



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FRENTE ÀS BACTÉRIAS DA
CAVIDADE ORAL**

Bolsista: Jéssica Mayumi Mattos Miki, CNPq

MANAUS
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0043/2009
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FRENTE ÀS BACTÉRIAS DA
CAVIDADE ORAL

Bolsista: Jéssica Mayumi Mattos Miki, CNPq
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

MANAUS
2010

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas.

Na natureza nada se cria,
nada se perde, tudo se transforma.

Antoine Lavoisier

RESUMO

Todos os microrganismos que habitam o interior das plantas, pelo menos um período de seu ciclo, sem causar nenhum dano aparente são considerados endofíticos. São capazes de produzir metabólitos potencialmente bioativo e do ponto de vista ecológico é extremamente importante, a descoberta de fontes microbianas produtoras de fármacos de alto valor agregado, inclusive para tratamento de *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, os principais microrganismos presentes em patologias bucais e dentais. O objetivo desta pesquisa foi identificar o perfil fitoquímico dos extratos brutos de fungos endofíticos e avaliar a atividade antimicrobiana frente às bactérias da cavidade oral por métodos bioautográficos. Para selecionar os constituintes químicos foram utilizados 15 extratos orgânicos obtidos de cinco espécies de fungos endofíticos. De cada colônia dividida em três porções dos endofíticos selecionados foram retirados fragmentos da região central nos quais foram transferidos para um frasco de Erlenmayer contendo solvente de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e etanol 95%) para extração de biocompostos. Após 48 horas, o extrato bruto foi separado da biomassa por filtração em papel de filtro. O extrato foi levado à secura para evaporação do solvente, em evaporador rotatório. Os extratos foram redissolvidos com o solvente extrativo para determinação do perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana. Para os testes de bioautografia foi utilizada Cromatoplaça de Camada Delgada (CCD). Os extratos brutos foram diluídos no solvente extrativo até obtenção da mesma concentração do padrão de clorhexidina 20mg/mL. Posteriormente, as CCDs foram submetidas ao sistema de eluição de forma a se obter o maior fracionamento dos biocompostos. As substâncias foram observadas em luz UV, ácido sulfúrico ou iodo, determinando-se os respectivos *R_f* (*retention factor*) de cada banda visualizada. Para determinação da atividade antimicrobiana por bioautografia, em condições assépticas, 20 mL de ágar Müeller Hinton a 40 °C, suplementados com 500 µL de suspensão celular (escala de McFarland 1) de todos os microrganismos-teste e 500 µL de Cloreto de Trifeniltetrazoliun-TTC 1,0 % (p/v) foi vertido no cromatograma em placa de Petri medindo (120 mm x 90 mm). Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a atividade antimicrobiana foi avaliada visualizando-se um halo de inibição. Os extratos brutos selecionados para os testes bioautográficos possibilitaram a detecção de substâncias antimicrobianas presentes nos extratos de acetato de etila de *A. speleneus*, *P. simplicissimum*, extratos de hexano de *P. simplicissimum*, *A. janus*, *A. speleneus* e extrato de etanol de *P. simplicissimum* contra *S. mutans* em diferentes zonas de inibição, sugerindo a presença de compostos, porém não foi encontrada atividade antimicrobiana frente a *E. faecalis*. Conclui-se que os extratos de fungos endofíticos apresentaram substâncias bioativas frente a *S. mutans*, mostrando ser objeto de novas pesquisas de princípios biotecnológicos na Odontologia.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; fungos endofíticos; atividade antimicrobiana; bioautografia.

ABSTRACT

All organisms that inhabit the interior of plants, at least one period of their cycle, without causing any apparent damage are endophytic. Such are capable of producing potentially bioactive metabolites, and from an ecologic perspective, the discovery of microbial drug manufactures is extremely important, including for the treatment of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*, the main microorganisms present in oral and dental pathologies. The objective of this research was to identify a phytochemical profile of the brute extracts of the endophytic fungi and evaluate the antimicrobial activity alongside the bacteria of oral cavities by bioautographic means. For the selection of the chemical constituents, fifteen organic extracts were obtained of five species of endophytic fungi. Of each colony divided into three portions of the selected endophytics, fragments were extracted of the central region which were deposited into an Erlenmayer flask containing solvent of increasing polarity (hexane, ethyl acetate, or ethanol 95%) for the extraction of biocomposites. After 48 hours, the brute extract was separated from the biomass through filtration by filter-paper. The extract was taken to be dried for the evaporation of the solvent, in a rotating evaporator. The extracts were redissolved with the extractive solvent for the determination of the chromatographic profile and antimicrobial activity. For the bioautography tests Chromatoplasma of Thin Layer were utilized. The brute extracts were diluted in the extractive solvent until obtaining the same concentration of chlorhexidine 20mg/ml. Subsequently, the Chromatoplasmas of Thin Layer were submitted to the elution system in order to obtain the largest fractions of biocomposites. The substances were observed under UV light, in sulfuric acid or iodine, determining their respective R_f (retention factor) of each spot visualized. For the determination of the antimicrobial activity per bioautography in aseptic condition, 20 mL of agar Müller Hinton at 40 °C, supplemented with 500 µL of cellular suspension (McFarland scale 1) of all test micro organisms and 500 µL of Chloride Trifeniltetrazolium-TCC 1.0% (w/v) was poured in the chromatogram into a Petri dish measuring (120 mm x 90 mm). After solidification of the center, the plates were incubated at 37°C for 24 hours and the antimicrobial activity was evaluated by viewing from the inhibition area. The selected brute extracts allowed for the detection of antimicrobial substances present in the ethyl acetate extracts of *A. speleneus*, *P. simplicissimum*, hexane extracts of *P. simplicissimum*, *A. Janus*, *A. speleneus* and ethanol extract of *P. simplicissimum* against *S. mutans* in different areas of inhibition, suggesting the presence of composites, nevertheless no antimicrobial activity was found against *E. faecalis*. It is concluded that fungi extracts presented bioactive endophytic substances against *S. mutans*, proven to be the object of further research of principles of biotechnological dentistry.

Keywords: *Streptococcus mutans*; endophytic fungi, antimicrobial activity; bioautography.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	08
2.	OBJETIVOS.....	11
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6.	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24
	AGRADECIMENTOS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Todos os microrganismos que habitam o interior das plantas, pelo menos num período de seu ciclo vital, sem causar nenhum dano aparente podem ser classificados como endofítico. Esse grupo de microrganismo tem capacidade de produzir metabólitos potencialmente bioativos e são diferentes dos epífitos, por colonizarem o interior das plantas e não a superfície. Além disso, também se diferenciam dos fitopatógenos por que estes causam doenças a seus hospedeiros (AZEVEDO, 2000; ARAÚJO et al., 2002).

Do ponto de vista ecológico é extremamente importante, a descoberta de fontes microbianas produtoras de fármacos de alto valor agregado, porém são produzidos em quantidades reduzidas por diversas espécies vegetais. Estas, devido ao extrativismo predatório estão ameaçadas de extinção. Nesse sentido, os endofíticos apresentam-se como uma perspectiva muito importante para garantir a preservação desses vegetais, uma vez que para o isolamento de espécies endofíticas há a necessidade de apenas uma pequena porção de tecido vegetal, mantendo-se assim a produção de compostos que asseguram a vida de pessoas afetadas por inúmeras doenças (PRINCE, 2008).

Vários estudos foram feitos verificando a bioatividade de metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados de plantas medicinais em diversas áreas (OLIVEIRA, 2008; PRINCE, 2008). Assim sendo, estudos com a finalidade de identificar compostos com atividade para o tratamento de bactérias da cavidade oral, a exemplo de *Streptococcus mutans*, um dos agentes etiológicos da cárie dental de grande importância científica e, constituintes da microbiota oral normal, são muito importantes para ações profiláticas (BARBOSA, et al., 2008).

A cárie dental é uma doença infecto-contagiosa e incurável, de caráter multifatorial, e que acomete cerca de 95% da população mundial de forma diferente para cada indivíduo; resulta da colonização de microrganismos na superfície do esmalte dental, que metabolizam

carboidratos fermentáveis e produzem ácidos (NARVAI, 2000; STAMFORD et al., 2005; RODRIGUES, 2008).

Assim, a cárie dental pode ser entendida como o resultado do desequilíbrio do processo físico-químico de desmineralização/remineralização (des/re) da estrutura dental em decorrência do meio bucal. Este processo é basicamente reações químicas de ganho/perda de íons entre o esmalte e o meio (des/re), é fisiológico e depende do equilíbrio hidrogeniônico entre o meio ambiente bucal (biofilme dental e saliva) e o esmalte dental. Quando o processo de desmineralização predomina sobre a remineralização resulta em perda mineral. Inicialmente essa perda é imperceptível, porém, podemos observar o aparecimento clínico das lesões de cárie, e com o avanço, pode-se comprometer o periodonto e a polpa, levando até a perda do elemento dental (BANDEIRA et al., 2008).

A maioria dos casos de necrose pulpar geralmente se inicia com a invasão bacteriana e de suas toxinas via lesão de cárie (ILARA et al., 2005). As principais vias de invasão dos microrganismos à polpa e periápice são através de uma cavidade aberta causada por trauma; intervenções dentárias ou cárie; pelos canalículos da dentina cortada ou cariada; através do sulco gengival e por invasão ao longo da membrana periodontal nas diversas formas da doença periodontal; por extensão da infecção periapical de dentes vizinhos infectados; pela corrente sanguínea por uma bacteremia ou septicemia (BURNETT et al., 1978). Estes microrganismos e produtos chegam ao canal, penetram nos túbulos dentinários e propagam-se para o sistema de canais radiculares, incluindo ramificações, istmos e deltas apicais alcançando a região periapical resultando em lesões do periápice (GOMES, 2000). Todavia, a partir da instalação da necrose pulpar, ocorre a infecção. Quanto maior o tempo de necrose, maior será a quantidade de microrganismos no sistema de canais radiculares. Estes representam o principal fator etiológico das patologias perirradiculares (SIQUEIRA-JR, 2001).

A presença de bactérias e toxinas no interior da polpa causa irritações ao tecido, gerando inflamações agudas ou crônicas, e sua intensidade depende da quantidade e intensidade da agressão dos microrganismos, bem como a capacidade de defesa imunológica do hospedeiro (DE DEUS, 1992).

Os microrganismos mais comumente encontrados em polpas vitais e sem inflamação, ou de polpas não expostas nas fases precoces da inflamação são os estreptococos do grupo mutans e não-hemolíticos. As bactérias anaeróbias são capazes de penetrar nos túbulos dentinários em diferentes profundidades. Os enterococos que são difíceis de eliminar dos canais radiculares ocorrem em casos persistentes que não respondem com o tratamento endodôntico convencional, ou seja, com o preparo químico-mecânico do canal radicular. O *Enterococcus faecalis* é o enterococo mais comum, gram-positivo, entérico facultativo (PINHEIRO et al., 2003), além de ser um dos principais responsáveis pelas falhas no tratamento endodôntico (SIQUEIRA-JR, 2001; GOMES et al., 2004).

O hipoclorito de sódio, solução fisiológica, EDTA, ácido cítrico, digluconato de clorexidina e várias outras soluções têm sido empregadas com este propósito, no entanto, ainda não existe um irritante que reúna todas as propriedades de limpeza do canal radicular com ação lubrificante durante a ação de corte dos instrumentos, remoção de *smear layer*, potencial germicida e potencial solvente sobre o exudato, tecido pulpar necrosado e pré-dentina (GOMES, 2000).

Diante do exposto, novos conhecimentos sobre princípios bioativos de metabólitos de origem microbiana associada a plantas podem ser a base de futuros produtos com atividade antagonista aos microrganismos da cavidade oral.

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo, identificar o perfil fitoquímico dos extratos brutos de fungos endofíticos e avaliar a atividade antimicrobiana frente às bactérias da cavidade oral, tais como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus faecalis*, presentes em patologias dentais por métodos bioautográficos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Fungos endofíticos são fungos que, durante certo período de suas vidas, colonizam os tecidos internos de plantas sem causar sintomas a estas (PETRINI, 1992).

A associação com fungos endofíticos pode ser benéfica à planta, pois esses são capazes de produzir metabólitos secundários que podem auxiliar o sistema imunológico da planta no combate a insetos, com produção de toxinas (JARVIS, 1996).

O uso de plantas com fins medicinais para tratamento de várias doenças é uma prática amplamente difundida pela população amazônica. O conhecimento dos benefícios de certas plantas no tratamento de infecções faz parte do acervo cultural e passado de geração a geração. Na Amazônia existe cerca de 50 mil espécies de plantas (aproximadamente 2% estudada), o que representa uma grande fonte de pesquisa para obtenção de antibióticos, anti-inflamatórios, diuréticos, analgésicos, laxantes, antidepressivos e anti-hipertensivos (BANDEIRA, 1998).

Schuch (1999) demonstrou que plantas como o cravo-da-índia, calêndula, barbatimão, rama-de-batata e alecrim apresentam atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, inferindo que poderiam ser eficazes no tratamento da cárie dental. Todas as plantas possuíram atividade antimicrobiana, porém o melhor resultado foi obtido com o uso de cravo-da-índia.

Huang *et al.* (2001) testaram a ação de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais frente a outros fungos e tumores. Os resultados indicaram que esses fungos são importantes em medicina como agentes antimicrobianos e antitumorais.

Os endofíticos surgem como um novo campo de exploração e de novas descobertas biotecnológicas. Com o uso indiscriminado de antibióticos e a conseqüente seleção de cepas de bactérias resistentes a esses medicamentos, é indispensável à busca a novas drogas, para que não haja um retrocesso no tratamento. Considerando que seis, em cada vinte medicamentos relacionados a essa aplicação, têm origem fúngica, os fungos endofíticos, por

ainda serem pouco estudados, principalmente os presentes em espécies tropicais, surgem como um enorme potencial na descoberta de novos produtos (SCHULZ et al., 2002).

Os fungos endofíticos podem agir de maneira antagônica, neutra ou até benéfica para o vegetal hospedeiro, exibindo vários graus de interdependência fisiológica e ecológica. Muitas vezes, os metabólitos produzidos por fungos endofíticos podem ser neutros ou terem ação antagônica para o hospedeiro. Em outros casos, são de grande importância para a farmacologia. Existem pesquisas que comprovam a ação antioxidante de alguns fungos somente quando endofíticos, de grande importância para a indústria de cosméticos (STROBEL et al., 2002), e antitumorais, que podem parar o desenvolvimento ou até impedir a formação de tumores (STROBEL et al., 1997).

Segundo Schulz e Boyle (2002), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas.

Oliveira et al. (2004) verificaram a eficácia antimicrobiana dos extratos etanólicos de barbatimão e guaçatonga na formação de halos de inibição para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces actinomycetencomitans* e *Candida albicans*, em menor escala.

Já na comparação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de barbatimão e de hipoclorito de sódio a 1% e 2,5%, verificou-se a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* com o hipoclorito, mas o barbatimão não inibiu *E. coli*. (OLIVEIRA DA, 2005)

Cafeu et al. (2005) identificaram substâncias antifúngicas isoladas do fungo endofítico *Xylaria* sp. de *Palicourea marcgravii* (rubiaceae) com atividade antagonista frente aos fungos fitopatogênicos de interesse comercial.

A Espinheira-santa é uma planta muito utilizada na medicina popular utilizada no tratamento de úlceras gástricas e problemas digestivos. Figueiredo (2006) isolou fungos

endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart ("Espinheira-santa") e testou quanto à atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas em humanos e fungos fitopatogênicos, sugerindo o grande potencial deste gênero a ser explorado.

Muitos estudos vêm sendo realizados na busca de novos princípios ativos em plantas. Dentre os vários insumos vegetais utilizados na região amazônica para tratamento de doenças, têm-se as preparações caseiras das folhas, vagens ou cascas de espécies vegetais (MACIEL, 2002). São utilizadas na medicina popular como cicatrizante, anti-diabético, antimicótico, anti-anêmico, anti-hemorragico, anti-diarréico, contra tosse, asma, tuberculose, anti-ulceroso, afecções da boca e garganta, estimulante digestivo, diurético, laxante e antimicrobiano (BANDEIRA, 1998; LIMA, 2007; OLIVEIRA, 2008).

Os *Streptococcus mutans*, de todas as bactérias orais, têm sido os microrganismos mais estudados e considerados os maiores responsáveis pela doença cárie (MICHALEKS, 1981; STAMFORD, 2005), no qual são encontrados na boca após erupção dos dentes (FEJERSKOV; KIDD, 2005) e são capazes de colonizar superfícies dentárias e desenvolver cárie em humanos, sendo responsáveis inclusive pelo início do processo cariioso (VAN HOUTE, 1993). Fazem parte da microflora oral normal e podem ser encontrados sobre superfícies dentárias sem desenvolver cárie (BARBOSA, et al., 2008).

Capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, os *Streptococcus mutans* se fixam às estruturas dentárias. Produzem também polissacarídeos intracelulares, que servem como substrato de reserva para continuar a produção de ácido (capacidade acidogênica), mesmo quando não há nutrientes disponíveis no meio. Devido a sua capacidade de crescer, somada à produção de ácido num pH baixo, são denominados estrategistas de pH (BARBOSA et al., 2008).

Nos casos de necrose pulpar, as principais vias de invasão dos microrganismos à polpa e periápice são através de uma cavidade aberta; pelos canalículos da dentina cortada ou

cariada; através do sulco gengival e por invasão ao longo da membrana periodontal nas diversas formas da doença periodontal; por extensão da infecção periapical de dentes vizinhos infectados; pela corrente sanguínea por uma bacteremia ou septicemia (BURNETT et al., 1978; ILARA et al., 2005).

O *Enterococcus faecalis* é o enterococo mais comum, gram-positivo, entérico facultativo responsável pelas falhas no tratamento endodôntico convencional, ou seja, com o preparo químico-mecânico do canal radicular (SIQUEIRA-JR, 2001; PINHEIRO et al., 2003; GOMES et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A prospecção de constituintes químicos foi realizada de acordo com a metodologia de Matos (1997) modificada para extratos brutos de fungos endofíticos. Foram utilizados quinze extratos concentrados de fungos endofíticos obtidos da análise de cinco culturas de fungos endofíticos do laboratório (Quadro 1) e que tiveram atividade antagônica aos microrganismos testados.

Fungos	Registro DPUA
<i>Aspergillus janus</i>	1684
<i>Aspergillus penicilloides</i>	1571
<i>Aspergillus speneus</i>	1567
<i>Penicillium simplicissimum</i>	1568
<i>Penicillium melinii</i>	1565

Quadro 1: Identificação dos fungos endofíticos

Fragmentos da região central da colônia foram divididos em 3 porções. Cada porção foi depositada em um frasco de Erlenmeyer contendo 10 mL do solvente de polaridade crescente (hexano, acetato de etila ou etanol 95%) para extração de biocompostos (FUJIHASHI et al., 2002) (Quadro 2; Figura 1). Após 48 horas o material foi filtrado. Para a evaporação do solvente, o extrato orgânico foi levado à secura em evaporador rotatório obtendo-se assim o extrato desidratado (BARBOSA et al., 2004). Os extratos orgânicos foram redissolvidos com o solvente extrativo (500 µL) para determinação do perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana.

ESPÉCIES	SOLVENTE EXTRATOR	PESO DA BIOMASSA (g)
<i>Aspergillus janus</i>	Acetato de etila	1,68
	Hexano	0,967
	Etanol	1,443
<i>Aspergillus speneus</i>	Acetato de etila	0,58
	Hexano	0,526
	Etanol	0,564
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Acetato de etila	0,995
	Hexano	0,827
	Etanol	0,982
<i>Penicillium Melinii</i>	Acetato de etila	0,432
	Hexano	0,437
	Etanol	0,606
<i>Aspergillus penicilloide</i>	Acetato de etila	1,517
	Hexano	1,609
	Etanol	1,369

Quadro2: Peso da biomassa

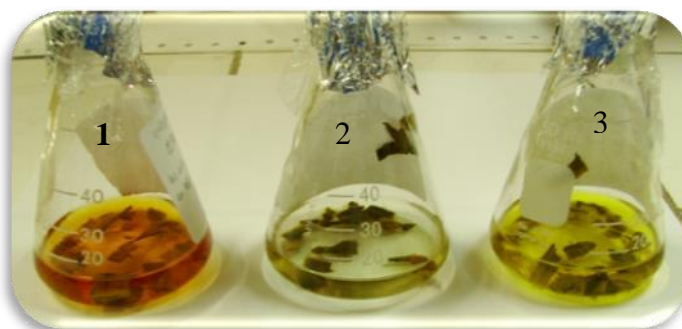


Figura 1: Solventes de polaridade crescente para extração de biocompostos.
1-hexano; 2-acetato de etila; 3-etanol 95%

Para os testes de bioautografia foram utilizadas cromatoplasas de camada delgada (CCD) - MACHEREY-NAGEL, ALUGRAM® SIL G, em sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₄₅, suporte em alumínio, com espessura de 0,2mm, medindo 5x10cm. Em uma das extremidades das CCD, foi traçada uma linha a um centímetro com lápis grafite, determinando-se o ponto de partida das amostras (extratos e padrão). Na extremidade oposta, foi marcada outra linha registrando o limite máximo da eluição da fase móvel. As placas foram tratadas previamente com metanol P.A., em cuba cromatográfica e, para manter a saturação no recipiente, foi colocado papel de filtro medindo 15x15cm.

Os extratos brutos foram diluídos no solvente extrativo (acetato de etila, hexano e etanol 95%) até se obter a mesma concentração do padrão de 20mg/mL. Com um capilar de vidro, uma alíquota de cada extrato foi aplicada a uma distância de um centímetro, em cada cromatoplaca. Como padrão foi utilizada solução de clorhexidina (20mg/mL). O teor extrativo (TE) foi calculado segundo a fórmula abaixo.

$$\%TE = \frac{\text{Peso do extrato bruto}}{\text{Volume inicial de biomassa}} \times 100$$

Posteriormente, as CCDs foram submetidas à eluição nos seguintes sistemas: hexano:acetato de etila (6:4;v/v), acetato de etila:hexano (6:4; v/v) e hexano:acetato de etila (8:2; v/v), de forma a se obter o maior fracionamento dos biocompostos. Seguida a eluição, a secagem das cromatoplasmas foi realizada a 25 °C. As substâncias foram observadas em UV de 254 nm e 365 nm, determinando-se os respectivos *R_f* (*retention factor*) de cada banda visualizada (SHITTU et al., 2006; SILVA et al., 2008).

$$R_f = \frac{\text{Distância de migração da substância}}{\text{Distância de migração do solvente}}$$

Para avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia, os microrganismos-teste foram cultivados em ágar Mueller Hinton, a 37°C por 24 horas (*S. mutans* CBAM 289 e *E. faecalis* CBAM 284). Os testes de bioautografia foram realizados seguindo-se a metodologia citada por Cunico et al. (2004) e Franco et al. (2007).

Nos cultivos dos microrganismos-teste foi preparada uma suspensão celular com água destilada esterilizada com turbidez semelhante à escala de Mc Farland 1. De cada suspensão e da substância reveladora [TTC- cloreto de trifeniltetrazólium 1% (p/v)] (MERCK) a 1% foi retirado 500µL para ser adicionado em 20 mL de ágar Müeller Hinton a 40 °C (Figura 2).

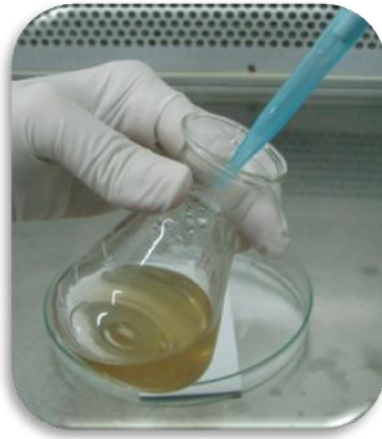


Figura 2: Adição de 500 ml da suspensão celular e solução TTC em ágar M6uller Hinton.

As cromatoplasmas, após a eluição foram colocadas em placa de Petri medindo 90x120mm e sobre ela foi vertido ágar Müeller Hinton contendo a suspensão celular dos microrganismos e o revelador (TTC) (Figura 3). Em seguida as placas devidamente fechadas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Como controle positivo foi utilizado solução de clorhexidina [20mg/mL (FGM)]. A atividade antimicrobiana foi determinada visualizando-se um halo de inibição em volta da biomolécula (SCHOMOURLO et al., 2005; AHMAD; BEG, 2001; BALINOVA, 1995).

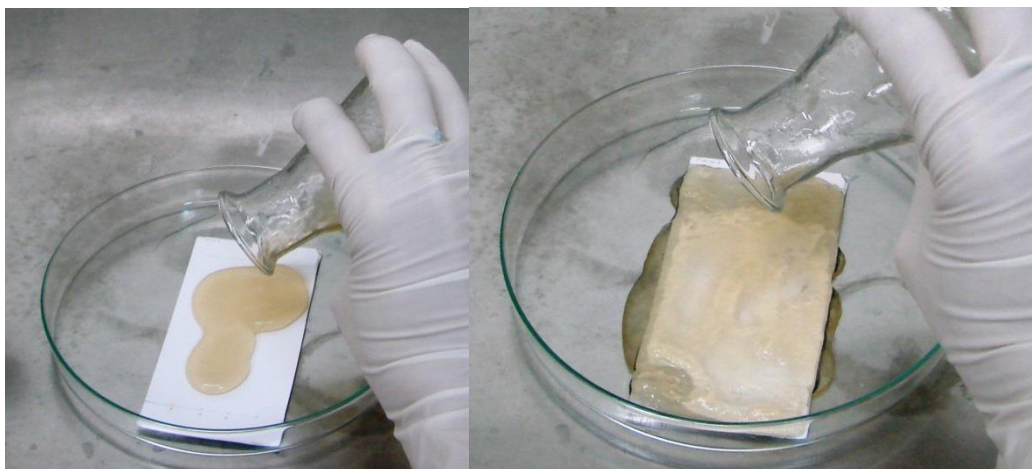
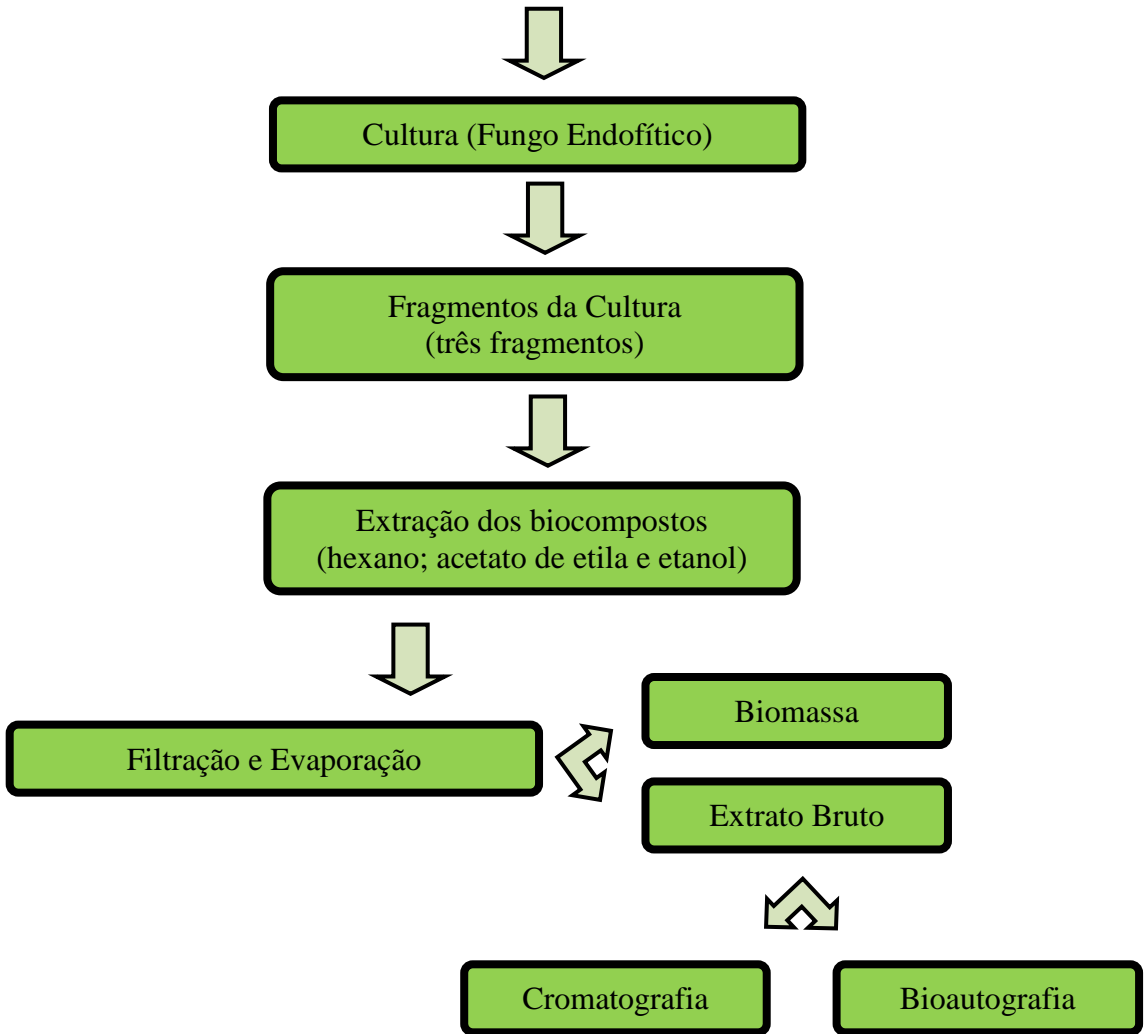


Figura 3: Ágar Müeller Hinton contendo suspensão bacteriana e revelador vertido sobre as cromatoplasmas

FLUXOGRAMA DO PROCESSO



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos utilizados neste ensaio foram os prevalentes na cavidade oral e estão relacionados a doenças bucais, tais como: cárie dental e doenças pulpares sendo amplamente estudados como ocorre com o *Streptococcus mutans* (NAVAI, 2000; FEJERSKOV; KIDD, 2005; STAMFORD et al., 2005; BARBOSA et al., 2008; RODRIGUES, 2008) e *Enterococcus faecalis* (GOMES, 2000; SIQUEIRA-JR, 2001; PINHEIRO et al., 2003; GOMES et al., 2004; PEREIRA, 2004; ABNADER, 2005; ILARA et al., 2005; SPONCHIADO, 2006;).

Os *Streptococcus mutans* são os microrganismos mais estudados e considerados os principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença cárie (STAMFORD, 2005), fazem parte da microflora normal e podem ser encontrados sobre superfícies dentárias sem desenvolver cárie (BARBOSA et al., 2008).

A presença do *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas está relacionada, na maioria das vezes, com insucesso do tratamento endodôntico convencional tornando a infecção perirradicular persistente (SPONCHIADO, 2006).

O método de bioautografia implica na associação da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) de forma prática e eficiente com bioensaio *in situ*, que permite a localização dos constituintes ativos (SHITTU, 2006).

Nas condições experimentais para os testes de bioautografia, os resultados referentes às zonas de inibição microbiana exibidas pelos diferentes constituintes dos extratos de fungos endofíticos pela técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) estão demonstrados nos cromatogramas (Figura 4).

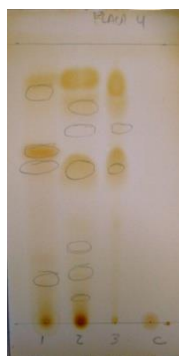


Figura 4: Cromatograma relativo aos compostos produzidos pelas espécies de fungos endofíticos em meio de cultura sólido.

A extração dos constituintes químicos foi realizada utilizando-se 3 tipos de solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e etanol 95%) em cada um dos fungos endofíticos que apresentaram atividade inibitória contra os microrganismos testados. A preparação dos extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos é o início para o isolamento e purificação dos constituintes químicos. Considera-se que solventes pouco polares (hexano) extraem mais facilmente mistura de compostos de baixa polaridade, porém pouco hidrófilos. O etanol foi utilizado para extração dos compostos mais polares e hidrófilos. (MATOS, 1997). O teor extrativo foi calculado e os valores obtidos estão citados no quadro 3.

FUNGO ENDOFÍTICO	TEOR EXTRATIVO DE HEXANO (% TE)	TEOR EXTRATIVO DE ACETATO DE ETILA (% TE)	TEOR EXTRATIVO DE ETANOL (%TE)
<i>Aspergillus speleneus</i>	7,5665	3,3275	7,0567
<i>Aspergillus penicilloide</i>	0,0435	3,1641	6,9127
<i>Penicillium melinii</i>	0,5034	5,2314	5,7920
<i>Penicillium simplissimum</i>	0,5078	1,2261	5,9979
<i>Aspergillus janus</i>	0,3205	0,5833	6,1538

Quadro 3: Teor extrativo dos extratos brutos de fungos endofíticos

EXTRATO BRUTO (20mg/ml)	MICROORGANISMO	R _f
<i>A. speleneus</i> (acetato de etila)	<i>S. mutans</i>	0,86
<i>P. simplicissimum</i> (acetato de etila)	<i>S. mutans</i>	0,88
<i>P. simplicissimum</i> (hexano)	<i>S. mutans</i>	0,88
<i>A. janus</i> (hexano)	<i>S. mutans</i>	0,20
<i>A. speleneus</i> (hexano)	<i>S. mutans</i>	0,21
<i>P. simplicissimum</i> (etanol)	<i>S. mutans</i>	0,12

Quadro 4: Fatores de retenção (R_f) dos extratos brutos de fungos endofíticos frente a *S. mutans*

A técnica da bioautografia permitiu delinear o perfil químico, em cromatoplaça de camada delgada (CCD), dos constituintes dos extratos de fungos endofíticos, detectando as substâncias ativas com atividade antimicrobiana.

A bioautografia sugeriu a presença de substâncias antibacterianas ativas presentes nos extratos de acetato de etila de *A. speleneus*, *P. simplicissimum*, extratos de hexano de *P. simplicissimum*, *A. janus*, *A. speleneus* e extrato de etanol de *P. simplicissimum* contra *S. mutans* (Quadro 4) em diferentes zonas de inibição, sugerindo a presença de ativos de diferentes polaridades. Entretanto nenhum extrato demonstrou atividade inibitória frente ao *E. faecalis*.

Cafêu et al. (2005) encontraram substâncias antifúngicas produzidas por *Xylaria sp*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (RUBIACEAE), contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, pelo teste de bioautografia.

Müller (2006) afirmou que diferentes extratos com compostos de diferentes polaridades frequentemente apresentam uma tendência similar da atividade antimicrobiana, já que a droga vegetal pode conter vários princípios ativos com o mesmo efeito possibilitando interações sinérgicas e superior eficácia em relação aos compostos isolados.

Apesar de a Bioautografia ser considerada eficiente devido às propriedades cromatográficas (polaridade relativa, absorvância em UV, reatividade química) associadas a resultados rápidos, é prudente enfatizar que os resultados possuem caráter qualitativo e que não é recomendado o uso de qualquer comparação quantitativa, como por exemplo, caracterizar uma substância como mais ativa em função do halo de inibição (JOHANN, 2003).

5. CONCLUSÃO

O método bioautográfico sugeriu a presença de bioativos com atividade antimicrobiana frente ao *S. mutans*. Além disso, os fungos endofíticos mostraram ser objeto de novas pesquisas e um recurso promissor na introdução de novos princípios biotecnológicos na Odontologia.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J Ethnopharmacology**, v.74, p.113-123, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LAVACA, P.T. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**; Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piracicaba-2002.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W, L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Journal of Biothecnology**, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.
- BALINOVA, A. 1995. Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide residues in plants and water. **AnalyticChimica Acha**, v. 311, n.3, p.423-427, 1995.
- BANDEIRA, M.F.C.L. **Estudo comparativo da compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao hidróxido de cálcio, em diferentes níveis de pesquisa: farmacológico, microbiológico em molares de rato**. Araraquara: UNESP, 1998. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 1998.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; FARIAS, P.P.L.; GONDIN, L.C.R.C.; INOUE, C.T.; SILVA, D.C. Aspectos preventivos da doença cárie. In: PORTO, C.L.D.A.; PEREIRA, J.C.; NETTO, C.A. **Cariologia- Grupo Brasileiro de Professores de Dentística**. 1.ed. São Paulo: Artes médicas, 2008.
- BARBOSA, A.N.; HERNANDEZ, P.A.G.; MACEDO, R.P.; RESTON, E.G.; BUSATO, A.L.S.; CARLI, G.; SUMMER, D.; MARTINS, C.; PEZZINI, R.P.; VALIM, R.R.; REICHERT, L.A.; LARENTIS, N. Conceitos atuais da etiologia da cárie dental- tratamentos tradicionais e alternativos. In: PORTO, C.L.D.A.; PEREIRA, J.C.; NETTO, C.A. **Cariologia- Grupo Brasileiro de Professores de Dentística**. 1.ed. São Paulo: Artes médicas, 2008.
- BARBOSA, W.L.R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I.C.C.; PINTO, L.N.; OLIVEIRA, F.Q.; OLIVEIRA, R.M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Rev. Científica da UFPA**, v.4, 2004.
- BURNETT, G.H.; SCHERP, H.W.; SCHUSTER, G.S. **Oral microbiology and infectious disease**. Baltimore: The Willians & Wilkins Co, 1978.
- CAFEU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, A.R. Substâncias anti-fúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marggravii* (rubiaceae). **Química Nova**, vol.28, n.6, 991-5, 2005.
- CUNICO, M.M.; CARVALHO, J.L.S.; KERBER, V.A.; HIGASKINO, C.E.K.; CRUZ ALMEIDA, S.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.97-103, 2004.

DE DEUS, Q.D. **Endodontia**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992.

FIGUEIREDO, J.A.G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* ssp.** Curitiba: UFPR, 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração: Microbiologia), Universidade Federal do Paraná, 2006.

FRANCO, A.L.P.; OLIVEIRA, T.B.; FERRI, P.H.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (alçafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.4, n.2, p. 208-20, 2007.

FUJIHASHI, G. A. ***Ananas Erectifolius* (Curauá): Padronização dos Extratos, Frações e do material vegetal.** Revista Científica da UFPA, V.3, Mar 2002.

GOMES, B.P.F.A. Microrganismos: quais são, onde estão, que danos causam? In: **Endodontia/ Trauma**, cap.15, p.77-97, 20º ciosp, 2000.

GOMES, B.P.F.A.; PINHEIRO, E.T.; GADÊ-NETO, C.R.; SOUSA, E.L.R.; FERRAS, C.C.R.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Microbiological examination of infected dental root canals, **Oral Microbiology Immunology**, v.19, n.2, p.71-76, 2004.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, n.47, p.163-167, 2001.

ILARA, L.E.D.; SOARES, R.G.; PEREIRA, D.R.; PIEROZAN, D.; SALLES, A.A.; LIMONGI, O. Verificação da presença microbiana no sistema de canais e periápice de dois dentes extraídos. **Stomatos**, v.11, n.21, p.21-26, jul/dez, 2005.

JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Natural Products, Complexity and Evolution In: **Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions**. Romeo et al. New York: Plenum Press, p. 265-293. 1996.

JOHANN, S. **Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos**. Florianópolis: UFSC, 2003. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

LIMA, A.M. **Estudo da atividade de fungos endofíticos e extratos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre o *Mycobacterium tuberculosis***. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, vol.25, n.3, p.429-438, 2002.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2a ed, Fortaleza: UFC, 1997.

MICHALEK, S.M.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H.; OCHIAI, K.; McGHEE, J.R. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infection and Immunity**, v.33, n.3, p.690-6, Sept, 1981.

MÜLLER, J.B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martius**. Santa Maria:UFSM, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

NARVAI, P.C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.5, n.2, p.381-392, 2000.

OLIVEIRA DA, Sponchiado Junior EC, Castilho C, Pereira JV, Pietro RCLR, Souza Neto MD. Avaliação da ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio e barbatimão em diferentes concentrações. **J Bras Fitomed** 2005; 3:12-5.

OLIVEIRA R, R, França EC, Segura ME, Santos VR. Susceptibilidade de microorganismos patogênicos da cavidade bucal a extratos de *S. adstringens* e *C. sylvestris*. **Braz Oral Res** 2004; 18 (Suppl): 95.

OLIVEIRA, J.S.R.L. **Estudo da *Caesalpinia ferrea* Martius na obtenção de bioativos antagonísticos aos agentes da tuberculose e candidíase**. Manaus: UFAM, 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2008.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1: p. 185-196, 1992.

PINHEIRO, ET; GOMES, BPFA; FERRAZ, CCR; TEIXEIRA, FB; ZAIA, AA; SOUZA-FILHO, FJ; Evaluation of root canal microorganism isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiology Immunology**, v.18, p.100-103, 2003.

PRINCE, K.A. **Determinação da atividade anti – *Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA**. Araraquara: UNESP, 2008. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2008.

RODRIGUES, J.A.; ARSATI, T.B.O.L.; FRANÇA, F.M.G.; REIS, A.F.; AMARAL, C.M.; BASTING, R.T. Cárie dental- conceitos e teorias. In: PORTO, C.L.D.A.; PEREIRA, J.C.; NETTO, C.A. **Cariologia- Grupo Brasileiro de Professores de Dentística**. 1. ed. São Paulo: Artes médicas, 2008.

SCHMOURLO, G.; MENDOÇA-FILHO, R.R., ALVINO, C.S; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J Ethnopharmacol**, v. 96, n.3, p. 563-568, 2005.

SCHUCH T, C. Plantas contra cárie. Disponível em: <http://www.geocities.com/buchaul/fnews08.htm>. Acesso em 17 de outubro de 2006, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytics continuum. **Mycol. Res.** v.109, n.6, p. 661-86, June, 2002.

SHITTU, O.B.; ALOFE, F.V.; ONAWUNMI, G.O.; OGUNDAINI, A.O.; TIWALADE, T.A. Bioautographic evaluation of antibacterial metabolite production by wild mushrooms. **African Journal of Biomedical Research**. v.9, p.57-62, 2006.

SILVA, M.S.A.; SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-40, Abr/Jun, 2008.

SIQUEIRA Jr, J.F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth an fail. **International Endodontic Journal**, v.34, p.1-10, 2001.

STAMFORD, T.C.M.; PEREIRA, D.M.S.; ALCÂNTARA, L.C.; COUTO, G.B.L. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de çarie em adolescentes sadios. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, Recife,v.5, n.1, p.71-6, Jan/Mar, 2005.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2002.

STROBEL, G.A; TORCZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. – a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*), **Plant Science**, Limerick, v. 128, n. 1, p. 97-108, 1997.

VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. **Adv Dent Res.**, v.7, n.2, p.87-96, Aug, 1993.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por dar-me sabedoria; força quando estava cansada e coragem para não desistir em meio às dificuldades.

Aos meus pais, Kiyoshi e Elizabeth, pelo amor, por acreditarem em meus sonhos e me ajudarem a alcançá-los, pelo incentivo e paciência. Amo vocês!

Ao meu irmão Luiz, minha cunhada Bárbara e minha sobrinha Isabela, pelo incentivo, amor e por me darem momentos de felicidade!

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, pela orientação, amizade e pela confiança em meu potencial científico.

À Prof^a. Dr^a. Carina Toda, pela amizade, incentivo e pela mão-amiga sempre estendida.

A Prof^a. Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira, pelas chamadas de atenção, boas risadas no Laboratório de Micologia, e por sua boa vontade em ajudar.

Ao Adam, um bem que Deus pôs no meu caminho, por dividir comigo as alegrias e tristezas, pelo carinho, companheirismo e paciência. Te Quiero Mucho!

Às minhas amigas, Vânia, Juliana, Rose e Lucianne pela amizade, palavras de incentivo e serem sempre a minha platéia perante minhas conquistas. Muito Obrigada!

Aos colegas, Viníciu Diniz e Hélio Cordeiro pela colaboração e disposição para a realização deste trabalho.

À Taciana, Thayana, Rosana e as demais meninas do Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Antônio Batista Silva, pela ajuda prestada e pela troca de conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento.