

Atividade antibacteriana de *Spondias mombin* sobre bactérias superinfectantes do meio ambiente bucal

Antibacterial activity of *Spondias mombin* on superinfecting bacteria in the oral environment

Actividad antibacteriana de *Spondias mombin* sobre bacterias superinfectantes en el medio oral

Recebido: 28/11/2020 | Revisado: 06/12/2020 | Aceito: 10/12/2020 | Publicado: 13/12/2020

Carlus Alberto Oliveira dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5988-1186>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: carlusalberto94@gmail.com

Moisés Willians da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8615-1103>

Centro Universitário de João Pessoa, Brasil

E-mail: dr.moiseswillians@gmail.com

Karolyne de Melo Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2111-6945>

UNIESP Centro Universitário, Brasil

E-mail: karolmelosoaresjp@gmail.com

Ana Karina Almeida Rolim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6910-2898>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: k_rolim19@hotmail.com

Fábio Victor Dias Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2334-7667>

Centro Universitário de João Pessoa, Brasil

E-mail: fabio_vct@hotmail.com

Kauana da Silva Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0385-9983>

Centro Universitário de João Pessoa, Brasil

E-mail: kauanaandrade12@gmail.com

Anderson Marcos Vieira do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8575-1580>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: andersonmarcos_611@hotmail.com

Maria Regina Macêdo-Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6362-502X>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

E-mail: mariareginamacedo@yahoo.com.br

Resumo

Objetivo: Avaliar in vitro a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *Spondias mombin* (cajá), sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). **Metodologia:** As linhagens microbianas foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37 °C por 18-20 horas. Em placas de petri contendo Agar Mueller Hinton foi introduzida solução salina inoculada com cada crescimento microbiano e confeccionados cinco orifícios padronizados de aproximadamente seis mm de diâmetro. Foram introduzidos 50µL da substância teste (Extrato Bruto- EB/Substância Pura - SP até a diluição 1:512) nos orifícios e incubadas a 37°C por 24 horas. O ensaio foi realizado em duplicata sobre cada linhagem. Utilizou-se como controles positivos o digluconato de clorexidina a 2% e o hipoclorito de sódio 2,5%. Para análise dos dados utilizou-se parâmetros estatísticos que incluíram valores: mínimo, máximo, média e desvio padrão. Aplicou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney na comparação da concentração inibitória mínima das substâncias. **Resultados:** Observou-se que a clorexidina e o extrato do cajá mostraram desempenho superior ao hipoclorito de sódio 2,5% sobre as bactérias testadas. Conforme resultados do teste U de Mann Whitney observou-se estatisticamente significativa apenas entre o extrato do cajá e o hipoclorito de sódio 2,5% ($p < 0,05$). **Conclusões:** Conclui-se que o extrato da folha de *S. mombin* apresentou atividade inibitória sobre crescimento planctônico de *S. aureus* e *E. faecalis*, estimulando a pesquisa para tratamento de infecções endodônticas persistentes através de produtos bioativos.

Palavras-chave: Microbiologia; Fitoterapia; Endodontia; Hipoclorito de sódio.

Abstract

Objective: To evaluate in vitro the antimicrobial action of the hydroalcoholic extract of the leaf of *Spondias mombin* (cajá), on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). **Methodology:** The microbial strains were grown in BHI broth (Brain Heart Infusion) and incubated at 37 ° C for 18-20 hours. In petri dishes containing Mueller Hinton Agar, inoculated saline solution was introduced with each microbial growth and five standardized holes of approximately six mm in diameter were made. 50µL of the test substance (Crude Extract - EB / Substance Pure - SP until 1: 512 dilution) was introduced into the holes and incubated at 37 ° C for 24 hours. The assay was performed in duplicate on each strain. Chlorhexidine digluconate 2% and sodium hypochlorite 2.5% were used as positive controls. For data analysis, statistical parameters were used that included values: minimum, maximum, average and standard deviation. Mann-Whitney U nonparametric test was applied to compare the minimum inhibitory concentration of the substances. **Results:** It was observed that the chlorhexidine and the extract of the caja showed superior performance to the sodium hypochlorite 2.5% on the tested bacteria. According to the results of the Mann Whitney U test, there was a statistically significant difference only between the extract of caja and sodium hypochlorite 2.5% ($p < 0.05$). **Conclusions:** It is concluded that the extract of the leaf of *S. mombin* showed inhibitory activity on planktonic growth of *S. aureus* and *E. faecalis*, stimulating research for the treatment of persistent endodontic infections through bioactive products.

Keywords: Microbiology; Phytotherapy; Endodontics; Sodium hypochlorite.

Resumen

Objetivo: Evaluar in vitro la acción antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Spondias mombin* (cajá), sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). **Metodología:** Las cepas microbianas se cultivaron en caldo BHI (infusión de cerebro y corazón) y se incubaron a 37 ° C durante 18-20 horas. En placas de Petri que contenían Agar Mueller Hinton, se introdujo solución salina inoculada con cada crecimiento microbiano y se realizaron cinco orificios estandarizados de aproximadamente seis mm de diámetro. Se introdujeron 50 µl de la sustancia de ensayo (extracto crudo - EB / sustancia pura - SP hasta una dilución 1: 512) en los orificios y se incubaron a 37°C durante 24 horas. El ensayo se realizó por duplicado en cada cepa. Como controles positivos se utilizaron digluconato de clorhexidina al 2% e hipoclorito de sodio al 2,5%. Para el análisis de los datos se utilizaron parámetros estadísticos que incluyeron valores: mínimo, máximo,

promedio y desviación estándar. Se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar la concentración mínima inhibitoria de las sustancias. Resultados: Se observó que la clorhexidina y el extracto de la caja mostraron un desempeño superior al hipoclorito de sodio al 2.5% sobre las bacterias probadas. De acuerdo con los resultados de la prueba U de Mann Whitney, hubo una diferencia estadísticamente significativa solo entre el extracto de caja y el hipoclorito de sodio al 2.5% ($p < 0.05$). Conclusiones: Se concluye que el extracto de hoja de *S. mombin* mostró actividad inhibidora sobre el crecimiento planctónico de *S. aureus* y *E. faecalis*, estimulando la investigación para el tratamiento de infecciones endodónticas persistentes a través de productos bioactivos.

Palavras chave: Microbiología; Fitoterapia; Endodoncia; Hipoclorito de sodio.

1. Introdução

Os micro-organismos (MOs) são responsáveis pelo desenvolvimento de polpas necróticas, patologia periapical e doenças pós-tratamento do canal radicular; sendo sua sobrevivência intra-radicular e suas propriedades patogênicas influenciadas por uma combinação de fatores, tais como: interação sinérgica entre espécies, capacidade de interferir e evadir a resposta do hospedeiro e os fatores de patogenicidade (Siqueira Junior et al., 2018; Macedo-Costa & Santos, 2019).

A principal causa de falha na terapia endodôntica, tem sido os micro-organismos existentes no sistema de canais radiculares (SCR), tanto devido a seus materiais metabólicos, como pelo efeito do biofilme que pode colonizar os canais acessórios, ístmos, deltas apicais e túbulos dentinários, dificultando sua erradicação pela instrumentação, uso de substâncias irrigadoras e de medicação intracanal. O insucesso também está relacionado as falhas técnicas, onde etapas importantes são negligenciadas resultando no controle deficiente da infecção endodôntica (Rocha; Cerqueira & Carvalho, 2020).

Para eliminar debris dos canais, diluir tecidos orgânicos remanescentes, purificar o espaço do canal, reduzir atividade microbiana e promover lubrificação, sem causar irritabilidade aos tecidos biológicos durante o preparo químico/mecânico, utiliza-se as substâncias irrigadoras, dentre elas, o hipoclorito de sódio (NaOCl) e digluconato de clorexidina (DCLX) (Arruda-Vasconcelos et al., 2019).

O hipoclorito de sódio tem sido a solução irrigadora mais usada durante décadas, devido a sua excelente ação como solvente tecidual e amplo espectro antimicrobiano, contudo, apresenta efeito citotóxico quando injetado nos tecidos periapicais, repulsivo gosto e

odor, além de ocasionar reações de hipersensibilidade. Já o digluconato de clorexidina é considerada padrão ouro como agente antimicrobiano, apresentando ação bacteriostática em baixas concentrações e bactericida em altas concentrações, entretanto, essa solução pode ocasionar resistência microbiana, manchamento de dentes e interferência gustativa (Macedo-Costa & Santos, 2019; Arruda-Vasconcelos et al., 2019; Gatelli & Bortolini, 2018).

A utilização das plantas medicinais como tratamento alternativo tem atraído o interesse da comunidade científica, principalmente devido às preocupações de segurança, efeitos colaterais, aumento constante na resistência a antibiótico e ineficácia de formulações de drogas alopáticas. O uso de fitomedicamentos enquanto prática alternativa da medicina popular tem aumentado consideravelmente, devido à sua biocompatibilidade, propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, propriedades antioxidantes, ausência de resistência microbiana quando comparados aos medicamentos alopáticos e, além disso, possui baixo custo, disponibilidade de matéria prima e trazem vários benefícios à saúde. Nessa perspectiva, o entendimento sobre a microbiota relacionada às infecções de canais radiculares consiste na busca para o desenvolvimento de soluções fitoterápicas mais efetivas (Siqueira Junior et al., 2018; Macedo-Costa et al., 2018; Alagl; Bedi & Almas, 2017; Gonçalves et al., 2018; da Silva et al., 2020).

Dentre os vegetais utilizado na medicina alternativa, destaca-se *Spondias mombin*, popularmente conhecida como “cajá”, pertencente à família *Anacardiaceae*. O uso das folhas é indicado em gargarejos, como adstringente, nas inflamações da boca e da garganta. No que se refere às atividades biológicas, foram citadas: atividade antimicrobiana, antioxidante, antiviral (Cabral et al., 2016; Silva et al., 2012).

Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho avaliar in vitro a ação antibacteriana do extrato da folha de *Spondias mombin* (cajá) sobre *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, micro-organismos associados às infecções endodônticas persistentes.

2. Metodologia

Coleta e preparação do extrato das folhas de *Spondias mombin*

Este estudo trata-se de uma pesquisa quantitativa. As folhas de *S. mombin* foram coletadas em uma fazenda particular na região de Tábua em Dom Marcolino Dantas/ RN (Tabua- RN S S° 28' 14'' W 35° 27' 37''). A espécie foi identificada pelo botânico Alan de Araújo Roque, com número de exsicata 12252. Posteriormente, as folhas coletadas foram

submetidas à secagem na sombra, sob temperatura ambiente durante duas semanas. Após secas, foram trituradas em um moinho de facas. O extrato foi preparado por maceração utilizando etanol: H₂O (70:30), durante um período de sete dias, obtendo-se assim o extrato hidroetanólico das folhas (EH). O extrato foi filtrado com o auxílio de um rotaevaporador à temperatura de 45° C. Para realização dos ensaios microbiológicos o EH foi liofilizado.

Preparação do inóculo e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de *Spondias mombin*

Utilizou-se cepas planctônicas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 292012) obtidas mediante solicitação na Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro/RJ). As amostras foram cultivadas em caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO®, Michigan, Estados Unidos) e levados em estufa bacteriológica (37±2 °C) sob condições estéreis, até a turbidez atingir 0,5 da escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). A atividade antimicrobiana em placas foi realizada segundo a metodologia adaptada de Bauer¹¹ para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em placas de petri contendo Agar Mueller Hinton (DIFCO®, Michigan, Estados Unidos) foi introduzida solução salina inoculada com cada crescimento microbiano e foram confeccionados cinco orifícios padronizados de aproximadamente seis mm de diâmetro em cada placa. Foram adicionados 50µL da substância teste (EB-Extrato Bruto até a diluição em água destilada 1:512) nos orifícios, e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. O ensaio foi realizado em duplicata sobre cada linhagem. Realizou-se os mesmos procedimentos para os controles positivos, o digluconato de clorexidina a 2% e o hipoclorito de sódio 2,5%.

Foi considerado CIM, a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano, representado pela presença de um halo de inibição, onde seu diâmetro total (incluindo os orifícios – 6 mm) foi aferido em milímetros (mm) com o auxílio de paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, Brasil).

Os resultados obtidos no teste da Concentração Inibitória Mínima (difusão em agar) foram coletados, organizados e apresentados em forma de tabelas com os seus respectivos valores das médias do diâmetro total dos halos, indicando a inibição do crescimento microbiano. Posteriormente, foram transferidos para um banco de dados informatizado e calculados os parâmetros estatísticos que incluirão valores das respectivas medidas descritivas: mínimo, máximo, média e desvio padrão. O nível de confiança utilizado para a obtenção dos intervalos foi de 95%. Aplicou-se o teste não paramétrico de U de Mann-

Whitney na comparação da inibição microbiana mínima dos extratos em relação aos controles positivos em software estatístico IBM SPSS 21.0.

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que o extrato da folha de *Spondias mombin* (cajá) apresentou atividade antimicrobiana até a concentração 1:512 sobre todos os micro-organismos testados.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido.

Linhagens Bacterianas	Extrato hidroalcoólico de <i>Spondias mombin</i> - Concentração (0,5 g/mL)									
	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,5	20,5	18,5	13,5	12,2	12,7	17	13	12,7	12,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	23	20	16,5	12,2	15	24,5	19	18	17	16
Medidas descritivas	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Mínimo	23	20	16,6	12,2	12,2	12,7	17	13	12,7	12,7
Máximo	25,5	20,5	18,5	13,5	15	24,5	19	18	17	16
Média	24,2	20,2	17,5	12,8	13,6	18,6	18	15,5	14,8	14,3
D. Padrão	1,76	0,35	1,41	0,91	1,97	8,34	1,41	3,5	3,04	2,33

EP: Extrato Puro.

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Na Tabela 1 estão os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em milímetros do diâmetro dos halos de inibição do extrato de *Spondias mombin*. Foi observada a média dos halos de inibição mensurados em milímetros (mm) do extrato do cajá, bem como as medidas de tendência central e dispersão, considerando as duas espécies microbianas testadas. Associado a isso, observou-se que o extrato da folha do cajá foi efetivo até a concentração 1:512 frente a *S. aureus* e *E. faecalis*.

Tabela 2. Medidas de tendência central da Concentração Inibitória Mínima do digluconato de clorexidina 2%.

Linhagens	Digluconato de clorexidina 2% - Concentração									
	SP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Bacterianas										
<i>Staphylococcus aureus</i>	28,5	22,2	21,5	19,5	11,2	11	10	10	10	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	23,5	18,7	18,2	17,7	17,5	16	15,5	13	12	11,7
Medidas descritivas	SP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Mínimo	23,5	18,7	18,2	17,7	11,2	11	10	10	10	8
Máximo	28,5	22,2	21,5	19,5	17,5	16	15,5	13	12	11,7
Média	26	20,4	19,8	18,6	14,3	13,5	12,7	11,5	11	9,8
D. Padrão	3,53	2,47	2,33	1,27	4,45	3,53	3,88	2,12	1,41	2,61

SP: Substância Pura.

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Na Tabela 2, observa-se a média dos halos de inibição mensurados em milímetros (mm) do digluconato de clorexidina 2% (controle), bem como as medidas de tendência central e dispersão, considerando as duas espécies microbianas testadas. Nota-se que a clorexidina obteve desempenho semelhante ao extrato do cajá, apresentando atividade até a última diluição (1:512).

Tabela 3. Medidas de tendência central da Concentração Inibitória Mínima do hipoclorito de sódio 2,5%.

Linhagens	Hipoclorito de sódio 2,5 % - Concentração										
	Bacterianas	SP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>Staphylococcus aureus</i>	24,7	23,2	17	16	15	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	15	17,2	19	6	0	0	0	0	0	0
Medidas descritivas	SP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Mínimo	20	15	17,2	19	6	0	0	0	0	0	0
Máximo	24,7	23,2	17,2	19	15	0	0	0	0	0	0
Média	22,35	19,1	17,1	17,5	10,5	0	0	0	0	0	0
D. Padrão	3,32	5,79	0,14	2,12	6,36	0	0	0	0	0	0

SP: Substância Pura.

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Na Tabela 3, observa-se a média dos halos de inibição mensurados em milímetros (mm) do hipoclorito de sódio 2,5%, bem como as medidas de tendência central e dispersão, considerando as duas espécies microbianas testadas. Nota-se que o hipoclorito de sódio apresentou atividade bacteriostática até a concentração 1:16 (quinta diluição), sobre *S. aureus* e *E. faecalis*.

Tabela 4. Resultados do teste U de Mann-Whitney extrato vs. digluconato de clorexidina 2%.

Micro-organismos	CIM – mean rank		Estatística U	Significância (p-valor)	Significância (p-valor p/grupo MO)
	Extrato Cajá	Clorexidina 2%			
<i>S. aureus</i>	11,90	9,10	36.000	0,288	
<i>E. faecalis</i>	9,40	11,60	39.000	0,405	0,924

Rank = média de postos no teste U de Mann-Whitney * Sig. p-valor < 0,05.

Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Na Tabela 4 é observado os resultados do teste U de Mann-Whitney da comparação da média de rank do extrato da folha do cajá e clorexidina 2%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as substâncias sobre as linhagens testadas (p-valor = > 0,05) separadamente, bem como não houve diferença do rank dos resultados agrupados (p-valor p/ grupo MO = 0,05).

Tabela 5. Resultados do teste U de Mann-Whitney do extrato vs. hipoclorito de sódio 2,5%.

Micro-organismos	CIM – mean rank		Estatística U (calculada)	Significância (p-valor)	Significância (p-valor p/ grupo MO)
	Extrato Cajá	Hipoclorito 2,5%			
<i>S. aureus</i>	9,15	11,85	36.500	0,303	
<i>E. faecalis</i>	8,00	13,00	25.000	0,057	0,045*

Rank = média de postos no teste U de Mann-Whitney * Sig. p-valor < 0,05.
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

A Tabela 5 representa os resultados do teste U de Mann-Whitney do extrato da folha do cajá e o hipoclorito de sódio 2,5%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as substâncias, sobre cada MO avaliado separadamente. Considerando o rank do grupamento microbiano (p-valor p/ grupo MO = < 0,05) observa-se significância do resultado (p-valor p/ grupo MO = 0,045).

Conforme relatado anteriormente, os vegetais são uma excelente fonte de busca de novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química. Além disso, apresenta um baixo custo e é bastante aceito pela população. Embora pesquisas utilizando vegetais como alternativa para tratamentos de afecções bucais seja relativamente recente, a aplicação empírica é bastante antiga. Segundo Macêdo–Costa & Santos (2019), essa prática milenar é herdada de “raizeiros”, “mateiros”, “rezadeiras”, erveiros, curandeiros, pajés e outros; aliada à etnofarmacologia, botânica, química dos compostos naturais, Microbiologia, Farmacologia e clínica.

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais é oriunda da presença de alguns metabólitos secundários, dentre eles: compostos fenólicos, flavonoides, taninos e saponinas, em concordância com o que foi encontrado nos estudos de Silva et al. (2012) e Cabral et al.

(2016). Tendo em vista que diversos estudos têm comprovado a efetividade dos compostos fenólicos, flavonoides e taninos como agentes antimicrobianos e antioxidantes (Cabral et al., 2016; Brito et al., 2018) pode-se sugerir que a grande atividade antibacteriana apresentada por *S. mombin* nesse estudo (Tabela 1) deve-se à presença desses metabólitos em sua composição.

Segundo Roumy et al. (2020), na medicina tradicional, as folhas e casca do caule da cajazeira (*S. mombin*) são utilizadas para tratamento de desordens infecciosas, principalmente diarreias e disenterias. Em seu estudo in vitro, os extratos aquosos e etanólico de folhas de cajazeira (*S. mombin*) inibiram o crescimento bacteriano.

Assim como os agentes antimicrobianos convencionais, nem todos os extratos são eficazes sobre todos os MOs, sobretudo quando se trata de MOs superinfectantes ou relacionados a infecções persistentes. Dentre esses MOs destacam-se *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, conhecidos pelo seu potencial de resistência microbiana (Roumy et al., 2020). De acordo com Kim et al. (2020) *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota do trato gastrointestinal e urinário, sendo um causador de infecções urinárias, endocardite bacteriana, infecções endodônticas e periodontite apical, apresentando certa resistência aos medicamentos endodônticos mais comuns.

Os micro-organismos do gênero estafilococos não são considerados parte da microbiota residente bucal humana, mas podem atuar como agentes patogênicos oportunistas em pacientes submetidos a tratamento sistêmico prolongado com agentes antimicrobianos ou imunossupressores (Buyck; Tuikens & Van Bambeke, 2013; Germão et al., 2018).

Costa et al. (2008) afirmam que na Odontologia, a presença de *Enterococcus faecalis* no interior de canais tem sido associada às infecções endodônticas persistentes, o que tem induzido o desenvolvimento de pesquisas para avaliar a efetividade da ação antimicrobiana de medicamentos intracanaís e soluções irrigadoras, conforme justificativa desse estudo.

Diversos estudos comparativos são realizados utilizando como controle substâncias já utilizadas clinicamente, tais como, o hipoclorito de sódio e o digluconato de clorexidina. Embora o hipoclorito de sódio seja utilizado mundialmente por apresentar excelente ação antimicrobiana, ele apresenta algumas limitações frente a espécies microbianas multirresistentes, a exemplo dos *S. aureus*. Nesse estudo, por exemplo, o hipoclorito de sódio na concentração 2,5% apresentou atividade bacteriostática relativamente baixa (dada sua aplicação clínica) frente a *S. aureus*, o que corrobora com achados de Leonardo et al. (1999).

Existem muitos métodos para avaliar a ação antimicrobiana in vitro de substâncias irrigadoras na Endodontia, o método escolhido para realização desse estudo foi a difusão em meio sólido (ágar), e por ser um método bastante efetivo, minimiza os fatores que influenciam

nos resultados como estudos realizados com humanos (Amparo et al., 2018). Embora os halos de inibição desse estudo tenham sido mensurados em 24h, Mickel et al. (2003) afirmam que não há diferença na avaliação até 48h da realização do experimento.

As soluções de hipoclorito de sódio, bastantes usadas na Endodontia, apresentam capacidade de dissolução de tecidos orgânicos, o que não é observado na clorexidina (Leonardo et al., 1999). Em seu estudo, Leonardo et al. (1999) afirmaram que a Clorexidina obteve um desempenho superior, seguindo de Hidróxido de cálcio, do Extrato de própolis e por fim o Hipoclorito de sódio 5%, confirmando os resultados do NaOCl observados nas Tabelas 3 e 5.

Embora o nível de confiabilidade de estudos in vitro seja validado, outros fatores podem influenciar nos resultados obtidos. Frazen et al. (2018) explicam que a localização geográfica de obtenção dos extratos, bem como forma de armazenamento das substâncias e meio de produção influenciam na interpretação dos resultados. O hipoclorito de sódio, por exemplo, apresenta instabilidade química considerável, onde até a forma de armazenamento pode influenciar negativamente na sua capacidade antimicrobiana. Esses problemas podem ser contornados quando o material testado segue um rígido protocolo de seleção (Werlang et al., 2016). Neste estudo, a atividade relativamente baixa do hipoclorito de sódio 2,5% pode ser justificada pela marca comercial do mesmo, ou tempo levado desde fabricação até a data do experimento, provavelmente.

Embora a clorexidina tenha alcançado resultados superiores que o extrato do cajá sobre *S. aureus* e *E. faecalis*, não houve diferença estatisticamente significativa no teste de Mann Whitney (Tabela 4). Numa visão geral observa-se que a clorexidina 2% foi mais efetiva que as demais substâncias, entretanto a partir da sexta diluição os resultados do extrato da folha do cajá são mais expressivos. Resultados semelhantes foram encontrados por Leonardo et al. (1999) em sua pesquisa.

Alguns experimentos in vitro, foram realizados para avaliação da ação antimicrobiana do cajá frente a bactérias do ambiente bucal e micro-organismos superinfectantes, que também são relacionados às infecções endodônticas persistentes. Silva et al. (2012) afirmam ao estudar os extratos, aquoso e hidroetanólico do *S. mombin*, observou que o mesmo apresentou atividade bacteriostática sobre a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Enterococcus faecalis*. Macêdo-Costa et al. (2018) confirmam os resultados desse trabalho (Tabela 1) ao estudar o extrato hidroetanólico do *S. mombin*, sendo efetivo bacteriostático até o décimo tubo (1:512) para *E. faecalis*, efeito até a diluição 1:512, e que o efeito bactericida do extrato bruto foi eficaz nas duas primeiras horas de contato com o *E. faecalis*. Macêdo-Costa et al. (2018)

em seu estudo realizado com clorexidina 0,12%, afirmou que o extrato de *S. mombin* apresentou desempenho médio superior e estatisticamente significativo (p 0,001) até a diluição 1:512 (0,97 mg/ mL) e 1:256 (1,95 mg/mL) sobre *E. faecalis* ATCC e *P. aeruginosa* ATCC, respectivamente.

Com respeito a citotoxicidade do extrato da folha de *S. mombin*, Costa et al. (2008) relataram em seu trabalho que o extrato hidroetanólico das folhas do cajá não apresentaram toxicidade. Foi observado, inclusive, um aumento no metabolismo mitocondrial dos fibroblastos 3T3, com uma proliferação de 25 -100% a mais que o controle, porém não há outros relatos na literatura. Portanto, testes de citotoxicidade em hemácias e de índice de seletividade podem ser indicados para uma futura aplicabilidade clínica em canais radiculares e sítios periodontais.

Em todas as concentrações e frente os dois MOs testados, o extrato da folha do cajá obteve um desempenho superior ao hipoclorito de sódio 2,5% e semelhante a clorexidina 2%, conforme resultados do teste U de Mann Whitney (Tabelas 4 e 5), entretanto, esperava-se que os halos de inibição dos extratos fossem maiores nos tubos mais concentrados, onde uma variação é observada até a diluição 1:512. Esse último resultado contradiz a maioria dos estudos encontrados na literatura acerca da relação entre a concentração dos extratos vegetais e a sua melhor atividade antimicrobiana, que usualmente creditam aos extratos brutos superiores àqueles diluídos. Por tal razão, torna-se necessário a realização de novos experimentos envolvendo o extrato em questão.

Os resultados do encontrados nesse trabalho confirmam os valores gerados pelo teste U de Mann Whitney (Tabelas 4 e 5), no entanto, é possível que embora a clorexidina tenha alcançado resultados superiores, o extrato do cajá foi semelhantemente efetivo até a última diluição e os valores não se distanciam muito do controle (clorexidina 2%).

A atividade antimicrobiana é apenas um dos requisitos desejáveis das SQAs, além de ajudar no debridamento do SCR, ter capacidade de dissolução de tecido orgânico, exibir boa capacidade lubrificante, oferecer tensão superficial de forma a aceder a áreas inacessíveis, prevenir a formação da smear layer durante a instrumentação e não possuir efeitos citotóxicos aos tecidos perirradiculares. Portanto, outras capacidades devem ser avaliadas nos extratos vegetais, não só apenas estudos microbiológicos (Macedo-Costa et al., 2018; Leonardo et al., 1999).

Com as limitações dos estudos disponíveis na literatura, mais pesquisas laboratoriais e clínicas são necessárias para avaliar a segurança, a eficácia e a biocompatibilidade de outros extratos de plantas, antes de finalmente recomendá-las como irrigantes endodônticos

alternativos. Finalmente, os extratos vegetais testados clinicamente só devem ser usados para os procedimentos de tratamento estabelecido (Melo et al., 2017).

4. Conclusões

Os resultados dessa pesquisa demonstraram que o extrato hidroalcoólico da folha de *S. mombin* (cajá) apresentou expressiva atividade bacteriostática até a diluição 1:512 em comparação com as substâncias testadas, o hipoclorito de sódio 2,5% (1:16) e clorexidina 2% (1:512), sobre os crescimentos planctônicos de *S. aureus* e *E. faecalis*.

Apesar da excelente ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *Spondias mombim*, estudos futuros são necessários, tais como, citotoxicidade, toxicidade aguda, triagem fitoquímica, além de ação adstringente e antiaderente, para assegurar sua efetividade em futura aplicação clínica na Endodontia. Destarte, faz necessário a inclusão de cepas de origem clínica e organizadas em biofilme multiespécie, pois apresentam diferentes perfis de susceptibilidade, assegurando maior fidelidade na avaliação.

Referências

Arruda-Vasconcelos, R., Barbosa-Ribeiro, M., Louzada, L. M., Mantovani, G. D. & Gomes, B. P. F. A. (2019). Apically extruded debris using passive ultrasonic irrigation associated with different root canal irrigants. *Braz. Dent. J.*, 30(4), 363-367.

Alagl, A. S., Bedi, S. & Almas, K. (2017). Phytosolutions for *Enterococcus faecalis* in endodontics: An update. *Oral Health Dental Manag.* 7(6), 332-336.

Amparo, T. R., Braga, V. C. C., Seibert, J. B., de Souza, G. H. B., & Teixeira, L. F. M. (2018). Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. *Infarma – Ciências Farmacêuticas*, 30(1), 50-59.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. of Clin.*, 45(4), 493-496.

Brito, S. A., de Almeida, C., de Santana, T. I., da Silva Oliveira, A. R., do Nascimento Figueiredo, J., Souza, I. T., de Almeida, L. L., da Silva, M. V., Borges, A. S., de Medeiros, J.

W., da Costa Silva Neto, J., de Cássia Ribeiro Gonçalves, R., Kitagawa, R. R., Sant'Ana, A., Rolim, L. A., de Menezes, I., da Silva, T. G., Caldas, G., & Wanderley, A. G. (2018). Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. *Oxid Med Cell Longev.*, 2018, 1-20.

Buyck, J. M., Tuikens, P. M., & Van Bambeke, F. (2013). Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in a model of THP-1 Human Monocytes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 57(5), 2310–2318.

Cabral, B, Siqueira, EMS, Bitencourt, M. A. O., Lima, M. C. J. S., Lima, A. K., Ortmann, C. F., Chaves, V. C., Fernandes-Pedrosa, M. F., Rocha, H. A. O., Scortecci, K. C., Reginatto, F. H., Giordani, R. B. & Zucolotto, S. M. (2016). Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 26(3), 304-311.

Costa, E. M. M. B., Esmeraldo, M. R. A., Carvalho, M. G. F., Daniel, R. L. D. P., Pastro, M. F., Silva-Júnior, F. L. (2008). Avaliação da ação antimicrobiana de própolis e de substâncias utilizadas em endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clín. Integr.* 8(1), 21-25.

Franzen, F. L., Fries, L. L. M., Oliveira, M. S. R., Lidório, H. F., Menegaes, J. F. & Lopes, S. J. (2018). Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. *Acta Iguazu*, 7(1), 9-21.

Gatelli, G., & Bortolini, M. C. T. (2018): O uso da clorexidina como solução irrigadora em endodontia. *Revista Uningá*, 20(1), 119-122.

Gonçalves, M. M. M., Cajaiba, R. L., Santos, W. B., Sousa, E. S., Martins, J. S. C., Pereira, K. S. & Sousa, V. A. (2018). Estudo etnobotânico do conhecimento e uso de plantas medicinais em Santa Luzia, Maranhão, Brasil. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, 9(5), 12-21.

Germao, V. E., Xavier, C. M. R., Jales, M. M. S., Albuquerque, T. V. G., De Lima. E. L. F. & Ribeiro, L. H. (2018). Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura. *Rev Nova Esperança*, 16(2), 91-99.

Kim, A. R., Kang, M., Yoo, Y. J., Yun, C. H., Perinpanayagam H, Kum, K. Y., Han, S. H. (2020). *Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid disrupts mature Enterococcus faecalis biofilm*. J Microbiol., 58,1-6.

Leonardo, M. R., Tanomaru-Filho, M., Silva, L. A. B., Nelson-Filho, P., Bonifácio, K. C. & Ito, I. Y. (1999). *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J. Endod. 25(3), 167-71.

Macedo-Costa, M. R., & Santos, C. A. O. (2019). *Fitoterapia: Uma opção para tratamento endodôntico*. 1ª edição. João Pessoa: Novas edições acadêmicas.

Macedo-Costa, M. R., Santos, C. A. O., Lucena, E. R., Pereira, M. S. V. & Lima, K. C. (2018). Antibacterial and anti-adherent effect of *Mimosa tenuiflora* and *Myrciaria cauliflora* on dental biofilm bacteria. Afr. J. Microbiol. Res. 12(8):181-185.

Mickel, A. K., Nguyen, T. H., & Chogle, S. (2003). Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. J. Endod., 29(4), 257-258.

Melo, P. G. B., Neto. A. C., Silva, C. K., Arroio, G., Ferrarezi, M. L., Antoniette, R. N., & Weckwerth, P. H. (2017). *Fitoterapia na Odontologia: um novo paradigma*. Braz. J. Surg. Clin. Res., 20(3), 97-102.

Rocha, T. A. F., Cerqueira, J. D. M. & Carvalho, E. S (2018). Infecções endodônticas persistentes: causas, diagnóstico e tratamento. Rev Ciênc. Méd. Biol. 17(1),78-83.

Roumy, V., Ruiz, J. C. M., Bonneau, N., Samaillie, J., Azaroual, N. & Encinas, L. A. (2020). Plant therapy in the Peruvian Amazon (Loreto) in case of infectious diseases and its antimicrobial evaluation. J ethnopharmacol, 249, 1-25.

Siqueira-Júnior, J. F., Rocas, I. N., Alves, M. F. M., Perez, A. R. & Ricucci, D. (2018). Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz. Oral Res., 32(01), 2-19.

Silva, A. R., Morais, S. M., Marques, M. M., Oliveira, D. F., Barros, C. C., Almeida, R. R., Vieira, IGP & Guedes, M. I. F. (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* espécies from Northeastern Brasil. *Pharm. Biol.*, 50(6), 740-746.

Silva, J. M. D., Verçosa, B. M. G., Nobre, F. C., de Melo Azevedo, L., Silva, M. L. T., Belo, Z. S., & Cota, A. L. S. (2020). Utilização de fitoterápicos na Odontologia: revisão integrativa. *Research, Society and Development*, 9(8), e209985370-e209985370.

Werlang, A. I., Baldissarelli, F., Werlang, F. A., Vanni, J. R., Hartmann, M. S. M. (2016). Insucesso no tratamento endodôntico: uma revisão de literatura. *Revista tecnológica*, 5(2), 31-47.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Carlus Alberto Oliveira dos Santos – 20%

Moisés Willians da Silva – 15%

Karolyne de Melo Soares – 15%

Ana Karina Almeida Rolim – 7,5%

Fábio Victor Dias Silva – 10%

Kauana da Silva Andrade – 10%

Anderson Marcos Vieira do Nascimento – 7,5%

Maria Regina Macêdo-Costa – 15%