

Atividade antibacteriana de imburana-de-espinho sobre bactérias do meio ambiente bucal

Antibacterial activity of imburana-de-espinho on oral bacteria

Actividad antibacteriana de la imburana-de-espinho sobre las bacterias orales

Recebido: 26/04/2022 | Revisado: 05/05/2022 | Aceito: 13/05/2022 | Publicado: 18/05/2022

Heloísa Peixoto Dantas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2078-1169>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: heloisap.dantas@gmail.com

Valkleudson Santos de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8613-9537>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: valkleidsonaraujo@hotmail.com

Rebeca Silva Ribeiro Confessor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0746-1024>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: recebaodontoufrn@gmail.com

Edine Maria de Medeiros Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1649-0510>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: edinecampos@hotmail.com

Renato Dantas de Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2208-7808>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: renatodantas18@hotmail.com

Ruthineia Diogenes Alves Uchoa Lins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0047-5976>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: aruthineia@gmail.com

Maria Celeste Nunes de Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9826-4981>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: celmelo@gmail.com

Silvana Maria Zucolotto Langassner

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2768-0793>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: silvanazucolotto@ufrnet.br

Kênio Costa de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5668-4398>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: limke@uol.com.br

Maria Regina Macedo Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6362-502X>
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
E-mail: mariareginamacedo@yahoo.com.br

Resumo

Devido aos altos índices de infecções bucais, em paralelo à necessidade de novos métodos antimicrobianos, os fitoterápicos têm sido a escolha com ação efetiva e de menor toxicidade, quando vigorosamente padronizados. A planta medicinal *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett, popularmente conhecida como imburana-de-espinho, encontrada no bioma Caatinga, tem sido pesquisada para esse fim. Com isso, o objetivo da pesquisa é investigar in vitro a ação antimicrobiana, bactericida e antiaderente do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett sobre *Streptococcus mutans*. Após a confecção do extrato, foram executados 3 experimentos: determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos*; determinação da concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) e; determinação da cinética bactericida (CB) com cultivo de *S. mutans*. O resultado para a CIM foi a diluição 1:16 ($3,125 \times 10^{-2}$ g/mL), enquanto a CIMA foi a diluição 1:128 ($3,90625 \times 10^{-3}$ g/mL) e a CB apresentou crescimento bacteriano 2 horas após o contato do

extrato com a bactéria. A conclusão do presente estudo é que o extrato apresenta ação bacteriostática e antiaderente, contudo, a cinética bactericida precisa de mais estudos.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Ensino; Fitoterapia; Imburana; *Streptococcus mutans*.

Abstract

Due to the high rates of oral infections, in parallel with the need for new antimicrobial methods, herbal medicines have been the choice with effective action and less toxicity, when vigorously standardized. The medicinal plant *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett, popularly known as imburana-de-espinho, found in the Caatinga biome, has been researched for this purpose. Thus, the objective of the research is to investigate in vitro the antimicrobial, bactericidal and anti-adherent action of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett on *Streptococcus mutans*. After making the extract, 3 experiments were carried out: determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract from the stem bark of *C. leptophloeos*; determination of adhesion minimum inhibitory concentration (MICA) and; determination of bactericidal kinetics (BC) with *S. mutans* culture. The result for the MIC was the 1:16 dilution ($3,125 \times 10^{-2}$ g/mL), while the CIMA was the 1:128 dilution ($3,90625 \times 10^{-3}$ g/mL) and CB showed bacterial growth 2 hours after the contact of the extract with the bacteria. The conclusion of the present study is that the extract has bacteriostatic and anti-adherent action, however, the bactericidal kinetics needs further studies.

Keywords: Antimicrobial; Teaching; Phytotherapy; Imburana; *Streptococcus mutans*.

Resumen

Debido a las altas tasas de infecciones orales, en paralelo con la necesidad de nuevos métodos antimicrobianos, los medicamentos a base de hierbas han sido la elección con una acción eficaz y menos toxicidad, cuando se estandarizan vigorosamente. Para ello, se ha investigado la planta medicinal *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett, conocida popularmente como imburana-de-espinho, que se encuentra en el bioma Caatinga. Así, el objetivo de la investigación es investigar in vitro la acción antimicrobiana, bactericida y antiadherente del extracto hidroetanólico de la corteza del tallo de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett sobre *Streptococcus mutans*. Luego de realizar el extracto, se realizaron 3 experimentos: determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto de corteza de tallo de *C. leptophloeos*; determinación de la concentración inhibitoria mínima de adhesión (MICA) y; determinación de la cinética bactericida (BC) con cultivo de *S. mutans*. El resultado para el MIC fue la dilución 1:16 ($3,125 \times 10^{-2}$ g/mL), mientras que el CIMA fue la dilución 1:128 ($3,90625 \times 10^{-3}$ g/mL) y CB mostraron crecimiento bacteriano 2 horas después del contacto del extracto con la bacteria. La conclusión del presente estudio es que el extracto tiene acción bacteriostática y antiadherente, sin embargo, la cinética bactericida necesita más estudios.

Palabras clave: Antimicrobiano; Enseñanza; Fitoterapia; Imburana; *Streptococcus mutans*.

1. Introdução

A medicina popular no Brasil é derivada de uma mistura de culturas indígenas, europeias e africanas e é caracterizada pelo conhecimento tradicional relacionado ao uso de plantas medicinais que surgem como alternativa a terapias associadas ao tratamento de doenças (inclusive bucais), sobretudo, nas regiões que possuem pouca infraestrutura para o acesso aos fármacos comercializados. No entanto, muitas espécies são usadas sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país com uma enorme biodiversidade, existe uma lacuna nas pesquisas realizadas sobre o tema (Trentin et al., 2013; Moro et al., 2018; Cartaxo et al., 2010; Groppo et al., 2008; Giraldi & Hanazaki, 2010).

A Caatinga é um bioma do Nordeste do Brasil e contém uma grande diversidade de recursos vegetais utilizados na medicina para tratar enfermidades (Agra et al., 2007). Dentre as plantas encontradas nessa região, a *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett (*C. leptophloeos*), da família *Burseraceae*, tem sido investigada por suas propriedades biológicas e fisiológicas. *C. leptophloeos* é popularmente conhecida por imburana, imburana-de-espinho e imburana-de-cambão, palavra de origem tupi que significa “falso imbu” ou “falsa árvore da água” (“y-mb-u” refere-se a “árvore da água” e “ra-na” a “falso”) (Trentin et al., 2013; Dantas-Medeiros et al., 2021b).

Estudos já comprovaram a presença de vários compostos bioativos na espécie *C. leptophloeos*. Apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas - contra gram-positivas e negativas, e fungos. Pode ser usado como infusão, chá, xarope, maceração ou decocção por via oral ou tópica. Utiliza-se casca, caule, folhas, frutos, flores, látex e sementes para tratar doenças inflamatórias, respiratórias, renais, intestinais, diabetes, dores, úlceras e insônia (Trentin et al., 2013; Dantas-

Medeiros et al., 2021b; Pereira et al., 2017; Pessoa et al., 2021; Albuquerque et al., 2007; Agra et al., 2007a; Carvalho, 2009).

Há uma crescente busca por alternativas para o tratamento de infecções, inclusive na odontologia. A cárie dentária é a doença bucal mais comum no mundo. O principal agente etiológico é a bactéria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) que, além de ser acidúrica e acidogênica, tem forte capacidade de formação de biofilme, promovendo resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às terapias antibióticas convencionais (Eriksson et al., 2017; Wang et al., 2012; Trentin et al., 2013; Taraszkievicz et al., 2013). Para prevenir e tratar corretamente, é necessário controlar o fator etiológico. Muitos agentes antimicrobianos já são utilizados para prejudicar a adesão bacteriana, associados com a desorganização mecânica do biofilme através da escovação. Existe uma ampla lista de drogas baseadas e derivadas de produtos naturais, contudo podem gerar efeitos adversos e colaterais ao hospedeiro, além do uso indevido proporcionar resistência microbiana (Wang et al., 2012; Taraszkievicz et al., 2013; Pereira et al., 2017; Dantas-Medeiros et al., 2021b; Groppo et al., 2008). Para mais, a busca por novas modalidades de tratamento não pode cessar devido à toxicidade a curto e longo prazo e custos elevados. Assim, é necessário que exista uma persistente pesquisa pela obtenção de formulações para higiene bucal mais potentes.

Para resolução desses problemas, tem-se pesquisado alternativas como o uso de fitoterápicos. Estudos já comprovaram que as plantas medicinais podem possuir compostos biologicamente ativos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antissépticas, anti-inflamatórias, anticolagenases, analgésicas e agentes sedativos, proporcionando uma defesa química (Trentin et al., 2013; Moro et al., 2018; Otimenyin, 2018).

Tendo em vista o potencial da *C. leptophloeos* e a necessidade de inovação dos métodos terapêuticos aplicados na odontologia, o objetivo da pesquisa é investigar in vitro a ação antimicrobiana, bactericida e antiaderente do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *C. leptophloeos* sobre *S. mutans*.

2. Metodologia

2.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo in vitro, pré-clínico. Este estudo se reveste de importância, na medida em que o desenvolvimento de soluções naturais alternativas e economicamente viáveis, com menores efeitos colaterais, substituindo antimicrobianos usualmente utilizados, para o tratamento de infecções bucais, sobretudo a doença cárie, são requeridas.

2.2 Material Vegetal

O material vegetal é constituído das cascas do caule de *C. leptophloeos*. O material vegetal foi coletado na comunidade do Carão, Município de Altinho, no Pernambuco, Brasil, as seguintes coordenadas geográficas: latitude: 8° 29 32 S e longitude: 36° 03 03 W. A autorização da coleta foi obtida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número de processo 35017 e a Autorização de acesso ao Patrimônio Genético foi obtida pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente (CGEN/MMA), sob o número de cadastro no SISGEN A618873. Uma exsiccata incluindo folhas e cascas do caule de *C. leptophloeos* foi depositada no Herbário Geraldo Mariz (UFP) da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), com o número de registro UFP: 46.191.

2.3 Preparação do Extrato das Cascas do Caule de *C. Leptophloeos*

O material foi seco em estufa de ar circulante (temperatura inferior a 45 °C), e em seguida foram trituradas em moinho de facas. O material obtido após trituração foi submetido à produção do extrato, pelo método de maceração (48 h), utilizando como solvente etanol: água (70:30, v/v) na proporção de 1:10 de solvente (g/v). Na sequência, o material vegetal foi submetido a três remacerações seguidas de 48 horas, cada. Em seguida, o extrato foi filtrado através de filtro de papel obtendo-se então os

extratos hidroetanólicos (EH) 70%. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida com o auxílio de um evaporador rotatório (Büchi®) com temperatura $\leq 40^{\circ}\text{C}$ e por fim liofilizado e armazenado a -20°C .

2.4 Partição Líquido-Líquido do Extrato das Cascas do Caule de *C. leptophloeos*

Após a redução total da fase orgânica do extrato com o auxílio de um evaporador rotatório à temperatura não superior a 40°C , a fase aquosa do extrato foi submetida a uma partição líquido-líquido em funil de separação. Foram utilizados solventes de polaridade crescente, para obtenção das frações diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt), n-butanol (n-BuOH) e residual aquosa. O processo foi repetido 3 vezes utilizando uma alíquota de 150 mL por vez para cada solvente.

2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Extrato das Cascas do Caule DE *C. leptophloeos*

A bactéria *S. mutans* foi cultivada em meio Ágar Mueller Hinton (MH) a 37°C durante 24 horas e o inóculo foi padronizado em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,9% estéril. A suspensão microbiana foi ajustada com o auxílio da escala de McFarland e semeada em placas contendo meio Ágar MH estéril. O extrato foi diluído em água destilada estéril, na concentração de 0,5 g/mL. A partir da diluição 1, por diluição seriada, contendo 0,5 mL de água destilada estéril em outros nove tubos, foi adicionado 0,5 mL da diluição anterior. Nos poços identificados, foram colocados setenta microlitros da diluição, conforme método adaptado de Bauer, Kirby, Sherris e Turck (1966). O controle positivo foi feito com digluconato de clorexidina a 0,12%. Então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, o crescimento microbiano foi indicado e o halo de inibição formado.

2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência do Extrato das Cascas do Caule de *C. leptophloeos*

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao vidro (simulando superfície dentária), foi determinada na presença de sacarose a 5%, de acordo com método adaptado de Gerbara, Zardetto e Mayer (1996), usando-se concentrações crescentes e dobradas da solução e diluídas do extrato, variando de EB a 1:512. A partir do crescimento bacteriano, as linhagens foram sub-cultivadas a 37°C em Caldo MH (DIFCO®, Michigan, Estados Unidos), obtendo-se um inóculo de 106 UFC/mL. Foram distribuídos 1,8mL do subcultivo em tubos de hemólise e, em seguida, adicionado 0,2 mL da solução correspondente à escala do extrato. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas em microaerofilia, com os tubos inclinados a 30° . A leitura foi realizada através da observação visual da aderência da bactéria às paredes do tubo após agitação. Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada linhagem selecionada. O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo, o digluconato de clorexidina a 0,12%. A CIMA foi definida como a menor concentração do agente em meio com sacarose, que impede a aderência ao tubo de vidro.

2.7 Determinação da Cinética Bactericida do Extrato das Cascas do Caule de *C. leptophloeos*

A curva bacteriana frente ao extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* foi avaliada a partir de adaptação do método de Peyret, Carret, Carre, Fardel e Flandrois (1990). As amostras foram inoculadas em caldo nutritivo (BHI- DIFCO®, Michigan, Estados Unidos), incubadas a 37°C e subcultivadas em Caldo MH (DIFCO®, Michigan, Estados Unidos), obtendo-se um inóculo de 106 UFC/mL. A 9 mL da cultura microbiana, será adicionado 1 mL do extrato (CIM), e ao tubo controle foi adicionado 1 mL de água destilada e esterilizada. As alíquotas - cem microlitros - dos tubos foram retiradas após 2 e 3 horas de incubação e semeadas em placas com Ágar MH (DIFCO®, Michigan, Estados Unidos). Cada ensaio foi realizado em duplicata. A leitura das placas foi efetuada após incubação por 24 horas a 37°C , pelo método padrão de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) placas, observando o potencial bactericida do extrato por um determinado tempo.

2.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram coletados, organizados e as médias foram apresentadas em forma de tabelas. Para determinação da CIM do extrato, a formação de halo definiu a menor concentração. Para a CB e CIMA a análise foi descritiva através do método padrão de contagem de UFC/mL e através da observação visual da aderência dos microrganismos às paredes do tubo de vidro, respectivamente.

3. Resultados e Discussão

Para a concentração inibitória mínima (CIM) para a bactéria *S. mutans*, foram constatadas diluições diferentes nas duplicatas, correspondente a 1:16 e 1:32, com concentrações de $3,125 \times 10^{-2}$ g/mL e $1,5625 \times 10^{-2}$ g/mL, tendo média de halo de 11 e 5, respectivamente, exibido na Tabela 1.

Tabela 1 - Determinação da concentração inibitória mínima do extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* com cultivo de *S. mutans*

Diluição	Média dos halos de inibição de extrato	Diluição	Média dos halos de inibição de clorexidina
EB (0,5 g/ml)	23 mm	SP ($1,2 \times 10^{-1}$ %)	33 mm
1:2 ($2,5 \times 10^{-1}$ g/mL)	19 mm	1:2 (6×10^{-2} %)	31 mm
1:4 ($1,25 \times 10^{-1}$ g/mL)	16 mm	1:4 (3×10^{-2} %)	30,5 mm
1:8 ($6,25 \times 10^{-2}$ g/mL)	13,5 mm	1:8 ($1,5 \times 10^{-2}$ %)	27,5 mm
1:16 ($3,125 \times 10^{-2}$ g/mL)	11 mm	1:16 ($7,5 \times 10^{-3}$ %)	24,5 mm
1:32 ($1,5625 \times 10^{-2}$ g/mL)	5 mm	1:32 ($3,75 \times 10^{-3}$ %)	19,5 mm
1:64 ($7,8125 \times 10^{-3}$ g/mL)	-	1:64 ($1,875 \times 10^{-3}$ %)	16,5 mm
1:128 ($3,90625 \times 10^{-3}$ g/mL)	-	1:128 ($9,375 \times 10^{-4}$ %)	13,5 mm
1:256 ($1,953125 \times 10^{-3}$ g/mL)	-	1:256 ($4,6875 \times 10^{-4}$ %)	11,5 mm
1:512 ($9,76562 \times 10^{-4}$ g/mL)	-	1:512 ($2,34375 \times 10^{-4}$ %)	-

Fonte: Autores.

Para a determinação da concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) do extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* para a bactéria *S. mutans*, foi observado que a partir da nona diluição havia adesão da bactéria à parede do tubo de hemólise, como mostrado na Tabela 2. Dessa forma, a CIMA é a diluição 1/128 ($3,90625 \times 10^{-3}$ g/mL). Para a determinação da cinética bactericida (CB) do extrato, foi utilizada a CIM, ou seja, diluição 1/16, com adição à solução contendo *S. mutans*, demonstrando que nessa diluição não foi possível ver atividade bactericida do extrato, como mostra a Tabela 3. Para a CB, foi necessário a redução do tempo de coleta das alíquotas, reduzindo o padrão de 24 horas para o de 3 horas.

Tabela 2 - Determinação da concentração inibitória mínima de aderência do extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* para *S. mutans*

Tubo	Aderência com extrato	Tubo	Aderência com clorexidina
EB (0,5 g/ml)	-	SP (1,2 x 10 ⁻¹ %)	-
1:2 (2,5 x 10 ⁻¹ g/mL)	-	1:2 (6 x 10 ⁻² %)	-
1:4 (1,25 x 10 ⁻¹ g/mL)	-	1:4 (3 x 10 ⁻² %)	-
1:8 (6,25 x 10 ⁻² g/mL)	-	1:8 (1,5 x 10 ⁻² %)	-
1: 16 (3,125 x 10 ⁻² g/mL)	-	1: 16 (7,5 x 10 ⁻³ %)	-
1: 32 (1,5625 x 10 ⁻² g/mL)	-	1: 32 (3,75 x 10 ⁻³ %)	-
1: 64 (7,8125 x 10 ⁻³ g/mL)	-	1: 64 (1,875 x 10 ⁻³ %)	-
1: 128 (3,90625 x 10 ⁻³ g/mL)	-	1: 128 (9,375 x 10 ⁻⁴ %)	-
1: 256 (1,953125 x 10 ⁻³ g/mL)	+	1: 256 (4,6875 x 10 ⁻⁴ %)	-
1: 512 (9,76562 x 10 ⁻⁴ g/mL)	+	1:512 (2,34375 x 10 ⁻⁴ %)	-

Fonte: Autores.

Tabela 3 - Determinação da cinética bactericida do extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* para *S. mutans*.

Placa	Crescimento bacteriano com Extrato + <i>S. mutans</i>	Crescimento bacteriano com Água destilada estéril
2 horas	+	-
3 horas	+	-

Fonte: Autores.

O desenvolvimento de novos fitoterápicos constitui uma importante fonte de inovação em saúde com a inclusão de novas alternativas terapêuticas. A RDC N° 26, de maio de 2014 define fitoterápicos como medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Com o propósito da inserção da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), o Ministério da Saúde vem desenvolvendo ações para implementar novas políticas públicas voltadas à introdução do uso de plantas medicinais e da fitoterapia no SUS e que ocorra o desenvolvimento do setor, em toda a cadeia produtiva (Brasil, 2006).

Na odontologia, os fitoterápicos têm sido incentivados através da aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e com os avanços científicos (da Silva et al., 2020). Estudo de Jácome et al. (2022) apontaram ainda que os fitoterápicos são uma opção viável para usar pré e pós-cirurgias odontológicas.

A imburana-de-espinho (*C. leptophloeos*) é tradicional do bioma da Caatinga e é utilizada pela população local como uma planta medicinal. A família *Burseraceae* é encontrada principalmente na região Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil e é formada por aproximadamente 600 espécies distribuídas entre 20 gêneros, de porte arbóreo, raramente arbustos, que possuem óleos essenciais aromáticos e resina na casca. As folhas são alternas, em espiral ou dística, compostas, pinadas, ternadas ou unifolioladas. É uma família de distribuição pantropical, mas apresenta a maior riqueza de espécies na América do Sul (Daly, 1987; Watson & Dallwitz, 1991). O gênero *Commiphora* possui 208 espécies, distribuídas por toda América do Sul, embora a maior parte das espécies seja encontrada no Nordeste brasileiro (Carvalho, 2009).

Estudos anteriores comprovaram que a espécie possui baixo efeito tóxico em modelos experimentais in vivo de camundongos CL-EtOH L e efeitos antidiarreico, antiespasmódico, e anti-inflamatório in vitro; evita a formação de biofilme com atividade bacteriostática contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* – incluindo quando há resistência a metilicilina -, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Aspergillus spp.* (Pessoa et al., 2021; Dantas-Medeiros et al., 2021b; Trentin et al., 2013; Dantas-Medeiros et al., 2021a; Silva et al., 2019; Pereira et al., 2017).

Tem sido demonstrado que a espécie *C. leptophloeos* possui compostos bioativos capazes de promover efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Dentre os compostos encontrados estão taninos, ácidos fenólicos, flavonóides O- e C-glicosilados, lignanas (hinoquinina), tipos A- e B-proantocianidinas poliméricas, terpenóides, ácido quínico, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido protocatecuico. Pode ser utilizado de diversas formas, como infusão, chá, xarope, maceração ou decocção por via oral ou tópica. Utiliza-se a casca, caule, folhas e frutos para tratar doenças inflamatórias, tosse, bronquite, infecções, edema, diabetes, úlceras, asma e dor. As flores e látex são indicados para problemas renais, gripe, tosse, bronquite, disfonia, inflamação, dor de dente, cólica e diarreia, enquanto as sementes são recomendadas no tratamento da insônia (Trentin et al., 2013; Dantas-Medeiros et al., 2021a; Pereira et al., 2017; Dantas-Medeiros et al., 2021b; Pessoa et al., 2021; Albuquerque et al., 2007; Agra et al., 2007a; Carvalho, 2009).

O presente estudo avaliou a atividade da *C. leptophloeos* diante microrganismos do meio ambiente bucal, sobretudo quanto a *S. mutans*. Para tal, a padronização de extratos vegetais é uma etapa primordial no desenvolvimento de novos fitoterápicos. Estudos voltados para extratos da casca do caule da imburana-de-espinho já foram realizados. O isolamento, a elucidação estrutural e a caracterização das substâncias no extrato foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência. A toxicidade do extrato foi avaliada in vitro pelo ensaio de MTT (ensaio de viabilidade celular), apresentando toxicidade em concentrações superiores a 200 µg/mL; e citometria de fluxo e in vivo pelo teste de toxicidade aguda, via oral, concluindo que possui baixa toxicidade e a dose letal é superior a 2000 mg/kg. A atividade anti-inflamatória in vitro foi avaliada pelo ensaio de óxido nítrico induzido por LPS e in vivo nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e de bolsa de ar induzida por zimozam, tendo ação significativa em concentrações de 100 a 400 mg/kg. Para os resultados já obtidos, destacamos o isolamento do composto majoritário (dímero de catequina), descrito pela primeira vez, que apresentou uma promissora atividade antibacteriana. Além disso, foi observado que o extrato hidroetanólico das cascas do caule não dispõe de citotoxicidade e apresenta um potencial terapêutico para o desenvolvimento de fitoterápicos com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (Dantas-Medeiros et al., 2019). É importante mencionar que, até o momento, não há relatos na literatura da avaliação do potencial antibacteriano de *C. leptophloeos* contra bactérias do meio ambiente bucal e doenças bucais biofilme dependentes.

Para alcançar o objetivo da pesquisa, foram realizados 3 experimentos. O primeiro experimento visava a avaliação da CIM para *S. mutans*. Foi observado que a CIM é a diluição 1:16 ($3,125 \times 10^{-2}$ g/mL). Na duplicata com extrato no experimento com a bactéria, foi observado que o poço com diluição 1:32 ($1,5625 \times 10^{-2}$ g/mL) ainda apresentou halo de inibição, contudo, como ocorreu apenas em uma placa, utilizou-se a última diluição que englobasse ambas. Ainda é possível avaliar que, por ter ocorrido formação de halo nos poços com concentrações maiores, o extrato tem capacidade inibitória.

O segundo experimento avaliou a CIMA para *S. mutans* e foi constatada a capacidade de inibir a aderência bacteriana, desfavorecendo a formação de biofilme. A CIMA é a diluição 1:128 ($3,90625 \times 10^{-3}$ g/mL), dessa forma, a partir da diluição 1:256 ($1,953125 \times 10^{-3}$ g/mL), houve adesão bacteriana no tubo de hemólise.

O terceiro experimento avaliou a CB, utilizando a CIM, para a bactéria. Esse teste demonstrou que houve formação de um tapete bacteriano por toda a placa tanto em 2 horas como em 3 horas após a mistura do extrato com *S. mutans*, concluindo

então que a capacidade CB acontece antes das 2 horas de contato. Há ainda a possibilidade de a concentração usada ter sido insuficiente para uma ação da CB do extrato mais prolongada, sendo necessários mais estudos com concentrações maiores.

Diante dos resultados apresentados por essa pesquisa, é importante ressaltar que a literatura tem escassez de informações sobre plantas medicinais para uso na prática odontológica, sobretudo quanto à qualidade, segurança e eficácia, sendo necessários mais estudos voltados para essa linha de pesquisa (Groppo et al., 2008).

4. Conclusão

O presente estudo pode concluir que o extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* tem capacidade inibitória do crescimento bacteriano de *S. mutans*. Além disso, exibe capacidade inibitória de aderência da bactéria, contudo, a cinética bactericida utilizando a CIM foi insuficiente, sendo necessários mais estudos com concentrações maiores. Dessa forma, o extrato apresenta ação bacteriostática e antiaderente. É importante mencionar que, até o momento, não havia relatos na literatura, in vivo ou in vitro, da avaliação do potencial antibacteriano de *C. leptophloeos* contra bactérias do meio ambiente bucal.

Dessa forma, propõe-se, para trabalhos futuros, a investigação da ação antimicrobiana do extrato das cascas do caule de *C. leptophloeos* frente a outros microrganismos que compõem o meio ambiente bucal e que estão associados a doenças biofilme-dependentes. Além disso, são necessários testes da ação do extrato frente aos microrganismos em cultura mista e organizados em biofilme, bem como estudos de citotoxicidade.

Referências

- Agra, M. D. F., Baracho, G. S., Nurit, K., Basílio, I. J. L. D., & Coelho, V. P. M. (2007). Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 383-395.
- Agra, M. D. F., Freitas, P. F. D., & Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 114-140.
- Ajayi, A. M., Martins, D. T. O., Balogun, S. O., Oliveira, R. G., Ascêncio, S. D., Soares, I. M., Barbosa, R. S., & Ademowo, O. G. (2017). Ocimum gratissimum L. leaf flavonoid-rich fraction suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and peritonitis in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 204, 169-178.
- Albuquerque, U. P., Lucena, R. F., Monteiro, J. M., Florentino, A. T., & Almeida, C. F. (2006). Evaluating two quantitative ethnobotanical techniques. *Ethnobotany Research and Applications*, 4, 051-060.
- Albuquerque, U. P., Medeiros, P. M., Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Lins Neto, E. M. D. F. L., Melo, J. G., & Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of ethnopharmacology*, 114(3), 325-354.
- Araújo, T. A. S., Alencar, N. L., Amorim, E. L. C., & Albuquerque, U. P. (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of ethnopharmacology*, 120(1), 72-80.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress*, 153-167.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 149-158.
- Bezerra, A. G., Negri, G., Duarte-Almeida, J. M., Smaili, S. S., & Carlini, E. A. (2016). Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. *Einstein (São Paulo)*, 14(1), 56-63.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brasil, Ministério da Saúde (2006). Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006.
- Brasil, Ministério da Saúde (2009) RENISUS. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.
- Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014). Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 14 de maio de 2014.

- Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Resolução de Diretoria Colegiada nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 24 de julho de 2017.
- Brown, W. J. (1988). National Committee for Clinical Laboratory Standards agar dilution susceptibility testing of anaerobic Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 32(3), 385-390.
- Brownlee, H. E., Hedger, J., & Scott, I. M. (1992). Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(4), 227-231.
- Calixto, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 131-134.
- Campaniço, A., Moreira, R. & Lopes, F. (2018). Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 525-545.
- Cartaxo, S. L., Souza, M. M. & Albuquerque, U. P. (2010). Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 326-342.
- Carvalho, A. C. B., Nunes, D. S. G., Baratelli, T. G., Mahmud, N. S., Shuqair, S. A. Q. & Machado Netto, E. (2007). Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, 5(11), 26-32.
- Carvalho, P. E. R. (2009). Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Carvalho, P. E. R. (2009). Imburana-de-espinho, *Commiphora leptophloeos*, Comunicado Técnico 228, 01-08.
- Cavalcanti, C. E. L., Silva, S. J., Castro, F. D., Dantas, M. A. C., Silva, H. & Pereira, C. T. (2016). Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-10.
- Chetia, M. & Das, R. (2018). Effect of (-)-epicatechin, a flavonoid on the NO and NOS activity of *Raillietina echinobothrida*. *Acta Tropica*, 178, 311-317.
- Church, D. F. & Pryor, W. A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspectives*, 64, 111-126.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement, ed. Document M100-S22. Pensilvânia, USA.
- Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D., Nör, C., Sarmiento, L., Lamb, L., Hass, M., Von Poser, G. & Schapoval, E. E. S. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10(6-7), 511-516.
- Daly, D. C. D. B. (1987). *A taxonomic revision of protium (burseraceae) in eastern Amazonia and the Guianas. (volumes i and ii)* (Doctoral dissertation, City University of New York).
- Dantas-Medeiros, R. (2019). *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett (Burseraceae): estudo fitoquímico, toxicidade e avaliação do potencial antiinflamatório e antimicrobiano (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).
- Dantas-Medeiros, R., Furtado, A. A., Zanatta, A. C., Torres-Rêgo, M., Lourenço, E. M. G., Alves, J. S. F., Galinari, E., Rocha, H. A. O., Guerra, G. C. B., Vilegas, W., Araújo, T. A. S., Fernandes-Pedrosa, M. F. & Zucolotto, S. M. (2021b). Mass spectrometry characterization of *Commiphora leptophloeos* leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113229.
- Dantas-Medeiros, R., Zanatta, A. C., Souza, L. B. F. C., Fernandes, J. M., Amorim-Carmo, B., Torres-Rêgo, M., Fernandes-Pedrosa, M. F., Vilegas, W., Araújo, T. A. S., Michel, S., Grougnet, R., Chaves, G. M. & Zucolotto, S. M. (2021a). Antifungal and Antibiofilm Activities of B-Type Oligomeric Procyanidins From *Commiphora leptophloeos* Used Alone or in Combination With Fluconazole Against *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 12, 613155.
- da Silva, JMD, Verçosa, BMG, Nobre, FC, de Melo Azevedo, L., Silva, MLT, Belo, ZS, & Cota, ALS (2020). Utilização de fitoterápicos na Odontologia: revisão integrativa. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 9 (8), e209985370-e209985370.
- David, J. P. L., Nascimento, J. A. P. & David, J. M. (2004). Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. *Infarma*, 16(9-10), 71-76.
- Eriksson, L., Lif Holgersson, P., Esberg, A. & Johansson, I. (2017). Complexos microbianos e cárie em crianças de 17 anos com e sem *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 97(3), 275282.
- Gerbara, E. C. E., Zardetto, C. G. D. C. & Mayer, M. P. A. (1996). Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 10(4), 251-256.
- Gillet, J. B. (1979). *Commiphora* (Burseraceae) in south America and its relationship to *Bursera*. *Kew Bulletin*, 34(3), 569-587.
- Gilligan, J. P., Lovato, S. J., Erion, M. D. & Jeng A. Y. (1994). Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*, 18, 285-292.
- Giraldi, M. & Hanazaki, N. (2010). Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 24, 395-406.
- Gomes, J. A. S., Félix-Silva, J., Fernandes, M. J., Amaral, G. J., Lopes, P. N., Egito, T. S. E., Silva-Júnior, A. A., Zucolotto, M. S. & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2016). Aqueous Leaf Extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail Decreases Local Effects Induced by Bothropic Venom. *BioMed Research International*, 1-16.

- Gonzalez, M. H., Bianchi, R. S., Pereira C. D., Cassiano, M. N. & Cass, B. Q. (2011). Evaporative light scattering detector: operation principles and applications in high performance liquid chromatography. *Scientia Chromatographica*, 3(4), 315-325.
- Grosso, F. C., Bergamaschi, C. C., Cogo, C., Franz-Montan, M., Motta, R. H. L. & Andrade, E. D. (2008). Use of phytotherapy in dentistry. *Phytotherapy Research*, 22(8), 993-998.
- Hajhashemi, V., Sadeghi, H., Minaiyan, M., Movahedian, A. & Talebi, A. (2010). Central and peripheral anti-inflammatory effects of maprotiline on carrageenan-induced paw edema in rats. *Inflammation Research*, 59(12), 1053-1059.
- He, M., Min, Jia-Wei., Kong, Wei-Lin., He, Hua-Xiao., Li, Jun-Xu. & Peng, Bi-Wen. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115, 74-85.
- Holetz, F. B., Pessini, L. G., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V. & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031.
- International Conference on Harmonization (1996). Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. Rockville: FDA.
- Jácome, E. V. M., de Macedo, D. D. S., Ferreira, F. D., de Paiva Diógenes, R. F., Alves, A. D. D., & Lima, Á. M. P. (2022). Fitoterapia em tratamentos pré e pós-cirúrgicos odontológicos. *Revista Fitos*, 16(1), 83-92.
- Jan, H. A., Wali, S., Ahmad, L., Samin, J., Ahmad, N. & Ulla, N. (2017). An ethnomedicinal survey of medicinal plants of Valley Chinglai District Buner, Pakistan. *European Journal of Integrative Medicine*, 3, 64-74.
- Jeon, J., Kim, H. J., Lee, C. K., Oh, C. H. & Song, H. J. (2014). The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. *Annals of Dermatology*, 26(5), 1-6.
- Jiang, W. J., Daikonya, A., Ohkawara, M., Nemoto, T., Noritake, R., Takamiya, T., Kitanaka, S. & Iijima, H. (2017). Structure-activity relationship of the inhibitory effects of flavonoids on nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(2), 779-788.
- Jiang, Y., Yang, W., & Gui, S. (2018). Procyanidin B2 Protects Rats from Paraquat-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunobiology*, 223(10), 555-561.
- Jung, H. A., Jim, S. E., Choi, R. J., Kim, D. h., Kim, Y. S., Ryu, J. H., Kim D-W., Son, Y. K., Park, J. J. & Choi, J. S. (2010). Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1. *Life Sciences*, 87, 420-430.
- Júnior, W. S., Ladio, A. H. & Albuquerque, U. P. (2011). Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 338-252.
- Kale, M., Misar, A. V., Dave, V., Joshi, M. & Mujumdar, A. M. (2007). Antiinflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 300-304.
- Kamran, M., Khan, M. R., Khan, H. U., Abbas, M., Iqbal, M. & Nazir, A. (2018). Phytochemical and cytotoxic evaluation of *Medicago monantha*: In vivo protective potential in rats. *Biomedicine. Pharmacotherapy*, 102, 1052-1063.
- Kao, T. K., Ou, Y. C., Raung, S. L., Lai, C. Y., Liao, S. L. & Chen, C. J. (2010). Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Science*, 86, 315-321.
- Klein, T., Longhini, R., Bruschi, M. L. & Mello, J. C. P. (2009). Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(3).
- Latha, B. P., Reddy, R. M., Ismail, S. M., & Vijaya, T. (2010). Medicinal plants and their derivatives as potential source in treatment of obesity. *Asian J Exp Biol Sci*, 1(4), 719-727.
- Lesellier, E., Valarché, A., West, C. & Dreux, M. (2012). Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1250, 220-226.
- Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Perez, D. L. & Heredia, B. J. (2016). Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-15.
- Lima, C. S., Albuquerque, U. P., Silva, F. S. B. & Sntos, H. R. S. (2017). Mycorrhizal symbiosis increase the level of total foliar phenols and tannins in *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett seedlings. *Industrial Crops & Products*, 104, 28-32.
- Moro, M. G., Souto, M. L. S., Franco, G. C. N., Holzhausen, M. & Pannuti, C. M. (2018). Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: a systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 53(3), 288-297.
- Otimenyin, S. O. (2018). Antiinflammatory Medicinal Plants: A Remedy for Most Disease Conditions?. In *Natural Products and Drug Discovery* (pp. 411-431). Elsevier.
- Pereira, J. J. S., Pereira, A. P. C., Jandú, J. J. B., Paz, J. A., Crovella, S., Correia, M. T. S. & Silva, J. A. (2017). *Commiphora leptophloeos* phytochemical and antimicrobial characterization. *Frontiers in Microbiology*, 8, 52.
- Pessoa, R. F., Figueiredo, I. A. D., Ferreira, S. R. D., Silva, A. R. L. F. C., Paiva, R. L. M., Cordeiro, L. V., Lima, E. O., Cabrera, S. P., Silva, T. M. S. & Cavalcante, F. A. (2021). Investigation of ethnomedicinal use of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett (Bursaceae) in treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113564.

Silva, I. F., Guimarães, A. L., Amorim, V. S., Silva, T. M. G., Peixoto, R. M., Nunes, X. P., Silva, T. M. S. & Costa, M. M. (2019). Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Commiphora leptophloeos* (mart.) JB Gillett against *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in ruminants. *Ciência Animal Brasileira*, 20.

Taraskiewicz, A., Fila, G., Grilholc, M. & Nakonieczna, J. (2013). Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed Research International*, 2013.

Trentin, D. S., Silva, D. B., Amaral, M. W., Zimmer, K. R., Silva, M. V., Lopes, N. P., Giordani, R. B. & Macedo, A. J. (2013). Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PloS one*, 8(6), e66257.

Wang, W., Tao, Rui., Tong, Z., Ding, Y., Kuang, R., Zhai, S., Liu, J. & Ni, L. (2012). Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides*, 33(2), 212-219.

Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1991). The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Australian Systematic Botany*, 4(4), 681-695.