

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Atividade antimicrobiana de diferentes extratos
etanólicos de *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.
em estreptococos orais**

Rafael Guerra Lund

Pelotas, 2007

RAFAEL GUERRA LUND

**Atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos
de *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. em estreptococos
orais**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Odontologia, Área de concentração em
Dentística

Orientador: Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Co-orientadora: Profa. Dra. Gladis Aver Ribeiro

PELOTAS

Rio Grande do Sul - Brasil

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Lund, Rafael Guerra

Atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos de *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. em estreptococos orais / Rafael Guerra Lund. - Pelotas: UFPel, 2007.

71f.

Orientador: Francisco Augusto Burkert Del Pino

Co-orientadora: Gladis Aver Ribeiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Pós-Graduação em Odontologia, 2007.

1. Dentística. 2. Agentes cariostáticos. 3. Cogumelos medicinais. 4. Streptococcus mutans. 5. Cogumelo-do-sol. 6. Agentes antimicrobianos. I. Del Pino, Francisco Augusto Burkert. II. Ribeiro, Gladis Aver. III. Título.

BLACK D2

Catalogação na Fonte: Aline Herbstrith Batista CRB 10/ 1737

Banca examinadora

Prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente

Profa. Dr. Rogério Antônio Freitag

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino (Orientador)

Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha vó materna, meus pais e minhas irmãs, que através dos seus esforços inesgotáveis, foram os principais responsáveis pela minha formação, bem como a minha maior fonte de inspiração para sempre lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Francisco Augusto Burkert Del Pino, exemplo de dedicação ao trabalho e incentivo à pesquisa. Sempre soube, com sabedoria, exigir e elogiar nos momentos certos. Obrigado pelo constante estímulo para eu lutar pelos meus objetivos e a confiança na minha atuação acadêmica. Mas, principalmente, agradeço o vínculo de amizade construído nesses anos de convívio.

À minha co-orientadora Professora Doutora Gladis Aver Ribeiro, exemplo de disciplina e compromisso com a docência. Agradeço pelo auxílio indispensável na execução deste trabalho e por tudo que eu aprendi como aluno e professor colaborador de Microbiologia.

Ao Professor Doutor José Soares Nascimento, professor dedicado e especialista no mundo macrofúngico. Obrigado pelos ensinamentos sobre cogumelos e o seu apoio constante e incondicional neste trabalho.

Ao Professor Doutor Flávio Fernando Demarco, exemplo de pesquisador e meu eterno orientador, agradeço a confiança em mim depositada, a constante orientação de meus passos como pesquisador e a grande contribuição para a realização deste trabalho.

Aos Professores Evandro Piva e Flávio Renato Reis de Moura, meus eternos “gurus”, agradeço a infinita amizade. Até hoje não acredito que tenha sido merecedor de tamanha credibilidade, mas foi exatamente há 6 anos atrás que vocês me deram uma chance de mostrar o meu trabalho na Faculdade e eu comecei a fazer pesquisa em Odontologia. Olha no que resultou!!

Aos meus colegas e ex-colegas do Mestrado e Doutorado em Odontologia, Sônia, Renata, Paula, Giana, Vanessa, Flávia, Catiara, Fabrício, Dudu, Donassollo, Luciano, Fábio Lima, Fábio Herrmann, Josiane, Francine, Antônio, Elaine, Elenara, Mabel, Max, agradeço os grandes momentos que passamos juntos e a amizade conquistada com todos vocês.

Aos meus colegas Rodrigo “Baiano”, Sinval, Nihad e “Tino”, companheiros de militância acadêmica, colegas e amigos inseparáveis, por fazerem parte fundamental da minha história.

Às minhas colegas do Curso de especialização em Fitoquímica, agradeço a convivência maravilhosa que tivemos durante o curso e a nossa amizade.

À minha amiga Rosana, aluna da Biologia que eu adotei como co-orientada, mas sem registro. Agradeço todo o teu esforço e dedicação comigo. Obrigado pela tua amizade. Que este seja apenas um dos muitos trabalhos que faremos juntos.

À minha amiga Regina, também aluna da Biologia, agradeço os momentos que passamos juntos no laboratório e a amizade construída.

À minhas amigas Ane, Vivi e Anaí, alunas da Química, agradeço todos os momentos que passamos juntos no Laboratório de Flúor. Vocês são muito especiais!

Aos professores doutores Rogério Freitag, Maria Regina Rodrigues e Adriana Etges, obrigado pelo carinho e atenção de vocês. Também agradeço pela amizade de vocês e por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a continuar.

Às professoras do Departamento de Microbiologia, Helen, Patrícia, “Kika”, Sandra, Neila, Sabrina e Tiago, agradeço o convívio e os grandes momentos no Departamento de Microbiologia..

Aos demais amigos do Laboratório de Bacteriologia da profa. Gladis, agradeço todo a atenção, carinho e apoio de vocês.

A CAPES, importante órgão de fomento à pesquisa, agradeço o financiamento das minhas atividades de pós-graduando.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão deste trabalho, meu sincero agradecimento.

*“Perseverança não é uma longa
corrida; é um conjunto de
várias corridas curtas,
uma depois da outra.”*

(Walter Elliott)

Resumo

Lund, Rafael Guerra. **Atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos de *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. em estreptococos orais.** 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Uma variedade de doenças envolve a cavidade oral, como a cárie dental, considerada a patologia oral mais prevalente em todo o mundo. Atualmente, a cárie dental é uma doença multifatorial infecto-contagiosa, associada a bactérias patogênicas residentes do biofilme dental. Estes microrganismos são os responsáveis pela produção de ácidos e produtos citotóxicos que, respectivamente, levam à desmineralização de esmalte dental e inflamação gengival com posterior destruição dos tecidos de suporte dos dentes. Assim, o uso de agentes antimicrobianos eficientes contra essas bactérias é um importante meio de controle dessa doença bucal. Vários agentes antimicrobianos de origem natural estão sendo investigados devido as suas possíveis propriedades farmacológicas. O cogumelo *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. ("cogumelo-do-sol) destaca-se entre os produtos naturais com notáveis propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatórias e antitumorais. Neste estudo foi avaliado o efeito de três extratos etanólicos brutos (EtOH 100%, 75% e 50%) deste cogumelo sobre o crescimento e a aderência de estreptococos do grupo mutans. Os extratos etanólicos foram obtidos através do método de extração por maceração. Os controles negativos foram etanol 100%, 75% e 50%. Os testes antimicrobianos utilizados contra *Streptococcus mutans* UA 159 e *Streptococcus sobrinus* 6715 foram o método de difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e aderência dos microrganismos à superfície de vidro (Adh). No método de difusão em ágar, apenas o extrato 100% etanólico apresentou sinal de inibição do crescimento microbiano. Já nos testes de determinação da CIM e CBM, os três extratos apresentaram propriedades antimicrobianas e os valores de CIM e CBM variaram entre 87,4 e 444,5 µg/mL. A CBM para os três extratos etanólicos foi igual a CIM para *S.sobrinus*, mas apenas o extrato etanólico 75% foi bactericida para *S. mutans*. Entre os extratos etanólicos testados, o extrato 100% etanólico foi o mais ativo (CIM 87.4µg/mL). A aderência celular também foi inibida em concentrações de 100 a

400µg/mL dos extratos obtidos com etanol 50% e 75%. Concluindo, os extratos etanólicos de *A. brasiliensis* mostraram notáveis efeitos inibitórios no crescimento bacteriano e o extrato 100% etanólico foi o mais ativo.

Palavras chave: Agentes cariostáticos. Cogumelos medicinais. Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Cogumelo-do-sol. Agentes antimicrobianos.

Abstract

Lund, Rafael Guerra. **Antimicrobial activity of different ethanolic extracts of *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. against oral streptococci.** 2007. 71f. Dissertation (Master's in Dentistry) – Postgraduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas.

A great variety of diseases can affect the oral cavity, such as dental caries, that is considered the most prevalent oral disease worldwide. The multifactorial and infect-contagious characteristics of dental caries have been established, associated with resident bacterial pathogens of dental biofilm. These microorganisms are responsible by the production of acids and citotoxic products, which could respectively promote the demineralization of dental structure and gingival inflammation, with posterior destruction of supporting tissues. Therefore, the use of efficient antimicrobial agents against pathogenic bacteria is an important tool in the control of oral diseases. Several natural antimicrobial agents have been investigated because of their possible pharmacological properties. The mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. ("Royal-Sun-Agaricus") is pointed out as a natural product with noticeable antibacterial, antifungicidal, anti-inflammatory and antineoplastic properties. In this study the potential effect of this natural product was evaluated using three ethanolic crude extracts (100%, 75% and 50% EtOH) on growth and adherence of mutants streptococci. The ethanolic extracts were obtained by maceration process. Negative controls were 100%, 75% and 50% ethanol. The antimicrobial tests used against *Streptococcus mutans* UA 159 and *Streptococcus sobrinus* 6715 were agar diffusion method, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and bacterial cell adherence to a glass surface. In agar diffusion method, only the 100% ethanol extract revealed a slight inhibition of bacterial growth. Yet, in MIC and MBC tests, the three extracts presented antimicrobial properties and MIC and MBC values ranged between 87.4 and 444.5 µg/mL. The MBC for the three ethanolic extracts was similar to MIC against *S. mutans*, but only 75% ethanol extract was bactericidal against *S. sobrinus*. Among the ethanolic extracts tested, 100% ethanol extract was the most active (MIC 87.4 µg/mL). The cellular adherence also was inhibited at concentrations from 100 to 400 µg/mL of 50% and 75% ethanol extracts. In conclusion, the ethanolic extracts from *A. brasiliensis*

showed remarkable inhibitory effects on bacterial growth and the 100% ethanol extract was the most active.

Keywords: Cariostatic agents. Medicinal mushrooms. Biofilms. *Streptococcus mutans*. Royal-Sun-Agaricus. Antimicrobial agents.

Lista de Figuras

Figura 1	Espécie <i>Agaricus brasiliensis</i> S. Wasser et al. (“Cogumelo-do-sol”).....	24
Figura 2	Cepas de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> visualizadas através da coloração de Gram (aumento 1000x).....	27
Figura 3	Técnica da vela queimada (Carpentter), utilizada para obter condições de microaerofilia em jarra.....	28
Figura 4	Aparelho utilizado na quantificação da suspensão bacteriana.....	29
Figura 5	Disposição dos cilindros de aço inox sobre o meio de cultura para o teste de difusão em ágar.....	30
Figure 1	Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values of ethanolic extracts of <i>A. brasiliensis</i> against <i>S. mutans</i> UA159.....	53
Figure 2	Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) values of ethanolic extracts of <i>A. brasiliensis</i> against <i>S. sobrinus</i> 6715.....	54
Figure 3	Minimal concentration of ABL 75% EtOH and ABL 50% EtOH capable of totally inhibit the adherence of growing <i>S. mutans</i> UA 159 and <i>S. sobrinus</i> 6715 cells.....	55

Lista de Tabelas

Table 1	Mean area of the zones of microbial growth inhibition in mm (n=6) provided by the ethanolic extracts of <i>Agaricus brasiliensis</i>	52
----------------	---	----

Lista de abreviaturas

%	Percentual
°C	graus Celsius
[]	Concentração
BHI	Brain Heart Infusion
DO	Densidade Óptica
DQO	Departamento de Química Orgânica
et al.	e outros
Fig.	Figura
FO	Faculdade de Odontologia
g	Grama
h	Hora
IB	Instituto de Biologia
λ	Comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
μm	Micrometro
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
n	número de espécimes
pH	potencial de hidrogênio iônico
p/v	peso por volume
s	Segundo
UFPEl	Universidade Federal de Pelotas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v/v	volume por volume
x	Multiplicação
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
Adh	Teste de aderência celular bacteriana à superfície de vidro
MIC	Minimal Inhibitory Concentration

MBC	Minimal Bactericidal Concentration
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
CFC	Colony Forming Units
EtOH	Etanol
SUS	Sistema Único de Saúde
ABL	<i>Agaricus brasiliensis</i>

Sumário

1 Introdução geral.....	18
2 Projeto de pesquisa - Atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos de <i>Agaricus brasiliensis</i> S. Wasser et al. em estreptococos orais.....	20
2.1 Introdução.....	20
2.2 Justificativa.....	25
2.3 Objetivos.....	25
2.4 Hipóteses.....	25
2.5 Material e Métodos.....	26
2.5.1 Preparação dos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>.....	26
2.5.2 Determinação da atividade antimicrobiana.....	27
2.6 Cronograma.....	33
2.7 Orçamento.....	35
3 Relatório do trabalho de campo.....	36
4 Artigo - Antimicrobial activity of ethanolic extracts from <i>A. brasiliensis</i> (Agaricaceae) against oral streptococci (<i>formatado para o periódico Journal of Ethnopharmacology</i>).....	38
5 Conclusões.....	56
6 Referências.....	57
7 Anexos.....	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

As infecções bacterianas da cavidade oral mais comuns nos seres humanos são cárie dental e doença periodontal (LOESCHE, 1986), sendo que o biofilme dental tem sido extensivamente estudado por sua relação com estas infecções (GIBBONS; VAN HOUTE, 1975). Placa dental é um biofilme bacteriano encontrado naturalmente na superfície dos dentes, apresentando composição bacteriana e bioquímica que podem variar em dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos (MARSH, 1992).

A formação deste biofilme inicia-se com a película adquirida, que é uma fina camada aderida à superfície dental, constituída principalmente por componentes salivares, além de produtos bacterianos e constituintes citoplasmáticos (GIBBONS; VAN HOUTE, 1975). Minutos após sua formação, bactérias interagem com a película através de uma série de mecanismos específicos e na seqüência, outras bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes se aderem tanto à película adquirida quanto as bactérias já aderidas (ELLEN; LÉPINE; NGHIE, 1997).

A cavidade bucal apresenta uma microbiota natural com composição característica que na maioria das vezes coexiste de modo harmônico e pacífico com o hospedeiro, mantendo a integridade dos tecidos bucais (MARCOTE; LAVOIE, 1998). Entretanto, alguns fatores podem causar um desequilíbrio desta comunidade de modo a favorecer o crescimento e o estabelecimento de bactérias odontopatogênicas, como os estreptococos do grupo mutans. Um dos principais fatores deste desequilíbrio é a dieta rica e freqüente em sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo mutans, uma vez que estes microrganismos apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença deste açúcar no meio bucal, permitindo a sua aderência, colonização e posterior acúmulo na superfície do esmalte dental. (HAMADA; KOGA; OSHIMA, 1984; LOESCHE, 1986; NAPIMOGA et al., 2005).

Deste modo, estratégias têm sido estudadas no sentido de prevenir a cárie dental, seja inibindo o crescimento dos estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal ou inibindo a aderência destas bactérias à superfície dos dentes, impedindo assim a formação do biofilme dental (KOO et al., 2000a; KOO et al., 2000b; DUARTE et al., 2003; YATSUDA et al., 2005).

Nas últimas décadas, têm se observado um crescente interesse por medicinas alternativas e terapias naturais, especialmente no uso de substâncias com propriedades antimicrobianas, tendo os cogumelos encontrado grande aceitação (ISRAELSON, 1991; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005). Dentre os cogumelos, a espécie *Agaricus brasiliensis* s. Wasser et al., popularmente conhecida pelo nome de “cogumelo-do-sol”, tem se destacado pelas suas propriedades farmacológicas, tais como atividade antineoplásica, imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, antimutagênica, citotóxica, antialérgica, antiinflamatória, antiaterogênica, hipoglicêmica, hepatoprotetiva e neurológica (OSAKI et al., 1994; VOGEL et al., 1994; KAWAGISHI et al., 1989, 1990; DENADAI et al., 1998; TAKUSABURO; YOSHIKI, 1998; MIZUNO et al., 1999; MENOLI et al., 2001; OHNO et al., 2001; SORIMACHI et al., 2001; BARBIZAN et al., 2002; MIZUNO, 2002; WASSER, 2002; ROSA et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; KUROIWA et al., 2005; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005; MACHADO et al., 2005; ANGELI et al., 2006; GRINDE; HETLAND; JOHNSON, 2006).

Além disso, tem sido investigada a composição química das espécies do gênero *Agaricus*, e pesquisadores já tem demonstrado que a atividade antineoplásica desses cogumelos está diretamente relacionada à presença de polissacarídeos antitumorais na sua composição (KAWAGISHI et al., 1989, 1990; TAKUSABURO; YOSHIKI, 1998; MIZUNO, 1999; FAN et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005). Dentre esses polissacarídeos extraídos de diferentes tipos de cogumelos, destaca-se especialmente o complexo glicoprotéico de ligação (1→6) – β – D – glucan-proteína, extraído do “cogumelo-do-sol” (*A. brasiliensis*) (OHNO et al., 2001; TAKAKU et al., 2001).

Cabe salientar a presença de outros dois componentes em *A. brasiliensis*, tais como: os lipídios, especialmente o ácido linoléico que apresenta evidências de ser bactericida e ser o principal lipídio com atividade antimutagênica (OSAKI et al., 1994), além de uma grande quantidade de ergosterol que é o precursor da vitamina D, essencial no combate à osteoporose (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005).

Desse modo, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de três diferentes extratos etanólicos de *Agaricus brasiliensis* (“cogumelo-do-sol”) sobre estreptococos do grupo mutans.

2. PROJETO DE PESQUISA

2.1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais

Nas últimas décadas têm sido observado mundialmente, um crescente uso de produtos naturais para a prevenção de doenças bucais devido as suas possíveis propriedades farmacológicas, principalmente antimicrobianas (LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1977; WU-YUAN; GREEN; BIRCH, 1990; PHILLIPS, 1991; PEREIRA et al., 1994; CAI; WU, 1996; MARCOTE; LAVOIE, 1998). Assim, a descoberta de novos produtos naturais com atividade antibacteriana e talvez com menor efeito adverso, seria muito importante para obtenção de um meio efetivo de controle da formação da placa dental patogênica. Porém, para avaliar a atividade biológica são necessárias análises progressivas começando com estudos laboratoriais *in vitro*, passando por modelos de estudo *in vivo* e culminando com os estudos clínicos longitudinais (WU-YUAN; CHEN; WU, 1988).

O programa de investigação dos produtos naturais baseia-se fundamentalmente no conhecimento popular, a partir de entrevistas com “sábios”, “curandeiros”, “ervateiros”. Também são utilizados questionários para obter informações relacionadas ao número de plantas, colheita, período, partes da planta utilizada, nome popular, formas de utilização, coleta da amostra com o usuário, identificação taxonômica e processamento dos dados (MACIEL et al., 2002).

Quanto ao produto natural, é necessário obter-se informações da medicina popular a respeito da sua toxicidade; realizar pesquisa bibliográfica; extrair informações botânicas, taxonômicas e químicas; analisar fatores ambientais (local da coleta, época etc.); verificar se é ativo farmacologicamente; realizar estudo etnofarmacológico; e identificar quando este composto é utilizado. Quando o produto natural é selecionado, são realizados ensaios farmacológicos e toxicológicos para confirmar sua atividade. Após, verifica-se se a substância ativa é conhecida, se existe faixa de concentração/dose para uso e a sua toxicidade (MACIEL et al., 2002; BRASIL, 2004; BOMBARDELLI; BOMBARDELLI, 2005; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Um produto natural pode ser constituído por um organismo inteiro (cogumelo, planta ou animal) ou parte deste (basidioma, flores, folhas, raízes, seiva, ou glândulas).

A procura de novas substâncias torna-se necessária à medida que $\frac{2}{3}$ das doenças esperam tratamentos satisfatórios e surgem cepas resistentes (DUARTE et al., 2003).

Existem várias formas de preparo dos produtos naturais, dentre as quais merecem destaque: infusão, decocção, maceração, xarope, compressa, cataplasma, pedilúvio e banho. No que se refere à sua apresentação, eles estão dispostos na forma de essências, hidrolatos, tinturas.

A cavidade bucal, de modo similar a outros sítios do corpo humano, apresenta uma microbiota natural com composição característica que, na maioria das vezes, coexiste de modo harmônico com o hospedeiro. Entretanto, na maioria dos indivíduos ocorre, em algum período de sua vida, episódios de doenças bucais causados por um desequilíbrio na composição da microbiota bucal residente. As manifestações clínicas deste desequilíbrio, que incluem a cárie dental e doença periodontal são endêmicas em sociedades industrializadas e estão aumentando em países em desenvolvimento (MARSH, 1992).

Cárie dental

Atualmente está bem estabelecido que a cárie dental é uma doença multifatorial, infecto-contagiosa, associada a um grupo de microrganismos. Estes microrganismos formam um biofilme patogênico que se adere sobre a superfície dental, de modo a produzirem ácidos e produtos citotóxicos que levam, respectivamente, a desmineralização do esmalte dental e inflamação gengival (MOSADOMI, 1987). Este biofilme é genericamente conhecido como placa dental. A placa dental que se forma sobre a superfície do dente apresenta uma composição microbiana e bioquímica variável, podendo mudar de modo a tornar este biofilme patogênico (MOSADOMI, 1987; OSAWA et al., 1992). Assim, fatores que levam ao desequilíbrio da comunidade microbiana de modo a favorecer o crescimento de bactérias odonto ou periodontopatogênicas, direcionam para o surgimento de uma placa dental relacionada à cárie dental e doença periodontal (OSAWA et al., 1992).

Um dos fatores de desequilíbrio fundamental para o aparecimento de uma placa dental cariogênica é a dieta rica e freqüente em carboidratos fermentáveis,

principalmente a sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo mutans, como *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, uma vez que estes microrganismos apresentam vantagens no nicho ecológico quando da presença de sacarose no meio bucal (NAPIMOGA et al., 2005).

Os estreptococos do grupo *mutans*, além de serem acidogênicos e acidúricos, não só fermentam a sacarose como a partir desta sintetizam polissacarídeos extracelulares (IKENO; IKENO; MIYASAWA, 1991; ISRAELSON, 1991). Esta síntese é feita por glucosiltransferases, que facilitam a aderência dos estreptococos do grupo mutans, permitindo assim o seu acúmulo sobre a superfície lisa do esmalte dental. Inicia-se, assim, a formação da placa dental relacionada à cárie (NAPIMOGA et al., 2005).

Deste modo, o uso de agentes antimicrobianos eficientes contra estes patógenos bucais pode ser importante na prevenção da cárie dental (OSAWA et al., 2002; WU-YAN; CHEN; WU, 1988; YATSUDA et al., 2005).

Cogumelos comestíveis e medicinais

Os cogumelos têm sido utilizados em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção de doenças. O consumo *per capita* de cogumelos na alimentação aumentou nas últimas décadas e isto seria de grande utilidade principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil, que apresenta uma grande biodiversidade e onde a população carente poderia ter acesso à uma fonte nutricional de proteínas e a formas terapêuticas de custos mais baixos em relação a medicamentos industrializados (MARCOTE; LAVOIE, 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Agaricus brasiliensis Murril, ss. Heinemann, popularmente conhecido no Brasil pelo nome de “Cogumelo-do-sol” é um cogumelo medicinal largamente consumido e prescrito, no Japão, para fins terapêuticos. Pertencente à família *Agaricaceae*, este cogumelo é nativo da América do Sul e existem vários tipos de pratos à base deste produto natural e/ ou de seus extratos (KUROIWA et al., 2005). As linhagens brasileiras do “Cogumelo-do-sol” (identificadas por Heinemann) são realmente diferentes das identificadas por Murrill (cogumelos da Flórida). Este foi o motivo de nomeá-lo como *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heineman ou, propor uma nova espécie *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.) (WASSER et al., 2002).

Os principais centros produtores de cogumelos localizam-se nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo os principais cogumelos cultivados: *Agaricus bisporus* (“Champignon”), *Lentinula edodes* (“Shiitake”), *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* (“Hiratake” e “Shimeji”) e, mais recentemente, *Agaricus brasiliensis* (“Cogumelo-do-sol” no Brasil e “Himematsutake” no Japão).

As pesquisas sobre as propriedades medicinais do *A. brasiliensis* iniciaram-se no Japão (KUROIWA et al., 2005; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005; OHNO et al., 2001), mas hoje são realizadas também em outros países. O seu efeito farmacológico mais conhecido está relacionado à modulação do sistema imunológico contra o câncer. Na última década, vários estudos direcionaram-se aos polissacarídeos antitumorais que compõem o *Agaricus blazei* (sinonímia *A. brasiliensis*): 1,6- β -glucano, complexo glucano-proteína, α -glucana e heteroglicano. Os polissacarídeos antitumorais foram encontrados não apenas no basidioma do *Agaricus blazei*, mas também no seu meio de cultura líquido e micélio (OHNO et al., 2001). Denadai et al. (1998) observaram o efeito do extrato de *A. blazei* como antimutagênico em camundongos e Menoli et al. (2001) relataram que o extrato de *A. blazei* exibe atividades antimutagênicas quando testado em células pulmonares V79 de hamsters. A inibição de crescimento tumoral pelo extrato aquoso também foi observada por Takusaburo e Yoshiaki (1998) e Fan et al. (2003), e substâncias antitumorais (como os seus próprios polissacarídeos extracelulares) têm sido isoladas desses extratos (KAWAGISHI et al., 1990). No futuro, também poderá ser utilizado como uma dieta complementar, com efeito anticarcinogênico, conforme foi observado por Barbizan et al. (2002). Além disso, uma avaliação de 90 dias da toxicidade subcrônica do extrato aquoso de *A. blazei* Murrill, nas concentrações de 0 a 5%, em modelo animal com ratos, revelou que este extrato não ocasionou efeitos adversos significantes nos espécimes (KUROIWA et al., 2005).

Os resultados da ação medicinal do *A. brasiliensis* representam um possível avanço científico e econômico para o Brasil, o qual possui uma riqueza inestimável representada pela biodiversidade. O incentivo à pesquisa de novos fármacos a partir de cogumelos encontrados neste território, por pesquisadores brasileiros qualificados, em instituições nacionais, garante a consolidação de grupos de pesquisa que possam projetar o Brasil na concorrida área da indústria química-farmacêutica.

Cabe reforçar que a descoberta de novos agentes antimicrobianos permite ampliar as possibilidades de tratamento da doença cárie, melhorando a qualidade de vida da população atingida. Além disso, a geração de patentes, que advém de tais descobertas, representam não só um aumento de divisas para o Brasil, mas garante a obtenção de fármacos com menor custo, os quais representam uma importante economia para o Sistema Único de Saúde (SUS).

Portanto, considerando a grande biodiversidade do Brasil e o baixo custo desses produtos naturais, o objetivo deste projeto será avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* de três diferentes extratos etanólicos brutos de *Agaricus brasiliensis* (fig. 1) sobre estreptococos orais.



Figura 1 - Espécie *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.

("Cogumelo –do-sol").

Fonte: NASCIMENTO, 2004

2.2 JUSTIFICATIVA

O presente projeto propõe analisar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos do cogumelo *Agaricus brasiliensis*, devido à:

1. Carência de informação do potencial antimicrobiano deste cogumelo sobre os patógenos bucais, principalmente com relação ao método de avaliação: halo de inibição (teste de difusão em ágar), determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), e teste de aderência celular à superfície de vidro.
2. Falta de conhecimento a respeito da influência da utilização de etanol em diferentes concentrações na atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *A. brasiliensis* obtido.

2.3 OBJETIVOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos e fracionados de *Agaricus brasiliensis*, a qual será analisada sobre estreptococos envolvidos na cárie dental (*S. mutans* UA 159 e *S. sobrinus* 6715), através da:

1. Determinação de halo de inibição através do método de difusão em ágar;
 2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por macrodiluição;
 3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
 4. Determinação da aderência celular bacteriana à superfície de vidro;
- Verificar a influência da utilização de diferentes concentrações de etanol, no processo de extração etanólica do basidioma seco de *Agaricus brasiliensis* com relação ao efeito antimicrobiano.

2.4 HIPÓTESES

1) Os extratos etanólicos de *Agaricus brasiliensis* apresentam atividade antibacteriana sobre os microrganismos cariogênicos, revelando uma ação bactericida e bacteriostática, além de atuarem positivamente sobre a aderência bacteriana, que é um dos fatores de virulência dos estreptococos orais, que consiste na aderência ao substrato dental.

2) Extratos etanólicos obtidos com diferentes concentrações de etanol apresentam diferenças quanto à atividade antimicrobiana.

2.5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos serão realizados nos Laboratórios de Fitoquímica (Departamento de Química Orgânica), Bacteriologia (Departamento de Microbiologia e Parasitologia) e Corrosão e Controle de Flúor (Departamento de Bioquímica) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

2.5.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Agaricus brasiliensis*

Matérias-primas

Os corpos frutíferos (basidiomas) do cogumelo *Agaricus brasiliensis* serão obtidos no Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Os cogumelos serão secos em estufa com circulação de ar forçado, à temperatura de 55°C, por 72h. Depois, serão moídos e armazenados até a preparação dos extratos, conforme Gameiro et al. (2005).

Obtenção dos extratos etanólicos

Na preparação dos extratos etanólicos a partir de basidiomas do cogumelo *A. brasiliensis* secos e triturados, serão utilizados 10g de pó seco do cogumelo para 50mL de cada concentração de etanol realizada (etanol 100%, 75% ou 50%, v/v). Os extratos etanólicos serão obtidos após três etapas sucessivas de maceração do pó por 72h, com etanol à temperatura de 4°C. A cada 72h, os extratos serão decantados e filtrados e mais 50mL de etanol 100% ou solução hidroalcolica a 50% ou 75% v/v será adicionado a cada resíduo para continuar o processo de extração. A duração total da extração será de 216h (nove dias). Logo, será gasto um volume total de 150mL de extrator para cada 10g de pó utilizado. Transcorrido o período de extração, os volumes de extrato serão concentrados em aparelho evaporador

rotatório¹, à pressão reduzida, e reunidos. Os extratos hidroalcólicos (obtidos por maceração com etanol 75% e 50%) ainda serão congelados a -20°C e, depois, -83°C, e submetidos à liofilização.

Solubilização dos extratos e frações para os testes

Os extratos obtidos serão dissolvidos em etanol nas concentrações utilizadas no processo de extração (etanol 100%, 75% ou 50%, v/v).

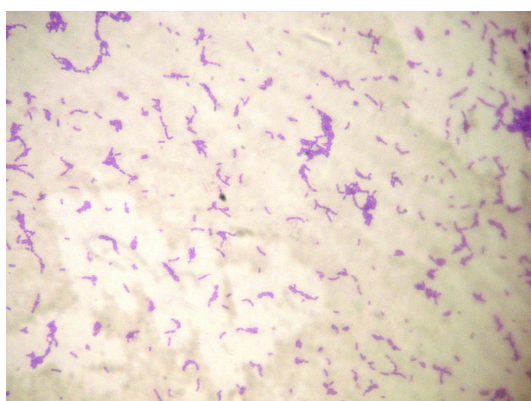
Depois de esterilizados por filtração, em filtro de membrana microbiológico de 0,45µm de diâmetro (Millipore), serão preparadas seis diluições. Estas diluições serão conservadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

As concentrações finais testadas variarão de 2000 até 10µg/mL. A concentração final do etanol nos tubos-testes não superará 0,6% (v/v) para não interferir na viabilidade ou proliferação celular (HAYACIBARA et al., 2005). As soluções serão conservadas a -20°C até o momento da sua utilização.

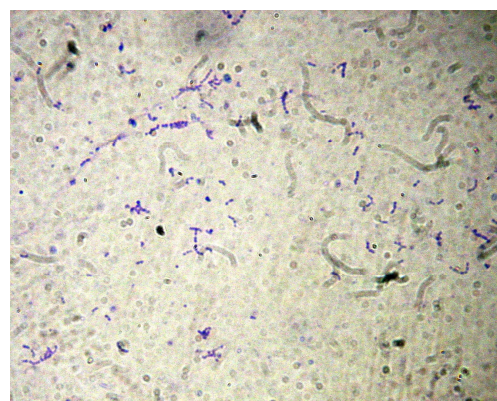
2.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os microrganismos utilizados serão estreptococos do grupo *mutans* (fig. 2):

- *Streptococcus mutans* UA159
- *Streptococcus sobrinus* 6715



S. mutans UA159



S. sobrinus 6715

Figura 2 – Cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus* visualizadas através da coloração de Gram (aumento 1000x).

¹ Marca Quimis®, modelo Q-344B2 (Quimis® Aparelhos científicos Ltda., Diadema, SP)

As cepas bacterianas puras de *Streptococcus mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715 serão cedidas pelo prof. Pedro Luiz Rosalen, do Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, da Faculdade de Odontologia da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP).

Preparo da suspensão bacteriana

Os microrganismos serão inicialmente reativados a partir das suas culturas originais mantidas em meio BHI² contendo 20% de glicerol à -80°C (ou liofilizadas) e posteriormente serão cultivados em placas de ágar BHI e Ágar Columbia contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro nas seguintes condições: temperatura de 37°C , em condições de microaerofilia através da técnica da vela queimada (técnica de Carpentter) (fig. 3) (5-10% CO_2), por 18-24 horas. As colônias isoladas serão ressuspensas em 5mL de solução de NaCl 0.89% estéril até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bact/mL) (fig. 4).

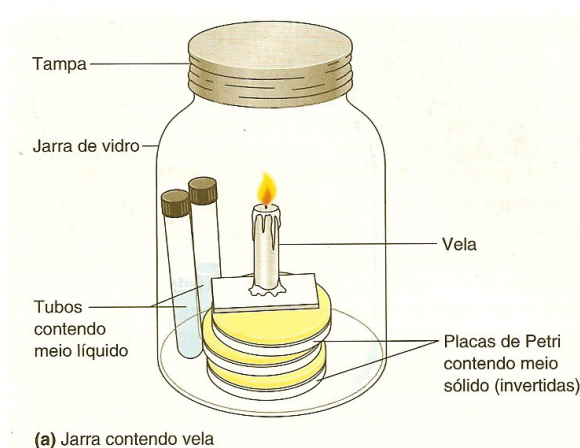


Figura 3 – Técnica da vela queimada (Carpentter), utilizada para obter condições de microaerofilia em jarra.

Fonte: TORTORA, 2005, p. 167

² Brain Heart infusion (Accumedia Manufacturers, Inc. Lansing, Michigan, EUA)



Figura 4 – Aparelho utilizado na quantificação da suspensão bacteriana.

Halo de inibição

Os procedimentos para a determinação dos halos de inibição serão realizados de acordo com a metodologia descrita por Piddock (1990). Uma alíquota de 400µL de cada suspensão bacteriana será homogeneizada com 40mL de ágar BHI a 45°C pela técnica de “pour plate”, sendo distribuída em placa de Petri (Ø 150mm), sobre uma camada base preexistente de ágar MH (Müeller Hinton). Para o método de difusão em ágar, os procedimentos do inóculo são apropriados para providenciar um crescimento semi-confluente dos microrganismos testados ($1-2 \times 10^8$ UFCs/mL).

Seis cilindros estéreis de aço-inoxidável 8.0 x 10mm (diâmetro interno de 6mm) serão colocados sobre cada placa de ágar inoculado (fig. 5). Os extratos etanólicos secos de *A. brasiliensis* serão diluídos em etanol absoluto, 75% ou 50%, v/v, até obter uma concentração de 10%. 40µL dos extratos e o seu controle negativo (etanol 100%, 75% ou 50%, v/v) serão colocados nos cilindros. As placas serão mantidas por 2h à temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos através do ágar. Após estes procedimentos, as placas serão incubadas em ambiente de microaerofilia, a 37°C e 10% de CO₂, por 24-48h.

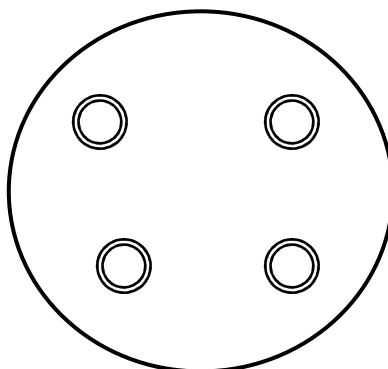


Figura 5 – Disposição dos cilindros de aço inox sobre o meio de cultura para o teste de difusão em ágar.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM será realizada em meio líquido, através da técnica de macrodiluição (PIDDOCK, 1990; PHILLIPS, 1991). Para isto, a suspensão microbiana será homogeneizada em caldo BHI na proporção 1:1000 (v/v) (diluído em relação ao inóculo utilizado para halo de inibição) de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL, e a concentração dos extratos testados variará de 25 a 1600 µg/mL.

Após a homogeneização, 4960µL serão transferidos em tubos de vidro estéreis, sendo posteriormente pipetados 40µl dos extratos de *A. brasiliensis* (com concentração final variando entre 2,5 e 177,8µg/mL) ou controle negativo (etanol 100%, 75% ou 50%, v/v). Os tubos serão, em seguida, homogeneizados com auxílio de um agitador de tubos³ em baixa velocidade e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente (temperatura de 37°C e 10% de CO₂).

A CIM será considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura da absorbância a 600nm (Abs.₆₆₀) menor que 0,05.

³ Biomixer Multi-Mixer MVS-1, Biosystems, Curitiba, PR

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os tubos incubados para determinação da CIM em meio líquido serão utilizados para determinação da CBM (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990). Uma alíquota (50µl) será inoculada em placas de Ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro e posteriormente as placas serão incubadas em ambiente a 37°C e 10% CO₂. A CBM será considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

Teste de aderência celular à superfície de vidro

Para o teste de aderência celular à superfície de vidro, será preparado meio de cultura BHI caldo com 1% de sacarose. O inóculo será padronizado em absorbância de 660nm (0,135abs). A inoculação do meio será na proporção de 1:100. O meio inoculado será distribuído (2480µL) em tubos de vidro e serão acrescentados 20µL das amostras de extratos. Serão separados dois tubos para controle negativo com etanol 100%, 75% ou 50% v/v. Após agitação, os tubos serão incubados por 18h, a 37°C e 10% de CO₂. Os tubos serão dispostos numa angulação de 30°.

A leitura poderá ser visível ou em espectrofotômetro.

Na leitura em espectrofotômetro, o meio de incubação será descartado e as células bacterianas aderidas ao vidro serão suavemente lavadas duas vezes com 1mL de tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 6.8, contendo 0,02% de azida sódica, para a remoção completa das células não-aderidas ao vidro, e o seu sobrenadante será descartado. Depois, serão dispensados 5mL do tampão e se realizará a seqüência: agitação em aparelho agitador de tubos homogeneizador³, aparelho sonicador (ultra-som), e desprendimento com auxílio de bastão de vidro. Com isto, será finalizado o procedimento para realização da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550nm (luz visível). Os resultados serão obtidos pelo cálculo da diferença entre o valor encontrado e o valor obtido pelo controle.

Delineamento experimental e estatística descritiva

O trabalho será desenvolvido em um delineamento inteiramente casualizado, constando de três experimentos: halo de inibição, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), e teste de aderência celular bacteriana à superfície de vidro (Adh). Cada tratamento será realizado em triplicata. No entanto, todos os experimentos serão repetidos por quatro vezes.

2.6 CRONOGRAMA

Ano	2005												2006												2007
Mês	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Projeto piloto			X	X																					
Colheita do <i>Agaricus brasiliensis</i>					X																				
Secagem					X	X																			
Exscicata							X																		
Obtenção dos extratos etanólicos de <i>A. brasiliensis</i>								X	X																
Diluição e esterilização dos extratos									X																
Avaliações da atividade antibacteriana										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						

CRONOGRAMA (CONTINUAÇÃO)

[illegible]

2.7 ORÇAMENTO

Natureza	Quantidade	Preço (R\$)
Reagentes químicos		
Etanol PA	2L	35,00
Sacarose PA	250g	70,00
Hipoclorito de sódio 10%	60kg	63,00
Meios de Cultura		
Agar BHI	500g	178,00
Caldo BHI	500g	156,00
Agar Mueller-Hinton	500g	156,00
Agar Columbia	500g	330,00
Matérias-primas		
Cogumelo-do-sol	5kg	75,00
Material permanente de laboratório		51.000,00
Produção de painéis		200,00
Publicações		200,00
Digitação e impressão dos artigos		500,00
Materiais diversos		100,00
TOTAL		R\$53.063,00

2 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

Este estudo seguiu as metodologias apresentadas no projeto. O primeiro passo executado para o início desta pesquisa foi a aquisição do *Agaricus brasiliensis* (“cogumelo do Sol”) com o prof. José Soares do Nascimento. Além disso, as cepas bacterianas puras de *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sobrinus* 6715 foram cedidas prof. Pedro Luiz Rosalen, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP).

As linhagens de *A. brasiliensis* (ABL99/30) testadas foram obtidas da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), localizada em Botucatu, SP.

A secagem e as extrações do cogumelo foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, localizado no Departamento de Química Orgânica da UFPel. Os cogumelos foram secos em estufa de secagem com circulação e renovação de ar modelo MA-035⁴.

Depois de desidratados, os espécimes foram triturados em moinho com rotor horizontal em inox 12 dentes (modelo MA-021)⁴, localizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, sob responsabilidade da profa. Fátima Alves Tereza Beira. Os extratos foram filtrados e os sobrenadantes foram concentrados, sob pressão reduzida, em aparelho evaporador rotatório a vácuo (condensador diagonal), da marca Quimis[®], modelo Q-344B2¹, localizado no Laboratório de Fitoquímica da UFPel. Os extratos foram liofilizados no Departamento de Biotecnologia, Instituto de Biologia, da UFPel⁵.

O cultivo das linhagens bacterianas e os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (IB - UFPel), sob coordenação da profa. Gladis Aver Ribeiro. Para o teste de aderência celular bacteriana à superfície de vidro, as células bacterianas aderidas foram desprendidas do tubo através de um aparelho sonicador⁶ (ultra-som), localizado no Departamento de Biotecnologia (Instituto de Biologia) da UFPel.

⁴ Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP

⁵ Aparelho Micro Modulyo, série 3062, da marca Edwards High Vacuum (Inglaterra, RU)

⁶ Ultrasonic homogenizer, série 4710, marca Cole-Parmer Instrument Co. (Chicago, EUA)

As leituras dos testes foram realizadas no Laboratório de Corrosão e Controle de Flúor, no Departamento de Bioquímica (Instituto de Química e Geociências) da UFPel. Os resultados de CIM, CBM e Teste de Aderência à superfície de vidro (Adh) foram avaliados e interpretados através de um espectrofotômetro⁷, em um comprimento de onda de 550nm (para determinação da CIM e CBM) e 580nm (para o teste de aderência bacteriana à superfície de vidro).

Durante todos os ensaios antimicrobianos, as amostras foram realizadas em triplicata e os testes repetidos, no mínimo, três vezes.

Após completarem-se dez meses de avaliação, foram realizadas reuniões com os pesquisadores responsáveis pelo trabalho para discutir os resultados deste estudo.

⁷ Marca FEMTO, modelo 700 Plus (Femto Ind. e Com. de Instrumentos Ltda., São Paulo, SP, Brasil)

4 ARTIGO

Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *A. brasiliensis* (Agaricaceae) against oral streptococci

Rafael G. Lund^{a,*} , Francisco A. B. Del Pino^a , Rosana Serpa^b , José S. do Nascimento^b , Viviane M. da Silva^c , and Gladis Aver Ribeiro^b

^a *Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel) – Gonçalves Chaves Street, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas, RS, Brazil*

^b *Department of Microbiology and Parasitology, Biology Institute, Federal University of Pelotas (UFPel)*

^c *Department of Biochemistry, Chemistry and Geosciences Institute, Federal University of Pelotas (UFPel)*

* Adress all correspondence to Rafael Lund, Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel)– Gonçalves Chaves Street, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel/Fax: +55 53 3222-6690; E-mail: rglund@ufpel.edu.br

Abstract

This study evaluated the antimicrobial activity of three different ethanolic extracts of *Agaricus brasiliensis* Wasser et al. (Agaricaceae) on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. Crude ethanolic extracts (100% EtOH, 75% EtOH and 50% EtOH, v/v) obtained from dried basidiomes of *A. brasiliensis* were assessed against *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* 6715 by agar diffusion method, determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and inhibition of cell adherence to a glass surface. In agar diffusion method, only the 100% ethanol extract revealed slightly inhibition of bacterial growth. Yet, in MIC and MBC tests, the three extracts presented antimicrobial properties and MIC and MBC values between 87.4 and 444.5 µg/mL. The MBC was predominantly similar to MIC against *S. mutans*, but only 75% ethanol extract was bactericidal against *S. sobrinus*. Among the ethanolic extracts tested, 100% ethanol extract was the most active (MIC 87.4µg/mL). The cellular adherence also was inhibited at concentrations from 100 to 400 µg/mL of 50% and 75% ethanol extracts. These results provide promising baseline information for the potential use of *Agaricus brasiliensis* against *mutans streptococci*. These findings warrant more-in-depth studies of the active principles of this mushroom ethanol extracts.

Keywords: Antimicrobial agents; Cariostatic agents; Medicinal mushrooms; Dental plaque; *Streptococcus mutans*; *Agaricus*.

1. Introduction

Several natural products have been used and also investigated more thoroughly as potential agents to prevent oral diseases, especially plaque-related diseases such as dental caries. Dental caries development involves a series of events in the biofilm on the tooth surface, where

bacterial interactions with diet occur (Gibbons and van Route, 1975; Loesche, 1986). There is a general consensus that the frequent consumption of carbohydrates, mainly sucrose, can result in the emergence of cariogenic microorganisms, such as mutans streptococci. *Streptococcus mutans* is generally accepted to be the principle causative agent of dental caries (Hamada et al., 1984; Napimoga et al., 2005). Therefore, mutans streptococci should be one of the prime targets for any therapeutic agent aimed at preventing dental biofilm-related diseases, such as dental caries.

In the course of these investigations, mushrooms have emerged as sources in the discovery of novel potentially therapeutic agents because they need antibacterial and antifungal compounds to survive in their natural environment. So, it is not surprising that antimicrobial compounds with more or less strong activities could be isolated from many mushrooms and that they could be of benefit for human (Rosa et al., 2003). Nevertheless, only compounds from microscopic fungi are on the market as antibiotics till now (Lindequist et al., 2005).

A. brasiliensis S. Wasser et al. (Wasser et al., 2002) (syn., *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem.), known in Brazil as “Cogumelo-do-Sol” and worldwide as “sun mushroom” or “Himematsutake”, has been largely cultivated in Brazil because of its medicinal properties (Machado et al., 2005). Strains of this species were exported to Japan from Brazil in 1965 and their fruiting bodies have been used as medicines in Japan and many other countries (Mizuno et al., 1999). This mushroom, since 80s, started to be commercially produced in Brazil (Nascimento and Eira, 2003). It has been reported that approximately 37 tons of the dried fruiting body of *A. brasiliensis* is produced every year, and the major part of this amount is sold to Japan. The price paid to producers by intermediaries from Asiatic market varies from US\$28.00 to US\$85.00 per kilogram (dried) (Eira, 2003).

“Cogumelo-do-sol” preparations have therapeutic effects, such as immunomodulatory activity and antineoplastic activities (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1999; Ohno et al., 2001; Dong et al., 2002; Kobayashi et al., 2005).

With the increasing tendency for the use of ethanolic extracts in phytotherapy, joined with the cosmopolitan spreading and use of *A. brasiliensis*, an investigation of ethanolic extracts of this medicinal species for antimicrobial dental therapy is relevant.

Few investigations about antimicrobial activity of medicinal mushrooms have been carried out, including with oral microorganisms. So, the aim of this paper was to report the antimicrobial activity of three ethanolic extracts of *A. brasiliensis* against oral streptococci.

2. Materials and methods

2.1 Preparation of ethanolic extracts

Dried basidiomes of *A. brasiliensis* - strains ABL99/30 - were obtained from Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, in Botucatu, São Paulo, Brazil. A voucher specimen was deposited in the Mycoteca of the Experimental Laboratory of Micology, Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil).

The mushrooms were harvested with pileo closed, washed and dried at 55°C during 72 h. After that, they were ground to powder formation.

Dried and crushed fruiting bodies of the mushroom (30g) were assigned in three groups. Ten grams of dried powder were submitted to maceration with 50mL of 100% ethanol, v/v (ABL 100% EtOH extract), 10g with 50mL of 75% ethanol (ABL 75% EtOH extract) and other 10g with 50mL of 50% ethanol (ABL 50% EtOH extract), at 4°C, during 216 h.

After each 72 h, the extracts were filtered and this procedure was repeated twice with more 50mL of the corresponding ethanolic solutions. Then, the supernatants were concentrated under reduced pressure in rotavapor and lyophilized. The lyophilized were resuspended in

their corresponding ethanolic solutions (100%, 75% or 50%, v/v) at concentrations of 15.74% (w/v) for ABL 100% EtOH and 20% (w/v) for ABL 75% EtOH and ABL 50% EtOH, just prior to performance of the assays.

2.2 Test microorganisms

The *in vitro* antimicrobial activity of *A. brasiliensis* ethanolic extracts was tested against the oral streptococci: *Streptococcus mutans* UA159 and *Streptococcus sobrinus* 6715. These Gram-positive bacteria were obtained from the Department of Pharmacology, Anesthesiology and Therapeutics, Faculty of Dentistry, University of Campinas (UNICAMP) (Piracicaba, São Paulo, Brazil).

2.3 Antimicrobial activity assays

2.4 Agar diffusion assay

The disk diffusion method was performed to evaluate the antimicrobial activity of the *A. brasiliensis* ethanol extracts (Koo et al., 2000a). A suspension of the tested microorganisms (0.1mL of 10^8 cells per mL) was spread on the solid media plates. The microorganisms were seeded by pour plate in BHI agar and incubated for 18-24h. The oral streptococci grown on brain-heart infusion agar were suspended in sterile brain-heart infusion broth. The suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale (1.5×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹). A 400 μ L portion of each test suspension was mixed with 40mL brain-heart infusion agar at 45°C, and poured on to a previously set layer of Mueller Hinton agar. Nutritive media were prepared according to the manufacturer's instructions. All agar plates were prepared in 90mm Petri dishes with 22mL of agar giving a final depth of 4mm. The inoculum procedure was appropriate to provide a semiconfluent growth of the microorganisms tested. Six sterilized stainless-steel cylinders of 8.0 x 10.0 mm (inside dia.

6mm) were placed on to each inoculated agar plate. The test extracts or controls (40 μ L) were applied inside the cylinders. The plates were kept for 2h at room temperature to allow the diffusion of the agents through the agar. Afterwards, the plates were incubated at 37°C under microaerophilic conditions (5-10% CO₂) and for an appropriate period of 24-48 h. Cylinders with 40 μ L of 100% EtOH, 50% EtOH or 75% EtOH were used as negative controls.

Zones of inhibition of microbial growth around the cylinder containing the extracts were measured in millimeters, using a rule, after the incubation time. Each treatment, in a completely randomly design, was processed in triplicate. Three replicates were made for each microorganism. The experiment was repeated twice.

2.5 Broth dilution assay (MIC and MBC)

The antimicrobial activity of *A. brasiliensis* ethanolic extracts was examined by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in accordance with Koo et al. (2000b) and Duarte et al. (2003). For MIC determination, the starting inoculum was 5×10^5 CFU mL⁻¹. Two-fold dilution series of extracts (concentrations ranging from 1777.8 to 27.778 μ g mL⁻¹ two-folds) were tested. The control vehicles were 100%, 75% and 50% ethanol (final ethanol concentrations in the culture medium of: 0.900%, 0.675% and 0.450% v/v, respectively). MIC was defined as the lowest concentration of extract that had restricted growth to a level lower than OD of 0.05 at 660nm (no visible growth). For the determination of MBC, an aliquot (50 μ L) of all incubated test tubes with concentrations higher than the MIC was sub-cultured on Agar Columbia plates supplemented with 5% of defibrinated sheep blood. The MBC was defined as the lowest concentration that enables no growth on the blood agar (99.9% killed). Three replicates were made for each concentration of the tested extracts for both assays (MIC and MBC), in each experiment. The experiment was repeated three times.

2.6 Inhibition of growing cell adherence to glass surface

To assess bacterial adherence to a glass surface, microorganisms were grown in BHI broth plus 1% sucrose (w/v) at 37°C, 10% CO₂ at an angle of 30° for 18 h in glass test-tubes, containing sub-MIC levels of the *A. brasiliensis* ethanolic extracts (or vehicle controls) as detailed in Hamada and Torii (1978) and Koo et al. (2000a). Isolated colonies, after cultured in brain-heart infusion agar plates, during 18-24 h, were suspended in 4.5 mL of sterile brain-heart infusion broth, and the suspension adjusted to 0.5 on the McFarland scale ($1.5 \cdot 10^8$ CFU $\cdot$ mL⁻¹). A portion of the suspension was mixed with brain-heart infusion broth (1:1000 dilution, v/v) containing 1% sucrose, and 2.48 mL were transferred to a test-tube. Subsequently, 20 µL of a two-fold dilution series of the test extracts (ABL 50% and ABL 75%) (concentrations ranging from 19.7 to 1600 µg mL⁻¹ reaction) and their controls (75% or 50% ethanol, v/v) were inoculated, stirred and then incubated. The final concentrations of 75% and 50% ethanol inside the culture medium were 0.6% and 0.4% (v/v), respectively. After incubation, the adhered cells were washed and re-suspended in an ultrasonic bath. The amount of adhered cells was measured spectrophotometrically at 550 nm (Hamada & Torii, 1978; Duarte et al., 2003).

The inhibition of adherence was defined as the lowest concentration that allowed no visible cell adherence on the glass surface. Three replicates were made for each concentration of the tested extracts in each experiment. The experiment was repeated three times.

3. Results and discussion

Among the ethanol extracts of *A. brasiliensis* (ABL EtOH) tested, only the treatment with ABL 100% ethanol extract presented growth inhibition zone (Table 1), and this was biggest to

S. sobrinus. The controls (100%, 75% and 50% ethanol, v/v) did not form any inhibitory zone against both mutans streptococci tested.

The MIC values from the different *A. brasiliensis* ethanol extracts ranged from 87.4 to 444.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 2). The MBC values of the ethanol extracts were similar to MIC values against *Streptococcus sobrinus*, whereas only ABL 75% showed bactericidal effect against *Streptococcus mutans* in the concentrations tested.

In general, the potency order of *A. brasiliensis* ethanol extracts against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* viability was: 100% EtOH > 75% EtOH > 50% EtOH.

Furthermore, this study investigated whether *A. brasiliensis* ethanolic extracts affect the sucrose-dependent adherence of growing mutans streptococci cells to a glass surface. The adherence assays were conducted using sub-MIC levels, since false positive results could be generated due the antimicrobial effects of the extract. The results obtained on this study were closer to MIC and MBC values suggesting a bacteriostatic/bactericidal effect instead of an inhibition of a virulence factor from oral streptococci which is the bacterial adherence.

The *in vitro* inhibition of adherence of these microorganisms was evident (Fig. 1) when they were grown in broth containing sucrose and different concentrations of ABL 75% EtOH and ABL 50% EtOH. The rate of inhibition was 100% against *S. mutans* at concentrations of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ABL 75% EtOH) and 100 $\mu\text{g/mL}$ (ABL 50% EtOH) and against *S. sobrinus* at concentrations of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ABL 75% EtOH) and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ABL 50% EtOH).

The broth dilution tests showed that all ethanolic extracts of *Agaricus brasiliensis* had effect against microbial growth *in vitro* compared to their controls (100% EtOH, 75% EtOH or 50% EtOH, v/v). The results of these ethanolic extracts against mutans streptococci illustrated that ABL 100% EtOH extract was more efficient in their activity compared to the other ethanolic extracts. The diffusion method is the most often employed in research and in spite of certain limitations, but it is a model with a low credibility for samples that are

difficult to diffuse in the media because there is no relation between their solubility in water, diffusion power and antimicrobial study. In some cases the diffusion techniques can be used for antimicrobial screening but they couldn't be used as a definitive method because there is no relationship between MIC values and inhibition diameters (Rios et al., 1988).

The antimicrobial activity was found to increase with increasing the EtOH concentration of the extract indicating possibly that compounds responsible for biological activity are present in biggest amount in the most concentrated ethanol extract. The present data suggest that *A. brasiliensis* has bioactive compounds that possess antimicrobial activity *in vitro*. According to Osaki et al. (1994), the basidiome of *A. brasiliensis* is source of linoleic acid (an unsaturated fatty acid that represents 70–78% of lipids total of its fruiting body), obtained in hexanic extracts, and *trans*-11-octadecadienoic, 13-hydroxy-*cis*-9 acid, isolated in chloroform:methanol (2:1) extracts. Linoleic acid was identified as the main substance which exhibited antibacterial activity and antimutagenic activity against benzo-pyrene in *Salmonella* in the Ames assay. Yet, in agreement with the authors, the second identified component not revealed antimutagenic capacity. Other corroborating studies have verified that long-chain unsaturated fatty acids, such as linoleic acid, have shown antibacterial activity (Lee et al., 2002; Osawa et al., 2004; Zheng et al., 2005;). Agaridiol (1-arylpropane-1,2-diol) was isolated from basidiome of *Agaricus* spp. and showed moderate antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* (Berg et al., 1999). Several lectins were isolated from *A. bisporus*, *A. blazei*, *A. campestris*, and *A. edulis* showing antibacterial activity (Vijayan and Chandra, 1999).

Other studies with *A. blazei* Murrill ss. Heinem. have discovered bioactive compounds and complex substances with antimicrobial, antiviral, antitumor, antiallergic, immunomodulating, anti-inflammatory, antiatherogenic, hypoglycemic, hepatoprotective and central activities compounds, mainly due polysaccharide–protein complexes extracted from the basidiomycete *A. blazei*, especially the β -D-glucans (Kobayashi et al., 2005; Lindequist et al., 2005;

Machado et al., 2005; Angeli et al., 2006). However, ingredients with low molecular weight and high solubility, such as ergosterol, pyroglutamate and fragments of β -glucans (Mizuno et al., 1999; Dong et al., 2002), also have been postulated to be responsible for the antitumor activity and reveal antiviral (Sorimachi et al., 2001; Grinde et al., 2006), bactericidal and fungicidal effects (Vogel et al., 1974; Rosa et al., 2003).

The results of the present study provide an important basis for the use of ethanolic extracts from basidiomes of *Agaricus brasiliensis* for the treatment of infections associated to oral microorganisms, such as mutans streptococci. The remarkable inhibitory effects of ethanol extracts of this mushroom could be a useful source for the development of novel and promising antimicrobial agents against oral pathogens, such as mutans streptococci. However, further pharmacological and toxicity studies will be necessary to confirm this hypothesis. Also, these findings warrant more-in-depth studies of the active principles of this mushroom ethanol extracts.

Acknowledgements

The authors are grateful to professor P. L. Rosalen for kindly providing the bacteria strains to the experiment.

References

- Angeli, J. P. F., Ribeiro R., Gonzaga M. L. C., Soares S. de A. , Ricardo M. P. S. N. , Tsuboy M. S. , Stidl R. , Knasmueller S. , Linhares R. E., Mantovani. M. S., 2006. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biology and Toxicology* 22, 285-291.
- Berg, A., Zipper, H., Dörfelt H., Walter, G., Udo, G., 1999. Agaridiol, a new 1-arylpropan-1,2-diol produced by *Agaricus* sp. *Journal of Basic Microbiology* 39, 213-215.

- Dong, Q., Yao, J., Yang, X. T., Fang J. N., 2002. Structural characterization of a water-soluble beta-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. Carbohydrate Research 337, 1417-1421.
- Duarte, S., Koo, H., Bowen, W. H., Hayacibara, M. F., Cury, J. A., Ikegaki, M., Rosalen, P. L., 2003. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biological & Pharmaceutical Bulletin 26, 527-531.
- Eira, A. F., 2003. Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). Aprenda Fácil Editora, Viçosa, p. 26.
- Gibbons, R. J., von Houste, J. 1975. Bacterial adherence in oral microbial ecology, Annual Review of Microbiology 29, 19–44.
- Grinde, B., Hetland, G., Johnson, E., 2006. Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. International Immunopharmacology 6, 1311-1314.
- Hamada, S., Torii, M., 1978. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. Infection and Immunity 20, 592–599.
- Hamada, S., Koga, T., Oshima, T., 1984. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. Journal of Dental Research 63, 407–411.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydrate Research 186, 267-273.
- Kobayashi, H., Yoshida, R., Kanada, Y., Fukuda, Y., Yagyu, T., Inagaki, K., Kondo, T., Kurita, N., Suzuki, M., Kanayama, N., Terao, T., 2005. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and

peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 131, 527-538.

Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., Cury J. A., 2000a. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology* 45, 141-148.

Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ambrosano, G. M. B., Murata, R., Yatsuda, R., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Park, Y. K., 2000b. Effect of a New Variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Current Microbiology* 41, 192-196.

Lee, J. Y., Kim, Y. S., Shin, D. H., 2002. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2193-2199.

Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., Jülich, W-D., 2005. The pharmacological potential of Mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine:eCAM* 2, 285-299.

Loesche, W. J., 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews* 50, 353–380.

Machado, M. P., Filho, E. R., Terezan, A. P., Ribeiro, L. R., Mantovani, M. S., 2005. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Toxicology in vitro* 19, 533-539.

Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H., Tsuchida, H., 1999. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *Biochemistry and Molecular Biology International* 47, 707-714.

Mizuno, T., 2002. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill stimulate (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4, 312-399.

- Napimoga, M. H., Hofling, J. F., Klein, M. I., Kamiya, R. U., Gonçalves, R. B., 2005. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *Journal of Oral Science* 47, 59-64.
- Nascimento, J. S., Eira, A. F., 2003. Occurrence of the false truffle (*Diehliomyces microsporus* Gilkey) and damage on the Himematsutake medicinal mushroom (*Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 5, 87-94.
- Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Motoi, M., Yadomae, T., 2001. Antitumor β -Glucan from the Cultured Fruit Body of *Agaricus blazei*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24, 820-828.
- Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J., Miyazaki, T., 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 114, 342-350.
- Osawa, K., Miyasaki, K., Shimura, S., Okuda, J., Matsumoto, M., Ooshima, T., 2001. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *Journal of Dental Research* 80, 2000-2004.
- Rios, J. L., Recio, M. C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127-149.
- Rosa, L. H., Machado, K. N., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A., Zani, C. L., 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 967-974.
- Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K., Niwa, D., 2001. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO cells in vitro. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65, 1645-1647.
- Vijayan, M., Chandra, N., 1999. Lectins. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 707-714.

Vogel, F. S., McGarry, S. J., Kemper, L. A., Graham, D.G., 1974. Bacteriocidal properties of a class of quinoid compounds related to sporulation in the mushroom *Agaricus bisporus*. The American Journal of Pathology 76, 165–174.

Wasser, S. P., 2002. Review of medicinal mushrooms advance: good news from old allies. HerbalGram 56, 28-33.

Wasser, S. P., Didukh, M. Y., Amazonas, M. A. L. A., Nevo, E., Stamets, P., Eira, A. F., 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? International Journal of Medicinal Mushrooms 4, 267–290.

Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., Kim, W. G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. FEBS Letters 579, 5157-5162.

Table 1

Mean area and standard deviation of the zones of microbial growth inhibition in mm (n=6) provided by the ethanolic extracts of *Agaricus brasiliensis*

Treatments	<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	<i>Streptococcus sobrinus</i> 6715
ABL 100% EtOH	0.83 (0.258)	1.0 (0.000)
ABL 75% EtOH	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)
ABL 50% EtOH	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)
100% EtOH	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)
75% EtOH	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)
50% EtOH	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)

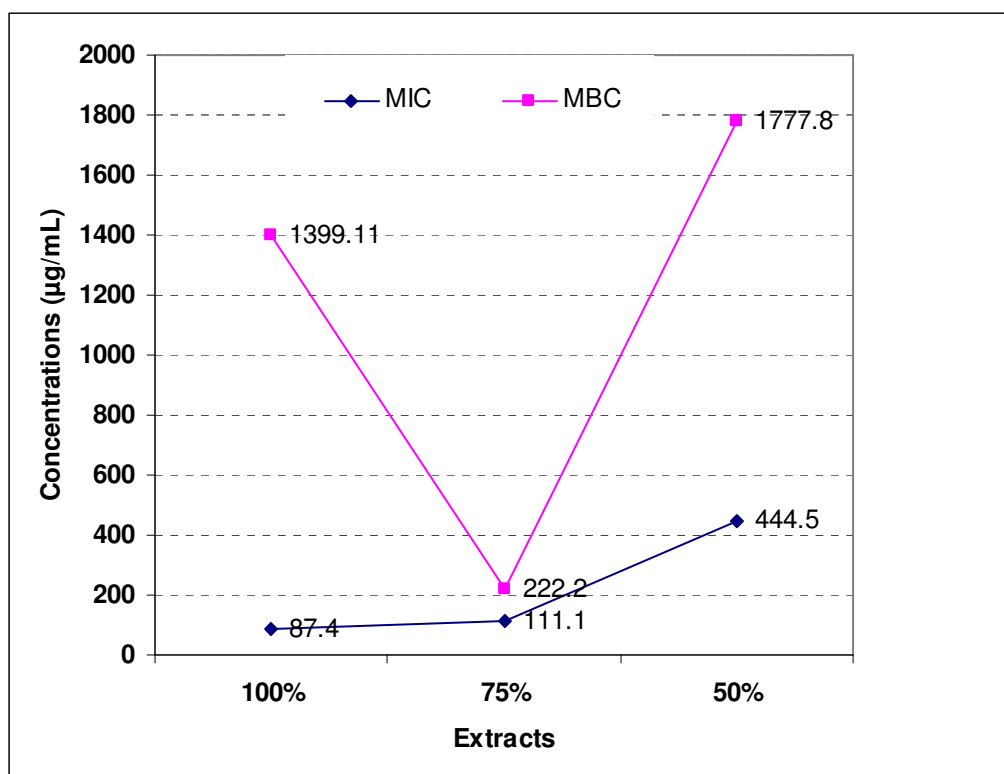


Fig. 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values of ethanolic extracts of *A. brasiliensis* against *S. mutans* UA159.

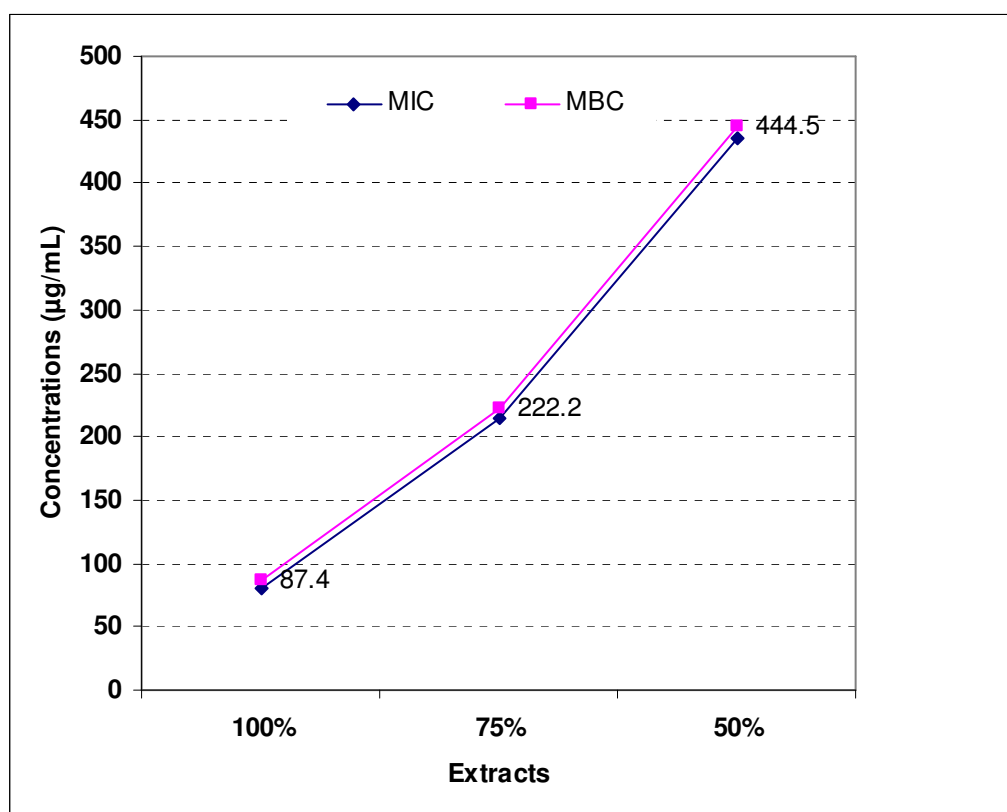


Fig. 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values of ethanolic extracts of *A. brasiliensis* against *S. sobrinus* 6715.

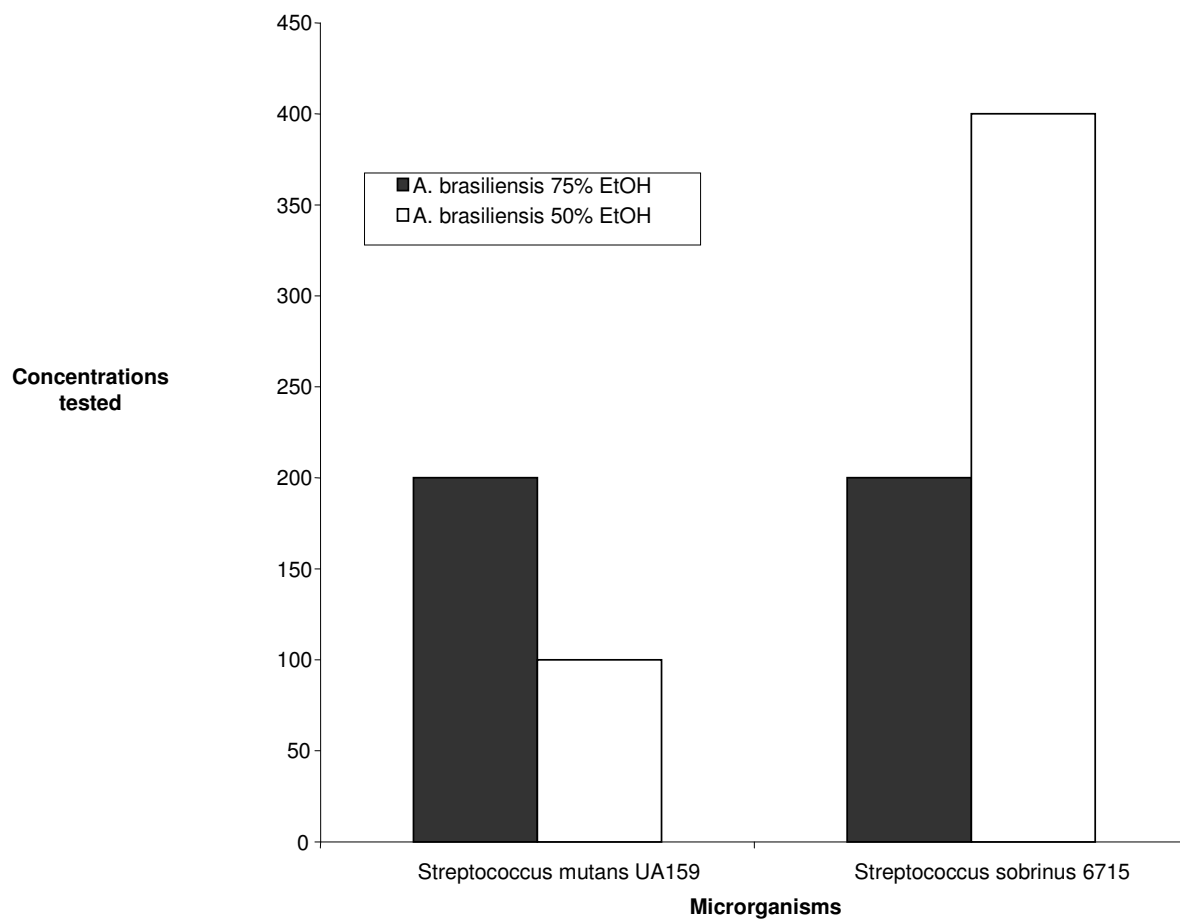


Fig. 3: Minimal concentration of ABL 75% EtOH and ABL 50% EtOH capable of totally inhibit the adherence of growing *S. mutans* UA 159 and *S. sobrinus* 6715 cells.

5 CONCLUSÕES

- 1) *Agaricus brasiliensis* extraído com EtOH 100% apresenta leve inibição do crescimento de *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715 pelo método de difusão em ágar;
- 2) Todos os extratos etanólicos (100%, 75% e 50%, v/v) de *A. brasiliensis* apresentaram atividade antimicrobiana contra os estreptococos orais nas técnicas de macrodiluição em caldo (CIM e CBM);
- 3) A concentração inibitória mínima é maior no extrato de *A. brasiliensis* 100% etanólico para as duas bactérias do grupo mutans;
- 4) *Streptococcus sobrinus* é mais suscetível à ação bactericida dos extratos etanólicos de *A. brasiliensis* do que o *S. mutans*;
- 5) Dentre os extratos etanólicos avaliados no teste de aderência à superfície de vidro (EtOH 75% e EtOH 50%), a menor concentração capaz de inibir totalmente a aderência do *S. mutans* é obtida com o extrato etanólico a 50%, enquanto que para o *S. sobrinus* ocorre com o extrato de EtOH 75%.

6 REFERÊNCIAS

- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, R.; GONZAGA, M. L. C.; SOARES, S. DE A.; RICARDO M. P. S. N.; TSUBOY, M. S.; STIDL, R.; KNASMUELLER, S.; LINHARES, R. E.; MANTOVANI, M. S. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, p. 285-291, 2006.
- BARBIZAN, L. F.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVADORRI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; CAMARGO, J. L. V. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethopharmacology**, v. 83, p. 25-32, 2002.
- BERG, A.; ZIPPER, H.; DÖRFELT, H.; WALTER, G.; UDO, G. Agaridiol, a new 1-arylpropan-1,2-diol produced by *Agaricus* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, p. 213-215, 1999.
- BOMBARDELLI, E.; BOMBARDELLI, V. Twenty years'experience in the botanic health food market. **Fitoterapia**, v. 76, p. 495-507, 2005.
- BRASIL. Resolução RDC – nº 48, de 18 de março de 2004 (DOU 18/03/2004). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. ANVISA, Brasília, 2004.
- CAI, L.; WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal Natural Products**, v. 59, p. 987-990, 1996.
- DENADAI, R.; LIMA, P. L. A.; SALVADORI, D. M. F.; EIRA, A. F.; BAZO, A. P.; RIBEIRO, L. R. The protective effect of mushroom (*Agaricus blazei*) teas on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 179, 1998.
- DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X. T.; FANG, J. N. Structural characterization of a water-soluble beta-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1417-1421, 2002.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, 527-531, 2003.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.).** 1 ed. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2003. 398 p.

ELLEN, R. P.; LÉPINE, G.; NGHIEM, P. M. *In vitro* models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 1, p. 33-42, 1997.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A. L.; SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* s. Wasser et al. LPB 03 (Agaricomycetideae) in submerged fermentation and its antitumor effect. **International Journal of Medicinal Mushroom**, v. 5, p. 17-23, 2003.

GAMEIRO, P. H. **Efeito antimutagênico do extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* em cultura de linfócitos humanos.** 2005. 53f. Monografia (Conclusão do Curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, v. 29, p. 19-44, 1975.

GRINDE, B.; HETLAND, G.; JOHNSON, E. Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1311-1314, 2006.

HAMADA, S.; TORII, M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. **Infection and Immunity**, v. 20, p. 592–599, 1978.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 407–411, 1984.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 25, p. 347-351, 1991.

ISRAELSON, L. The role of natural products in oral health care. **Journal of Clinical Dentistry**, (Spec. Iss), p. 5-6, 1991.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1→6) β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor

activity of the resulting products. **Carbohydrate Research**, v. 12, p. 393-403, 1990.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v. 186, n. 2, p. 267-273, 1989.

KOBAYASHI, H.; YOSHIDA, R.; KANADA, Y.; FUKUDA, Y.; YAGYU, T.; INAGAKI, K.; KONDO, T.; KURITA, N.; SUZUKI, M.; KANAYAMA, N.; TERAOKA, T. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, p. 527-538, 2005.

KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p.141-148, 2000a.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a New Variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v. 41, p. 192-196, 2000b.

KUROIWA, Y.; NISHIKAWA, A.; IMAZAWA, T.; KANKI, K.; KITAMURA, Y.; UMEMURA, T.; HIROSE, M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p.1047-1053, 2005.

LEE, J. Y.; KIM, Y. S.; SHIN, D. H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2193-2199, 2002.

LEWIS, H.; ELVIN-LEWIS, M. P. F. In.: **Medical Botany**. New York, Wiley & Sons, 1977.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W-D. The pharmacological potential of Mushrooms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2, p. 285-299, 2005.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, p. 50, p. 353–380, 1986.

- MACHADO, M. P.; FILHO, E. R.; TEREZAN, A. P.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. **Toxicology in vitro**, v. 19, p. 533-539, 2005.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARCOTE, H. ; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 71-109, 1998.
- MARSH, P.D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **Journal of Dental Research**, v. 71, p. 1431-1438, 1992.
- MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v. 496, p. 5-13, 2001.
- MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERA, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 47, p. 707-714, 1999.
- MIZUNO, T. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill stimulate (Agaricomycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 312-399, 2002
- MOSADOMI, H.A. The effect of crude extracts of nine African chewing sticks on oral anaerobes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 23, p. 55-60, 1987.
- NAPIMOGA, M. H.; HOFLING, J. F.; KLEIN, M. I.; KAMIYA, R. U.; GONÇALVES, R. B. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **Journal of Oral Science**, v. 47, p. 59-64, 2005.
- NASCIMENTO, J. S. Reino FUNGI, Pelotas, 8 novembro 2004. Disponível em: <ib.ufpel.edu.br/basidiomycota.pdf> Acesso em: 16/01/2007.
- NASCIMENTO, J. S.; EIRA, A. F. Occurrence of the false truffle (*Diehliomyces microsporus* Gilkey) and damage on the Himematsutake medicinal mushroom

(*Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, p. 87-94, 2003.

OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 820-828, 2001.

OSAWA, K. YASUDA H, MARUYAMA T, MORITA H, TAKEYA K, ITOKAWA H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 2970-2974, 1992.

OSAWA, K.; MIYASAKI, K.; SHIMURA, S.; OKUDA, J.; MATSUMOTO, M.; OOSHIMA, T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 11, p. 2000-2004, 2001.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*. **Yakagaku Zasshi – Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 114, p. 342-350, 1994.

PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; do NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antifotes, IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.

PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 27, p. 1-50, 1991

PIDDOCK, L. J. V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 307-318, 1990.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p.127–149, 1988.

ROSA, L. H.; MACHADO, K. N.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 967–974, 2003.

SORIMACHI, K.; IKEHARA, Y.; MAEZATO, G.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; AKIMOTO, K.; NIWA, D. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of

cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO cells in vitro. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, p. 1645–1647, 2001.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1409-1413, 2001.

TAKUSABURO, E.; YOSHIKI, F. Antitumor effect of peptideglucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)**, v.11, p. 249–265, 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current opinion in structural biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

VOGEL, F. S.; MCGARRY, S. J.; KEMPER, L. A.; GRAHAM, D. G. Bacteriocidal properties of a class of quinoid compounds related to sporulation in the mushroom *Agaricus bisporus*. **The American Journal of Pathology**, v. 76, p. 165–174, 1974.

WASSER, S. P. Review of medicinal mushrooms advance: good news from old allies. **HerbalGram**, v. 56, p. 28-33, 2002.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 4, p. 267–290, 2002.

WU-YUAN, C.D.; CHEN, C.Y.; WU, R.T. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans streptococci. **Journal of Dental Research**, v. 67, p. 51-55, 1988.

WU-YUAN, C.D.; GREEN, L.; BIRCH, W.X. *In vitro* screening of chinese medicinal toothpastes: Their effects on growth and plaque formation of mutans streptococci. **Caries Research**, v. 24, p. 198-202, 1990.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L. G.; Effect of *Mikania* genus plant on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 183-189, 2005.

ZHENG, C. J.; YOO, J. S.; LEE, T. G.; CHO, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, W. G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579,n. 23, p. 5157-5162, 2005

6 ANEXOS

- Normas (“guide for authors”) para submissão do Artigo: Lund, R. G.; Del Pino, F. A. B.; Serpa, R.; Nascimento, J. S.; Ribeiro, G. A. Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *A. brasiliensis* (Agaricaceae) against oral streptococci, ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*;

-Carta de submissão (“cover letter”) do artigo ao *Journal of Ethnopharmacology*.

Guide for Authors

I. Scope of the journal

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources. Accordingly, today's Ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the documentation of indigenous medical knowledge, scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. **Clinical studies** on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems.

The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only. All reviews and commentaries are fully peer-reviewed. Potential authors are strongly encouraged to contact the Reviews Editor jethnopharmacol@pharmacy.ac.uk prior to writing a review. A one-page outline and a short C.V. of the (senior) author should also be included.

THE "RULES OF 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here.](#)

II. Preparation of manuscripts

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors. The publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal. Submission of an article is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author(s) permission to publish his/her article in this journal implies the exclusive authorization to

the publisher to deal with all issues concerning copyright therein. Further information on copyright can be found on the Elsevier website.

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

1. Manuscript types

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors;
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.
7. Conference announcements and news.

2. General procedures

The language of the Journal is English. Manuscripts should be neatly typed, double-spaced throughout, including tables, on pages of uniform size with at least 2.5 cm margins on all sides. Use one font type and size throughout the manuscript. Author(s) should not break or hyphenate words. When using an electronic printer, the right-hand margin should not be justified. Footnotes in text are not permitted. The text of the manuscript must be paginated, the first page being the title page. The manuscript, typed with double spacing and ample margins, should be submitted with a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and

biodiversity rights and a clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist ([click here](#)).

The following format and order of presentation is suggested.

2.1. Title, author(s), address(es)

The title should be no longer than 100 letters, including spaces. Initials or first and middle names followed by last name of the author or authors must be given (**not** last name followed by initials). If there are two or more authors with different addresses, use a superscripted letter (a, b, c etc.), not a number, at the end of the last name of each author to indicate his/her corresponding address. The full address of the corresponding author (the way the author wishes to be contacted) should be provided. The corresponding (usually, the senior) author, to whom correspondence and proofs will be sent, must be indicated by an asterisk and footnoted, and in the footnote, his/her telephone and fax numbers, and e-mail address must be indicated. Address(es) should be underlined or italicised.

2.2. Abstract

The abstract should present a summary of the problem, scientific method, major findings and conclusions, in no more than 200 words and in one paragraph and presented at the beginning of the paper. Unsubstantiated speculation should not be included. Footnotes may not be used. References, if cited, must provide complete publication data.

2.3. Text layout

The text of a research paper should be divided into the following headings: Introduction, Methodology (or Materials and Methods), Results, and Discussion and conclusions. Each heading (and subheading) must be numbered using the convention established in the journal. Acknowledgements should come after Discussion and conclusions and before References; Acknowledgements and References are not to be numbered. Headings must be bold-faced and written in an upper-and-lower case style [not in caps], while subheadings should be underlined or italicised. Tables and figures are to be placed at the end of the text, after References. Authors are required to include: (i) the chemical structure, formula and proprietary name of novel or ill-defined compounds; (ii) the w/w yield of prepared extracts in terms of starting crude material; (iii) complete formulation details of all crude drug mixtures; (iv) the voucher herbarium specimen number of the plant(s) studied in case of less well known plants, cited using the collector and collection number (e.g., *Doe 123*), and indicating the name of the herbarium institution where it has been deposited. All plant materials must be fully identified as in the following illustration: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don f. *albus* Pich. (Apocynaceae) as authenticated by Dr. John Doe, Department of Botany, University of Connecticut.

2.4. Guidelines for Plant and Animal Names

All scientific names (Latin binomials) must be underlined or italicised throughout the text and in the tables and figures. For plant and animal species, full or complete scientific names, genus-species and the correct authority citation, must be used, *when that name appears for the first time in text*. The authority citation may be dropped in subsequent mention of that name throughout the text. The family name must follow the scientific name in parentheses when the name appears for the first time in the text. Full scientific names and the family name of the subject plants/animals must be used in the Abstract. Synonyms must be indicated in parentheses and preceded by the word "syn." followed by a colon. Authors are advised to consult the International Plant Name Index (IPNI) (<http://www.ipni.org>) and W3Tropicos (<http://www.mobot.org>) web-based databases to determine the correct spelling of full plant scientific names. Generic names may be abbreviated (e.g., *C. roseus* for *Catharanthus roseus*), provided such practice does not lead to confusion; generic names, however, must not be abbreviated when the name appears for the first time in the text. Specific epithets must never be abbreviated; thus, the use of *Catharanthus r.* is not allowed.

2.5. Keywords

Authors are requested to assign 3-6 keywords to the manuscript, preferably taken from Index Medicus or Excerpta Medica Index, for abstracting and indexing purposes. These keywords should

be typed at the end of the Abstract. Each keyword should start with a capital letter and be separated from each other by a semi-colon.

2.6. Tables, illustrations and graphs

Tables should be on separate sheets, one table per sheet, and should bear a short descriptive title. Footnotes in tables should be indicated by consecutive superscript letters, not numbers.

Figures should be original ink drawings, photographs or computer drawn figures in the original, and of high quality, ready for direct reproduction. Xerox copies are unacceptable as they give unsatisfactory results after final printing. Figures should be drawn in such a way that they can be reduced to **8 cm** in width (i.e., the column width); in exceptional cases a reduction to a width of **17.5 cm** will be allowed. All lettering should be such that height of **1.2-1.5mm (minimum)** of numbers and capital letters results after reduction. Numerical scales, scale and curve legends, and all other lettering within the figure itself should be drawn with a lettering guide (stencil) or should be done using strippers (Letraset, etc). All figures should have captions. Each figure should be identified in the margin or at the back in a corner with the name of the author and the figure number. The figure captions should be on a separate sheet. One set of original drawings is required.

Colour illustrations should be submitted as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. The 2006 price for color figures is EUR 285 for the first page and EUR 191 for subsequent pages.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

2.7. References

References should be referred to by name and year (Harvard system) chronologically in the text (e.g.: Brown and Penry, 1973; Stuart, 1979; Ageel et al., 1987) and listed alphabetically at the end of the paper. No ampersand should be used and the words "et al." should not be underlined or italicized. Only papers and books that have been published or in press may be cited. For papers in press, please cite the DOI article identifier. The Digital Object Identifier (DOI) is a persistent identifier which may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The DOI will never change. Therefore, it is an ideal medium for citing Articles in Press, which have not yet received their full bibliographic information. *Unpublished manuscripts or manuscripts submitted to a journal but which have not been accepted may not be cited.* Journal and book titles should not be underlined or italicised and should be given in full in the reference list, with no underline or italics.

Examples:

Journals:

Britton, E.B., 1984. A pointer to a new hallucinogen of insect origin. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 331-333.

Books: Emboden, W., 1972. *Narcotic Plants*. Studio Vista, London, p. 24.

Multiauthor Books:

Farnsworth, N.R., 1988. Screening plants for new medicines. In: E.O. Wilson and F.M. Peter (Eds.), *Biodiversity*, National Academy Press, Washington, D.C., pp. 83-97.

Ethnopharmacological Communications (formerly short communications) are brief contributions on:

- isolation of biological active compound(s) from a traditional medicine,
- screening of a series traditional medicines for biological activity,
- study on a pharmacological activity of a traditional medicine,
- study on the toxicology of a traditional medicine.

([click here](#)) for examples of various formats.

III. Submission

All manuscripts (except reviews, commentaries and book reviews) must be submitted to <http://authors.elsevier.com/journal/jethpharm>

Each Submission must include a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights and a clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist ([click here](#)).

If an author cannot submit their manuscript electronically, then please send to:

Professor Dr R. Verpoorte
Editor-in-Chief, *Journal of Ethnopharmacology*
Division of Pharmacognosy
Institute of Biology
Leiden University
P.O. Box 9502
2300 RA Leiden
The Netherlands

IV. Copyright regulations for authors

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microform, or any other reproductions of similar nature and translations, and includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation into retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists. Transfer of copyright agreement forms will be sent to the corresponding author following acceptance of the manuscript.

V. Retained authors' rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article

- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

VI. Correcting proofs and reprints

Proofs will be sent to the corresponding author. Elsevier is now sending PDF proofs by e-mail for correction. If an author is unable to handle this process, regular print proofs will be sent. Elsevier will do everything possible to get the article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all corrections are sent back in ONE communication. Subsequent corrections will not be possible. Only typesetting errors may be corrected; no changes in, or additions to, the accepted manuscript will be allowed. Proofs should be returned to Elsevier within 48 hours. Twenty-five offprints of each paper will be supplied free of charge to the corresponding author. Additional offprints can be ordered at prices shown on the offprint order form that accompanies the copyright form.

VII. Language Polishing

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our [Terms & Conditions](#).

VIII. US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

IX. Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit Elsevier's Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when the article status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

No responsibility is assumed by the Publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of the rapid advances made in the medical sciences, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.

Cover Letter

This study was performed according to international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights).

The present article emphasizes that mushrooms are promising sources in the discovery of novel potentially therapeutic agents to prevent oral infections, such as dental caries.

In our investigation, we assessed the antimicrobial effect of ethanolic extracts extracted from basidiomes of *Agaricus brasiliensis* (mushroom popularly known as “sun mushroom”, “Royal-Sun-Agaricus” or “Himematsutake”) against *Streptococcus mutans* UA159 and *Streptococcus sobrinus* 6715. Mutans streptococci are the most important etiological agents related to dental caries.

Our findings will contribute to other studies with mushrooms in Dentistry, especially about *Agaricus brasiliensis* that showed remarkably inhibitory effects against the oral pathogens tested.

It's possible that this work was the first study which assessed antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Agaricus brasiliensis* mushroom against mutans streptococci.

Sincerely,

Rafael Guerra Lund