

Efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.)O.Berg.] sobre *Streptococcus* da cavidade oral

CARVALHO, C.M.^{1*}; MACEDO-COSTA, M.R.²; PEREIRA, M.S.V.³; HIGINO, J.S.⁴; CARVALHO, L.F.P.C.⁵; COSTA, L.J.⁶

¹Departamento de Odontologia Restauradora, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário, João Pessoa, PB, 58051-900. *carine.markus@gmail.com*. ²Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário, João Pessoa, PB, 58059-900. *mariareginamacedo@yahoo.com.br*. ³Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário, João Pessoa, PB, 58059-900. *svieira@dbm.ufpb.br*. ⁴Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50740-521. ⁵Departamento de Clínica e Odontologia Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário, João Pessoa, PB, 58051-900. *luizfernandood@gmail.com*. ⁶Departamento de Clínica e Odontologia Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário, João Pessoa, PB, 58051-900. *linoj@uol.com.br*

RESUMO: Este estudo avaliou a ação do extrato etanólico das folhas de *Myrciaria cauliflora* (Mart.)O.Berg. sobre três culturas de *Streptococcus* formadoras do biofilme dental. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido. Os dados obtidos foram satisfatórios para todas as espécies ensaiadas (*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Streptococcus sanguis* ATCC 10557) gerando halos de inibição quando utilizado o extrato puro e diluições 1:2 e 1:4. Os resultados incentivam a realização de novas pesquisas que viabilizem a produção de compostos com finalidade terapêutica que possam ser utilizados clinicamente na odontologia.

Palavras-chave: *Myrciaria cauliflora*, atividade antimicrobiana, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*

ABSTRACT: *In vitro* antimicrobial effect of jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.)O.Berg] extract on *Streptococcus* from the oral cavity. This study evaluated the action of ethanolic extract of *Myrciaria cauliflora* (Mart.)O.Berg leaves on three *Streptococcus* cultures from dental plaque. Antimicrobial activity was assessed by agar-well diffusion method. The obtained data were satisfactory for all assayed species (*Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 and *Streptococcus sanguis* ATCC 10557) yielding inhibition halos when the pure extract and 1:2 and 1:4 dilutions were used. These results encourage new studies for the production of therapeutic compounds to be used in clinical dentistry.

Key words: *Myrciaria cauliflora*, antimicrobial activity, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*

INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença de etiologia multifatorial relacionada a fatores como dieta, microbiota bucal, hábitos de higiene, características salivares e, constitui-se, juntamente à doença periodontal, nos problemas bucais mais freqüentes na saúde pública do Brasil (Pinto, 2000). Do ponto de vista microbiológico, o aparecimento de lesões da doença está ligado à complexa estrutura do biofilme

dental que envolve a participação de vários microrganismos como o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) e *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*), os quais colonizam a superfície dos elementos dentários pouco tempo após a irrupção dos mesmos na cavidade bucal (Kawashima et al., 2003; Svensater et al., 2003; Lindquist & Emilson, 2004; Marsh, 2004; Seki et al.,

Recebido para publicação em 30/01/2008

Aceito para publicação em 04/09/2008

2006).

A aderência das bactérias às superfícies dentárias inicia-se através de uma película adquirida acelular constituída por proteínas e glicoproteínas oriundas da saliva e fluido gengival. Após a colonização inicial de bactérias, ocorre o aumento da quantidade e da diversidade microbiana proporcionando a formação e acúmulo do biofilme dental, fator etiológico determinante da cárie dentária e maioria das doenças bucais. Um dos fatores primordiais ao desenvolvimento do biofilme cariogênico é o acúmulo de estreptococos que leva à produção de ácidos proporcionando queda do pH e aumento da possibilidade de desmineralização dos tecidos dentais (Murata, 2004). A promoção da higiene bucal, utilizando métodos mecânicos e/ou químicos, reduz ou elimina o biofilme dental prevenindo o aparecimento ou diminuindo a severidade da cárie e doenças periodontais (Fejerskov, 2004).

O estudo de compostos e extratos de produtos naturais tem sido realizado visando a obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem a prevenção de doenças bucais, especialmente as relacionadas ao biofilme dental, com o máximo de efetividade e o mínimo de agressão ao organismo (Botelho et al., 2007). Deste modo, a atividade antimicrobiana de produtos naturais sobre microrganismos, principalmente os do gênero *Streptococcus*, foram alvo de pesquisas conduzidas por Filoche et al. (2005), Uzel et al. (2005), Melo et al. (2006), Percival et al. (2006), Vasconcelos et al. (2006), Xiao et al. (2006) e Botelho et al. (2007).

A espécie *Myrciaria cauliflora* conhecida, popularmente, como jabuticaba paulista, jabuticaba assú (Ascheri et al., 2006) ou jabuticaba pnhem (Brunini et al., 2004), é uma planta nativa do Brasil, da Mata Atlântica, que vegeta diversos solos, podendo ser encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul. Os estudos fitoquímicos da jabuticaba encontrados na literatura são poucos, estando reportada a presença de ácido ascórbico, taninos e glicosídeos cianidínicos e peonidínicos (Reynertson, 2006). Macedo-Costa (2008) observou resultados positivos do extrato do caule de *Myrciaria cauliflora* Berg. sobre cepas de *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mitis*.

Este estudo teve como objetivo determinar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrciaria cauliflora* sobre culturas de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguis*, microrganismos formadores do biofilme dental.

MATERIAL E MÉTODO

Foi estudada a folha da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). O material botânico foi adquirido no mercado público de João Pessoa (Paraíba) e identificado botanicamente no Laboratório de

Toxicologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. As folhas foram lavadas com água para separação da matéria-prima a ser utilizada na pesquisa que, em seguida, foi levada à secagem permanecendo, durante uma semana, em estufa a 33°C para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático. Posteriormente, o material foi retirado da estufa, triturado a pó em moinho elétrico. A extração ocorreu através da solução extratora de álcool metanol (a 80% v/v) renovado, constantemente, por um período de 24 horas, pelo qual se obteve um concentrado de 500 mL acondicionado em frasco âmbar, limpo, seco e estocado em câmara fria. A concentração da solução em nível de extrato fluido 1:1 (p/v) foi realizada em rota-vapor (Modelo Ika-Werk) a uma temperatura constante de 45°C.

As linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, utilizadas neste estudo, foram obtidas mediante solicitação na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tozello” (Campinas/SP), remetidas em Agar Sangue Inclinado (“slants”) e, posteriormente, reativadas no Laboratório de Genética de Microrganismos - Departamento de Biologia Molecular/CCEN da Universidade Federal da Paraíba.

Para determinação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana em placas e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato, foi utilizado o método de difusão em meio sólido. O experimento foi realizado em duplicata para cada cepa ensaiada, sendo considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de ocasionar inibição completa de crescimento bacteriano. As linhagens bacterianas foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion - DIFCO) e incubadas a 37°C, em estufa biológica, sob condições de microaerofilia, pela técnica da chama da vela por 18 a 20 horas. Perfurações de, aproximadamente, 6 mm de diâmetro foram realizadas no meio de cultura (Agar Mueller Hinton – DIFCO, acrescido de sacarose) onde foram depositados 50 µL das soluções do extrato diluído, com diluições variando de 5% a 0,15%. As placas foram incubadas, em estufa bacteriológica a 37°C, por um período de 24 horas. Decorrido o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição do desenvolvimento bacteriano foram mensurados, em milímetros, da borda do poço ao início do desenvolvimento.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os controles mecânico e químico do biofilme dental constituem-se nos principais métodos preventivos empregados contra a cárie dentária e as doenças periodontais. A busca por produtos naturais,

que apresentem satisfatória ação antimicrobiana, de forma a inibir os microrganismos cariogênicos e periodontopatogênicos impulsiona a realização de ensaios *in vivo* e *in vitro* utilizando extratos de plantas.

O agente químico utilizado para controle microbiano na cavidade bucal deve ser inócuo aos tecidos bucais, reduzir o biofilme bacteriano e gengivite, inibir a calcificação do biofilme, não favorecer a resistência bacteriana, não manchar os dentes e apresentar substantividade. No entanto, nenhum dos produtos disponíveis comercialmente apresenta todas essas características destacando-se a clorexidina como um dos agentes mais utilizados na atualidade (Lindhe, 1999).

Neste estudo, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrciaria cauliflora* obteve ação antimicrobiana positiva sobre linhagens de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguis*, microrganismos aeróbios predominantes no biofilme supragengival (Figura 1). Pode-se observar, na Tabela 1, que a ação

antimicrobiana foi homogênea para as linhagens ensaiadas e ainda, que a inibição do crescimento bacteriano diminuiu, conforme ocorreu a redução na concentração do extrato, sendo possível observar a formação de halos de inibição a partir do extrato puro até a sua segunda diluição. Os resultados também aparecem representados pela Figura 2.

Efeitos antimicrobianos efetivos sobre os *S. mutans* também foram encontrados por Filoche et al. (2005), Melo et al. (2006), Percival et al. (2006), Vasconcelos et al. (2006) e Xiao et al. (2006) que estudaram óleos essenciais de canela, extratos da casca do caule de cajueiro, cacau, alecrim-pimenta e própolis, respectivamente. Os *S. mutans* são juntamente aos *S. sobrinus* os microrganismos mais comumente encontrados na microflora bucal e, apesar destes apresentarem menor prevalência, crianças portadoras de ambas as espécies apresentam maior susceptibilidade à cárie dental que aquelas que possuem apenas uma delas (Linguist & Emilson,

TABELA 1. Concentração Inibitória Mínima, em meio sólido, do extrato hidroalcoólico de *Myrciaria cauliflora*, sobre linhagens de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sagüis*.

Linhagens Bacterianas	Diâmetro dos Halos de Inibição (mm)									
	Concentração do Extrato (mg mL ⁻¹)									
	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>Streptococcus mutans</i>	16	14	12	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus sanguis</i>	16	14	13	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0

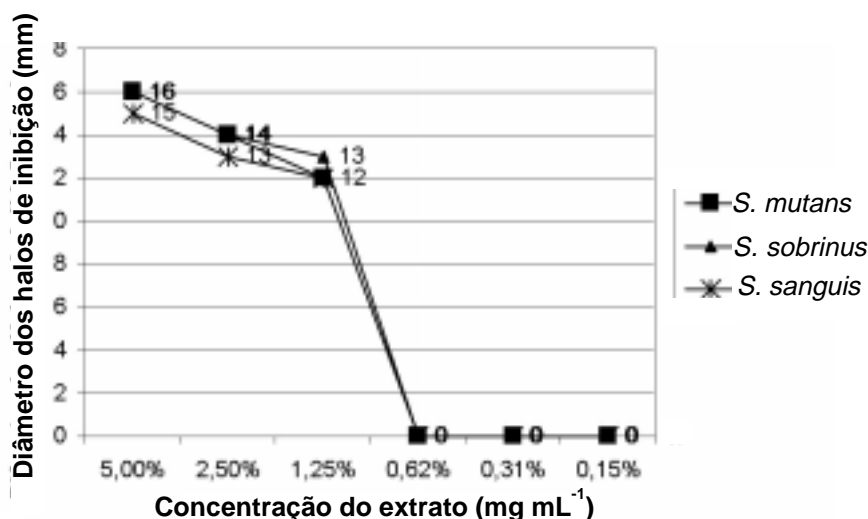


FIGURA 1. Representação gráfica da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de folhas de jabuticabeira sobre linhagens de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguis*.

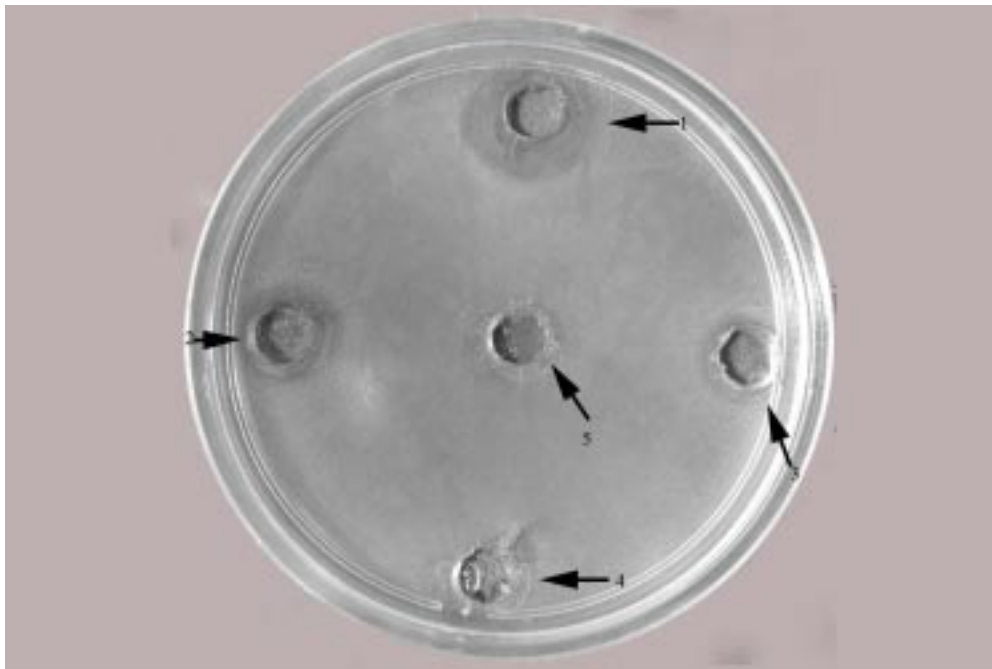


FIGURA 2. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrciaria cauliflora* sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* nas concentrações de (1) extrato puro; (2) diluição 1:2; (3) diluição 1:4; (4) diluição 1:8; (5) diluição 1:16.

2003). Resultados satisfatórios sobre os *S. mutans* e *S. sobrinus* também foram encontrados por Gebara et al. (1996) com a utilização de cacau, própolis e tomilho.

De acordo com Percival et al. (2006), o pré-tratamento das superfícies dentárias com os fenóis pentâmeros do cacau, produz o efeito de reduzir a formação do biofilme dental por *S. mutans*, efeito não observado sobre o *S. sanguis*. No entanto, quando estudada a atividade antimicrobiana dos fenóis do cacau, observou-se a inibição do crescimento apenas de *S. sanguis*. Efeito positivo sobre a inibição de ambas as espécies foi obtido com a utilização do extrato do caule do *Anacardium occidentale* por Melo et al. (2006).

Neste estudo, o extrato das folhas de *Myrciaria cauliflora* apresentou bom efeito inibitório sobre o crescimento de todas as espécies bacterianas estudadas (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguis*) suscitando assim a possibilidade da sua incorporação a agentes antibiofilme como colutórios e dentifrícios.

Dado o exposto, pode-se concluir que o extrato das folhas da *Myrciaria cauliflora* apresenta potencial atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sagüis*. Este estudo serve de subsídio a futuros experimentos que visem elucidar as substâncias ativas deste extrato bem como seu mecanismo de ação, toxicidade e atividade antimicrobiana sobre outros microrganismos. A busca

por agentes antimicrobianos com aplicabilidade terapêutica e economicamente viáveis torna-se um evento importante na promoção da saúde bucal da população.

REFERÊNCIA

- ASCHERI, D.P.M.; ASCHERI, J.L.M; CARVALHO, C.W.P. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia Alimentar Campinas**, v.26, n.4, p.1-9, 2006.
- BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against other pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.349-56, 2007.
- BRUNINI, M.A. et al. Influencia de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Myrciaria jabuticaba* Berg) cv "sabará". **Ciência e Tecnologia Alimentar Campinas**, v.24, n.3, p.378-83, 2004.
- FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Research**, v.38, p.182-91, 2004.
- FILOCHE, S.K.; SOMA, K.; SISSONS, C.H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology Immunology**, v.20, p.221-5, 2005.
- GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.10, p.251-6, 1996.
- KAWASHIMA, M. et al. Real time interaction of oral

- streptococci with salivary components. **Oral Microbiology Immunology**, v.18, p.220-5, 2003.
- LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Genotypes and Caries Development in Children to Mothers Harboring Both Species. **Caries Research**, v.38, p.95-103, 2004.
- LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 720p.
- MACEDO-COSTA, M.R. **Atividade antimicrobiana e antiaderente de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir e *Myrciaria cauliflora* Berg sobre bactérias do biofilme dental**. 2008. 72p. Monografia (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial film. **Caries Research**, v.38, p.204-11, 2004.
- MELO, A.F.M. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.202-5, 2006.
- MURATA, R.M. **Avaliação *in vitro* do efeito do kaempferol e tt-farnesol sobre o biofilme dental-inibição e viabilidade bacteriana**. 2004. 38p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
- PERCIVAL, R.S. et al. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **European Journal of Oral Science**, v.114, p.343-8, 2006.
- PINTO, V.G.P. **Saúde bucal coletiva**. 4.ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 2000. 202p.
- REYNERTSON, K.A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v.69, p.1228-30, 2006.
- SEKI, M. et al. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. **Oral Microbiology Immunology**, v.21, p.47-52, 2006.
- SILVEIRA, F.T. et al. 2006. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, n.2, p.327-33, 2006.
- SVENSATER, G. et al. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. **Caries Research**, v.37, p.395-403, 2003.
- VASCONCELOS, L.C.S. et al. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* L. (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. **Brazilian Dental Journal**, v.17, n.3, p.223-7, 2006.
- UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different *Anatolian propolis* samples. **Microbiological Research**, v.160, p.189-95, 2005.
- XIAO, J. et al. Effects of *Nidus vespae* extract on the growth and acidogenicity of oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v.51, p.804-13, 2006.