

CAROLINE BENITES TEIXEIRA

**SCREENING DE PLANTAS PRESENTES NO PANTANAL SUL-MATO-
GROSSENSE FUNDAMENTADO NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

CAMPO GRANDE
2014

CAROLINE BENITES TEIXEIRA

**SCREENING DE PLANTAS PRESENTES NO PANTANAL SUL-MATO-
GROSSENSE FUNDAMENTADO NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia DA Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros

CAMPO GRANDE
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINE BENITES TEIXEIRA

SCREENING DE PLANTAS PRESENTES NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE FUNDAMENTADO NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros

Resultado_____

Campo Grande (MS),_____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros
Instituição: UFMS

Prof^a. Dr^a. Ana Paula da Costa Marques
Instituição: UFMS

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Fernandes Fitts
Instituição: UFMS

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros, pela confiança, amizade, orientação, compreensão em todos os momentos em que precisei.

À Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Fernandes Fitts, pela paciência, disponibilidade, orientação, dedicação, amizade, afeto, coragem, incentivo, compreensão. Palavras são pouco para expressar o meu agradecimento. Quando o desespero tomou conta e as adversidades pareciam impedir o desfecho desta história, a senhora surgiu e criou condições para que todo o trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, pelas orientações, por fornecer a droga vegetal e disponibilizar o laboratório de Farmacognosia para confecção dos extratos.

À equipe de professores do laboratório de Bioquímica que disponibilizaram equipamentos do laboratório para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos alunos de graduação Igor Otero, Julia e ao aluno de mestrado Daniel Demarque, pelo apoio, auxílio e conselhos durante a execução laboratorial da pesquisa.

Às técnicas Rosiane e Joslaine do laboratório de Microbiologia; Amanda do laboratório de Farmacognosia; Michelle e Clarice do laboratório de Bioquímica, pelo auxílio e orientação no laboratório.

À minha família pela compreensão, incentivo, esforço e apoio.

A Deus, por enviar pessoas especiais que me ajudaram a realizar este sonho.

Não poderia esquecer de todas estas pessoas que dedicaram um tempo de suas vidas, uma hora do seu dia para contribuir para que este trabalho se concretiza-se. Quantas histórias marcaram estes dois anos, momentos de tensão, dificuldade, tristeza, superação, companheirismo e alegrias. Agradeço imensamente a todos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

Teixeira CB. **Screening de plantas presentes no pantanal sul-mato-grossense fundamentado na atividade antimicrobiana.** Campo Grande; 2014. [Dissertação] – Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Diversos estudos demonstraram atividade antimicrobiana de extratos de plantas com potencial para o desenvolvimento de produtos terapêuticos. Diante da necessidade de ampliar a disponibilidade de agentes antimicrobianos para combate e prevenção da cárie dentária, foi desenvolvida a presente pesquisa visando explorar a biodiversidade do Pantanal e estudar a atividade antimicrobiana de plantas para aplicação na odontologia. A partir da seleção de 12 plantas que estão inseridas no bioma do Pantanal foi testado a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e das frações da planta de maior atividade frente à estreptococos cariogênicos e da microbiota bucal. Foi utilizado o método da microdiluição em caldo que fornece a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos testados nas concentrações que variaram de 15,6 a 1000 µg/mL. A clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo e a leitura da CMI foi realizada, após 24 horas de incubação, pelo método visual e posterior confirmação com resazurina. Os ensaios foram realizados em triplicata. A Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi obtida pela inoculação, em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), das suspensões dos poços das placas de CMI, que não apresentaram crescimento bacteriano pela leitura visual. A menor concentração do extrato que impediu o crescimento bacteriano após 48 horas de incubação, foi considerada a CMB. *Ipomoea alba* foi a planta que obteve melhor desempenho dentre as 12 plantas selecionadas para o estudo. O extrato bruto apresentou atividade bactericida e bacteriostática diante de todos os estreptococos testados. Foi constatada CMI de 31,2 µg/mL para todos estreptococos exceto *S. gordonii* que foi 15,6 µg/mL. O valor da CMB foi de 125 µg/mL para *S. mutans*, 62,5 µg/mL para *S. sanguinis*, 31,2 µg/mL para *S. oralis* e *S. gordonii*. O extrato bruto de *Ipomoea alba*, apresentou menor valor de CMI quando comparado com as frações testadas para o *S. mutans*. Os extratos brutos de *Ipomoea chiliantha*, *Cassia grandis*, *Coutarea hexandra*, *Vitex cymosa* não demonstraram atividade antimicrobiana para nenhum dos micro-organismos testados. Os demais extratos, *Eclipta prostrata*, *Echinodorus grandiflorus*, *Senna obtusifolia*, *Zanthoxylum rigidum*, *Triplaris gardneriana*, *Anadenanthera colubrina*, *Tabebuia impetiginosa* apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos um tipo de estreptococo testado. De acordo com os resultados do presente estudo, a *Ipomoea alba* pode ser considerada uma planta promissora para a realização de estudos futuros com a finalidade de desenvolvimento de produtos antimicrobianos que possam ser utilizados no controle e prevenção da cárie dentária.

Palavras-chave: extratos vegetais; metabólitos secundários; antimicrobianos.

ABSTRACT

Teixeira CB. **Screening of wetland plants of the antimicrobial activity sul mato grossense reasoned.** Campo Grande; 2014. [Dissertação] – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Several studies shown the antimicrobial activity of plants extracts with potential to development of therapeutic products. In face of the need to enlarge the availability of antimicrobial agents to fight and prevent the dental caries, this work was developed in order to explore the biodiversity of Pantanal and verify the antimicrobial activity of plants and its applicability on odontology. From the selection of 12 plants of Pantanal biome tested the antimicrobial activity of their raw extracts and the fractions of the plant with superior activity front of the streptococcus cariogenic and of microbiote buccal. It was used the method of *microdilution* that provides the minimum inhibitory concentration (MIC) of the tested extracts in the concentrations that vary from 15,6 to 1000 µg/mL. chlorhexidine 0,12% was used as a positive control and the MIC reading was done, after 24 hours of incubation, by the visual method and verified with the resazurin method. The test were performed in triplicates. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was obtained by inoculation, in agar Brain Heart Infusion (BHI), of the suspension of the wells of the plates MIC, of the not wells in which no bacterial growth was visually observed. The less concentration of the extract that stopped the bacterial growth after 48h of incubation was considered the MBC. The *Ipomoea alba* was the plant with best performance among 12 plants selected in the study. Its raw extract shown bactericide and bacteriostatic activities in face of all tested species of streptococcus. It was observed the MIC of 31,2 µg/mL on all tested streptococcus, except the *S. gordonii* that was 15,6 µg/mL. The MBC was 125 µg/mL for *S. mutans*, 62,5 µg/mL for *S. sanguinis*, and 31,2 µg/mL for *S. oralis* and *S. gordonii*. The raw extract of *Ipomoea alba* shown fewer MIC values when compared to its tested fractions for *S. mutans*. The raw extracts of *Ipomoea chiliantha*, *Cassia grandis*, *Coutarea hexandra*, and *Vitex cymosa* have not presented antimicrobiotic activity for any tested microorganisms. The remaining extracts, *Eclipta prostrata*, *Echinodorus grandiflorus*, *Senna obtusifolia*, *Zanthoxylum rigidum*, *Triplaris gardneriana*, *Anadenanthera colubrina*, and *Tabebuia impetiginosa* have presented antimicrobiotic activity for, at least, one tested specie of streptococcus. According to the results obtained in this study, the *Ipomoea alba* can be regarded as a promising plant to future works in order to develop antimicrobiotic products for preventing and control of dental caries.

Keywords: plant extracts; secondary metabolites; antibiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de distribuição dos extratos na microplaca.....	33
Figura 2 – Fluxograma metodológico.....	35
Figura 3 – Distribuição dos materiais na coluna.....	36
Figura 4 – Fluxograma de confecção da fração alcaloidica.....	37
Figura 5 – Microplaca contendo extrato bruto de <i>Ipomoea alba</i> utilizada para o teste de CMI frente ao <i>Streptococcus mutans</i>	41
Figura 6 – Representação dos resultados dos testes de Sonneschein e Dragen - dorff.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores da CMI de plantas frente aos <i>S. mutans</i> segundo a literatura...	26
Quadro 2 – Espécies selecionadas para o estudo.....	29
Quadro 3 – Esquema de distribuição dos materiais de acordo com as linhas e as colunas para os testes de alcaloides.....	38
Quadro 4 – Valores de CMI e de CMB ($\mu\text{g/mL}$) para as plantas estudadas em relação aos estreptococos orais.....	40
Quadro 5 – Valores de CMI e CMB das frações de <i>Ipomoea alba</i> , segundo cada estreptococo, em $\mu\text{g/mL}$	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASE	<i>Accelerated Solvent Extractor</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BEPan	Banco de Extratos do Pantanal
BHI	Brain Heart Infusion
CMB	Concentração mínimabactericida
CMI	Concentração mínimainibitória
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>S.gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S.oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S.salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S.sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
CCD	Cromatografia em camada fina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Km ²	quilômetro quadrado
P.A	Pró-análise

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1	Plantas medicinais.....	13
2.2	Pantanal sul-mato-grossense.....	14
2.2.1	<i>Ipomoea alba</i>	14
2.2.2	<i>Ipomoea chiliantha</i>	15
2.2.3	<i>Echinodorus grandiflorus</i>	16
2.2.4	<i>Zanthoxylum rigidum</i>	16
2.2.5	<i>Anadenanthera colubrina</i>	17
2.2.6	<i>Cassia grandis</i>	17
2.2.7	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	18
2.2.8	<i>Coutarea hexandra</i>	19
2.2.9	<i>Triplaris gardneriana</i>	19
2.2.10	<i>Vitex cymosa</i>	20
2.2.11	<i>Senna obtusifolia</i>	20
2.2.12	<i>Eclipta prostrata</i>	21
2.3	Propriedades biológicas das plantas.....	21
2.4	Uso de antimicrobianos na Odontologia.....	23
2.5	Antimicrobianos para controle e prevenção da cárie dentária.....	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivo específico.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODO.....	28
4.1	Seleção e identificação do material vegetal.....	28
4.2	Delineamento do estudo.....	30
4.3	Preparo do extrato.....	30
4.4	Preparo das culturas de estoque de bactérias.....	31
4.5	Preparo e diluição das soluções dos extratos.....	31
4.6	Preparo do inóculo (NCCLS, 2003).....	31
4.7	Preparo das microplacas.....	32
4.8	Concentração mínima inibitória (CMI).....	34

4.9	Concentração mínima bactericida (CMB).....	34
4.10	Extração das partições do extrato bruto de <i>Ipomoea alba</i>.....	35
4.11	Obtenção de fração alcaloidica.....	36
4.12	Teste de detecção de alcaloides.....	37
5	RESULTADOS.....	39
6	DISCUSSÃO.....	44
7	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido estudadas e utilizadas como matéria prima para a fabricação de produtos com finalidades terapêuticas ao longo da história da humanidade. Os avanços tecnológicos possibilitaram o desenvolvimento de métodos capazes de isolar e identificar compostos químicos biologicamente ativos a partir de extratos obtidos de diferentes partes das plantas. Esses compostos podem apresentar propriedades diversas, dentre elas, a atividade antimicrobiana (MACIEL et al., 2002; NAMITA; MUKESH, 2012).

Pesquisas com plantas para investigação de propriedades antimicrobianas merecem destaque em função da grande disponibilidade de matéria prima, variabilidade de compostos químicos, baixo custo e possibilidade de superar o espectro de atividade antimicrobiana dos fármacos existentes (NASCIMENTO et al., 2000; FLOGLIO et al., 2006; ALMEIDA; SCHEFFER, 2012).

Os antimicrobianos atuam como coadjuvantes no combate das infecções que acometem a cavidade oral, e dentre elas, está incluída a cárie dentária (BAELUM; FEJERSKOV, 2007; MENDES et al., 2008). De acordo com a epidemiologia da doença, houve um declínio expressivo na prevalência durante o final do século XX e início do século XXI (NARVAI et al., 2006). Entretanto, a cárie dentária ainda é considerada um problema de saúde pública e a causa primária de dor e perda de dentes em todas as partes do mundo (JURIC, 2013). No entanto, essa situação é mais evidente em países em desenvolvimento, onde a assistência odontológica é limitada e os mecanismos de controle e prevenção são insuficientes para minimizar os efeitos deletérios da doença. Apesar do declínio na prevalência, atribuído principalmente ao maior acesso à água e dentifrícios fluoretados, a elaboração de estratégias, com embasamento na etiologia microbiana e caráter multifatorial da doença, pode significar um grande avanço para se alcançar o controle efetivo da doença (BAGRAMIAN et al., 2009; RUGG-GUNN, 2013).

Em relação ao caráter multifatorial da cárie dentária, é importante destacar o papel de micro-organismos como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* e outros membros da microbiota normal que também podem contribuir com o processo de doença (KUTSCH; YOUNG, 2011). A organização dessas bactérias na forma de biofilme acentua a complexidade da interação microbiana e da participação de cada

micro-organismo na instalação e desenvolvimento da cárie (MARSH, 2010).

O controle do biofilme dental é de fundamental importância para a manutenção da saúde bucal e pode ser realizado por meio de procedimentos mecânicos e químicos. A utilização de agentes antimicrobianos no controle químico complementa a higienização bucal, auxiliando na profilaxia e tratamento, não somente da cárie dental, mas também da doença periodontal e da halitose (NARVAI et al., 2006; MOREIRA et al., 2008; MARSH, 2010).

A clorexidina é considerada o agente antimicrobiano de referência no controle químico do biofilme dental (NOIRI et al., 2003; MATHUR et al., 2011). Trata-se de um composto sintético, utilizado na forma de digluconato. Apresenta amplo espectro contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (TWETMAN, 2010). De importância para o tratamento e controle da cárie dental, destaca-se por interferir na adesão bacteriana e substantividade que mantêm o produto disponível por aproximadamente 12 horas (MATHUR et al., 2011).

Apesar dos seus benefícios, o uso da clorexidina é limitado pelo número de efeitos adversos que causa. Dentre esses, destacam-se a perda temporária da capacidade gustativa (MOREIRA et al., 2008), manchamento de dentes, restaurações, língua e próteses; tumefações nos lábios e na glândula parótida; descamações na mucosa oral; dispnéia; anafilaxia e urticária (CIANCIO, 1995; MATHUR et al., 2011).

Dessa forma, a busca de novos agentes antimicrobianos surge como uma necessidade para ampliar as opções do mercado farmacêutico. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de 12 espécies de plantas presentes no Pantanal Sul-mato-grossense sobre o crescimento e a viabilidade de bactérias da microbiota bucal, contribuindo com a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos que possam ampliar as opções terapêuticas.

2 REVISÃO DALITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Há milhares de anos, as plantas foram inseridas no contexto da humanidade para uso na alimentação, arborização, obtenção de remédios, cosméticos, perfumes e venenos. Como agentes terapêuticos, as plantas têm sido empregadas para o tratamento de diversas enfermidades, ainda que empiricamente e fundamentado apenas na observação (FLOGLIO et al., 2006). Propriedades como ação anti-inflamatória geral e sobre a mucosa oral já foram relatadas pela medicina popular, além da ação antipirética, analgésica, antimicrobiana, anticancerígena e hepatoprotetora (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; BHATTARAI et al., 2006; GROppo et al., 2008; JAIN et al., 2011; NAMITA; MUKESH, 2012). Sustentando essas observações, pesquisadores vêm comprovando, cientificamente, a existência de substâncias biologicamente ativas presentes em diferentes partes das plantas (KUETE, 2010; LIMA et al., 2011).

Com referência na atividade antimicrobiana, as plantas têm recebido atenção especial em função da emergência disseminada de resistência bacteriana aos antimicrobianos tradicionais (NASCIMENTO et al., 2000). O uso de plantas pode representar uma solução para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que propriedades antimicrobianas já foram reconhecidas empiricamente há séculos (VERMA; SINGH, 2008). Extratos brutos e constituintes químicos isolados de plantas têm sido alvos de estudos com modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Tais estudos já comprovaram a ação contra micro-organismos envolvidos na etiologia de importantes doenças infecciosas (INDU et al., 2006; GORDIEN et al., 2009; PANKAJ et al., 2011).

Estudos para a utilização de plantas medicinais como meio de tratamento ou prevenção de doenças infecciosas são realizados em muitas áreas do globo e são influenciadas pelas características culturais, condições climáticas e do solo, pela disponibilidade e pela biodiversidade da região. Segundo Gobbo-Neto e Lopes, (2007), a quantidade de compostos químicos biologicamente ativos presentes nas plantas não é constante ao longo do ano e pode ser influenciada pelas alterações sazonais. Além disso, a temperatura, umidade e qualidade de nutrientes no solo

também podem alterar a quantidade e o tipo de metabólito presente. Dessa maneira, a caracterização de um composto químico e de sua atividade biológica dependem da região geográfica onde a planta foi cultivada.

2.2 Pantanal sul-mato-grossense

A região do Pantanal é uma planície inundada pela bacia do Alto Paraguai e representa um dos ecossistemas do Brasil. Dentro do território brasileiro, abrange os estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, cuja extensão é de aproximadamente de 138.183 Km², ao qual 48.865 km² (35,36%) está inserido no Mato Grosso e 89.318 km² (64,64%) no Mato Grosso do Sul (SILVA; ABDON, 1998). Em relação ao clima, é predominante tropical com períodos de seca no inverno, e chuva no verão (MARCUIZZO et al., 2010). Sua vegetação é composta por quatro regiões fitoecológicas que são Mata Decídua, Mata Semidecídua, Cerrado e Chaco. As características climáticas e do solo possibilitaram grande biodiversidade na flora da região (SILVA et al., 2007).

As plantas *Ipomoea alba*, *Ipomoea chiliantha*, *Echinodorus grandiflorus*, *Zanthoxylum rigidum*, *Anadenanthera colubrina*, *Cassia grandis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Coutarea hexandra*, *Triplaris gardneriana*, *Vitex cymosa*, *Senna obtusifolia* e *Eclipta prostrata*; são plantas que compõem a flora pantaneira. Por estarem inseridas em famílias e gêneros que apresentam compostos biologicamente ativos, com propriedade antimicrobiana comprovada, podem ser promissoras para o estudo da atividade contra estreptococos da microbiota bucal (SOUZA et al., 2004; CORDEIRO et al., 2006; FERREIRA et al., 2006; MOCCELINI et al., 2009; LUCAS et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2011).

2.2.1 *Ipomoea alba*

A *Ipomoea alba*, conhecida como dama-da-noite, pertence a família convolvulaceae; é uma espécie de floração noturna, nativa das regiões tropicais e subtropicais da América. No Brasil, encontra-se em todas as regiões. Quanto ao domínio fitogeográfico, pertence às vegetações da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata atlântica e Pantanal (BIANCHINI; FERREIRA, 2010). Já foram isolados alcaloides da espécie a partir das sementes (GOURLEY et al., 1969) e relatada

atividade antimicrobiana dos extratos clorofórmico e etanólico das partes aéreas de *I. alba* sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes* e *Bacillus cereus* (LUCAS et al., 2010).

Castilho et al., em 2013, testaram a ação antimicrobiana de 25 extratos de plantas sob *Enterococcus faecalis*. Dentre os extratos metanólicos ativos, a espécie *Ipomoea alba* apresentou excelentes resultados. Foram isolados compostos e identificados como possíveis triterpenos, e os valores de CMI e CMB foram iguais e correspondentes a 0,04mg/mL.

Barrella et al., em 2012, avaliaram a ação do extrato de *Ipomoea alba* sobre a doença periodontal e presença de toxicidade em ratos. O estudo foi realizado por meio da análise de perda óssea por fotografia padronizada. A perda óssea foi mensurada pela distância do cimento à crista óssea. O ensaio de toxicidade aguda, foi realizado pela aplicação intraperitoneal de diferentes doses do extrato e posterior observação da presença de reações tóxicas. Os resultados demonstraram que o extrato não apresentou nenhum efeito na redução da perda óssea, e quanto aos testes de toxicidade aguda, demonstraram ausência de toxicidade para o sistema nervoso central, autônomo, psicomotor e sensorial.

2.2.2 *Ipomoea chiliantha*

O Cipó-de-leite (*Ipomoea chiliantha*) pertence à família convolvulaceae. Não possui descrição literária sobre domínio fitogeográfico da espécie e são escassos estudos sobre a atividade biológica da mesma. Existem investigações mostrando propriedades antibacterianas de outras espécies do mesmo gênero como na *Ipomoea cairica* (FERREIRA et al., 2006) e *Ipomoea stans* além da *Ipomoea alba* relatada anteriormente (REYNOLDS et al., 1995). Existem ainda estudos demonstrando propriedades antifúngicas (GOUN et al., 2003) e anti-inflamatórias na *Ipomoea imperati* (PAULA et al., 2003).

No trabalho apresentado por Ferreira et al. (2011), sobre compostos químicos de partes aéreas de *Ipomoea chiliantha*, foram identificados a presença de 18 substâncias, dentre elas flavonoides, esteroides, triterpenos, derivados do ácido cafeico e ácido p-cumárico esterificados.

2.2.3 *Echinodorus grandiflorus*

Echinodorus grandiflorus, popularmente conhecida como aguapé, entre outras denominações, trata-se de um subarbusto aquático que pode atingir 1-2 metros de altura. Encontrada em vegetações de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, geograficamente está distribuída entre o nordeste, centro-oeste, sul e sudeste do Brasil (BRASIL, 2010a). Essa espécie de planta tem despertado o interesse de pesquisadores por apresentar substâncias bioativas da classe dos flavonoides (GARCIA et al., 2010) e taninos (JOAQUIM et al., 2008). Inúmeras propriedades já foram relatadas na literatura para os extratos dessa espécie de planta, dentre elas: analgésica, anti-inflamatória (DUTRA et al., 2006), anti-hipertensiva (LESSA et al., 2008) e antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (SOUZA et al., 2004).

Entretanto, não há registros sobre estudos que relacionem a atividade antimicrobiana da planta referenciada frente à linhagem de estreptococos incluídos no presente estudo.

2.2.4 *Zanthoxylum rigidum*

A espécie *Zanthoxylum rigidum* pertence aos biomas do cerrado e do pantanal; está distribuída pelo centro-oeste e sudeste do país (PIRANI, 2011). Moccelini et al. (2009) estudaram a fitoquímica das raízes de *Zanthoxylum rigidum* e identificaram compostos químicos como o triterpeno lupeol, os esteroides campesterol, estigmasterol e sitosterol, a sacarose, o flavonoide hesperidina e os alcaloides *N*-metilatanina e 6-acetonildiidroqueleritrina.

Não há relatos sobre atividades biológicas para essa espécie. Quanto ao gênero *Zanthoxylum*, já foram atribuídas diversas propriedades como antiplasmódica, anti-inflamatória, antimicrobiana (VILLAMIZAR et al., 2011), antitumoral, fungicida e citotóxica (ADESINA, 2005).

Um estudo sobre a atividade antibacteriana de 21 substâncias isoladas de duas espécies do gênero *Zanthoxylum* (*Z. monophyllum*, *Z. quinduense*) comprovou que 11, das 21 substâncias naturais avaliadas, causaram inibição do crescimento bacteriano. Foram testadas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e

Enterococcus faecalis) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) (LADINO et al., 2011).

2.2.5 *Anadenanthera colubrina*

A *Anadenanthera colubrina* é uma espécie arbórea encontrada principalmente em regiões de caatinga, porém, também está presente no Cerrado, Mata Atlântica e no Pantanal. É uma planta que possui capacidade de adaptação fisiológica a diferentes ambientes (POTT et al., 2009; BRASIL, 2010b).

No Brasil, concentra-se nas regiões nordeste, centro-oeste, sul e sudeste. É usada na arborização de pastos, confecção de tacos, ripas, embalagens, lenha e carvão (MORIM, 2014). Apresenta ação antioxidante, antiproliferativa (MELO et al., 2010), anti-inflamatória (SANTOS et al., 2013) e antimicrobiana (MORS et al., 2000), além da presença de taninos, que contribuem para atividade antioxidante (MELO et al., 2010).

No estudo realizado por Gonçalves et al. (2005), foi avaliado a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de 43 espécies de árvores, dentre elas *Anadenanthera colubrina*. As bactérias estudadas foram *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus* spp coagulase-negativa. O extrato hidroalcoólico *Anadenanthera colubrina* não apresentou atividade antimicrobiana para nenhuma das espécies testadas.

2.2.6 *Cassia grandis*

Cassia grandis, popularmente conhecida como cássia-rosa, pertence à família fabaceae, típica de regiões tropicais e subtropicais. É considerada árvore de grande porte, de 15 a 20 metros de altura, empregada na arborização urbana. Típica de vegetações de Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Amazônia, sendo encontrada no norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil (POTT et al., 2009; SOUZA; BORTOLUZZI, 2012).

Para a espécie, já foram relatadas propriedades biológicas como anti-anêmicas (CAPÓ et al., 2004), contra afecções cutâneas (MACEDO; FERREIRA, 2004), e hipoglicemiante (KOLI et al., 2010).

A partir de plantas do gênero *Cassia*, já foram isolados alcaloides (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004), o que motivou a investigação da atividade antimicrobiana para a espécie.

Segundo Siqueira et al. (2011), as folhas da *Cassia grandis* apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e bactérias álcool-ácido-resistentes, exceto para leveduras. Ainda não há relatos na literatura sobre a atividade dessa espécie contra estreptococos orais.

2.2.7 *Tabebuia impetiginosa*

A *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo) é uma árvore característica da mata latifoliada do Pantanal e do Cerrado. Pertence a família Bignoniaceae e adapta-se bem aos solos com textura arenosa, úmidos e com boa drenagem, sendo típica da região centro-oeste (CARVALHO, 1994).

O principal composto biologicamente ativo é o lapachol (MELO et al., 2011; GOMEZ et al., 2009), mas ainda existem outros compostos importantes como os flavonoides (CORDEIRO et al., 2006).

A casca de *Tabebuia impetiginosa*, apresenta atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* e sobre outras bactérias intestinais de humanos (PARK et al., 2006).

Cordeiro et al. (2006) estudaram a atividade antimicrobiana de uma mistura de extratos hidroalcoólicos de *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major*, *Tabebuia impetiginosa*, *Achillea millefolium* e *Nasturtium officinale*, com a finalidade de desenvolver um enxaguatório bucal voltado para terapêutica de doenças periodontais. Os resultados demonstraram inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, pela combinação dos extratos.

2.2.8 *Coutarea hexandra*

A *Coutarea hexandra* é uma árvore baixa de tronco tortuoso e copa globosa. Nativa do Brasil está presente em todas as regiões e nas vegetações da Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal (BARBOSA, 2013).

Explorada por sua ação medicinal, é anti-inflamatória e anti-nociceptiva (LUCENA et al., 2006). No estudo de Santos et al. (2010), o extrato etanólico de *Coutarea hexandra* apresentou substâncias ativas para bactérias gram-positivas e levedura. Entretanto, o extrato não apresentou atividade antimicrobiana para todos os micro-organismos gram-negativos testados. Nunes et al. (2012) identificaram alto teor de flavonoides no extrato da casca dessa espécie.

2.2.9 *Triplaris gardneriana*

A *Triplaris gardneriana*, conhecida como pajaú, pertence à família polygonaceae, típica da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. No Brasil, está distribuída entre as regiões nordeste, centro-oeste, sul e sudeste (MELO, 2010).

Até o momento, não há estudos sobre atividade biológica e constituintes químicos dessa espécie. No entanto, flavonoides e taninos já foram isolados de outras espécies do mesmo gênero, sugerindo que essa espécie possa apresentar compostos promissores biologicamente ativos (CAMONES et al., 2010).

Roque et al. (2010) realizaram um estudo etnobotânico sobre plantas medicinais utilizadas por especialistas locais da comunidade rural de Laginhas no município de Caicó-Rio Grande do Norte. O objetivo do estudo foi identificar o potencial medicinal e características botânicas das plantas utilizadas na região; dentre as plantas utilizadas, estava a *Triplaris gardneriana*, que segundo o estudo, é conhecida pela população por sua efetiva ação contra gastrite e úlcera, e utilizada na forma de xarope ou infusão da casca.

2.2.10 *Vitex cymosa*

Essa espécie ocorre na região centro-oeste e no sul da Amazônia; seus frutos são comestíveis e apresentam propriedades medicinais. Pertence aos biomas da Amazônia e do Cerrado (POTT et al., 2009).

Conhecida popularmente como tarumã, sua árvore pode chegar a 20 metros de altura (LEITÃO et al., 2011). Santos et al. (2001) extraíram da fração diclorometânica das folhas de *V. cymosa*, um composto químico da classe iridoide. Leitão et al. (2011) isolaram flavonoides e triterpenos. Além da atividade antinociceptiva, a espécie é tradicionalmente usada no tratamento de artrite e como inseticida (OLIVEIRA et al., 2012).

2.2.11 *Senna obtusifolia*

Senna obtusifolia popularmente conhecida como fedegoso, mede cerca de 70-160 centímetros de altura, possui vagens e as folhas são alternadas com poucas flores de coloração amarela. Essa planta é frequentemente encontrada no meio de pastagens e de lavouras de soja (LORENZI, 1982). É típica dos biomas da Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica e Pantanal (SOUZA; BORTOLUZZI, 2011).

Rodrigues et al. (2011) realizaram um estudo no qual foi demonstrado propriedade antioxidante e atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* partir do extrato etanólico do caule e da folha de *Senna obtusifolia*. Para o extrato obtido a partir do caule, tanto a propriedade antioxidante quanto a atividade antimicrobiana superaram o extrato obtido com a folha.

Doughari et al. (2008) testaram as propriedades antimicrobianas e antifúngicas de frações acetônicas, diclorometânicas, metanólicas e hexânicas do extrato das folhas de *Senna obtusifolia* contra bactérias e fungos. Concluíram que os extratos apresentaram amplo espectro de atividade contra micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*), bactérias Gram-negativas (*Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) e fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus tamari*, *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*).

2.2.12 *Eclipta prostrata*

Agrião-do-brejo como é conhecida a *Eclipta prostrata*, pertencente à família *Asteraceae*, é uma erva ereta de ambientes úmidos (TZONEV, 2007). Cosmopolita no Brasil (MONDIN, 2004). Seu uso medicinal é amplo, sendo conhecida por sua atividade anti-angiogênica, anti-cancerígena (LIRDPRAPAMONGKOL et al., 2008) e pela sua ação leishmanicida (KHANNA et al., 2009).

No estudo de Karthikumar et al. (2007), as frações de hexano, acetato de etila, etanol/água, obtidas das folhas de *Eclipta prostrata*, demonstraram ação antioxidante e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Já foram isolados alcaloides, taninos, saponinas, esteroides, terpenos e flavonoides dessa espécie de planta (DHANDAPANI; SABNA, 2008).

2.3 Propriedades biológicas das plantas

As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos químicos envolvidos nos processos metabólicos relacionados com a sobrevivência, preservação e defesa vegetal. Tais compostos são denominados de metabólitos secundários e podem apresentar diversas propriedades biológicas, além de desempenharem funções distintas para a planta (SANTOS, 2007).

Os metabólitos secundários são de grande interesse para o homem, uma vez que já foram comprovadas diversas propriedades biológicas como antiviral, anti-ulcerogênica, anti-neoplásica, antioxidante, hepatoprotetora, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiplaquetária e antifúngica (LIMA et al., 2006; MACHADO et al., 2008).

As classes de compostos químicos resultantes do metabolismo secundário das plantas, que apresentam propriedades antimicrobianas são: flavonoides (MACHADO et al., 2008), alcaloides (ASSIS et al., 2009), quinonas (FALKENBERG, 2007), taninos (MONTEIRO et al., 2005), cumarinas (LIU et al., 2008), terpenos (DAVINO et al., 1989) e óleos essenciais (LIMA et al., 2006).

Os flavonoides são produtos resultantes do metabolismo secundários das plantas pertencentes ao grupo químico da classe de polifenóis. Na planta

desempenham ação de proteção contra radiação solar e contra infecção por microorganismos fito-patogênicos. Além disso, os compostos químicos da classe dos flavonoides são responsáveis pelas cores das plantas, o que contribui para atração de polinizadores (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Quanto a suas ações terapêuticas, já foram descritas atividade antimicrobiana, anti-neoplásica, antioxidante e anti-inflamatória (MACHADO et al., 2008).

Já os alcaloides são compostos normalmente derivados de aminoácidos. Nas plantas, possuem função de proteção contra insetos e herbívoros, além de regular o crescimento. São terapêuticos naturais com ação anestésica, analgésica, psicoestimulantes, neurodepressores e antimicrobiana (HENRIQUES et al., 2007; ASSIS, 2009).

As quinonas são produtos da oxidação de fenóis obtidas a partir do lapachol. Atuam contra diversos quadros patológicos envolvendo processos inflamatórios, infecções por fungos, vírus e bactérias, além de apresentar potente ação laxativa e antitumoral (ANTUNES et al., 2006; ALMEIDA, 2009; CARDOSO et al., 2010).

Outra classe de compostos isolados a partir das plantas são os taninos. Essas substâncias fenólicas já apresentaram ação antibacteriana, fungicida (MELLO; SANTOS, 2001; MONTEIRO et al., 2005), anti-hipertensiva, anti-hemorragica, anti-inflamatória (LOGUERCIO, 2005; SANTOS; MELLO, 2007).

As cumarinas são conhecidas por suas propriedades antitrombóticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (LIU et al., 2008; SINGH et al., 2010; YANG, 2010). Os terpenos são biossintetizados a partir de unidades de acetato, além de antimicrobianos, apresentam atividade inseticida e leishmanicida (DAVINO, 1989; VIEGAS JÚNIOR, 2003; ARRUDA et al., 2005).

Os óleos essenciais são compostos voláteis exercem papel de proteção contra predadores, perda de água, aumento de temperatura, além de atraírem polinizadores (SANTOS, 2007). Apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica (ARAÚJO et al., 2004; LIMA et al., 2006).

Metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana já foram isolados a partir do gênero ou da espécie de todas plantas selecionadas para este estudo. Entretanto, não há registro da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida dos extratos das plantas selecionadas para as espécies estreptococos testadas.

2.4 Uso de antimicrobianos na Odontologia

Dentre as bactérias que compõe a microbiota bucal encontram-se os agentes etiológicos da cárie e da doença periodontal. Dessa forma, agentes antimicrobianos são empregados no controle e prevenção das principais doenças que acometem a cavidade oral. Produtos com atividade antimicrobiana servem de coadjuvantes da remoção mecânica do biofilme dental. São indicados principalmente para o controle da doença ativa e para pacientes desmotivados, hospitalizados ou que apresentem alguma deficiência física ou mental (MONFRIN; RIBEIRO, 2000; GEBRAN; GEBERT, 2002; ADDY, 2005).

Com relação à etiologia da cárie dental, os estreptococos se destacam como os principais responsáveis pelo início da lesão cariosa. Apresentam inúmeros fatores de virulência que justificam o seu papel na etiologia da doença (FLEMMING et al., 2010). Além do envolvimento com a cárie dental, os estreptococos estão entre os grupos mais numerosos de bactérias, sendo encontrados em todas as superfícies da cavidade oral (AVILA et al., 2009). Estudos demonstraram que a partir da colonização da cavidade bucal, os estreptococos podem ainda estar envolvidos na etiologia de outras doenças infecciosas como a endocardite bacteriana (DOUGLAS et al., 1993; PEREIRA et al., 2003; SALGADO et al., 2013), abscessos hepáticos (SCHIFF et al., 2003) e pneumonia em pacientes hospitalizados (MORAIS et al., 2006). Tais estudos reforçaram a importância da realização do controle da microbiota bucal para prevenção de doenças oportunistas.

Diversos produtos são utilizados na odontologia para o controle da microbiota bucal; dentre eles, está a clorexidina, que permanece como referência devido a potente atividade antimicrobiana e substantividade. Embora de amplo espectro, a clorexidina apresenta efeitos colaterais, o que constitui grande estímulo para a busca de novas substâncias com ação similar ou superior e livre de efeitos indesejáveis (ANDRADE et al., 2011).

Além da clorexidina, o triclosan é utilizado como antisséptico bucal. O estudo de Moreira et al. (2008) demonstraram que quando associado ao fluoreto, o triclosan apresenta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 115442, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, mas na forma isolada, apresentou eficácia e substantividade limitadas.

Outro produto conhecido é o Listerine, derivado de compostos fenólicos. Consiste em uma mistura de óleos essenciais: timol, mentol, eucaliptol e salicilato de metila. Apesar de sua ação antimicrobiana, tem uma baixa substantividade e apresenta efeitos colaterais como sensação de queimação na mucosa bucal (TORRES et al., 2000). Os compostos fluoretados também estão dentre as substâncias antissépticas por reduzirem a desmineralização e adesão microbiana aos tecidos dentais (RUGG-GUNN; BANOCZY, 2013).

Já as plantas vêm se destacando como fonte de recurso terapêutico para uso na odontologia, devido à presença de compostos biologicamente ativos. A sanguinarina é um composto extraído da planta *Sanguinaria canadensis*; esse composto químico é utilizado na composição de soluções e dentifrícios como agente antimicrobiano contra micro-organismos patogênicos bucais. Assim como a sanguinarina, o extrato de malva também é utilizado em bochechos, pois atuam em processos inflamatórios e são indicados no tratamento de aftas, gengivites, amidalites, faringites, estomatites e abscessos dentários (TORRES et al., 2000).

A utilização de antissépticos como substância de prevenção ou como coadjuvante no tratamento de infecções bucais de origem bacteriana é aceita pela maioria dos estudos, pois visa explorar os recursos disponíveis para complementar os métodos de tratamento e prevenção existentes, visando a devolução da saúde ao indivíduo (GUNSOLLEY, 2010; VILLORIA; COSTINHA, 2013).

2.5 Antimicrobianos para controle e prevenção da cárie dentária

Um fator de grande importância na etiologia da cárie dentária é a produção de ácidos pelas bactérias da boca, a partir da fermentação de carboidratos da dieta. Dentre as bactérias com potencial cariogênico, é provável que, além da participação dos *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos*, outros micro-organismos possam colaborar com o processo de instalação e desenvolvimento da doença. A cárie ocorre quando há alterações significativas no ambiente da cavidade oral que resultam no aumento da produção de ácidos e seleção de bactérias tolerantes à redução do pH no biofilme dental (GUO; SHI, 2013).

A partir da seleção de bactérias cariogênicas, caso não seja realizada nenhuma intervenção, ocorre a evolução da doença com a destruição do esmalte,

invasão da dentina, polpa e comprometimento dos tecidos de suporte, aumentando o risco de perda do elemento dentário (ANDERSON et al., 2010).

O tratamento da cárie consiste na remoção do tecido desmineralizado e posterior reconstrução da estrutura afetada, para reabilitar estética e funcionalmente o dente afetado. Porém, é importante ressaltar que o controle da doença em detrimento à reabilitação deve ser prioritário (LUAN et al., 2000).

Existem diversos métodos de prevenção da cárie, que vão desde a higienização mecânica com uso de escovas e fio dental, uso de colutórios, até métodos mais abrangentes à coletividade, como a fluoretação da água e do sal. Vale a pena destacar que todos os métodos de prevenção convergem para o controle do biofilme dental (TWETMAN, 2010).

Os compostos fluoretados sempre foram bastante divulgados como substância para prevenção da cárie. O flúor atua como fortalecedor do esmalte dental por ampliar a incorporação de minerais a esta estrutura, tornando-a mais resistente ao ataque ácido promovido por bactérias orais (TENUTA; CURY, 2005). Além disso, o flúor apresenta efeito antimicrobiano, porém, não impede a formação e nem promove a eliminação de biofilme (AMERICAN, 2010). Para que o fluoreto exerça ação direta sobre as bactérias cariogênicas, sua concentração deve exceder a encontrada no meio bucal, atingindo concentrações próximas as aplicadas por profissionais (TORRES, 2000).

O uso da clorexidina no controle químico do biofilme dental deve ser indicado com cautela para pacientes hipertensos, uma vez que, dentre os efeitos indesejáveis desse produto está à alteração na capacidade gustativa, o que pode induzir o consumo excessivo de sal por estes pacientes na busca de saciar a deficiente percepção do sal durante o tratamento com a clorexidina. Um estudo realizado em humanos constatou que a clorexidina pode diminuir em 80% a percepção da salinidade (BRESLIN; THARP, 2001).

Devido aos malefícios que podem ser desencadeados pelo uso prolongado da clorexidina, pesquisas foram desenvolvidas na busca por substâncias que possam substituí-la ou ampliar as opções de escolha no mercado farmacêutico. Os extratos de plantas se tornaram a matéria prima para essa finalidade. Assim, é possível encontrar estudos que testaram a atividade antimicrobiana de diferentes plantas sobre os *Streptococcus mutans*, utilizando a metodologia da microdiluição em caldo. O quadro 1 apresenta os resultados dos estudos que testaram a atividade

antimicrobiana de plantas sobre duas cepas diferente de *S. mutans* e com os valores de CMI, inclusive para a clorexidina.

Quadro 1 - Valores da CMI de plantas frente aos *S. mutans*.

S. mutans UA159	CMI µg/mL	Planta	Extrato	Referência
	1.600	<i>Zingiber officinalis</i>	Óleo Essencial	Froner et al., 2011
	400	<i>Lippia alba</i>	Óleo Essencial	Froner et al., 2011
	200	<i>Siparuna guianensis</i>	Óleo Essencial	Froner et al., 2011
	100	<i>Myrcia multiflora</i>	Óleo Essencial	Froner et al., 2011
	12,5-25	<i>Rheedia brasiliensis</i>	Extrato hexânico	Almeida et al., 2008
	0,63	Clorexidina		Liu et al., 2012
S. mutans ATCC 25175	6.250	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Tintura hidroalcoólica	Pinheiro et al., 2012
	6.250	<i>Calendula officinalis</i>	Tintura hidroalcoólica	Pinheiro et al., 2012
	6.250	<i>Mikania glomerata</i>	Tintura hidroalcoólica	Pinheiro et al., 2012
	>400	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Extrato hidroalcoólico	Soares et al., 2008
	12.500	<i>Anacardium occidentale</i>	Extrato hidroalcoólico	Melo et al., 2006
	3.125	<i>Shinus terebinthifolius</i>	Tintura	Freires et al., 2010
	7.810	<i>Solidago microglossa</i>	Tintura	Freires et al., 2010
	562,6	<i>Cymbopogon citratus</i>	Óleo essencial	Perazzo et al., 2012
	62,5	<i>Cudrania tricuspidata</i>	Extrato metanólico	Lee, 2013
	62,5	<i>Sophora flavescens</i>	Extrato metanólico	Lee, 2013
	62,5	<i>Ginkgo biloba</i>	Extrato metanólico	Lee, 2013
	31,25	<i>Betula schmidtii</i>	Extrato metanólico	Lee, 2013
	40	Clorexidina		Pinheiro et al., 2012

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Verificar a possibilidade de utilização de extratos brutos de plantas coletadas no Pantanal sul-mato-grossense no controle de estreptococos orais.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos das plantas *Ipomoea alba*, *Ipomoea chiliantha*, *Echinodorus grandiflorus*, *Zanthoxylum rigidum*, *Anadenanthera colubrina*, *Cassia grandis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Coutarea hexandra*, *Triplaris gardneriana*, *Vitex cymosa*, *Senna obtusifolia* e *Eclipta prostrata* em relação aos estreptococos da cavidade oral;

- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações do extrato com melhor atividade antimicrobiana frente aos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Seleção e identificação do material vegetal

A amostra foi constituída de 12 espécies de plantas selecionadas entre as 106 cadastradas no Banco de Extratos do Pantanal (BEPan) do Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). A seleção foi realizada de acordo com as características químicas e atividades biológicas das espécies, conforme relatos da literatura. Foram consideradas as espécies que apresentavam metabólitos secundários das seguintes classes: flavonoides (MACHADO et al., 2008), alcaloides (ASSIS et al., 2009), quinonas (FALKENBERG, 2007), taninos (MONTEIRO et al., 2005), cumarinas (LIU et al., 2008), terpenos (DAVINO et al., 1989) e óleos essenciais (LIMA et al., 2006). Ainda foram considerados os estudos realizados não somente com as espécies, mas também com espécies diferentes incluídas no mesmo gênero. As 12 espécies selecionadas estão apresentadas no quadro 2.

Quadro 2 - Espécies selecionadas para o estudo

Espécie	Família	Parte coletada	Coordenada	Período da coleta
<i>Ipomoea alba</i>	<i>Convolvulaceae</i>	PA	19°35'6"S 57°0'43"O	28/07/12
<i>Ipomoea chiliantha</i>	<i>Convolvulaceae</i>	PA/FO	19°35'49"S 57°2'10"O	11/03/12
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	<i>Alismataceae</i>	PA/FO	19°36'15"S 57°3'1"O	11/03/12
<i>Zanthoxylum rigidum</i>	<i>Rutaceae</i>	RF/FO	19°29'2"S 57°2'16"O	10/03/12
<i>Anadenanthera colubrina</i>	<i>Fabaceae</i>	CAS	19°40'13"S 57°0'20"O	27/07/12
<i>Cassia grandis</i>	<i>Fabaceae</i>	CAS	19°34'4"S 57°0'59"O	28/07/12
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	<i>Bignoniaceae</i>	CAS	19°40'12"S 57°0'20"O	27/07/12
<i>Coutarea hexandra</i>	<i>Rubiaceae</i>	CAS/RF/FO	19°40'11"S 57°0'20"O	27/07/12
<i>Triplaris gardneriana</i>	<i>Polygonaceae</i>	CAS	19°34'36"S 57°59'59"O	28/07/12
<i>Vitex cymosa</i>	<i>Verbenaceae</i>	RF/FO	19°29'2"S 57°2'16"O	10/03/12
<i>Senna obtusifolia</i>	<i>Leguminosae</i>	PA/FO/FL	19°34'9"S 57°1'10"O	10/03/12
<i>Eclipta prostrata</i>	<i>Asteraceae</i>	PA/FO	19°29'0"S 57°2'14"O	10/03/12

Nota: RF- ramo fino, PA- parte aérea (composta por folha, ramo fino e caule), FL- flor, FO- folha, CAS- casca.

As plantas foram coletadas principalmente em áreas úmidas da região do Pantanal sul-mato-grossense. As coletas e a identificação das espécies estocadas no banco de extratos foram realizadas pela equipe de pesquisadores do BEPan/CCBS/UFMS, no período de março a julho de 2012. Após as coletas, as

plantas foram desidratadas em temperatura ambiente e, posteriormente, trituradas por meio de moinho de facas para estocagem sob a forma de pó. O acondicionamento foi realizado em frascos de vidro hermeticamente fechados, protegidos da luz, da umidade e do calor. Também foi coletado material para confecção de exsicata e registro no Herbário do Departamento Botânico da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campo Grande, MS.

4.2 Delineamento do estudo

Estudo experimental, *in vitro*, no qual foi avaliado a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Ipomoea alba*, *Ipomoea chiliantha*, *Echinodorus grandiflorus*, *Zanthoxylum rigidum*, *Anadenanthera colubrina*, *Cassia grandis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Coutarea hexandra*, *Triplaris gardneriana*, *Vitex cymosa*, *Senna obtusifolia* e *Eclipta prostrata*. Os extratos foram testados contra as seguintes espécies de bacterianas: *Streptococcus mutans* UA159 e as bactérias padronizadas pela “*American Type Culture Collection*” (ATCC): *Streptococcus sanguinis* (ATCC) 10556, *Streptococcus oralis* (ATCC) 10557, *Streptococcus gordonii* (ATCC) 35105. As bactérias foram cedidas pelo Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP). A atividade antimicrobiana dos extratos foi estudada por meio do teste de microdiluição em caldo, que fornece a concentração mínima inibitória (CMI).

4.3 Preparo do extrato

Para o preparo de cada extrato, foi utilizado aproximadamente 30 gramas da droga vegetal seca. Após a pesagem, o pó triturado foi processado pelo extrator Dionex modelo ASE 150 (*Accelerated Solvent Extractor*), por meio de líquido pressurizado. O solvente utilizado na extração foi a mistura etanol/água na proporção de 7:3 (70% etanol P.A e 30% água MiliQ). O processo de extração foi realizado a temperatura de 100°C, em um ciclo automatizado de 5 minutos. O líquido resultante da extração, foi submetido à secagem para evaporação dos solventes. Esse procedimento foi realizado em capela de exaustão, sob temperatura ambiente,

durante aproximadamente sete dias. Após esse período o material foi acondicionado em frasco de vidro com tampa, previamente esterilizado. Os extratos foram mantidos a temperatura de -20°C até o início da realização dos testes.

4.4 Preparo das culturas de estoque de bactérias

Foram preparadas culturas puras de cada bactéria, em caldo BHI (Oxoid) com 18 horas de incubação, a 37°C , e 5% de CO_2 . Em seguida, foram distribuídas alíquotas de $300\mu\text{L}$ dessa cultura bacteriana em *ependorfs* que continham $300\mu\text{L}$ de BHI e 40% de glicerol, resultando em uma concentração final de 20% de glicerol e volume de $600\mu\text{L}$. Posteriormente, as alíquotas nos *ependorfs* foram estocadas a -20°C . Para a realização dos testes microbiológicos, foi utilizado uma alíquota bacteriana para cada teste.

4.5 Preparo das soluções dos extratos

De cada extrato, inicialmente foi preparada uma solução utilizando-se as seguintes proporções: $8000\mu\text{g}$ do extrato bruto, adicionado a mistura de $1820\mu\text{L}$ de água MiliQ e $180\mu\text{L}$ de etanol P.A. Essa solução foi distribuída segundo a ilustração da figura 1.

4.6 Preparo do inóculo (NCCLS, 2003)

Para o preparo do inóculo de cada bactéria, a cultura de estoque em glicerol a 20% foi descongelada em temperatura ambiente e uma alíquotas de $50\mu\text{L}$ foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI. Esse tubo foi incubado em jarras de anaerobiose com 5% de CO_2 , por 18 horas, a 37°C . Após 18 horas, essa cultura foi semeada em 4 placas contendo ágar BHI, seguindo a técnica do esgotamento para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas por 24 horas, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Decorrido às 24 horas, foram selecionadas 5 colônias isoladas, de tamanho uniforme, as quais foram transferidas para tubos com 5 mL de caldo BHI com auxílio de uma alça de platina. Essa cultura foi incubada por 18 horas em jarras de anaerobiose com 5% de CO_2 , a 37°C .

Passado o tempo de incubação foi realizada a leitura do crescimento bacteriano em espectrofotômetro (Uv Vis Metrolab, modelo 330) sob comprimento de onda de 625 nanômetros. A partir dessa leitura, a cultura foi diluída em caldo BHI para obter o valor de absorvância entre 0,08 a 0,1, o que corresponde a uma quantidade aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidade Formadora de colônia por mililitro) e comparado ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland (PROBAC).

Após a diluição e obtenção do valor de absorvância adequado, a cultura foi novamente submetida à diluição seriada decimal. Para essa diluição, 1mL da solução contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foi transferido para 9mL de BHI e a seguir esse procedimento foi realizado por mais uma vez para obtenção de uma concentração de bactérias de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. O inóculo foi finalizado adicionando-se 5 mL de caldo BHI a essa cultura o que resultou em uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

4.7 Preparo das microplacas

O teste de microdiluição em caldo foi realizado, utilizando-se microplacas estéreis de poliestireno com fundo chato e 96 poços. Os poços, encontram-se dispostos em colunas de 1 a 12 e linhas de A a H e possuem capacidade para 300 μ L de volume. Dessa forma foi obtida a seguinte concentração do extrato a serem testados: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 μ g/mL.

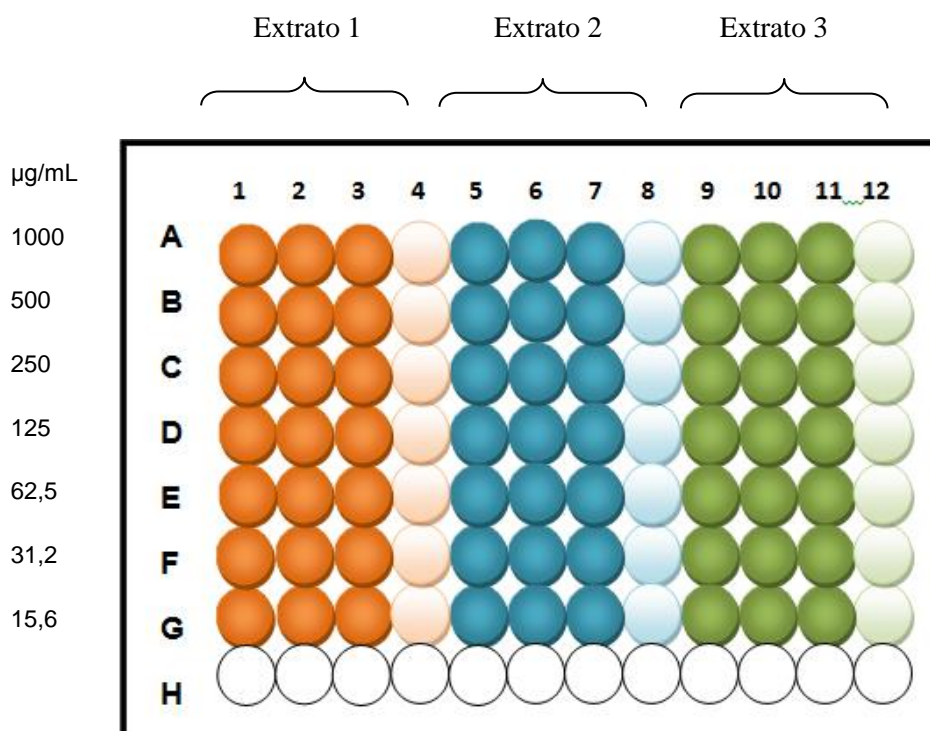
Em cada microplaca foi distribuído inicialmente 100 μ L de caldo BHI em todos os poços das colunas de 1 a 12 e das linhas de A a G. Na linha H foi distribuído 90 μ L de caldo BHI nas colunas 1, 2, 3, 7, 8 e 9; 100 μ L na colunas 4, 5 e 6, e 200 μ L nas colunas 10, 11 e 12 para a realização dos controles do teste.

A seguir foi distribuído 100 μ L da solução do extrato na linha A, nas colunas de 1 a 12, de modo que cada microplaca recebeu três extratos diferentes. Na sequência, foi realizada a diluição seriada do extrato transferindo-se 100 μ L de cada poço da linha A para a linha B e assim sucessivamente até a linha G, desprezando-se os 100 μ L finais.

Após, foi distribuído 100 μ L do inóculo nas linhas de A a G, porém, somente nas colunas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 e 11. As colunas 4, 8 e 12 foram utilizadas como controle de esterilidade do extrato, e para isso adicionou-se 100 μ L de caldo BHI estéril. Dessa forma, todos os poços apresentaram o volume final de 200 μ L e cada

concentração do extrato foi testada em triplicata. A figura 1 representa a distribuição dos extratos.

Figura 1- Esquema de distribuição dos extratos na microplaca



Nota: Os poços da linha H representam os controles do solvente, inóculo, clorexidina e do meio, respectivamente da esquerda para a direita.

Os poços da linha H foram todos utilizados como controles. As colunas de 1 a 3 foram controles do solvente. Para isso foi adicionado aos 90 µL de BHI, 10µL da solução etanol/água, mais 100 µL do inóculo para obtenção da concentração final de 9% de álcool. Nas colunas 4, 5, e 6 foi adicionado 100µL do inóculo aos 100µL de caldo BHI para controle do crescimento bacteriano. Nas colunas 7, 8, e 9 foi adicionado 100µL de inóculo aos 90µL de BHI mais 10 µL de clorexidina para obtenção da concentração final de 0,12 de clorexidina. Os poços 10, 11 e 12 foram utilizados como controle de esterilidade do meio de cultura e já foram preenchidos com 200µL de meio BHI estéril.

Após o preparo, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, durante 24 horas. Para maior confiabilidade dos resultados, os testes foram repetidos em três datas distintas.

4.8 Concentração mínima inibitória (CMI)

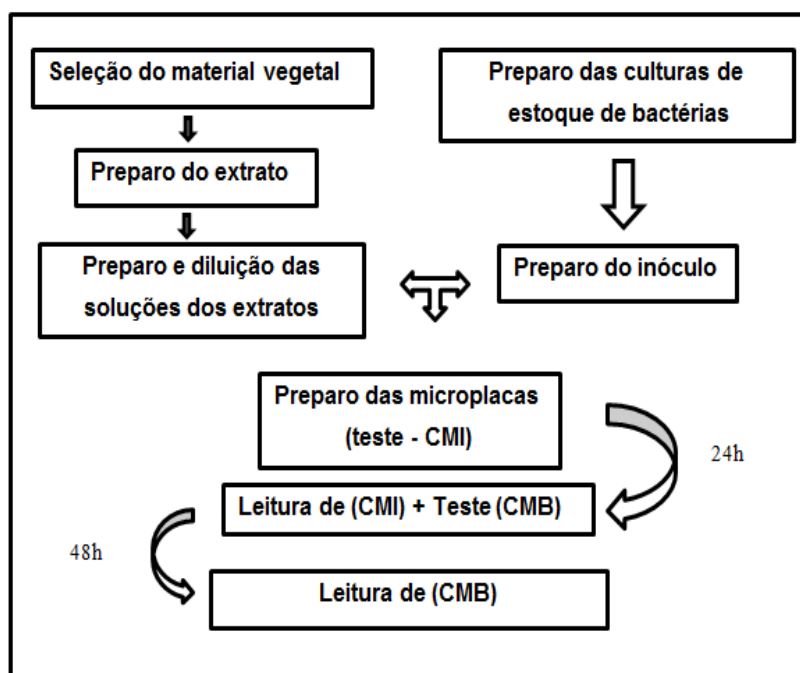
Após 24 horas de incubação das placas, foi realizada a leitura para determinação da concentração mínima inibitória de cada extrato. Após confirmada a leitura dos poços controles das colunas 4, 8 e 12 e da linha H, foi realizada a leitura visual de crescimento bacteriano em todos os poços que receberam o inóculo. Essa primeira leitura foi realizada pelo grau de turvação, comparando-se os poços que continham o extrato com os poços do controle de crescimento bacteriano. Para confirmar o grau de turvação referente ao crescimento bacteriano foi realizada também a comparação com a coluna de controle de esterilidade do extrato.

Após o registro da leitura visual foi retirada uma alíquota de 10µL de cada poço sem turvação para a realização do teste de Concentração Mínima Bactericida. A seguir, os resultados da CMI foram confirmados com a adição de 30 µL resazurina 0,01% em todos os poços da placa. Essa substância de coloração azul em contato com células bacterianas vivas oxida e altera a coloração do meio para vermelho. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada pela menor concentração do extrato que após a adição de resazurina manteve a coloração azul.

4.9 Concentração mínima bactericida (CMB)

A determinação da CMB foi realizada com 10µL retirados dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano pela leitura visual. Os 10µL retirados de cada poço foram semeados em placas de ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C, por 48 horas. Após esse período, foi realizada a leitura pela observação do crescimento bacteriano na superfície do ágar. A CMB foi considerada a menor concentração do extrato na qual não houve crescimento bacteriano, o que representa 99,9% de morte bacteriana. A figura 2 a seguir, representa o fluxograma resumido da metodologia.

Figura 2 - Fluxograma metodológico



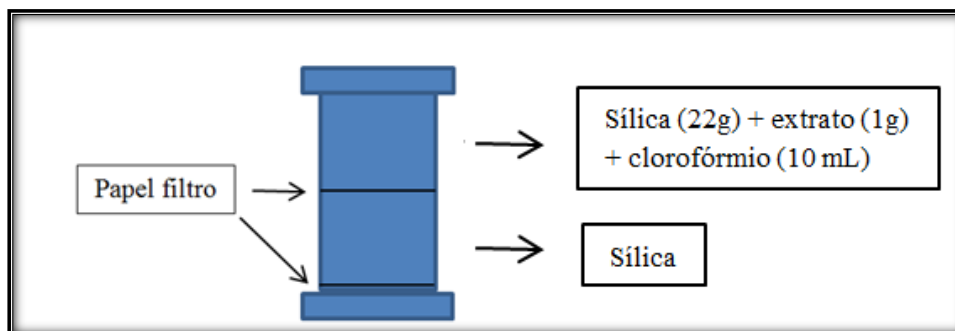
4.10 Extração das partições do extrato bruto de *Ipomoea alba*

O extrato bruto de *Ipomoea alba* foi submetido à partição em extrator de solvente acelerado ASE 150, Dionex. Para esse procedimento foram utilizados diferentes solventes seguindo uma ordem crescente de polaridade dos mesmos. Foram utilizados os seguintes solventes: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol/água (7:3).

Para o fracionamento foi preparada uma coluna que continha uma camada de 22 gramas de sílica (Aldrich 70-230 mesh), e uma camada da mistura de um grama do extrato bruto e 22 gramas de sílica (Aldrich 70-230 mesh) solubilizados com 10 mL de clorofórmio. Essas camadas foram separadas e preparadas sobre o papel filtro.

Após a montagem, na coluna foi inserida extrator para a realização do processo de extração seriada programando-se o aparelho para temperatura de 100°C, um ciclo estático de um minuto, 150% de lavagem, 100 segundos de purga. Para cada solvente, o processo de extração foi realizado duas vezes. A figura 3, representa a montagem da coluna.

Figura 3 - Distribuição dos materiais na coluna



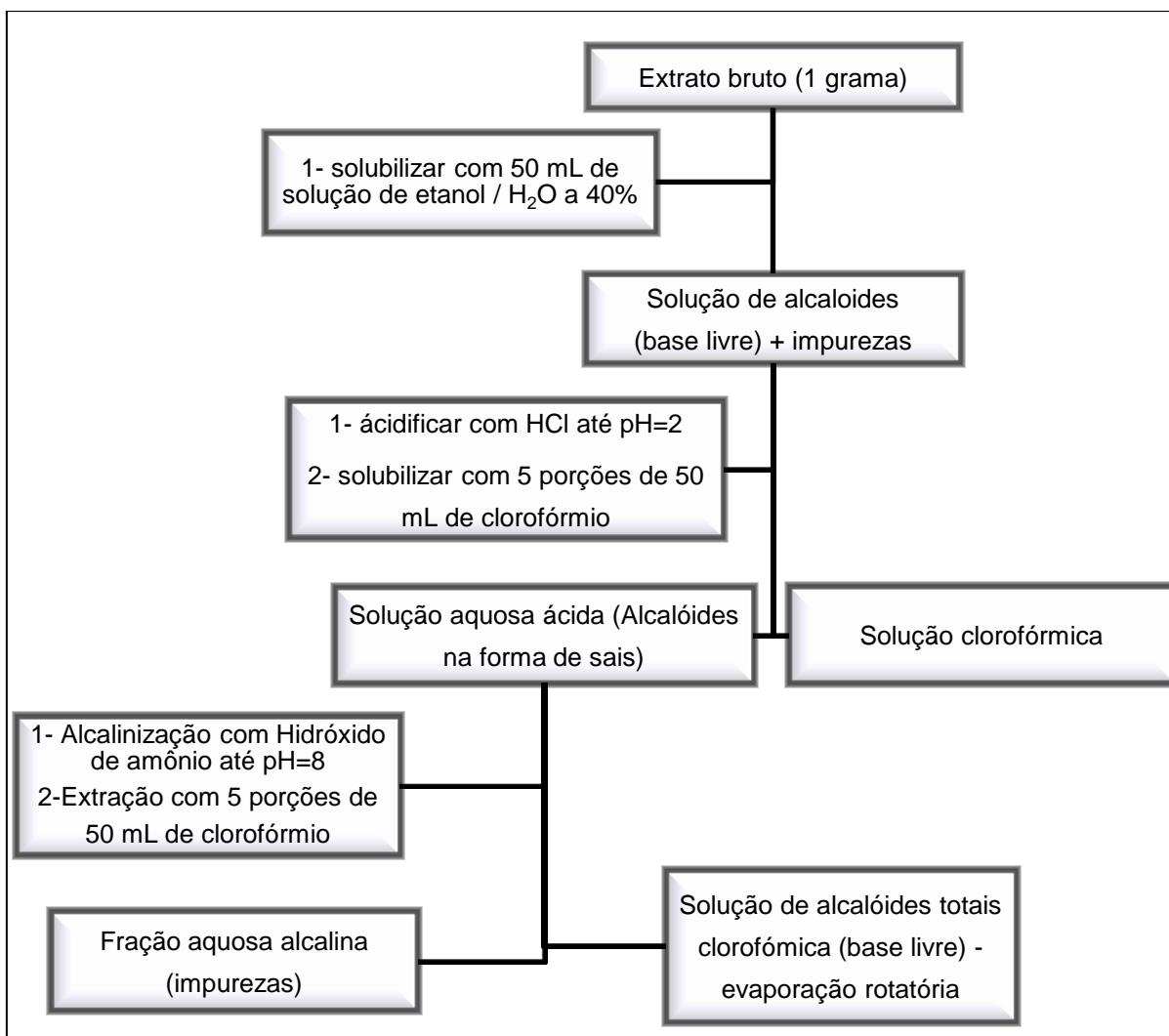
Os extratos obtidos por meio desse processo de extração foram posteriormente concentrados em evaporador rotativo e colocados em frascos de vidro para a secagem em capela de exaustão, por cinco dias. Após a secagem, as frações de *Ipomoea alba* foram submetidas aos testes de CMI e CBM para os estreptococos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*.

4.11 Obtenção de fração alcaloídica

A fração alcaloídica de *Ipomoea alba* foi obtida por meio de extração convencional em funil de vidro. Para esse procedimento, um grama de extrato bruto foi solubilizado em 50mL de solução constituída por etanol P.A/água a 40%. Após a solubilização, foram adicionadas gotas de ácido clorídrico até que a solução atingisse o pH=2. Em seguida, foram adicionados 250mL de clorofórmio, em 5 porções de 50mL, intercaladas por homogeneização manual. A seguir, a mistura foi colocada em funil de separação, onde permaneceu em repouso para separação das partes líquidas imiscíveis. Após a separação das partes, foram obtidas duas frações uma aquosa e outra clorofórmica.

Na sequência desse processo, a solução aquosa foi basificada, adicionando hidróxido de amônio até pH=8. A seguir, essa solução foi particionada com clorofórmio, em 5 porções de 50 mL e novamente foi separada em duas frações, uma aquosa e outra clorofórmica. Essa fração clorofórmica foi rota-evaporada e inserida em recipiente de vidro para secagem em capela de exaustão, por cinco dias, para posteriormente ser testada junto com as demais frações (SANTAVY, 1990). O fluxograma da figura 4 representa a obtenção da fração alcaloídica.

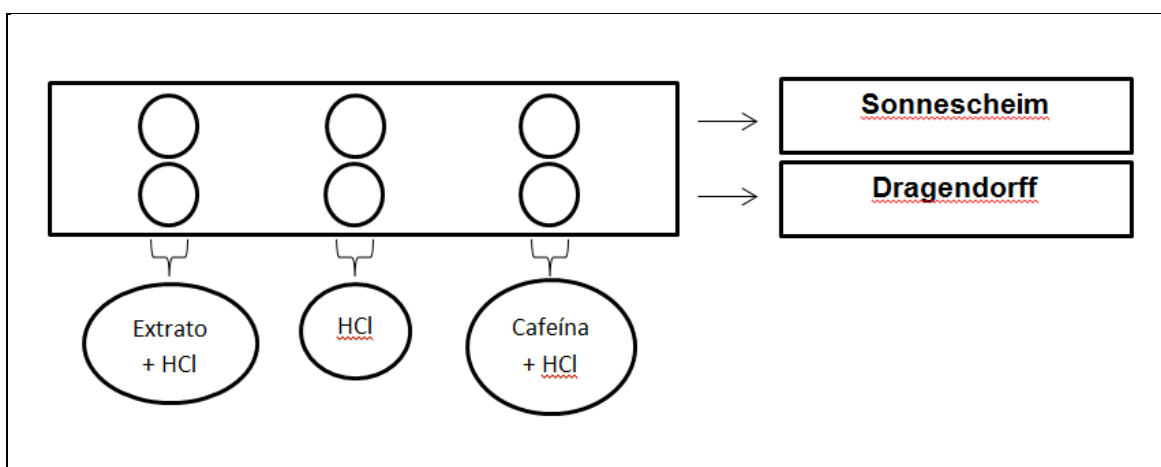
Figura 4 - Fluxograma de confecção da fração alcaloidica.



4.12 Teste de detecção de alcaloides

Foram realizados os testes de Sonneschein e Dragendorff para detecção de alcaloides, utilizando uma solução contendo 40 mg de extrato bruto de *Ipomoea alba* e 1mL de ácido clorídrico 2 molar. Os testes foram realizados com a utilização dos reagentes de Sonneschein e Dragendorff, diluídos em solução de ácido clorídrico. Como controle negativo, foi utilizado ácido clorídrico e como controle positivo, a cafeína (SANTAVY, 1990). A distribuição dos reagentes, controles e extrato, segue o esquema a seguir, representado no quadro 3.

Quadro 3 - Esquema de distribuição dos materiais de acordo com as linhas e as colunas para os testes de alcaloides.



5 RESULTADOS

Foram selecionadas para este estudo 12 espécies de plantas: *Ipomoea alba*, *Ipomoea chiliantha*, *Echinodorus grandiflorus*, *Zanthoxylum rigidum*, *Anadenanthera colubrina*, *Cassia grandis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Coutarea hexandra*, *Triplaris gardneriana*, *Vitex cymosa*, *Senna obtusifolia* e *Eclipta prostrata*.

Com exceção dos extratos de *Ipomoea chiliantha*, *Cassia grandis*, *Coutarea hexandra*, *Vitex cymosa*, os demais inibiram o crescimento de pelo menos uma espécie de estreptococos sem, entretanto, exercer nenhuma atividade bactericida nas concentrações testadas.

Foi constatado que o *Streptococcus sanguinis* foi sensível a maior número de extrato do que os demais micro-organismos, seguido pelo *Streptococcus oralis*, que foi inibido por quatro extratos e o *Streptococcus gordonii* por três.

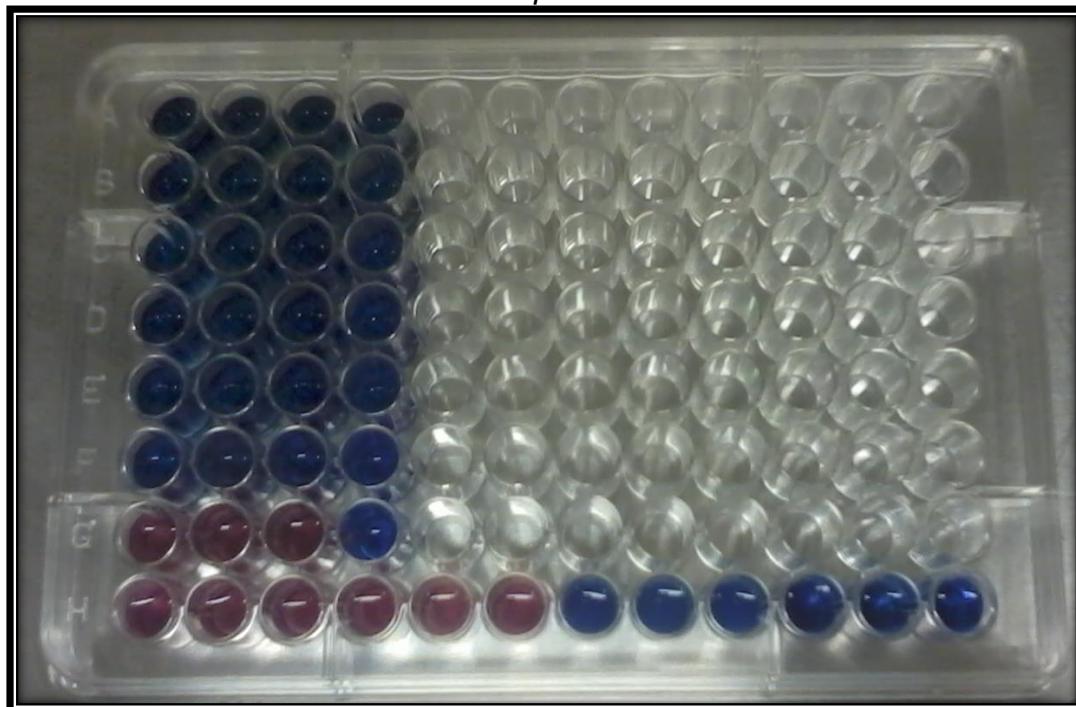
O extrato bruto de *Ipomoea alba* foi o que apresentou melhor atividade, com destaque para a capacidade bactericida e bacteriostática demonstradas pelos testes de CMI e CMB. Todas as espécies de bactérias testadas, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*, foram inibidas e mortas pela ação da *Ipomoea alba*.

A concentração mínima inibitória para a *Ipomoea alba* em relação as espécies de estreptococos testadas foi de 31,2µg/mL, exceto para o *Streptococcus gordonii* que foi inibido na concentração de 15,6µg/mL. Em relação à ação bactericida, a *Ipomoea alba* exerceu atividade contra *S. mutans* na concentração (125µg/mL). Para as espécies *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. gordonii*, a concentração bactericida foi 31,2µg/mL. Os resultados dos valores de CMI e CMB encontram-se expressos no Quadro 4.

Quadro 4 – Valores de CMI e de CMB ($\mu\text{g/mL}$) para as plantas estudadas em relação aos estreptococos orais.

Estreptococos orais Espécies	<i>S.mutans</i>		<i>S.sanguinis</i>		<i>S.oralis</i>		<i>S.gordonii</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Ipomoea alba</i>	31,2	125	31,2	31,2	31,2	31,2	15,6	31,2
<i>Ipomoea chiliantha</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	-	-	250	-	-	-	1000	-
<i>Zanthoxylum rigidum</i>	-	-	1000	-	-	-	-	-
<i>Anadenanthera colubrina</i>	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>Cassia grandis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	-	-	1000	-	-	-	-	-
<i>Coutarea hexandra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Triplaris gardneriana</i>	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>Vitex cymosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Senna obtusifolia</i>	-	-	1000	-	-	-	-	-
<i>Eclipta prostrata</i>	-	-	1000	-	1000	-	1000	-

Figura 5 – Microplaca contendo extrato bruto de *Ipomoea alba* utilizada para o teste de CMI frente ao *Streptococcus mutans*.



Nota: Os poços em azul representam ausência de bactérias; enquanto os em vermelho representam presença de bactérias.

Após a finalização dos testes com os extratos brutos das 12 plantas, observou-se que *Ipomoea alba* obteve os melhores resultados. Com isso, seu extrato bruto foi fracionado e testado para os estreptococos: *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. gordonii*. A fração hexânica de *Ipomoea alba* não apresentou atividade. A fração de etanol/água demonstrou CMI inferior aos CMI do extrato bruto de *Ipomoea alba* para os *Streptococcus sanguinis* e *oralis*. Para o *Streptococcus mutans*, a CMI encontrada no teste com as frações foi superior a obtida pelo extrato bruto. O resultado dos testes com as frações de *Ipomoea alba* encontram-se expressos na Quadro 5.

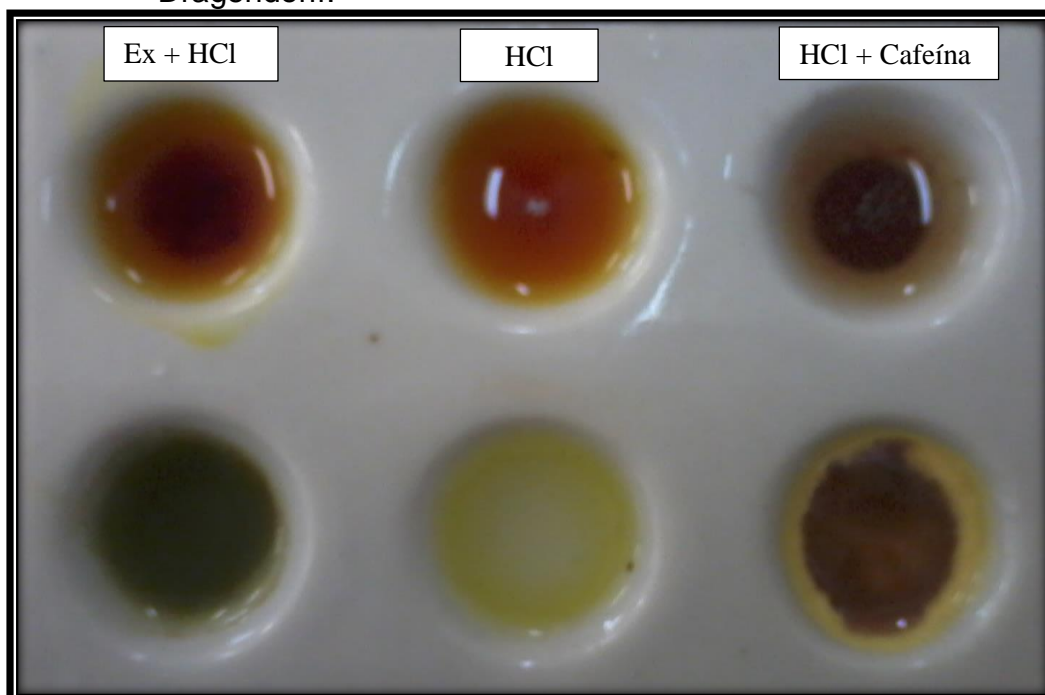
Quadro 5 - Valores de CMI e CMB das frações de *Ipomoea alba*, segundo cada estreptococo, em µg/mL.

Bactérias Frações	<i>S.Mutans</i>		<i>S.Sanguinis</i>		<i>S.Oralis</i>		<i>S.Gordonii</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Hexano	-	-	-	-	-	-	-	-
Diclorometano	-	-	125	-	500	1000	1000	-
Clorofórmio	500	-	62,5	250-125	250	250	250	500
Acetato de Etila	-	-	250	250	125	250	250	-
Etanol/ Água	62,5	250-125	15,6	62,5	15,6	62,5-31,2	15,6	125
Alcaloídica	62,5	125-62,5	62,5	125-62,5	62,5	62,5	31,2	62,5

O rendimento obtido do extrato bruto de *Ipomoea alba* foi de 11,23%, pois com a utilização de 30 gramas da planta seca foi obtido 3,73 gramas do extrato. O rendimento de cada fração preparada a partir da utilização de um grama do extrato bruto foi de 0,08 gramas para a fração hexânica; 0,503 gramas para a fração diclorometano; 0,0162 gramas para a fração clorofórmica; 0,1693 gramas para fração de acetato de etila; 0,226 gramas para etanol/água, o que corresponde a um rendimento de 8%, 50,3%, 1,62%, 16,93% e 22,6%, respectivamente. Quanto a fração Alcaloídica, foi utilizado um grama do extrato bruto e o rendimento foi de 0,18 gramas, que corresponde a um rendimento de 18%.

Os resultados dos testes de Sonneschein e Dragendorff confirmaram a presença de compostos da classe dos alcaloides no extrato bruto de *Ipomoea alba*. A presença de alcaloides foi caracterizada pela precipitação do extrato bruto que demonstrou-se semelhante ao controle positivo. A figura 6 representa os resultados do teste de detecção de alcaloides, onde a primeira linha representa o teste de Sonneschein e a segunda linha o teste de Dragendorff. Na primeira coluna, os poços foram preenchidos com extrato bruto de *Ipomoea alba*, ácido clorídrico e o reagente; na segunda coluna os poços foram preenchidos com ácido clorídrico e o reagente; na terceira coluna os poços foram preenchidos com cafeína, ácido clorídrico, reagente; como representado na metodologia descrita anteriormente.

Figura 6 - Representação dos resultados dos testes de Sonneschein e Dragendorff.



Nota: Na primeira linha encontra-se o reagente Dragendorff, e na segunda linha o reagente Sonneschein

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes realizados por diferentes grupos de pesquisadores confirmaram o potencial antimicrobiano de diversas plantas, frente aos micro-organismos envolvidos nas infecções que acometem a cavidade bucal (MELO et al., 2006; SOARES et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008; FREIRES et al., 2010; PERAZZO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2012; LEE, 2013).

Contribuindo com o conhecimento sobre a atividade antimicrobiana de plantas medicinais para uso na odontologia, foram estudadas 12 espécies de plantas coletadas na região do pantanal sul-mato-grossense. As plantas, *Ipomoea alba*, *Ipomoea chiliantha*, *Echinodorus grandiflorus*, *Zanthoxylum rigidum*, *Anadenanthera colubrina*, *Cassia grandis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Coutarea hexandra*, *Triplaris gardneriana*, *Vitex cymosa*, *Senna obtusifolia* e *Eclipta prostrata*, crescem naturalmente nessa região, entretanto a maioria pode ser encontrada também em outros biomas, como no Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica (CARVALHO, 1994; MONDIN, 2004; POTT et al., 2009; BIANCHINI; FERREIRA, 2010; MELO, 2010; BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b; PIRANI, 2011; SOUZA; BORTOLUZZI, 2011; SOUZA; BORTOLUZZI, 2012; BARBOSA, 2013).

Dentre as espécies estudadas, a *Ipomoea alba* foi a planta que apresentou melhores resultados para os testes de atividade antimicrobiana, sendo bactericida e bacteriostática para todas as espécies de estreptococos orais testadas.

A *Ipomoea alba* cé uma planta popularmente utilizada como antipirética, hipotensora e emoliente. Como agente antimicrobiano, demonstrou atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, *Bacillus cereus* (LUCAS et al., 2010), *Enterococcus faecalis* (CASTILHO et al., 2013), *Streptococcus mutans* e *sanguinis* (BARELLA et al., 2012). Com relação aos *Streptococcus mutans* e *sanguinis*, não há literatura, resultados para os testes de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB). Nossos resultados confirmam o potencial antimicrobiano e ampliam o espectro de atividade da *Ipomoea alba* uma vez que foram testadas outras espécies de estreptococos orais como *Streptococcus oralis* e *gordonii*.

No presente estudo, a CMI de *Ipomoea alba* variou de 15,6 a 31,2 µg/mL, para as espécies testadas. Esses resultados foram inferiores a 100 µg/mL, que é considerada uma concentração adequada para uma possível aplicação clínica do

extrato (RIOS et al., 1988; SUFFREDINI et al., 2006). Além disso, o estudo de Duarte et al. (2007) classificou as plantas que apresentam CMI inferior ou igual a 500 µg/mL como plantas de forte atividade antimicrobiana.

De acordo com os nossos resultados, o *S. gordonii* pode ser considerado a espécie mais sensível frente ao extrato bruto *Ipomoea alba*, pois foi inibido pela menor concentração do extrato em relação as demais espécies. Em oposição, os *S. mutans* demonstrou menor sensibilidade, principalmente em função da necessidade de uma concentração mais elevada para a ação bactericida. Esse fato pode estar associado aos inúmeros fatores de virulência já descritos para os estreptococos do grupo mutans, que os caracterizam como principais agentes etiológicos da cárie dentária (KRZYSCIAK et al., 2014; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Dentre esses fatores de virulência, estão incluídos mecanismos que garantem a sobrevivência bacteriana sob condições especiais, o que, conseqüentemente, aumenta a resistência natural aos agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2006) justificando assim, os resultados registrados pelos testes de CMI e CMB para os *Streptococcus mutans*.

Na concentração de 31,2 µg/mL, o extrato bruto de *Ipomoea alba*, apresenta ação bacteriostática para todas as espécies de estreptococos testadas, no entanto, a espécie *S. gordonii* teve o seu crescimento inibido na concentração de 15,6 µg/mL.

O extrato também possui ação bactericida para todas as espécies de estreptococos, na concentração de 31,2 a 125µg/mL. Dessa forma, o extrato bruto de *Ipomoea alba* pode ser considerado de amplo espectro de atividade antimicrobiana, pois possui atividade contra diferentes espécies de cocos e bacilos Gram-positivos (LUCAS et al., 2010; CASTILHO et al., 2013; BARELLA et al., 2012).

A atividade bactericida do extrato pode ser considerada importante para o tratamento da doença cárie já instalada, quando há o predomínio dos estreptococos cariogênicos como, por exemplo, na lesão de mancha branca do esmalte (MELO et al., 2006; SOARES et al., 2008; LEE, 2013). Além disso, a eliminação da microbiota cariogênica, segundo Huang et al. (2011), pode propiciar a recolonização por bactérias com menor potencial cariogênico. Por outro lado, a eliminação de bactérias associadas com estado de saúde pode causar um desequilíbrio na microbiota normal e proporcionar a instalação de micro-organismos com potencial patogênico desconhecido (AVILA et al., 2009). Esse fato reforça a importância para a correta

indicação de qualquer agente antimicrobiano e condena o uso indiscriminado dessa classe de medicamentos (PALMEIRA et al., 2010).

O *S. sanguinis* está presente no processo inicial de formação do biofilme dental. Embora predomine na condição de saúde, constitui importante agente etiológico da endocardite bacteriana subaguda, sendo responsável por 31,9% das endocardites (DOUGLAS et al., 1993; SALGADO et al., 2013). Dessa forma, a *Ipomoeaalba* poderia ser indicada para o desenvolvimento de enxaguatório bucal com finalidade como agente profilático de endocardite bacteriana.

Após a análise dos resultados obtidos com os extratos brutos das doze plantas e constatação do melhor resultado para *Ipomoea alba*, foram realizados testes com as partições do extrato bruto. Os resultados demonstraram que o extrato bruto de *Ipomoea alba* apresentou melhor atividade antimicrobiana do que as frações testadas. Isso ocorreu, possivelmente, devido ao sinergismo molecular dos componentes químicos presentes no extrato bruto. O potencial farmacológico das moléculas em conjunto pode resultar em maior atividade antimicrobiana do que quando fracionadas ou isoladas (SILVA JÚNIOR et al., 2010).

Os resultados indicam que a utilização do extrato bruto de *Ipomoea alba* é considerada mais vantajosa para o controle dos *Streptococcus mutans* por apresentar menor valor de CMI, quando comparado ao valor de CMI obtido pelas frações para a mesma bactéria. Já para os *Streptococcus sanguinis* e *oralis*, as frações etanólicas obtiveram menores valores de CMI que o extrato bruto. Enquanto os *Streptococcus gordonii* foram igualmente inibidos na concentração de 15,6 µg/mL, tanto pelo extrato bruto quanto pela fração de etanol/água. Quanto a atividade bactericida, o extrato bruto de *Ipomoea Alba* demonstrou-se mais ativo para os *Streptococcus sanguinis*, *oralis* e *gordonii*, quando comparados com as frações testadas, exceto para os *Streptococcus mutans* que apresentou variação na concentração bactericida entre os valores de 62,5 e 125µg/mL para a fração alcaloídica que foi a mais ativa.

O extrato bruto de *Ipomoea alba*, apresentou maior rendimento após o processo de extração que a maioria das suas frações. Considerando o rendimento, a simplicidade do processo de obtenção e a análise dos resultados de CMI para a principal bactéria envolvida na cárie, o *Streptococcus mutans*, é possível propor que o extrato bruto de *Ipomoea alba* possa ser preferível quando o seu uso é em relação a cárie dentária.

Comparando-se o valor da CMI do extrato bruto de *Ipomoea alba*, com os valores da CMI de outras plantas, frente aos *Streptococcus mutans* UA159, observamos que somente o extrato bruto hexânico de *Rheedia brasiliensis* apresentou menor valor de CMI (12,50-25 µg/mL) em relação ao valor de 31,2 µg/mL obtido em nosso estudo. Vale considerar que o extrato bruto utilizado no presente estudo foi preparado com água e pequeno percentual de etanol. Comparando-se os nossos resultados com os da literatura, podemos incluir o extrato bruto de *Ipomoea alba* dentre os extratos de maior potencial antimicrobiano encontrados para o *Streptococcus mutans* UA159 (SOARES et al., 2008; FREIRES et al., 2010; FRONER et al., 2011; PERAZZO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2012; LEE, 2013).

Em nosso estudo foi possível detectar a presença de compostos químicos da classe de alcaloides no extrato bruto de *Ipomoea alba*, esta classe de compostos já demonstrou diversas atividades biológicas, inclusive antimicrobiana (ASSIS, 2009; MEIRA et al., 2012). Analisando em conjunto os resultados do potencial antimicrobiano do extrato bruto de *Ipomoea alba*, é possível justificar a importância da realização de estudos futuros detalhados sobre a planta, bem como de sua ação antimicrobiana sobre o biofilme formado pelos *Streptococcus* da cavidade oral.

No presente estudo, a fração alcaloidica e a fração etanol/água de *Ipomoea alba* apresentaram maior atividade antimicrobiana frente aos estreptococos testados. Por outro lado, a fração hexânica não demonstrou atividade. Esses resultados sugerem que os compostos ativos que interagem no extrato bruto podem estar presentes nas frações mais polares.

Embora do mesmo gênero que *Ipomoea alba*; a *Ipomoea chiliantha* não apresentou atividade antimicrobiana. O gênero *Ipomoea* é considerado o mais representativo da família convolvulaceae por apresentar aproximadamente 700 espécies. Outras espécies do gênero de *Ipomoea hederacea*, por exemplo, é conhecida por apresentar atividade antioxidante, hepatoprotetora e antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Citrobacter sp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis* e *Bacillus subtilis*; atividade antifúngica contra *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus effusus*, *Yersinia aldovae*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichophyton rubrum* e atividade analgésica (ZIA-UL-HAQ et al., 2012). Já *Ipomoea cairica* apresenta atividade antimicrobiana frente aos *Staphylococcus aureus* (FERREIRA et al., 2006).

Quanto aos compostos químicos isolados das espécies do gênero *Ipomoea*, foram identificados nas espécies *I. muricata*, *I. hardwickii* e *I. alba* alcalóides indolizidínicos ipalbidine que apresentam ação analgésica e antioxidante; nas espécies *I. fistulosa*, *I. mueller* e *I. tricolor*, foram isolados alcalóides ergoline agroclavina, que são compostos químicos com potencial antimicrobiano (MEIRA et al., 2012).

A despeito da identificação de esteroides, triterpenos, flavonoide, derivados do ácido cafeico e ácido *p*-cumárico esterificado, nas frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila, fracionadas de *Ipomoea chiliantha* (FERREIRA et al., 2011), não foi observado atividade antimicrobiana para essa espécie no presente estudo. Os resultados obtidos com o extrato de *Ipomoea chiliantha* podem sugerir que o tipo e quantidade de metabólitos secundários possam sofrer interferência de fatores ambientais; interações bioquímicas, fisiológicas, ecológicas e evolutivas. Dessa forma, plantas de mesmo gênero ou espécie podem ser diferentes quimicamente e apresentar concentrações distintas de seus constituintes, o que pode ser uma variação influenciada pelas condições climáticas e de cultivo da região (ISMÁN, 2000; SANTOS, 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

Ipomoea alba, *Tabebuia impetiginosa*, *Senna obtusifolia*, *Zanthoxylum rigidum*, *Eclipta prostrata* e *Echinodorus grandiflorus* são bacteriostáticos frente a linhagem de *Streptococcus sanguinis*. Os *S. sanguinis* representam a espécie deste estudo que foram inibidos pelo maior número de extratos brutos testados.

S. sanguinis, *S. oralis* e *S. gordonii*, são espécies de estreptococos também presentes nas condições de saúde bucal (LEE, 2013). Por outro lado, estão envolvidos na etiologia da endocardite bacteriana subaguda, que consiste em um processo inflamatório do endocárdio, causada por agentes infecciosos, e que evolui com o passar de semanas a meses, apresenta toxicidade modesta e rara infecção metastática (SALGADO et al., 2013; MACHADO; FERREIRA, 2013).

Como as espécies de plantas *Echinodorus grandiflorus*, *Zanthoxylum rigidum*, *Anadenanthera colubrina*, *Tabebuia impetiginosa*, *Triplaris gardneriana*, *Senna obtusifolia*, *Eclipta prostrata*, não apresentaram atividade antimicrobiana para o *S. mutans* não despertam interesse para a prevenção e controle da cárie.

Embora estudos anteriores tenham demonstrado a presença de substâncias biologicamente ativas das classes de flavonoides, triterpenos em *Ipomoea chiliantha* (FERREIRA et al., 2011); alcalóides no gênero *Cassia* (VIEGAS JÚNIOR et al.,

2004); flavonoides no extrato de *Coutarea hexandra* (NUNES et al., 2012); iridoides, flavonoides e triterpenos na espécie *Vitex cymosa* (SANTOS et al., 2001; LEITÃO et al., 2011). *Ipomoea chiliantha*, *Cassia grandis*, *Coutarea hexandra* e *Vitex cymosa*, não apresentaram atividade antimicrobiana para os estreptococos da cavidade bucal testados.

Já a espécie *Echinodorus grandiflorus* demonstrou ação bacteriostática contra *S.sanguinis* e *S.gordonii* na concentração de 1000 µg/mL, assim como *Eclipta prostrata*, que além desses micro-organismos, também inibiu o crescimento do *S.oralis*. Apesar de *Echinodorus grandiflorus* (GARCIA et al., 2010) e *Eclipta prostrata*, apresentarem compostos químicos com atividade antimicrobiana (KARTHIKUMAR et al., 2007), neste estudo, estas duas espécies não demonstraram atividade antimicrobiana relevante. Esse fato pode estar associado à quantidade do metabólito ativo, que pode ser insuficiente para exercer ação desejada (NCUBE et al., 2010).

O extrato bruto de *Zanthoxylum rigidum* demonstrou-se pouco efetivo frente às bactérias testadas, por apresentar atividade apenas bacteriostática e contra os *Streptococcus sanguinis*. Apesar dos resultados obtidos, a literatura é deficiente de estudos sobre o seu uso terapêutico, tornando relevante nossos resultados de atividade antimicrobiana contra os estreptococos.

Outra espécie pouco estudada é a *Triplaris gardneriana*; o seu potencial químico e biológico permanece desconhecido para a comunidade científica, pois não há estudos demonstrando suas propriedades biológicas. Nesta pesquisa, pioneira sobre a ação antimicrobiana dessa espécie de planta, verificamos que o extrato bruto foi capaz de inibir apenas os *Streptococcus oralis*, sendo a concentração inibitória equivalente a 1000 µg/mL, considerado um valor elevado segundo os critérios de classificação de CMI e CMB adotados por Duarte et al. (2007).

Após a análise dos resultados obtidos por meio dos testes de CMI e CMB das doze espécies de plantas selecionadas. Constatou-se neste estudo, que o extrato bruto de *Ipomoea alba* apresenta atividade bactericida e bacteriostática frente aos estreptococos envolvidos no desenvolvimento da cárie dental. Sua capacidade bacteriostática demonstrou-se superior aos demais extratos avaliados. Os resultados corroboram com a literatura e fortalecem a utilização de extratos de plantas como princípio ativo para identificação de agentes antimicrobianos, além de apresentar a

espécie *Ipomoea alba* como uma possibilidade de utilização na produção de futuros fármacos para utilização na odontologia.

7 CONCLUSÕES

A *Ipomoea alba* foi a planta que apresentou melhor atividade antimicrobiana frente aos estreptococos bucais envolvidos no processo cariogênico.

Ipomoea chiliantha, *Cassia grandis*, *Coutarea hexandra*, *Vitex cymosa* não apresentaram atividade antimicrobiana para os estreptococos testados.

Zanthoxylum rigidum, *Tabebuia impetiginosa* e *Senna obtusifolia* são bacteriostáticas para *Streptococcus sanguinis* na concentração de 1000 µg/mL.

Echinodorus grandiflorus é bacteriostática para *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus sanguinis*.

Anadenanthera colubrina e *Triplaris gardneriana* são bacteriostáticas para *Streptococcus oralis*.

Eclipta prostrata é bacteriostática para *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*.

Ipomoea alba, é bacteriostática e bactericida frente aos estreptococos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*, em baixas concentrações.

O *Streptococcus mutans* demonstrou menor sensibilidade do que as demais bactérias, quando expostos aos extratos brutos; em oposição ao *Streptococcus sanguinis*, que foi o mais sensível.

Após a identificação da planta com melhor desempenho, as frações alcaloídica e etanol/água de *Ipomoea alba* foram as que apresentaram menores concentrações inibitórias e bactericidas mínimas.

O extrato bruto de *Ipomoea alba*, apresentou melhor potencial de inibição para o *Streptococcus mutans*, que suas frações.

REFERÊNCIAS*

Addy M. O uso de anti-sépticos na terapia periodontal. In: Lindhe J. Tratado de periodontia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.450-77.

Adesina SK. The Nigerian *Zanthoxylum*: chemical and biological values. Afr J.Trad CAM. 2005; 2:282-301.

Almeida ER. Preclinical and clinical studies of lapachol and beta-lapachone. The Open Nat Prod J. 2009; 2:42-7.

Almeida LSB, Murata RM, Yatsuda R, Dos Santos MH, Nagem TJ, Alencar SM, et al.. Antimicrobial activity of rheedia brasiliensis and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine. 2008: 1-6.

Almeida RB, Scheffer TP. Estudo sobre a utilização de recursos vegetais com potencial terapêutico. Rev Saúde Públ. 2012; 5(1):59-71.

American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on fluoride therapy. Reference manual clinical guidelines. 2010; 31(6):128-31.

Anderson H, Domenik Z. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. Dent Clin North Am. 2010; 54(3):453-62.

Andrade IP, Fardin RF, Xavier KBC, Nunes APF. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em micro-organismos da cavidade oral. Rev Bras Pesq Saúde. 2011; 13(3):10-16

*Estilo Vancouver apresentado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, publicadas inicialmente em 1979.

Antunes RMP, Lima EO, Pereira MSV, Camara CA, Arruda TA, Catão RMR, et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16(4):517-24.

Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Filho LS. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev Patol Trop.* 2004; 33(1):55-64.

Arruda DC, D’Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SRB. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5):1679-87.

Assis CM, Moreno PRH, Young MCM, Campos IPA, Suffredini IB. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcaloides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;19(2B): 626-31.

Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA and Cell Biology.* 2009; 28(8):405-11.

Baelum V, Fejerskov O. Diagnóstico da cárie dentária: um momento de reflexão a caminho da intervenção? In: Fejerskov O, Kidd E. *Cárie dentária a doença e seu tratamento clínico.* São Paulo: Santos; 2007. p.101.

Barbosa MR. *Coutarea* in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2013 [Acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13915>>.

Barrella GE, Suffredini IB, Ribeiro FV, Cirano FR, Pimentel SP. Evaluation of the effect of an organic extract obtained from *Ipomoea alba* L. on experimental periodontitis in rats. *Braz Oral Res.* 2012; 26(2):158-64.

Bagramian RA, Godoy FG, Volpe AR. The global increase in dental caries; a pending public crisis. *Am J Dent.* 2009; 22:3-8.

Bhattarai S, Chaudhary RP, Taylor RSL. Ethnobotany of Wild Junipers (*Juniperus* Species) in Manang District, Central. *Sci J World*. 2006; 4(4):1009-12.

Bianchini RS, Ferreira PPA. Convolvulaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2010 [acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB007022>.

Brasil. Flora do Brasil. Alismataceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2010a [acesso em 26 jun 2013]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004261>.

Brasil. Flora do Brasil. *Anadenanthera* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2010b [acesso em 17 out 2013]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB018072>.

Breslin PAS, Tharp CD. Reduction of saltiness and bitterness after chlorhexidine rinse. *Chem Senses*. 2001; 26:105-16.

Camones MAI, Ruiton CF, Teixeira BJ, Tarrillo IGM, Espinoza EDRT, Flor HO. Estudio farmacognóstico, actividad antioxidante y Toxicidad a dosis límite de *Triplaris americana* L. (Tangarana Colorada). *Rev Soc Quím Perú*. 2010; 76 (1):34-42.

Capó JT, Chanfrau JR, Mirabal JMG, Ruíz ZP, Fernández SA. Actividad antianémica de *La Cassia grandis* L. *Rev Cubana Farm*; 2004 [acesso em 31 mar 2014]. Disponível em: http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol38_3_04/far09304.htm.

Cardoso FL, Murakami C, Mayworm MAS, Marques LM. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill. Xanthorrhoeaceae. *Rev Bras Farmacogn*. 2010; 20(1):35-40.

Carvalho PER. Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: Embrapa/CNPF. 1994.p.640.

Castilho AL, Saraceni CHC, Díaz IEC, Paciencia MLB, Suffredini IB. New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. Braz Oral Res. 2013; 27(2):109-15.

Ciancio SG. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. Periodontol. 1995; 8:75-86.

Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. Braz J Pharmac Sci. 2006; 42(3):395-404.

Davino SC, Giesbrecht NA, Roque NF. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. Braz J Med Bio Res. 1989; 22:1127-9.

Dhandapani R, Sabna B. Phytochemical constituents of some Indian medicinal plants. Anc Sci Life. 2008; 27(4):1-8.

Doughari JH, El-mahmood AM, Tyoyina I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). Afr J Pharm Pharmacol. 2008; 2(1):7-13.

Douglas CWI, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. J Med Microbiol. 1993; 39:179-82.

Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol. 2007; 111:197-201.

Dutra RC, Tavares CZ, Ferraz SO, Sousa OV, Pimenta DS. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(4): 469-74.

Falkenberg MS. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre: UFRGS; 2007. p.657-65.

Ferreira AA, Oliveira PM, Evangelista EA, Alves RB, Pizziollo VR, Brasileiro BG. Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). Rev Bras Pub Med. 2006; 8(2):14-8.

Ferreira FP, Pott A, Oliveira DCR. Derivados fenilpropanóides e outros constituintes de *Ipomoea chiliantha* [on line]. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2011; Florianópolis-SC. Florianópolis-SC; 2011 [acesso em 26 jun 2013]. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T2435-2.pdf>

Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. Nati Rev Microbiol. 2010; 8(9):623-33.

Foglio MA, Queiroga CL, Sousa IMO, Rodrigues RAF. Plantas Medicinais Como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Multiciência. 2006: p.1-8.

Freires IA, Alves LA, Jovito VC, Almeida LFD, Castro RD, Padilha WWN. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. Odontol Clín Cient. 2010; 9(2):139-43.

Froner MF, Queiroz VS, Lyra L, Schreiber AZ. Avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais ricos em fenóis sobre células planctônicas de *streptococcus mutans* [online]. XIX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP; 2011; São Paulo. São Paulo: UNICAMP; 2011 [acesso em 12 nov 2013]. Disponível em: <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xixcongresso/paineis/062862.pdf>.

Garcia Ede F, Oliveira MA, Godin AM, Ferreira WC, Bastos LF, Coelho M, Braga FC. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicin*. 2010; 18(1):80-6.

Gebran MP, Gebert APO. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Tuiuti: Ciência e Cultura*. 2002; 26(3):45-58.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*. 2007; 30(2):374-381.

Gómez CJR, Prieto JM, Heinrich M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) — uma commodity global etno farmacológicos?. *J Ethnopharmacol*. 2009; 1:1-13.

Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol*. 2005; 72(3):353-8.

Goun E, Cunningham G, Chu D, Nguyen C, Miles D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia*. 2003; 76:592-6.

Gourley JM, Heacock RA, McInnes AG, Nikolin B, Smith DG. The Structure of Ipalbine, a New Hexahydroindolizina e Alkaloid, isolated from *Ipomoea alba* L. *Chemical Communications*; 1969.p.709-10.

Gordien AY, Gray AL, Franzblau SG, Seidel V. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *J Ethnopharmacol*. 2009; 126(3): 500-5.

Groppo FG, Ramacciato JC, Motta RHL, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *Int J Dent*. 2008; 5:109-15.

Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Int J Dent*. 2010; 38:S6-10.

Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. J Calif Dent Assoc. 2013; 41(2): 107-18.

Henriques AT, Limberger RP, Kerber VA, Moreno PRH. Alcaloides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: 6ed. UFRGS; 2007.p.767-88.

Huang R, Li M, Gregory RL. Special focus: bacterial biofilm special focus review: Biofilms the interactions among oral bacteria. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence 2:5; Landes Bioscience. 2011.p.435-44.

Indu MN, Hatha AAM, Abirosh C, Harsha U, Vivekanandan G. Antimicrobial activity of some of the south-indian species against serotypes of escherichia coli, salmonella, listeria monocytogenes and aeromonas hydrophila. Braz J Microbiol. 2006; 37:153-8.

Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. 2000; 19:603-8.

Jain A, Choubey S, Singour PK, Rajak H, Pawar RS. *Sida cordifolia* (Linn) – An overview. J APPL Pharm Sci. 2011; 01(02): 23-31.

Joaquim WM, Ono EO, Salatino ML. Some secondary metabolites in leaves of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldl). Micheli in Brazil. Open Agr J. 2008; 2:75-9.

Juric H. Current possibilities in occlusal caries management. Acta Med Acad. 2013; 42(2):216-22.

Karthikumar S, Vigneswari K, Jegatheesan K. Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of *Eclipta prostrata* (L). Sci Res Essay. 2007; 2(4):101-4.

Khanna LG, Krishnan L, Getti G. Leishmanicidal atividade de saponinas isolado das folhas de *Eclipta prostrata* e *Gymnema sylvestre*. Indian J Pharmacol. 2009; 41(1):32.

Koli SR, Joshi SV, Vyas BA, Upadhye MC, Kirve MS, Santos SS, *et al.* Avaliação do potencial anti-diabético de *Cassia grandis* usando um modelo in vivo. J Adv Pharm Technol Res. 2010; 3:330-3.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33:499–515.

Kuete, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. Planta Medica; 2010;76(14):1479-91.

Kutsch VK, Young DA. New directions in the etiology of dental caries disease. CDA J. 2011; 39(10):716-22.

Ladino OJP, Rodríguez JAP, Moreno JML, Sarmiento LL, Suárez LEC. Propiedades antibacterianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). Rev Cub de Farm. 2011; 45(3):431-38.

Lee SH. Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral Streptococci. J Microbiol. 2013; 51(4):484–9.

Leitão SG, Santos TC, Monache FD, Matheus ME, Fernandes PD, Marinho BG. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. Rev Bras Farmacogn. 2011; 21(5):874-83

Lessa MA, Araújo CV, Kaplan MA, Pimenta D, Figueiredo MR, Tibiriçá E. Efeitos anti-hipertensivos de extratos brutos das folhas de *Echinodorus grandiflorus*. Fundam Clin Pharmacol. 2008; 2:161-8.

Lima T, Silva O, Silva, L, Rocha T, Grossi-de-Sá M, Franco O, Leonardecz E. *In vivo* effects of cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC). Leaf extracts on diarrhea treatment. evidence-based complementary and alternative medicine. CAM. 2011:10.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev Bras de Farmacogn. 2006; 16(2):197-201.

Lirdprapamongkol K, Kramb JP, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Surarit R, Sila-Asna M, *et al.* Juice of *Eclipta prostrata* Inhibits Cell Migration *In Vitro* and Exhibits Anti-angiogenic Activity *In Vivo*. *In vivo*.2008; 22:363-8.

Liu X, Dong M, Chen X, Jiang MLVX, Zhou J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. ApplMicrobiolBiotechnol. 2008; 78:241-9.

Loguercio AP. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciênc Rural. 2005; 35(2):366-70.

Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. família leguminosae. São Paulo: Franciscana; 1982.p.238-85.

Luan WM, Baelum B, Fejerrskov O, Chen X. Ten-year incidence of dental caries in adult and elderly Chinese. Caries Res. 2000; 34:205-13.

Lucas EMF, Souza LPN, Carvalho TN, Takahashi JA. Um novo éter diaril macrocíclico isolado de *Ipomoea alba*[on line].33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2010; Águas de Lindóia -SP. Águas de Lindóia–SP: 2010 [acesso em 5 nov 2012]. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumosT0057-1.pdf>

Lucena JEX, Bispo MD, Nunes RS, Cavalcanti SCH, Teixeira-Silva F, Marçal RM, Antonioli AR. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entre casca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16(1):67-72.

Machado FCA, Ferreira MAF. Perfil da endocardite infecciosa em hospital de referência entre 2003 e 2009. *Rev Bras Odontol.* 2013; 70(1):8-11.

Macedo M, Ferreira AR. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev Bras Farmacogn.* 2004; 14(1):40-4.

Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora.* 2008; 27(1/2): 33-9.

Maciel MAM, Angelo C, Pinto AC, Veiga Jr. VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova.* 2002; 25(3): 429-38.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Int J Dent.* 2010; 38(S1):S11-5.

Marcuzzo FFN, Faria TG, Cardoso MRD, Rezende Melo DCR. Chuvas no Pantanal brasileiro: análise histórica e tendência futura [on line]. 3º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal; Embrapa Informática Agropecuária/INPE; 2010; Cáceres. Mato Grosso: Embrapa; 2010 [acesso em 20 nov 2013]. Disponível em: http://www.cprm.gov.br/publique/media/Evento_tendencia_Marcuzzo.pdf

Mathur S, Mathur T, Srivastava R, Khatri R. Chlorhexidine: the gold standard in chemical plaque control. *Natl JPhysiol Pharm Pharmacol.* 2011; 1(2): 45-50.

Meira M, Silva EP, David JM, David JP. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Rev Bras Farmacogn.* 2012; 22(3): 682-713.

Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(2): 202-5.

Melo JG, Araújo TAS, Castro VTNA, Cabral DLV, Rodrigues MD, Nascimento SC, Amorim ELC, Albuquerque UP. Content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules. 2010; 15:8534-42.

Melo, E. *Polygonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2010 [acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20606>>.

Melo JG, Santos AG, Amorim EL, Nascimento SC, Albuquerque. Plantas medicinais utilizadas como agentes antitumorais no Brasil: uma abordagem etnobotânica. Evid Based Complement Alternat Med. 2011.p.359-65.

Mello JCP, Santos SC. Taninos. In: Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ed. Porto Alegre: UFSC; 2001; (24):517-43.

Mendes LGA, Biazevic MGH, Miguel-Crosato E, Mendes MOA. Dental caries and associated factors among Brazilian adolescents: a longitudinal study. Braz J Oral Sci. 2008; 7(26):1614-19.

Moccelini SK, Silva VC, Ndiaye EA, Sousa Jr PT. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). Quim Nova. 2009; 32(1):131-3.

Mondin CA. *Eclipta* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2004 [acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16092>>.

Monfrin RCP, Ribeiro MC. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2000; 54(1):401-7.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Quim Nova. 2005; 28(5):892-6.

Morais TMN, Silva A, Avi ALRO, Souza PHR, Knobel E, Camargo LFA. A Importância da Atuação Odontológica em Pacientes Internados em Unidade de Terapia Intensiva. Rev BrasTerIntensiva. 2006; 18(4):412-7.

Moreira ACA, Santos TAM, Carneiro MC, Porto MR. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. Rev Ci Med Biol. 2008; 7(3):266-72.

Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. Medicinal plants Brazil - reference publications Inc. Algonac, Michigan. 2000. p.501.

Mossini SAG, Kimmelmeier C. A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. Acta Farm Bonaerense. 2005; 24(1):139-48.

Namita P, Mukesh R. Medicinal plants used as antimicrobial agents: a review. Int Res J Pharm. 2012; 3(1):31-40.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social. Rev Panam Salud Pub. 2006; 19(6):385-93.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic - resistant bacteria. Braz J Microbiol. 2000; 31: 247-56.

Ncube B, Finnie JF, Van Staden J. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. South African Journal of Botany. 2010. p.79.

Nunes LG, Gontijo DC, Souza CJA, Fietto LG, Carvalho AF, Leite JPV. The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2012; (33):297-303.

Oliveira TA, Ronchi-Teles B, Fonseca CRV, Silva SLR, Pierre A, Santos PA, et al. Insecticidal activity of *Vitex cymosa* (Lamiaceae) and *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) extracts against *Sitophilus zeamais* adults (Curculionidae). *Emir J Food Agric*. 2012; 24(1): 49-56.

Palmeira JD, Ferreira SB, Souza JH, Almeida JM, Figueiredo MC, Pequeno AS, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólicos de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. *RBAC*. 2010; 42(1):33-7.

Pankaj S, Lokeshwar T, Mukesh B, Vishnu B. Review on neem (*Azadirachta indica*): thousand problems one solution. *Int Res J Pharm*. 2011; 2(12): 97-102.

Park BS, Lee HK, Lee SE, Piao XL, Takeoka GR, Wong RY, et al. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martium ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol*. 2006; 105:255-62.

Paula ACB, Hayashi LSS, Freitas JC. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb (Convolvulaceae). *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36:105-12.

Pereira CAZ, Rocio SCGP, Ceolin MFR, Lima APNB, Borlot F, Pereira RST, Moreira-Silva SF. Achados clínico-laboratoriais de uma série de casos com endocardite infecciosa. *J Pediatr*. 2003;79(5):423-8.

Perazzo MF, Neta MCC, Cavalcanti YW, Xavier AFC, Cavalcanti AL. Efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. *Rev Bras Ci Saúde*. 2012; 16(4):553-8.

Pinheiro MA, Brito DBA, Almeida LFD, Cavalcanti YW, Padilha WWN. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. *Rev Bras Prom Saúde*. 2012; 25(2):197-201.

Pirani JR. *Zanthoxylum* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2011 [acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1174>>.

Pott A, Pott VJ, Damasceno Jr GA. Fitogeografia do Pantanal. III CLAE e IXCEB; 2009; São Lourenço-MG. São Lourenço-MG: 2009 [acesso em 14 mar 2013]. Disponível em: http://www.seb.ecologia.org.br/2009/resumos_professores/arnildo_pott.pdf

Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol*. 1988; 23:127–49.

Rodrigues ACF, Costa JF, Silva FRG, Azevedo RRS, Nascimento EP, Silva AL, Souza LIO, Santos AF. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. *Revista Semente*. 2011; 6(6):250-7.

Roque AA; Rocha RM; Loiola MIB. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Rev Bras PI Med*. 2010; 12(1):31-42.

Rugg-Gunn A, Banoczy J. Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses for home use. Review article. *Acta Med Acad*. 2013; 42(2):168-78.

Salgado AA, Lamas CC, Bóia MN. Endocardite infecciosa: o que mudou na última década? *Revista HUPE*. 2013;12(1):100-9.

Santavy F. Alkaloids. In: Stahl E. *Thin – Layer Chromatography*. Nova York: 2ed. 1990. p.421-72.

Santos JS, Marinho RR, Valentim EE, Rodrigues L, Yamamoto MH, Teixeira SA, Muscara MN, Costa SK, Thomazzi SM. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. *J Ethnopharmacol.* 2013; 148:218-22.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS. 6ed. 2007.p. 404-34.

Santos SC, Mello JCP. Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS. 6ed. 2007.p. 615-45.

Santos TC, Schripsemab J, Monachec FD, Leitão SG. 2001. Iridoids from *Vitex cymosa*. *J Braz Chem Sci.* 2001; 12:763-6.

Santos SM, Silva CC, Santana RA, Plastino PJ, Albuquerque JFC, Sena RXFR. Determinação da atividade antimicrobiana de *Coutarea hexandra* (JACQ.) K. Schum. (Rubiaceae) [on line]. 50º Congresso Brasileiro de Química; 2010; Cuiabá-MT. [acesso em 29 mar 2014]. Disponível em:<http://www.abq.org.br/cbq/2010/trabalhos/7/7-252-7991.htm>

Schiff E, Pick N, Oliven A, Odeh M. Multiple liver abscesses after dental treatment. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 36:369-71.

Silva JSV, Abdon MM. Delimitação do pantanal brasileiro e suas subregiões. *Pesq Agropec Bras.* 1998; 33:1703-11.

Silva JSV, Abdon MM, Arnildo Pott A. Cobertura vegetal do bioma pantanal em 2002 [on line]. XXIII Congresso Brasileiro de Cartografia; 2007; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2007 [acesso em 19 jan 14]. Disponível em: <http://www.macroprograma1.cnptia.embrapa.br/projeto/probiopantanal/downloads-1/Probio7-Cobertura.pdf>

Silva Junior EA, Paludo CR, Ndiaye EA. Análise da atividade antibacteriana das frações do extrato bruto etanólico de *Licania humilis* (CHRYSOBALANACEAE) [online]. 50º Congresso Brasileiro de Química; 2010; Cuiabá-MT. Cuiabá-MT; 2010 [acesso em 27 fev 2013]. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2010/trabalhos/7/7-408-7298.htm>

Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Sá MM. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim Nova*. 2006; 29(4):844-55.

Siqueira SL, Machado LP, Santos SM, Aquino VCL, Araujo RO, Sena KXFR, Albuquerque JFC. Determinação da atividade antimicrobiana das folhas da *Cassia grandis* Linn. (FABACEAE) [online]. 51º Congresso Brasileiro de Química; 2011; São Luís-Ma. São Luís-Ma: 2011 [acesso em 6 ago 2013]. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2011/trabalhos/7/7-836-11384.htm>

Singh I, Kaur H, Kumar S, Kumar A, Lata S, Kumar A. Synthesis of new coumarin derivatives as antibacterial agents. *Int J Chem Tech Res*. 2010; 2:1745-52.

Souza GC, Haas AP, Von GLP, Schapoval EES, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. *JEthnopharmacol*. 2004;90:135-43.

Souza VC, Bortoluzzi RLC. *Cassia* in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2012 [acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82791>>.

Souza VC, Bortoluzzi RLC. *Senna* in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [online]. 2011 [acesso em 05 abr 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23161>>.

Soares SP, Vinholis AHC, Casemiro LA, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre micro-organismos da cárie dental. *Rev Odonto Ciênc*. 2008; 23(2):141-4.

- Suffredini IB, Paciencia MLB, Nepomuceno DC, Younes RN, Varella AD. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - clusiaceae. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006; 101(3): 287-90.
- Tenuta LMA, Cury JA. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: Assed S. Odontopediatria: bases clínicas para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.113-52.
- Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes anti microbianos e seu potencial de uso na odontologia. Rev Fac Odontol Pós-Grad. 2000; 3(2):43-54.
- Twetman S. Treatment Protocols: Nonfluoride management of caries disease process and available diagnostics. Dent ClinAm. 2010; 54(3):527-37.
- Tzonev R. *Eclipta prostrata* (Asteraceae): a new alien species for the Bulgarian flora. Phytologia Balcanica. 2007; 13(1): 79–80.
- Verma S, Singh SP. Current and future status of herbal medicines. Veterinary World. 2008; 1(11):347-50.
- Viegas JrC, Bolzani VS, Furlan M, Barreiro EJ, Young MCM, Tomazela D, Eberlin MN. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. J Nat Prod. 2004; 67:1279-86.
- Villamizar VEM, Barrera EDC, Suárez LEC. Análisis fitoquímico preliminar y actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto etanólico de corteza de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.(Rutaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(1):43-53.
- Villoria GEM, Costinha LHC. Antissépticos bucais no controle da bacteremia de origem oral. Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ. 2013; 12(1):76-83.

Yang D, Gu T, Wang T, Tang Q, Ma C. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells Bioscience. BiotechnolBiochem. 2010; 74:1424-30.

Yombi JC, Belkhir L, Jonckheere S, Wilmes D, Cornu O, Vandercam B, Rodriguez-Villalobos H. Streptococcus gordonii septic arthritis : two cases and review of literature. BMC Infectious Diseases.2012; 12:215.

Zia-UI-Haq M, Riaz M, De Feo V. *Ipomea hederacea* Jacq: A Medicinal Herb with Promising Health Benefits. Molecules.2012; 17:131-32-45.

Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS. 6ed. 2007.p. 601-8.