

AÇÃO IN VITRO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS

 <https://doi.org/10.56238/arev6n4-458>

Data de submissão: 27/11/2024

Data de publicação: 27/12/2024

Renata Lima Santos Oliveira¹

Mestre em Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, s/n, Salobrinho, Ilhéus - BA, 45.662-900
E-mail: renatinha.lima@hotmail.com
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5276437490499360>

Mariana Ely Araujo Oliveira

Biomédica

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, s/n, Salobrinho, Ilhéus - BA, 45.662-900
E-mail: eumariana.ely2001@gmail.com
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/4233129178953346>

Fernando Faustino de Oliveira

Doutor em Química

Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, s/n, Salobrinho, Ilhéus - BA, 45.662-900
E-mail: faustino@uesc.br
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/7591947265635324>

Rosilene Aparecida de Oliveira

Doutora em Química

Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, s/n, Salobrinho, Ilhéus - BA, 45.662-900
E-mail: rosilene@uesc.br
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/2189971824704477>

Gilsane Lino von Poser

Doutora em Farmácia

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000
E-mail: gilsane.von@ufrgs.br
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5223057662929273>

¹ Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Renata Lima Santos Oliveira.

Aline Oliveira da Conceição
Doutora em Biologia

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado,
km 16, s/n, Salobrinho, Ilhéus - BA, 45.662-900

E-mail: aoconceicao@uesc.br
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/9004278476364196>

Izaltina Silva Jardim Cavalli
Doutora em Bioquímica

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado,
km 16, s/n, Salobrinho, Ilhéus - BA, 45.662-900

E-mail: isjcavalli@uesc.br
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5065411466998527>

RESUMO

O Enterococcus faecalis tem uma função significativa nas doenças na prática clínica odontológica, principalmente como agente causador de infecções endodônticas e de tecidos moles. Os constituintes das plantas medicinais podem ser utilizados associados a medicamentos, como matéria prima, ou diretamente como compostos farmacologicamente ativos e oferecer alternativa ou coadjuvante no tratamento antimicrobiano, podendo ser um recurso útil na odontologia. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial inibitório e a interação com amoxicilina de extratos de plantas medicinais sobre *E. faecalis*. Duas estirpes de *E. faecalis*, ATCC 29.212 e ATCC 51.299, foram utilizadas para determinação do percentual de inibição do crescimento bacteriano, interação de antimicrobianos com extrato de planta e atuação sobre a formação do biofilme. Os extratos etanólicos de Lantana camara, Lippia macrophylla, Genipa americana, e extratos hexânicos de Hypericum connatum e *H. caprifoliatum* foram utilizados em concentrações que variaram entre 31,1 e 1000 µg/mL. Para os testes de interação entre extrato de planta e amoxicilina, utilizou-se o método de checkerboard com concentrações do extrato de *L. camara* de 16 a 1000 µg/mL e de amoxicilina de 0,16 a 10 µg/mL. Para verificação da atuação sobre a formação de biofilme, utilizou-se o método de cristal violeta. Todos os extratos testados inibiram o crescimento de *E. faecalis* variando conforme estirpe e extrato. Para a estirpe ATCC 29.212, todos os extratos apresentaram resultados significativamente inferiores ao valor médio de cloranfenicol e, na concentração de 500 µg/mL dos extratos, comparável ao valor médio de amoxicilina. Para a estirpe ATCC 51.299, nenhum extrato demonstrou ação comparável ao cloranfenicol ou à amoxicilina. Em relação a atuação sobre a formação do biofilme, observou-se que o extrato de *L. camara* na concentração de 1000 µg/mL não interfere na ação da amoxicilina. Conclui-se, portanto, que os extratos de espécies vegetais das famílias Verbenaceae, Hypericaceae e Rubiaceae são promissores como inibidores do crescimento do *E. faecalis* in vitro, recomendando-se mais pesquisas para estabelecer se estes extratos apresentam ou não eficácia na sua aplicação clínica na busca de tratamentos alternativos na doença bucal.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Enterococcaceae. Alterações Bucais. Antimicrobianos.

1 INTRODUÇÃO

As patologias da cavidade oral, especialmente das doenças periodontais e cáries dentárias, são consideradas um problema de Saúde Pública, capazes de ocasionar impactos negativos para comunidade e aumento na procura por tratamento e intumescência da demanda dos postos de saúde (Spezzia, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) quase metade da população mundial sofre com doenças bucais, afetando cerca de 3,5 bilhões de pessoas. Dentre os principais agravos bucais, as doenças periodontais e cárie representam grande parte dessas ocorrências. Conforme dados mundiais, ainda hoje, 43,75% da população mundial tem cáries (OMS, 2022).

Neste contexto, o tratamento odontológico tradicional para infecções bacterianas foca principalmente na remoção da causa e, como medida auxiliar, no uso de antibióticos. A administração de antimicrobianos pode atuar tanto na eliminação quanto na inibição do crescimento bacteriano, ou ser utilizada de forma profilática em pacientes com distúrbios sistêmicos e/ou com risco de desenvolver endocardite bacteriana (Almeida et al. 2014). No entanto, o uso excessivo e/ou de forma inadequada dos antibióticos podem comprometer de forma negativa a resposta clínica do paciente, podendo aumentar os custos com a hospitalização, além de contribuir com o aparecimento de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos. Isso significa que os medicamentos que anteriormente eram eficazes no tratamento de infecções tornam-se menos ou completamente ineficazes, dificultando o controle e tratamento dessas infecções (Brigantini et al., 2016).

Uma abordagem promissora para combater a resistência bacteriana é o uso de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas medicinais, que contêm compostos bioativos com potencial antimicrobiano contra estirpes resistentes (Isola, 2020; Moro et al., 2018) e relacionadas a patologias orais, como o *S. mutans* (Silva; de Oliveira; Coelho, 2024). Esses compostos podem possuir mecanismos de ação distintos dos antibióticos tradicionais, oferecendo uma alternativa eficaz. Além disso, o desenvolvimento de produtos naturais para tratar infecções bucais se destaca por seu baixo custo, menor risco de efeitos adversos e comprovada biocompatibilidade, tornando-se uma opção viável na medicina alternativa (Da Silva Sales et al., 2023).

Os compostos naturais e fitoterápicos utilizados na saúde bucal se tornam aliados em programas preventivos e curativos, prevenindo o crescimento bacteriano, a adesão e a colonização, além de ação anti-inflamatória, anti-hemorrágica e anestésica (Domingues et al., 2021). Na Odontologia, por exemplo, a inserção dos produtos naturais pode auxiliar no controle do crescimento do biofilme dental. Pode-se destacar que os componentes bioativos de alguns produtos naturais possuem potencial para prevenção e tratamento da doença periodontal, auxiliando na redução da comunidade microbiana subgengival associada à formação da gengivite e candidíase oral (Sakagami et al., 2018; Brasil, 2022).

Relatos da literatura demonstram que tanto substâncias isoladas quanto extratos de plantas podem apresentar potencial ação sobre *E. faecalis*. Destaca-se, os estudos experimentais com extrato rico em ácido ent-kauneróico (KAMg) obtido a partir de *Mikania glomerata*, o guaco (Moreira et al., 2016); extrato de pericarro da *Garcinia mangostana* (mangostão) (Janardhanan et al., 2017); flavonoides por Gutiérrez-Venegas et al. (2019) e o extrato metanolíco de *Rumex nervosus*, planta utilizada em fitoterápico na Arábia Saudita (Al-Farhan et al., 2022).

Os resultados da ação de extratos de plantas têm sido promissores mesmo em estirpes resistentes de *E. faecalis*. O extrato de *Psidium guajava*, por exemplo, pela ação de compostos fenólicos e flavonoides, inibe o crescimento de *E. faecalis* por comprometendo a integridade da membrana celular (Da Silva Sales et al., 2023) e o extrato de *Casearia sylvestris* pela presença de ácido caseário também pode interferir na estrutura celular da bactéria, causando sua inibição e possível morte (Vicari et al., 2022). Esses extratos são considerados alternativas promissoras devido à sua eficácia mesmo contra estirpes resistentes, ampliando as opções de tratamento no contexto odontológico.

As plantas das famílias Verbenaceae, Hypericaceae e Rubiaceae são reconhecidas na medicina popular e, cientificamente, por seus componentes bioativos. Dessa plantas, estudos têm sido realizados com extratos dos gêneros *Lippia*, *Lantana*, *Genipa* e *Hypericum*, com resultados promissores para a atividade contra diferentes micro-organismos. Assim, tendo em vista os escassos relatos de atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, este estudo visou verificar a ação inibitória e sobre a formação de biofilme dos extratos brutos das espécies vegetais *Lantana camara*, *Lippia macrophylla*, *Genipa americana*, *Hypericum connatum* e *H. caprifoliatum* sobre duas estirpes de *E. faecalis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMOS

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas as estirpes de *E. faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz ATCC 51.299 e *E. faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz (ATCC 29.212). Utilizou-se também *Staphylococcus aureus* (ATCC 29.213) para controle de formação de biofilme. As estirpes foram gentilmente cedidas por Acassia Lippi do Laboratório Fleury, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

As bactérias foram confirmadas quanto à morfologia (Gram) e às características fenotípicas (catalase, oxidase e susceptibilidade a antimicrobianos) e armazenadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz em meio Lignière. Para utilização, estas foram

reativadas em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (do inglês Brain Heart Infusion - BHI) 24h antes dos experimentos.

A fim de verificar a susceptibilidade dos microrganismos selecionados realizou-se teste de susceptibilidade aos antimicrobianos descrito pela BrCast (2021) frente aos antimicrobianos de uso comum na clínica odontológica tais como amoxicilina (10 µg; CECON, São Paulo, Brasil), e Vancomicina (10 µg; CECON, São Paulo, Brasil) através do método de difusão em ágar, conforme as normas padrão da BrCAST (2021) com modificações. Para isso, os inóculos foram padronizados a 0,5 na escala MacFarland e espalhados totalmente em placa de Petri com ágar Muller-Hinton (Kasvi, Paraná, Brasil) acrescido de 5% de sangue humano com anticoagulante. Após secagem do inóculo na placa, dispôs-se os discos contendo antimicrobianos sobre o ágar assepticamente. A placa foi incubada a 37 °C por 18 h em microaerofilia, após o qual o diâmetro do halo de inibição foi medido em milímetros e analisado quanto aos padrões reconhecidos para cada antimicrobiano quanto à sensível (S) ou resistente (R).

2.2 EXTRATOS VEGETAIS SELECIONADOS

As espécies colhidas no estado da Bahia, entre as cidades de Ilhéus e Itacaré, *Lippia macrophylla* (HUESC21.065), *Lantana camara* (HUESC21.064) e *Genipa americana* (13.923), foram identificadas pelo botânico e registradas no herbário da UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz). Os projetos envolvendo os extratos dessas plantas estão registrados no Sistema de gestão do patrimônio genético e conhecimento tradicional associado brasileiro (SISGEN) sob número A049687, A2153BD e A7C08DC, respectivamente.

Os extratos etanólicos das *Lantana camara* e *Lippia macrophylla* e dos galhos de *Genipa americana* foram obtidos a partir de material seco e triturado, macerado em etanol PA em três ciclos de 24 h e evaporados até obtenção de massa seca que foi posteriormente armazenada a 4-8°C, conforme descrição em Silva (2016) e Codignoto et al. (2017). Os extratos etanólicos foram, ainda, solubilizados em dimetilsulfóxido a 100 mg/mL e armazenado a -20°C até utilização.

As espécies de *H. connatum* e *H. caprifoliatum*, foram colhidas em 2006, no estado do Rio Grande do Sul, identificadas por botânico e a exsicata guardada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN/UFRGS). Os extratos hexânicos foram obtidos pelo grupo de Farmacognosia da UFRGS, liderados pela profa. Gilsane Lino Von Poser e estão descritos em Conceição et al. (2014). O acesso às plantas foi obtido em registro IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (n. 003/2008; Protocolo 02000.001717/2008 - 60) e encontram-se registradas no Sisgen sob número A97E6BC.

2.3 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Para a determinação do percentual de inibição do crescimento microbiano dos extratos de plantas, adotou-se a técnica descrita em Söderling et al. (2008), com modificações. Os extratos solubilizados em DMSO foram diluídos em BHI e testados nas concentrações de 0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mg/mL. A partir das diluições previamente preparadas, 90 µL dos tratamentos nas respectivas concentrações foram distribuídos em microplaca de 96 poços, sendo em seguida adicionado 10 µL do inóculo bacteriano que foi ajustado a 1,0 na escala Mc Farland, de modo que todos os poços da microplaca acomodassem um volume final de 100 µL.

Cada teste foi realizado em triplicata e repetido três vezes. Como controle positivo, utilizou-se os antibióticos cloranfenicol a 50 µg/mL e amoxicilina a 0,32 µg/mL (valor de ponto de corte BrCast, 2023), como controles negativos amostras dos extratos descritos na menor concentração testada, o inóculo bacteriano, além de poços contendo apenas BHI. As microplacas foram armazenadas a 36±1 °C. Após 24 horas de crescimento bacteriano, realizou-se leitura em espectrofotômetro (EZread, Analítica) a 450 nm de comprimento de onda. Para avaliar o percentual de inibição dos extratos utilizou-se a fórmula a seguir: % Inibição = $\chi\text{DOt}\cdot100/\chi\text{DOBac}\cdot100$. Em que: DOt_{450nm} = densidade óptica em comprimento de onda de 450 nm dos tratamentos; DOBac_{450nm} = densidade óptica em comprimento de onda de 450 nm do inóculo bacteriano.

Também, aplicou-se 10 µL do corante resazurina (Aldrich Chemistry) a 0,01% concentração final em cada um dos poços da microplaca e aguardou-se 1 a 2 h para verificar a viabilidade bacteriana. A ação bactericida foi avaliada conforme coloração azul ou rosa, caracterizando ausência ou presença de crescimento bacteriano após 24 h, respectivamente.

Os resultados foram armazenados em planilha Excel e os gráficos foram elaborados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5 (2007). A eficácia de inibição dos extratos de plantas foi comparada ao cloranfenicol e à amoxicilina através dos testes estatísticos Oneway ANOVA seguido de teste Tukey e teste t. Para tanto, considerou-se o intervalo de confiança de 95 % ($p<0,05$).

2.4 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE EXTRATO E AMOXICILINA PELO MÉTODO DE CHECKERBOARD

Para avaliar o efeito da combinação entre o extrato vegetal e antimicrobiano, utilizou-se o método de checkerboard descrito em Fernández-Cuenca et al. (2003), com modificações.

Para o teste, optou-se pelo extrato de *L. camara* na maior concentração testada (1000 µg/mL) devido à disponibilidade do extrato em laboratório.

A amoxicilina foi escolhida por ser o antimicrobiano de primeira escolha na clínica odontológica. As concentrações escolhidas da amoxicilina foram inferiores a 10 µg/mL conforme cut-off (10 µg/mL) publicado pela BrCast (2023). Também, pela técnica de microdiluição em caldo, estabeleceu-se a concentração inibitória mínima (CIM) da amoxicilina para as duas estirpes de *E. faecalis* em uso no experimento, obtendo-se o valor de 0,31 µg/mL para as duas estirpes.

Para realização do teste, 45 µL de cada substância duas vezes concentrada foram adicionadas às linhas e colunas da placa de 96 poços em fundo chato. Nas colunas, foram adicionadas concentrações de amoxicilina em concentrações finais de 0,01 a 10 µg/mL e nas linhas foram adicionados 45 µL de *L. camara* de 15,6 a 1000 µg/mL.

Os inóculos bacterianos das duas estirpes de *E. faecalis* ATCC 51.299 e ATCC 29.212 foram ajustados a 1,0 na escala McFarland e 10 µL dos mesmos foram distribuídos em todos os poços. Após 24 horas de incubação a 36,5 °C, em microaerofilia, adicionou-se 10 µL de resazurina a 0,1 % em cada orifício. Após 1 a 2 horas, realizou-se a determinação da CIM para cada substância na combinação entre elas. Para interpretação da interação calculou-se as concentrações inibitórias fractais (CIF) utilizando-se a fórmula descrita em Tong et al. (2006): CIF (A) = CIM (A) na combinação/CIM (A) sozinho; CIF (B) = CIM (B) na combinação/CIM (B) sozinho; ΣCIF = CIF (A) + CIF (B). Os resultados foram interpretados conforme valor de ΣCIF: ΣCIF – ≤ 0,5 corresponde a efeito sinérgico; ΣCIF – ≤ 0,75 corresponde a efeito parcialmente sinérgico; ΣCIF – > 4 corresponde a efeito antagônico; ΣCIF entre 0,75 e 4 corresponde à indiferença.

2.5 TESTE DE INTERFERÊNCIA DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

No ensaio de interferência na formação do biofilme utilizou-se o método de cristal violeta. Para a realização da técnica, inóculos bacterianos foram ajustados a 0,5 na escala McFarland. Em seguida, placas de 96 poços foram preenchidas com 100 µL dos diferentes tratamentos na concentração final a ser testada. Os tratamentos consistiram em amoxicilina a 0,31 µg/mL e extrato etanólico de *L. camara* a 1000 µg/mL. Após, 100 µL dos inóculos foram adicionados a cada orifício. Como controle de formação de biofilme, utilizou-se *S. aureus* sem antimicrobiano e com Gentamicina na concentração de 10 µg/mL e sub-MIC de 0,31 µg/mL (BrCast, 2021).

As placas foram mantidas por 48 h em estufa a 36,5 °C, em microaerofilia, e após formação e amadurecimento do biofilme, o meio sobrenadante foi cuidadosamente retirado e a lavagem dos poços realizada com tampão fosfato salina (Phosphate Buffered Saline, PBS) pH 7,4 estéreis para remoção das células planctônicas. Para a fixação das células bentônicas, 200 µL de metanol foram adicionados a cada poço de cultura e deixado agir por 15 min.

Após a remoção do metanol, o biofilme foi deixado para secar em temperatura ambiente e 200 µL de cristal violeta a 1 % foi adicionado a cada orifício. Decorrido 5 minutos de ação, o corante foi retirado e o biofilme lavado delicadamente com PBS por três vezes. Por fim, a biomassa foi solubilizada com 100 µL de etanol 96° para liberar e homogeneizar o conteúdo dos poços. Após 10 minutos, realizou-se leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

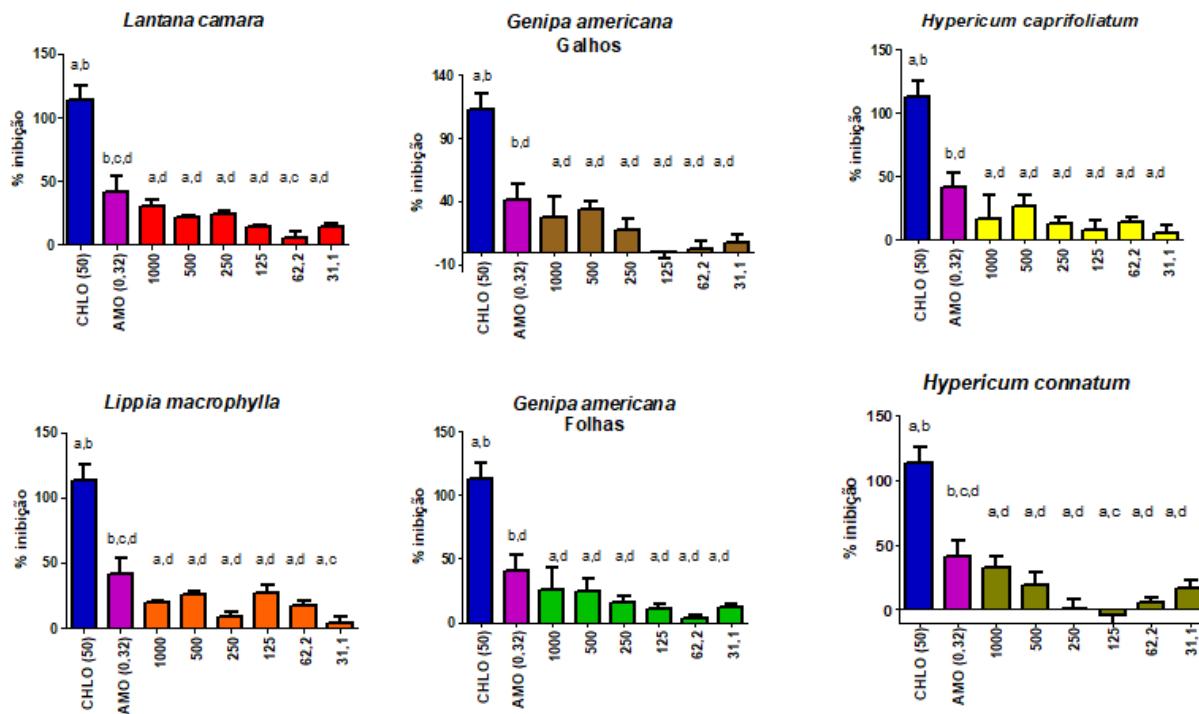
Os resultados foram armazenados em planilha Excel e os gráficos foram elaborados utilizando o programa GraphPad Prism v. 5 (2007). A influência dos extratos de plantas com ou sem a combinação com amoxicilina sobre a formação de biofilme analisada através dos testes estatísticos Oneway ANOVA seguido de teste Tukey e teste t. Para tanto, considerou-se o intervalo de confiança de 95 % ($p<0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por alternativas naturais no tratamento de infecções causadas por *E. faecalis* tem ganhado destaque na Odontologia, especialmente devido à crescente resistência bacteriana aos antibióticos tradicionais. A literatura existente demonstra que os extratos de plantas possuem um amplo espectro de atividades antimicrobianas e podem ser valiosas alternativas para o tratamento odontológico. Desta feita, neste trabalho, observamos o efeito inibitório com característica bacteriostática de extratos de plantas da Mata Atlântica sobre *E. faecalis*.

Neste estudo, para ambas as estirpes de *E. faecalis*, os extratos apresentaram efeito bacteriostático, visto pela viabilidade após 24 horas. Quanto ao percentual de inibição, para a estirpe de *E. faecalis* ATCC 29.212 (Fig. 1), todos os extratos apresentaram resultados significativamente ($p<0,01$) inferiores ao do cloranfenicol ($113,1 \% \pm 24,6$). Entretanto, em comparação à Amoxicilina, cujo percentual de inibição foi de ($40,9 \% \pm 24,52$), o extrato etanólico de *L. camara* ($30,2 \% \pm 11,02$) e o extrato hexânico de *H. connatum* ($32,42 \% \pm 17,07$), ambos na concentração de 1000 µg/mL, e o extrato etanólico dos galhos de *G. americana* ($33,21 \% \pm 13,12$) a 500 µg/mL foram comparáveis em percentual de inibição a este antimicrobiano.

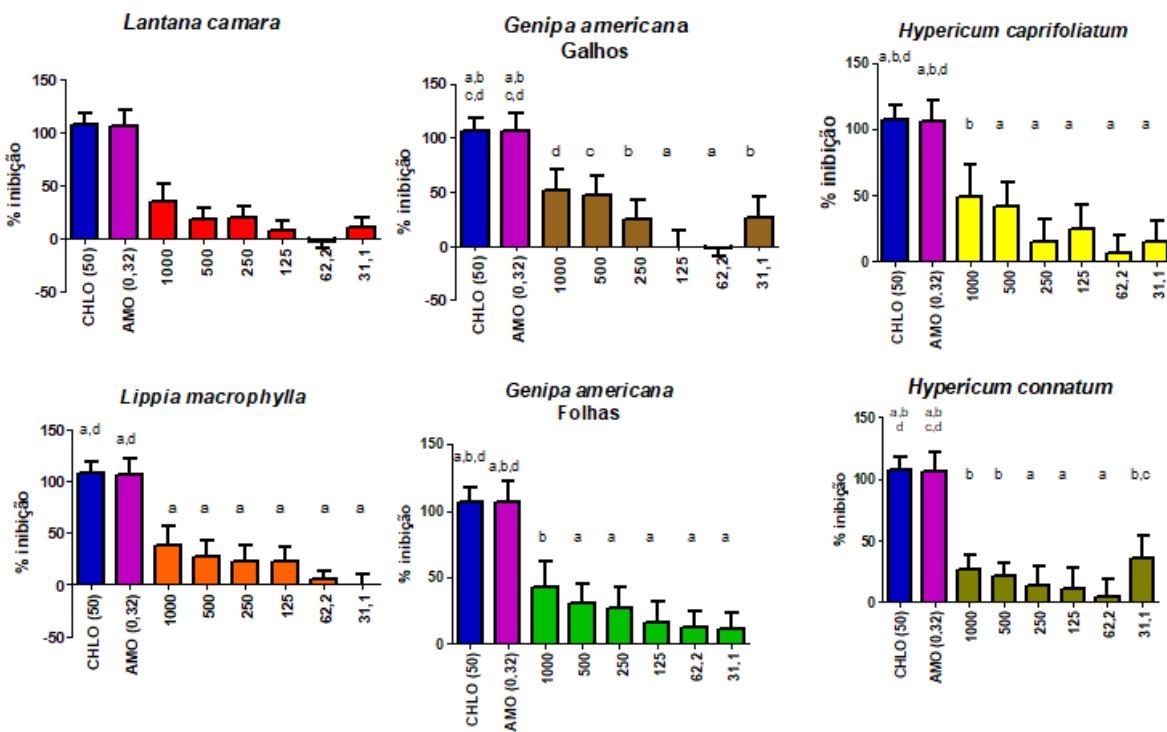
Figura 1. Percentual de inibição de cloranfenicol, amoxicilina e extratos de plantas sobre a estirpe de *E. faecalis* ATCC 29.212 pela técnica de microdiluição em caldo



Legenda: CHLO – cloranfenicol a 50 µg/mL; AMO – amoxicilina a 0,32 µg/mL. Nota: Comparação utilizando o teste t em nível de 5 % de significância, em que a: $p < 0,001$; b: $p < 0,05$; c: $p < 0,5$; d não há diferença significativa entre os tratamentos.

Para a estirpe ATCC 51.299 de *E. faecalis*, além do mesmo efeito bacteriostático, nenhum extrato demonstrou ação comparável aos dois antimicrobianos utilizados. Todas as amostras apresentaram porcentagens médias de inibição abaixo de 50 % em todas as concentrações testadas (Fig. 2).

Figura 2. Percentual de inibição de cloranfenicol, amoxicilina e extratos de plantas sobre a estirpe de *E. faecalis* ATCC 51.299 pela técnica de microdiluição em caldo



Legenda: CHLO – cloranfenicol a 50 µg/mL; AMO – amoxicilina a 0,32 µg/mL. Nota: Comparação utilizando o teste t em nível de 5 % de significância, em que a: p<0,001; b: p<0,05; c: p<0,5; d: não há diferença significativa entre os tratamentos.

Estudos como os de Tonino-Rivera et al. (2016) e Oliveira et al. (2018) mostraram que espécies do gênero *Lippia* têm potentes propriedades antimicrobianas, sendo eficazes contra diversas estirpes bacterianas incluindo *Streptococcus mutans*, agente importante na saúde bucal. Silva (2016) destacou que os extratos de *Lantana camara* e *Lippia macrophylla* mostraram inibição significativa do herpesvírus suíno tipo 1, sugerindo um amplo espectro de atividade antiviral. Com o presente trabalho, abre-se mais uma oportunidade para o estudo das possibilidades terapêuticas conta micro-organismos de plantas do gênero Verbenaceae.

Quando às espécies do gênero *Hypericum*, destaca-se o resultado inédito do extrato hexânico de *H. connatum* sobre a estirpe ATCC 29.212, cuja ação foi comparável ao do antimicrobiano amoxicilina. O presente estudo reitera o potencial antibacteriano dessa espécie vegetal, tendo em vista que estudo anterior realizado por Fratianni et al. (2013) já demonstrava atividade antibacteriana de amplo espectro e inibição da regulação do quorum sense bacteriano por extrato etanólico rico em polifenóis.

O potencial biológico, incluindo a atividade antimicrobiana, da espécie *Genipa americana* tem sido bem relatado na literatura e sintetizado em revisão realizada por Assis et al. (2023). Codignoto et al. (2017), por exemplo, demonstraram a ação bactericida do extrato de *G. americana* sobre *E. coli* e

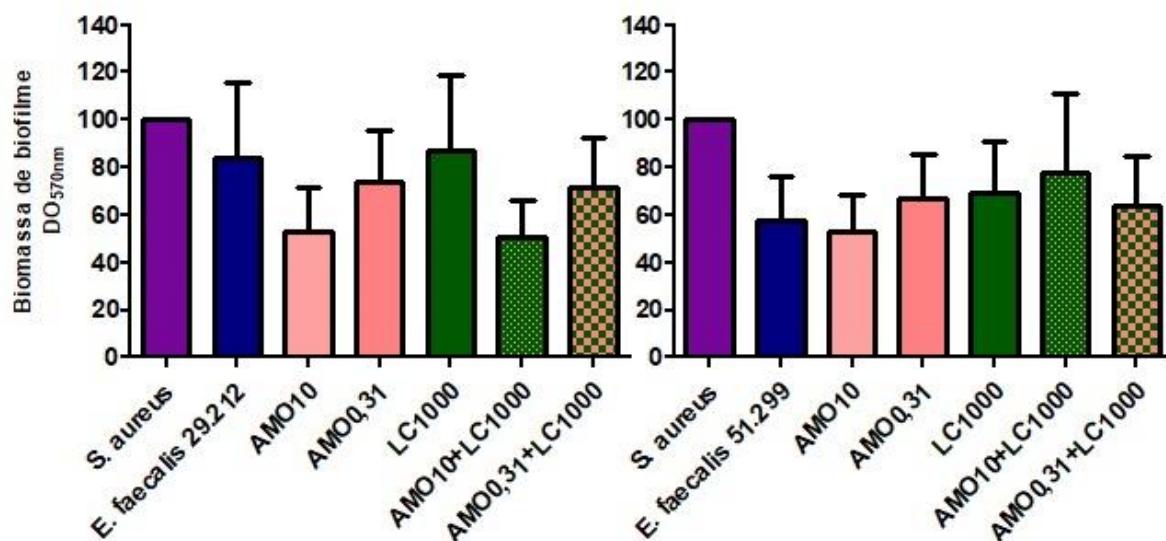
bacteriostática do extrato dos frutos sobre *S. aureus*. Cabe notar que, no presente estudo, apresentamos a ação bacteriostática do extrato etanólico dos galhos dessa planta sobre *E. faecalis*, ampliando o espectro de ação deste extrato. Tendo em vista o resultado semelhante ao da *S. aureus* sugere-se uma ação diferenciada associada ao tipo de parede bacteriana instigando mais estudos sobre o mecanismo de ação desses extratos vegetais.

Para os testes de interação entre extrato de planta e antimicrobiano, para ambas as estirpes, observou-se que a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *L. camara* foi de 16 µg/mL quando em conjunto com a amoxicilina e a CIM desse antimicrobiano quando em combinação com o extrato de *L. camara* não foi alterado, permanecendo em 0,31 µg/mL. Dessa feita, quanto ao efeito combinado de *L. camara* com amoxicilina, observou-se que o ΣCIF foi de 1,016, indicando como resultado, efeito indiferente. Destaca-se aqui, que se por um lado não se tem um efeito sinérgico ou antagônico sobre a amoxicilina, obtém-se uma optimização do efeito do extrato da planta com a possibilidade de utilização de menor quantidade de extrato em estudo futuros, na presença desse antimicrobiano.

Quanto a formação do biofilme, observou-se que a estirpe ATCC 29.212 foi capaz de formar massa de biofilme comparável à estirpe de *S. aureus* ATCC 29.213 formadora de biofilme (84,12 %) (Fig. 3). Já a estirpe ATCC 51.299, resistente a Vancomicina, formou 42,61 % a menos de biomassa que a estirpe *S. aureus*, formadora de biofilme. Observando-se a ação da amoxicilina sobre a formação de biofilme das duas estirpes de *E. faecalis*, embora sem significância estatística ($p=0,144$), na concentração de 10 µg/mL, a biomassa de biofilme da estirpe ATCC 29.212 demonstrou uma redução importante na biomassa de 31,37%. Para a estirpe ATCC 51.299 esta redução foi menor na mesma concentração, sendo apenas cerca de 5%. No caso do tratamento com a concentração mínima inibitória (0,31 µg/mL), remarca-se um aumento na biomassa de 9,19 %.

Em relação ao tratamento das estirpes de *E. faecalis* com o extrato etanólico de *L. camara* na concentração de 1000 µg/mL, observou-se aumentou na biomassa bacteriana que foi mais intensa para a estirpe ATCC 51.299 (11,99 %) do que para a estirpe ATCC 29.212 (3,04 %). Já no tratamento associado do extrato de *L. camara* com a amoxicilina, observou-se que o extrato não interferiu na ação da amoxicilina para a estirpe ATCC 29.212. Entretanto, para a estirpe ATCC 59.212, observou-se um leve aumento (10,58 %) na produção da biomassa.

Figura 3. Avaliação da ação de extrato etanólico de *L. camara* sobre a formação de biofilme em estirpes de *E. faecalis* ATCC 29.212 e ATCC 51.299



Legenda: *S. aureus*: Staphylococcus aureus ATCC 29.213; *E. faecalis* 29.212: Enterococcus faecalis estirpe ATCC 29.212; AMO10: tratamento de *E. faecalis* com amoxicilina a 10 µg/mL; AMO0,31: amoxicilina a 0,31 µg/mL; LC1000: extrato etanólico de *Lantana camara* a 1000 µg/mL.

Os estudos revisados acerca dos biofilmes trazem contribuições importantes, elucidando tanto os fatores que influenciam a formação desses biofilmes quanto as interações com o hospedeiro. Um ponto de convergência entre os estudos é a capacidade inata de *E. faecalis* em formar biofilmes em diversos ambientes e superfícies, independentemente da presença de proteínas ou genes específicos, como observado por Kristich et al. (2004) e Guerreiro-Tanomaru et al. (2013). Ambos os estudos destacaram que a formação de biofilmes ocorre em uma variedade de substratos e que fatores externos, como o tipo de superfície e o ambiente de cultivo, podem influenciar a organização e o crescimento desses biofilmes. O estudo de Kafil et al. (2016) evidencia que a exposição à gentamicina induz um aumento significativo na formação de biofilmes e na expressão de genes associados a fatores de colonização, o que destaca o impacto direto que os agentes antimicrobianos ou, no caso do presente estudo, extratos de plantas podem ter sobre o comportamento do patógeno.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo, dos produtos vegetais estudados, destacamos a ação dos extratos de *L. camara*, *L. macrophylla* e *H. connatum* sobre *E. faecalis*. Os extratos dessas plantas apresentaram um potencial promissor como agentes antimicrobianos, com variações em suas eficácia conforme diferentes estirpes de *E. faecalis* e combinação ao antibiótico amoxicilina. Entretanto, embora os resultados tenham sido promissores, a necessidade de otimização e investigações adicionais são

necessárias. A interação dos extratos com outros antimicrobianos de uso na clínica médica é essencial e estudos mais aprofundados envolvendo os genes do *E. faecalis*, tais como os da regulação da formação do biofilme, podem agregar informações importantes sobre a influência dos extratos de plantas sobre esta bactéria. Ainda, o estudo vem a contribuir com um campo de importância da saúde pública, que é a introdução de extratos naturais na Odontologia representando uma alternativa viável como tratamento adjuvante, especialmente como opções com menor toxicidade e custo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Renata Lima Santos Oliveira

REFERÊNCIAS

- AL-FARHAN, A. H. et al. In vitro antimicrobial activity of medicinal plant Rumex Nervosus against selected oral pathogens. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, v. 14, n. 1, p. S753, 2022.
- ALMEIDA, R. M. et al. Uso de antimicrobianos sistêmicos e locais no tratamento da Periodontite Agressiva. *Oral Science*, v. 6, n. 1, p. 4-9, 2014.
- ASSIS, R. C. et al. Biological properties of bioactive compounds from the fruit and leaves of the genipap tree (*Genipa americana L.*): A systematic review. *Food Bioscience*, v. 53, p. 102514, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102514>.
- BRIGANTINI, L. C. et al. Antibióticos em Odontologia. *Revista Uningá*, v. 49, n. 1, p. 121-127, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doença periodontal é uma das principais causas de perda total de dentes: conheça outros tipos de infecções. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/outubro/doenca-periodontal-e-uma-das-principais-causas-de-perda-total-de-dentes-conheca-outros-tipos-de-infeccoes>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- BRCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Tabela-pontos-de-corte-BrCAST-15-03-2023.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2024.
- CODIGNOTO, P. S. C. et al. In vitro cytotoxicity and biological activities of *Genipa americana* (Rubiaceae) ethanolic extracts. *African Journal of Microbiological Research*, v. 11, n. 9, p. 385-390, 2017.
- CONCEIÇÃO, A. O. et al. *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum connatum* affect human trophoblast-like cells differentiation and Ca^{2+} influx. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, n. 5, p. 367-373, 2014.
- DA SILVA SALES, A. P. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Psidium guajava* contra *Enterococcus faecalis*. *Revista Foco*, v. 16, n. 11, p. e3240-e3240, 2023.
- DOMINGUES, J. J. et al. Uso de fitoterápicos e demais componentes vegetais e minerais na fabricação de produtos odontológicos naturais: revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 3, p. 1-10, e57610313678, 2021.
- FERNÁNDEZ-CUENCA, F. et al. In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*, v. 49, n. 1-2, p. 24-26, 2003.
- FRATIANNI, F. et al. Biochemical composition, antimicrobial activities, and anti-quorum-sensing activities of ethanol and ethyl acetate extracts from *Hypericum connatum* Lam. (Guttiferae). *Journal of Medicinal Food*, v. 16, n. 5, p. 454-459, 2013.

FIOCRUZ. Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global. [artigo]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/antibioticos-resistencia-de-microrganismos-e-grave-ameaca-saude-global>. Acesso em: 05 set. 2019.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. et al. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of Endodontics (JOE)*, v. 39, n. 3, p. 346-350, 2013.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G. et al. Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque. *Heliyon*, v. 5, n. 12, e03013.13, 2019.

ISOLA, G. Current evidence of natural agents in oral and periodontal health. *Nutrients*, v. 12, n. 585, p. 1-4, 2020.

JANARDHANAN, S. et al. Antimicrobial effects of *Garcinia mangostana* on cariogenic microorganisms. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 1, p. ZC19, 2017.

KAFIL, H. S. Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Pathogenesis*, v. 92, p. 30-35, 2016.

KRISTICH, C. J. et al. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 1, p. 154-163, 2004.

MOREIRA, M. R. et al. Ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: In vitro activity against bacteria responsible for dental caries. *Fitoterapia*, v. 112, p. 211-216, 2016.

MORO, M. G. et al. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, v. 53, n. 3, p. 288-297, 2018.

OLIVEIRA, T. B. et al. O uso da Lippia no tratamento das doenças periodontais. *Journal of Dentistry & Public Health*, v. 9, n. 3, p. 227-237, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>. Acesso em: 17 out. 2024.

SPEZZIA, S. Uma análise das políticas públicas voltadas para os serviços de saúde bucal no Brasil. *Revista Brasileira de Odontologia*, Rio de Janeiro, v. 72, n. 1/2, p. 109-113, 2015.

SAKAGAMI, H. et al. Recent progress of basic studies of natural products and their dental application. *Medicines*, v. 6, n. 1, p. 4, 2018.

SILVA, L. D. Perfil fitoquímico e biológico de três espécies de *Lantana* localizadas no Sul da Bahia. Ilhéus, BA: UESC, 2016. 1 CD-ROM. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Botânica. Disponível em: https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS_2a25220de4d426fd6847df32f6fa7c68. Acesso em: 17 out. 2024.

SILVA, W. A. M.; DE OLIVEIRA, A. M. B. M.; COELHO, L. F. O. Revista ARACÊ, v. 6, n. 3, p. 9363-9376, 2024.

SÖDERLING, E. M. et al. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol concentrations. Current Microbiology, v. 56, n. 4, p. 382-385, 2008.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. Journal of Ethnopharmacology, v. 194, p. 749-754, 2016.

TONG, W. et al. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 28, n. 5, p. 454-456, 2006.

VICARI, N. G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de folhas e galhos de *Casearia sylvestris* contra *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina. Acta Biologica Brasiliensis, v. 5, n. 1, p. 33-45, 2022.