

Estudo *in vitro* da atividade do extrato etanólico de sementes de bacupari (*Rheedia gardneriana* Planch. & Triana) e das frações no crescimento de *Streptococcus mutans***SAMARÃO, S.S.^{1,2*}; CORRÊA, L.A.S.¹; MOREIRA, A.S.N.¹; FREIRE, M.G.M.¹; MACEDO, M.L.R.³**

¹Laboratório de Química, Biomoléculas e Laboratório de Microbiologia/Centro de Pesquisa/Institutos Superiores de Ensino do CENSA, CEP: 28035-310, Campos dos Goytacazes-Brasil ²Laboratório de Fitotecnia do Instituto Superior de Tecnologia em Ciências Agrárias-FAETEC, CEP:28060-560, Campos dos Goytacazes-Brasil *solangesamarao@gmail.com ³Departamento Tecnologia de Alimentos e da Saúde, UFMS, CEP: 79070-900, Campo Grande-Brasil

RESUMO: *Streptococcus mutans*, principal microrganismo da cavidade oral, desempenha papel preponderante na formação de placas dentárias, sendo considerado o agente etiológico primário da cárie. *Rheedia gardneriana*, conhecida popularmente como bacupari, é uma planta utilizada com fins medicinais para o tratamento de diversas patologias, e por apresentar atividade antimicrobiana de compostos das folhas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de extrato de semente de *R. gardneriana* sobre a cepa *S. mutans* UA159. Os testes foram conduzidos com o extrato etanólico bruto e as frações obtidas com os solventes diclorometano, etanol-água, metanol e hexano, em ensaios de inibição *in vitro*. O extrato bruto (100%) apresentou halos de inibição com diâmetro similar ao obtido com solução de digluconato de clorexidina 0,12%, usada como controle. Os ensaios com a fração diclorometano exibiram atividade inibitória 35% menor comparado com o controle, enquanto nenhum efeito antimicrobiano foi observado com a fração etanol-água. Contrariamente, os resultados obtidos com as frações hexânica e metanólica demonstraram claramente a atividade antimicrobiana por inibição do crescimento bacteriano. Na fração metanólica a formação de halos de inibição foi similar ao do controle. Estes dados apresentam atividade antimicrobiana de *R. gardneriana* contra *S. mutans*.

Palavras-chaves: *Rhedia gardneriana*, bacupari, atividade antimicrobiana, *Streptococcus mutans* UA159, cárie dental

ABSTRACT: *In vitro* study of the activity of ethanol extract from “bacupari” (*Rheedia gardneriana* Planch. & Triana) seeds and its fractions on *Streptococcus mutans* growth. *Streptococcus mutans*, which is the main microorganism of the oral cavity, plays a preponderant role in dental plaque formation and is considered the primary etiologic agent regarding caries. Commonly known as “bacupari”, *Rheedia gardneriana* is a plant used for medicinal purposes in the treatment of several pathologies; besides, its leaves have compounds that present antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The aim of this work was to evaluate the effect of *R. gardneriana* seed extract on *S. mutans* strain UA159. The tests were carried out with crude ethanol extract and the fractions obtained with the solvents dichloromethane, ethanol-water, methanol, and hexane in *in vitro* inhibition assays. The crude extract (100%) presented inhibition halos with diameter similar to that obtained by using 0.12% chlorhexidine digluconate solution as control. Assays with the fraction dichloromethane showed an inhibitory activity 35% lower than that of the control, whereas no antimicrobial effect was observed with the ethanol-water fraction. Conversely, the results obtained with the fractions hexane and methanol clearly demonstrated antimicrobial activity by inhibiting the bacterial growth. In the methanol fraction, the formation of inhibition halos was similar to that in the control. These data present antimicrobial activity of *R. gardneriana* against *S. mutans*.

Key words: *Rheedia gardneriana*, “bacupari”, antimicrobial activity, *Streptococcus mutans* UA159, dental caries

A cárie dentária é doença infecto-contagiosa que acomete cerca de 95% da população mundial, de forma específica para cada indivíduo (Stamford et al., 2005). Das patologias que acometem a cavidade oral, esta continua sendo a de maior incidência no mundo, constituindo um dos problemas mais comuns de saúde humana, juntamente com os problemas periodontais (Kuhn, 2002). É doença de caráter multifatorial, uma vez que o surgimento é dependente da interação de três fatores essenciais, o hospedeiro, representado pelos dentes, a microbiota da cavidade oral e a dieta consumida pelo indivíduo (Baratieri et al., 1993; Drumond et al., 2004).

A espécie *R. gardneriana* Planch & Triana, planta conhecida como bacupari, ocorre abundantemente em todo o país, sendo tradicionalmente utilizada com fins medicinais para o tratamento de inflamações, infecções e processos dolorosos. Compostos isolados das folhas da planta (volkensiflavone, fukugetina, fukogesida e GB-2^a) demonstraram significativo efeito analgésico e antiinflamatório em camundongos (Cechinel Filho & Yunes, 1998), assim como atividade antimicrobiana contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Verdi et al., 2004).

Outros compostos químicos já foram isolados do fruto maduro, sesquiterpenos, ésteres metílicos dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, carboidratos como galactose, glicose e frutose, triterpeno (ácido oleanólico), mistura de esteróides (estigmasterol e sitosterol) e benzofenona tetraprenilada, 7-epiculianona. Do caule e da raiz foram isolados, 5-diidroxixantona, lupeol, ácido betulínico, reedixantona B, 1,7-diidroxixantona, isoreedixantona B, reediacromenoxantona, 8-desoxigartanina, piranojacareubina, 7-preniljacareubina e β -sitosterol (Santos et al., 1999a). O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial do extrato bruto de sementes de *R. gardneriana* Planch & Triana e das frações sobre a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*.

Para o preparo do extrato foram utilizadas sementes de *R. gardneriana* Planch. & Triana (bacupari) obtidas da restinga da Praia de Grussaí, no Distrito de Cajueiro, Município de São João da Barra, RJ. A planta foi identificada botanicamente e o material depositado no herbário da UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) sob o número H 3022.

As sementes de *R. gardneriana* Planch. & Triana foram separadas das polpas dos frutos e secas em estufa com circulação de ar, na temperatura de 50°C. Esse material obtido foi triturado em liquidificador (750 g) e submetido à maceração em um litro de etanol comercial (95% v/v), por um período de sete dias à temperatura ambiente, com três repetições, procedendo-se em seguida a filtração, em funil comum com filtro de papel.

A partir da solução filtrada, concentrou-se o

extrato com o auxílio de roto-evaporador à temperatura de 76°C. Este procedimento foi realizado três vezes para obtenção do extrato bruto. Este extrato recebeu o nome de "extrato bruto etanólico" da semente de *R. gardneriana*.

Após os testes preliminares de atividade do extrato bruto da planta contra *S. mutans* iniciou-se o processo de partição deste extrato em diferentes solventes. Inicialmente, uma mistura de etanol:água (EtOH:H₂O) (1:3 v/v) e diclorometano (CH₂Cl₂) na proporção 1:1 v/v, foi colocada em funil de decantação, que após a partição chamaram-se fração hidroalcoólica (EtOH:H₂O), fração mais polar e fração CH₂Cl₂ fração menos polar, até evaporação total. A fração CH₂Cl₂ sofreu partição em hexano e metanol, na proporção 1:1 v/v, realizando sempre, após cada partição, os testes de inibição com as respectivas frações obtidas.

Foi utilizada a bactéria *Streptococcus mutans*, cepa UA 159 (ATCC 700610), gentilmente cedida pelo Professor Dr. Francisco Carlos Groppo, do Departamento de Diagnóstico Oral da Universidade de Piracicaba - UNICAMP - SP. A suspensão celular preparada com *S. mutans* foi inoculada em Agar BHI (Acumedia, EUA). Foi semeada por espalhamento em placa contendo o referido meio, após verificar a secagem da suspensão no meio, quatro poços foram perfurados com perfurador metálico de 0,8 cm de diâmetro, em um dos poços foram depositados 100 μ L de digluconato de clorexidina (0,12%), controle positivo e nos demais foram depositados 100 μ L do extrato bruto e diluições (100, 75, 50 e 25%). As placas foram incubadas por 48 horas em estufa em atmosfera de CO₂ (10%), a 37°C. Em seguida procedeu-se à leitura das medidas de diâmetro (mm) dos halos de inibição de crescimento bacteriano. Foram testados, também as frações etanol:H₂O, diclorometano, hexano e metanol. Os solventes (diclorometano, etanol, metanol e hexano) foram utilizados em todos os experimentos como controles negativos.

Este estudo tem como base o conhecimento popular sobre o uso de bacupari (*R. gardneriana* Planch. & Triana) na forma *in natura* e nos resultados de estudos sobre as propriedades curativas desta planta (Santos et al., 1999b; Cechinel Filho et al., 1998). No presente trabalho avaliou-se o efeito de extrato etanólico de sementes de *R. gardneriana* Planch. & Triana quanto à atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, principal microrganismo envolvido no processo de formação da cárie dental. A escolha do extrato alcoólico para a realização dos ensaios de inibição do crescimento microbiano foi baseada em dados da literatura, que mostram a utilização deste mesmo método para comprovar propriedades farmacológicas das folhas de bacupari, tais como analgesia (Cechinel Filho et al., 1998). Utilizando-se quatro diferentes solventes, o extrato bruto foi fracionado por sucessivas extrações,

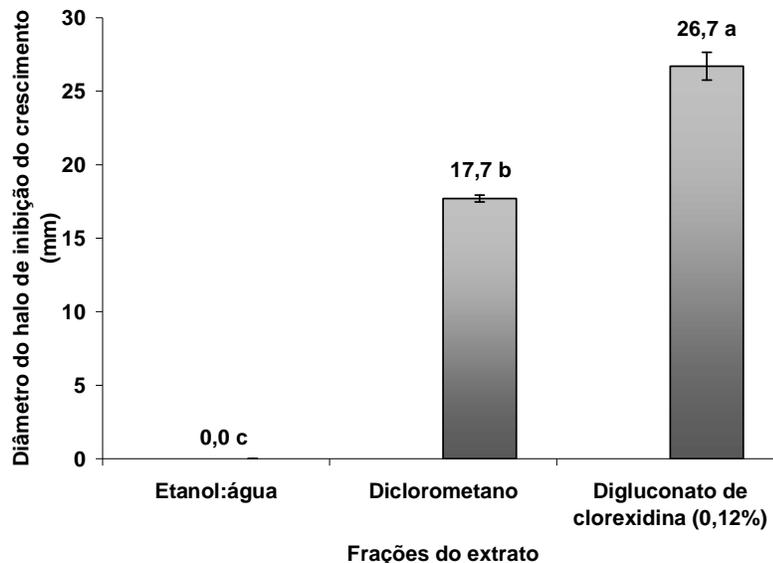


FIGURA 1. Efeito da fração etanol-água e da fração diclorometano de extrato de sementes de bacupari (*Rheedia gardneriana*) sobre o diâmetro do halo de crescimento de *S. mutans*. *Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o teste Tukey ($p \leq 0,05$).

resultando em quatro frações distintas, as quais foram igualmente testadas em ensaios de inibição *in vitro*.

Os resultados mostraram correlação linear entre a diluição do extrato bruto e o diâmetro do halo formado nas quatro condições avaliadas. Comparando-se estes resultados com aquele obtido com o emprego de digluconato de clorexidina, verificou-se que, com o extrato mais diluído (25%), a eficiência no processo de inibição foi prejudicada, sendo verificado diâmetro de halo 50% menor. No entanto, quando o extrato foi utilizado na forma bruta (não diluído), esse valor chegou a 80% do verificado com o controle (dados não mostrados).

A fração etanol:H₂O do extrato etanólico de sementes de *R. gardneriana* Planch. & Triana não formou halos de inibição de crescimento de *S. mutans*, enquanto na fração diclorometano houve formação do halo de inibição. A fração diclorometano apresentou uma atividade inibitória 35% menor que aquela alcançada com o tratamento controle e a fração etanol:água não apresentou inibição do crescimento da bactéria *S. mutans* (Figura 1).

As frações hexano e metanol de sementes de *R. gardneriana* Planch. & Triana são capazes de inibir o crescimento do *S. mutans*. Esse efeito é superior, no caso da fração metanólica, que levou à formação de halos de inibição de diâmetro médio praticamente idêntico ao verificado com o uso de digluconato de clorexidina (0,12%). No caso da fração hexânica, o diâmetro do halo é cerca de 30% menor que o do controle (Figura 2).

Algumas plantas tem sido investigadas com o propósito de combater as infecções bucais, principalmente as bactérias que causam cárie dental como *S. mutans*. Segundo dados de Sharma et al. (2009), o extrato das folhas de *Piper betle* apresentou atividade bactericida contra as espécies cariogênicas *S. mutans*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *S. sanguis*, *Actinomyces viscosus* *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fuseobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e inibiu o crescimento de biofilmes formados pelas bactérias *S. mutans* e *A. viscosus*. O extrato da casca do fruto da romã (*Punica granatum*) demonstrou efeito inibitório em ensaios com *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. sobrinu* e *Lactobacillus casei* (Pereira et al., 2006). Pesquisas recentes mostraram o potencial de inibição de *Mentha longifolia* no crescimento de *S. aureus*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. pyogenis*, demonstrando efeito maior contra *S. mutans* (Al-Bayati, 2009).

Santos et al. (1999b) verificaram, em ensaios *in vitro*, que vários compostos isolados do fruto de bacupari, como sesquiterpenos, ácido oleanólico e epiclusianona demonstraram potencial atividade bacteriostática e bactericida, contra diferentes microrganismos. Ácido oleanólico e epiclusianona apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, enquanto epiclusianona inibiu o crescimento de *Pseudomonas* sp. e *Clavibacter michiganense subsp. michiganense*, ambas fitopatogências.

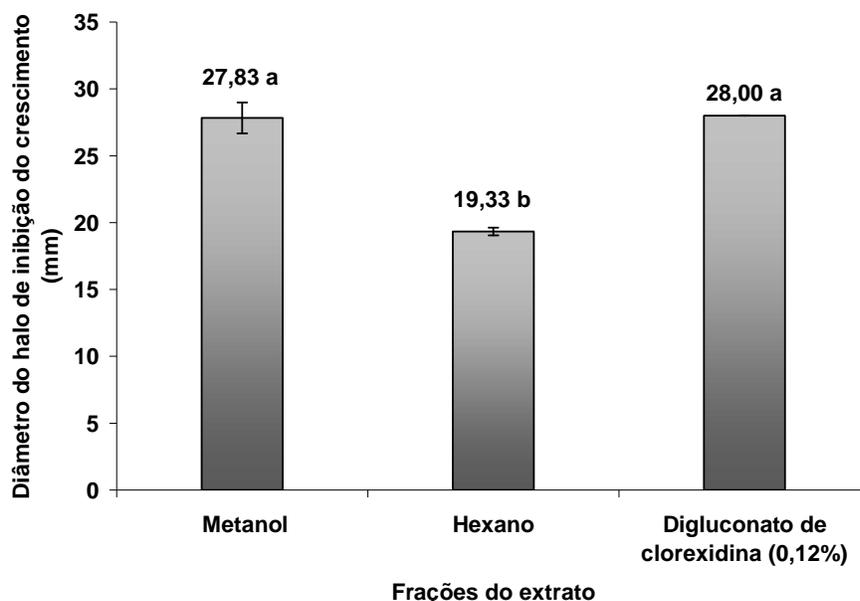


FIGURA 2. Efeito das frações metanólica e hexânica do extrato de sementes de bacupari (*R. gardneriana*) sobre o diâmetro do halo de crescimento de *S. mutans*. *Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Verdi et al. (2004) constataram o efeito inibitório de alguns derivados de extrato alcoólico bruto de folhas de *R. gardneriana* sobre dois importantes patógenos para humanos, *Bacillus cereus* e *S. aureus*. Os compostos volkensiflavona e fukugetina apresentaram elevada atividade contra *B. cereus*, tendo sido observados halos de 22 e 25 mm, respectivamente, em testes de inibição. *S. aureus* foi ligeiramente menos susceptível a estes compostos, verificando-se halos de inibição de 18 e 19 mm de diâmetro, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que o extrato etanólico de sementes de *R. gardneriana* fração metanol apresentou resultado tão eficiente quanto o digluconato de clorexidina (0,12%) no processo de inibição de crescimento de *S. mutans*. Embora as propriedades antimicrobianas dos extratos obtidos com as frações diclorometano e hexano das sementes de *R. gardneriana* não tenham sido tão efetivas quanto o controle, estes ainda possuem atividade antimicrobiana contra o *S. mutans*.

Estes dados indicam que medicamentos fitoterápicos produzidos a partir de sementes de *R. gardneriana* podem ser uma nova opção no controle de *S. mutans* e conseqüentemente no processo de prevenção e tratamento da cárie dental.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Cláudio Luis Melo de Souza pela análise estatística.

REFERÊNCIA

- Al-BAYATI, F.A. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.8, n.20, p.2-6, 2009.
- BARATIERI, L.N. et al. **Dentística: procedimentos preventivos e restauradores**. 2.ed. São Paulo: Quintessence/Editora Santos, 1993. 509p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p.99-105, 1998.
- DRUMOND, M.R.S. et al. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.4, n.1, p.33-8, 2004.
- KUHN, E. **Promoção da Saúde bucal em bebês participantes de um programa educativo-preventivo na cidade de Ponta Grossa - Pr**. 2002. 77p. Dissertação (Mestrado- Área de Concentração em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- PEREIRA, J.V. et al. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato de *Punica granatum* Linn. sobre microrganismo do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.88-93, 2006.
- SANTOS, M.H. et al. Epclusianona, a nova benzofenona tetrapenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v.22, n.5, p.654-60, 1999a.
- SANTOS, M.H. et al. Efeito de constituintes químicos

extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (Bacupari) sobre bactérias patogênicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.35, n.2, p.297-301, 1999b.

SHARMA, S. et al. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol for its potential use as an oral care agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1, p.216-22, 2009.

STAMFORD, T.C.M. et al. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes sadios. **Revista Brasileira Saúde Materno Infantil**, v.5, n.1, p.71-6, 2005.

VERDI, L.G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v.75, p.360-3, 2004.