

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE GUETTARDA SERICEA (RUBIACEAE) E DE SUAS FRAÇÕES SOBRE STREPTOCOCCUS ORALIS E STREPTOCOCCUS SOBRINUS

Érica de Menezes Rabelo¹; Ariana Azevedo Vasconcelos²; Willian Paulo dos Santos³; Elnatan Bezerra de Souza⁴; Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque⁵ Edson Holanda Teixeira⁶

Resumo

O gênero *Guettarda* (Rubiaceae) compreende plantas extensamente distribuídas em áreas tropicais. Elas são popularmente utilizadas na América do Sul para tratamento de ferimentos e inflamações em geral. *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sobrinus* são bactérias da cavidade oral que possuem a capacidade de formar biofilmes patogênicos que podem levar à formação da lesão cariosa. Este trabalho teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana do extrato etanólico e das quatro frações de *Guettarda sericea* na inibição do crescimento planctônico de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus oralis*. A concentração inibitória mínima foi verificada através da metodologia de microdiluição realizada em placas de poliestireno de 96 poços. O extrato, preparado com 4% DMSO, foi diluído de forma seriada na base dois (500 – 62,5 µg/mL), adicionado na placa na presença da bactéria (10^6 - 10^8 UFC/ml) e incubado a 37° C com 10 % de CO₂ por 24 horas. Foi utilizado como controle água do tipo Mili-RiOs. O crescimento bacteriano foi monitorado através de leituras realizadas em leitor de ELISA (DO_{620nm}) logo após montagem e com 24 h de incubação à 37°C com 10% de CO₂. Observamos que o extrato testado apenas interferiu no crescimento de *S. sobrinus* e *S. oralis* sem apresentação de uma concentração inibitória mínima. Enquanto as frações acetato, clorofórmio e n-butanol interferiram no crescimento de *Streptococcus oralis* nas concentrações 500 e 250 µg/mL e frente a *Streptococcus sobrinus* não houve nenhuma interferência. Assim, novos ensaios são necessários para melhor avaliar o potencial antimicrobiano desse extrato vegetal frente a bactérias do gênero *Streptococcus*.

Palavras-chave: *Streptococcus*; Rubiaceae; produtos naturais

Introdução

O Brasil detém a maior biodiversidade do planeta e um valioso conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais, que o destaca como um país com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e terapêuticas apropriadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Segundo Barreiro e Bolzani (2009), a biodiversidade brasileira pode ser considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas. Muitas dessas substâncias possuem propriedades antimicrobianas, entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. (AHMAD I.; BEG A.Z.,2001).

Um representante desta biodiversidade é a família Rubiaceae, uma das maiores dentre as angiospermas, compreende cerca de 13.000 espécies distribuídas em 650 gêneros e 44 tribos (ACHILLE *et al.*, 2006). O gênero *Guettarda*, pertencente à tribo Guettardeae, é composto por cerca de 150 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e neotropicais (ACHILLE *et al.*, 2006). Algumas das espécies pertencentes a este gênero apresentam comprovadas atividades biológicas. Dentre as quais estão *G. angelica* Mart., cujas raízes demonstraram atividades antibacteriana frente a salmonelas e hipoglicemiante em ratos (SOUSA *et al.*, 1984), *G. spruceana* Muell. Arg. usada como emenagoga e abortiva (QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2001) e *G. acreana* (Krause) que apresenta atividade antiinflamatória e antiespasmódica (CAPASSO *et al.*, 1998).

Guettarda sericea é uma espécie da família Rubiaceae, também conhecido popularmente como “esporão de galo”, é uma planta endêmica da região da caatinga do Brasil, apresentando hábito arbustivo, zoocoria como síndrome de dispersão e com frutificação contínua ao longo do ano. (ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RODAL, M. J. N., 2002; MORELLATO; LEITÃO FILHO, 1992).

A cárie dentária é reconhecida como uma doença infectocontagiosa, resultado de uma perda mineral localizada que reflete a atividade metabólica no interior do biofilme dentário. Dependendo de fatores tais como a dieta e a desorganização regular do biofilme, o tipo de microbiota predominante e sua harmonia com o hospedeiro pode variar. Quando a higiene bucal é deficiente e a utilização da sacarose é frequente, ocorre uma mudança ecológica do biofilme, podendo resultar na formação da lesão cariiosa (TORRES, 2000; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Na literatura, é possível encontrar relatos sobre a utilização de plantas medicinais para problemas bucais. Estas apresentam propriedades antiinflamatórias, anti-hemorrágicas, analgésicas, dentre outras. Como exemplo, pode-se citar: os óleos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e do cravo (*Eugenia caryophyllata* T.), indicados para odontalgias, a romã (*Punica granatum* Linn) que possui atividade antimicrobiana sobre o *Streptococcus mutans*, micro-organismo associado à formação do biofilme dental, além de apresentar atividade antisséptica e antibiótica usadas no tratamento de gengivite e feridas bucais (LIMA JÚNIOR, *et al.*, 2005).

Baseado neste contexto, torna-se de grande valia a realização deste estudo, para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato vegetal de *Guettarda sericea* no

controle de microrganismos do biofilme dental, uma vez que um agente fitoterápico produz menos agressões ao organismo, é de baixo custo e, portanto, acessível a toda população.

Este trabalho teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana do extrato etanólico e das quatro frações de *Guettarda sericea* na inibição do crescimento planctônico de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus oralis*.

Metodologia (Materiais e Métodos)

A concentração inibitória mínima foi verificada através da metodologia de microdiluição realizada em placas de poliestireno de 96 poços. (CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute). As substâncias teste: extrato etanólico e as frações acetato, clorofórmio, n-butanol e o resíduo, foram preparados com 4% DMSO, diluídas de forma seriada na base dois (500 – 62,5 ug/mL) e colocadas na placa.

Uma alíquota do estoque das espécies bacterianas, mantidas em freezer -80 °C, foram utilizadas para o cultivo em BHI (Brain Heart Infusion) caldo, por 24 horas e através de um repique, um novo inóculo foi realizado visando o crescimento por mais 18 horas, em seguida adicionou-se na placa (10^6 - 10^8 UFC/ml) na presença da substância teste e incubou-se a 37° C com 10 % de CO₂ por 24 horas. Foi utilizado como controle água do tipo Mili-RiOs.

O crescimento bacteriano foi monitorado através de leituras realizadas em leitor de ELISA (DO_{620nm}) logo após montagem e com 24 h de incubação à 37°C com 10% de CO₂. Foi considerada CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração das substâncias testes capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

As análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism ® versão 3.00 do Microsoft Windows®. O método utilizado foi ANOVA com One-Way Teste Bonferroni. Foram considerados os níveis de significância de p<0,001.

Resultados e Discussão

Nos testes de Concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o extrato etanólico em diferentes concentrações, as bactérias *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sobrinus* mostraram-se susceptíveis a ação biológica do extrato, sendo dose dependente, quando comparado aos controles negativos (Figura 1).

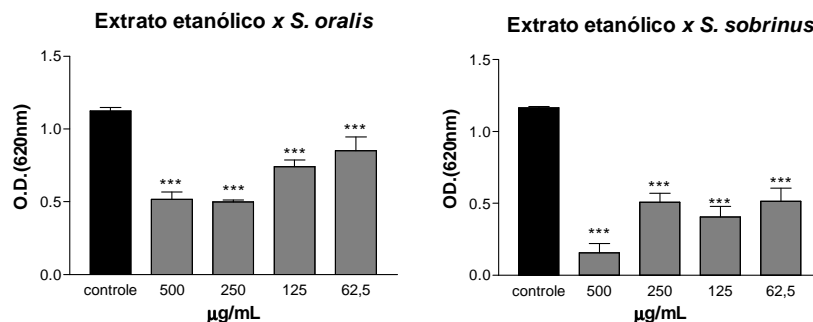


Figura 1 - Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato etanólico de *Guettarda sericea* em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sobrinus*.

Catão et al. (2006) utilizou diferentes concentrações do extrato etanólico da *P. granatum* frente a amostras de *Streptococcus aureus*, perceberam nesse estudo que todas as cepas apresentaram sensibilidade ao extrato e que a sensibilidade decaía à medida que aumentava a diluição do extrato.

Machado et al. (2002), realizaram o fracionamento do extrato acetato de etila de frutos de *Punica granatum*, guiado por ensaios antimicrobianos frente a colônias de *Staphylococcus aureus* resistentes, verificando a ação antimicrobiana de um tanino isolado do extrato. Como mostrado na Figura 2, as frações acetato, n-butanol e clorofórmio do extrato etanólico de *Guettarda sericea* inibiram o crescimento de *S. oralis* ($p < 0,001$) nas concentrações 500 a 250 µg/mL. Enquanto que as mesmas frações, nas mesmas condições, não interferiram positivamente no crescimento de *S. sobrinus* (Figura 3).

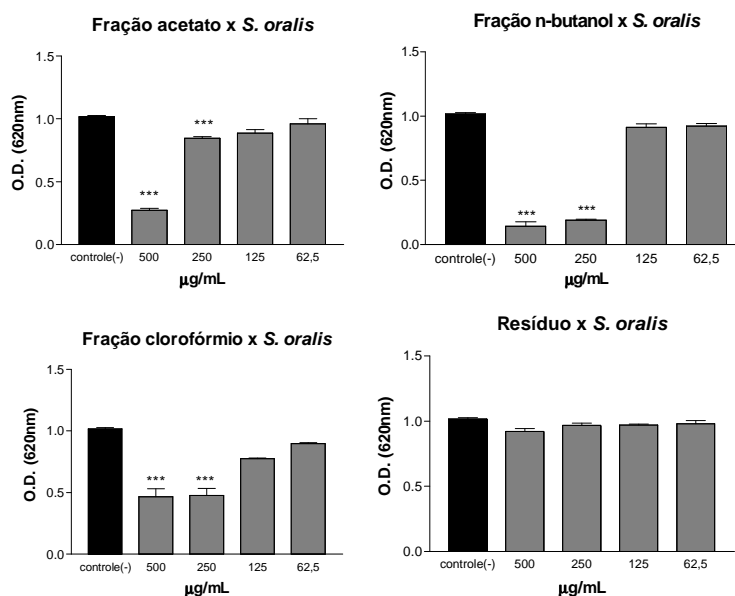


Figura 2 - Avaliação do potencial antimicrobiano das frações do extrato etanólico de *Guettarda sericea* em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus oralis*.

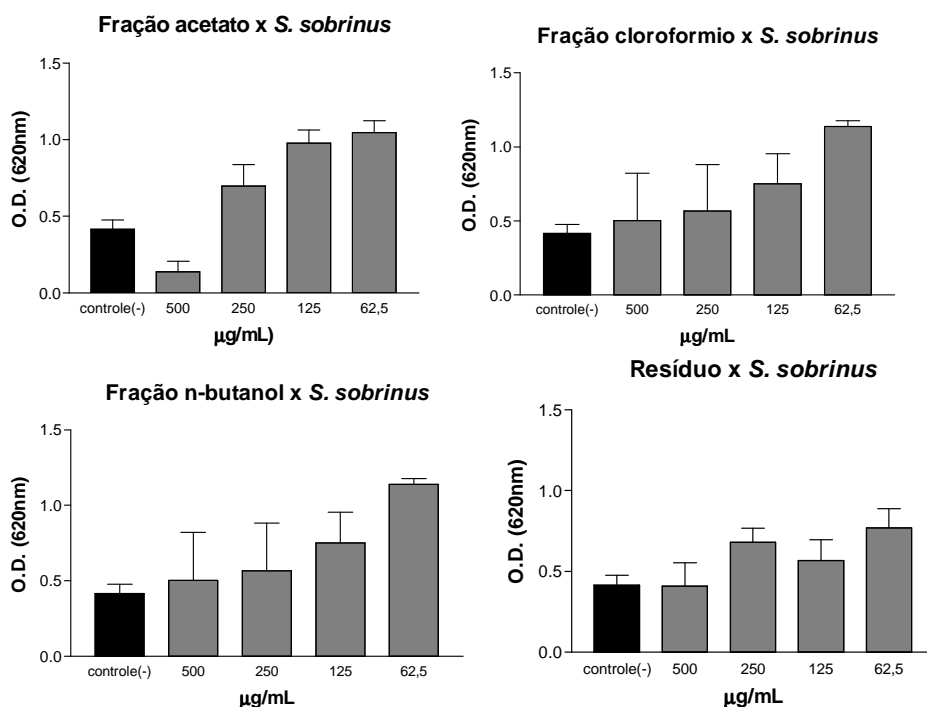


Figura 3 - Avaliação do potencial antimicrobiano das frações do extrato etanólico de *Guettarda sericea* em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus sobrinus*

Conclusão (Considerações Finais)

De acordo com os resultados obtidos, as frações do extrato etanólico de *Guettarda sericea* interferem de forma diferenciada no crescimento planctônico das bactérias testadas *S. oralis* e *S. sobrinus*. Como os resultados foram promissores, novos ensaios serão realizados de forma a avaliar o potencial antimicrobiano desse extrato vegetal frente a bactérias orais do gênero *Streptococcus*.

Referências

ACHILLE F.; MOTLEY, T.J.; LOWRY II, P.P.; JÉRÉMIE, J. Polyphyly in *Guettarda* 1. (Rubiaceae, Guettardeae) based on nrDNA its sequence data. **Ann Missouri Botanica.** , v. 93, p. 103-121, 2006.

AHMAD I. AND BEG A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, **Jornal. of Etnopharmacoly.** v.7, p.113-123, 2001

ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RODAL, M. J. N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa, Pernambuco. **Acta Botanica Brasilica**, p. 123-125, 2002.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.; Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 32, n. 3. p. 679-688, 2009.

CAPASSO, A. et al. Phytochemical and pharmacological studies of Guettarda acreana. **Planta Medicinal**, v. 64, p. 348-352, 1998.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de Punica granatum linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de Staphylococcus aureus. **RBAC**, v. 38, n.2, p. 111-114, 2006.

FERJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária-a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2005.

LIMA JÚNIOR, J. F.; VIEIRA, L. B.; LEITE, M. J. V. F., LIMA, K. C. O uso de fitoterápicos. **Saúde Rev.**, v.7, n. 16, p. 11-17, 2005.

MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; AMARAL, A. C. F.; SANTOS, K. R. N.; SILVA, M. G.; KUSTER, R. M. Antimicrobial Ellagitannin of Punica granatum Fruits. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 5, p. 606-610, 2002.

MINISTÉRIO da Saúde. Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. (2006) Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpc.pdf>> acesso em 20 fevereiro 2012.

MORELLATO, L. P. & LEITAO - FILHO, H. F. 1992. **Padroes de frutificação e dispersão na Serra do Japi**. In: Morellato, L.P. (Coord.). História Natural da Serra do Japi: Ecologia e preservação de uma floresta no Sudeste do Brasil. UNICAMP/ FAPESP, São Paulo, p.112 – 141, 1992.

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M.F., SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.. Avaliação da atividade anticonvulsivante de plantas do Nordeste brasileiro. **Acta Farmacology Bonaerense** v. 21, p.179-184, 2001.

SOUSA, M. P. et al. Triterpenoids from Guettarda angelica. **Phytochemistry**, n. 23, p. 2589-2592, 1984.

TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R.. Antimicrobial agents and your potential of use in dentistry. **Pós-grad Rev Fac Odontol**, v. 3, p. 43-52, 2000.

¹ Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Bolsista do Capes. Universidade Federal do Ceará-UFC. E-mail; ericamrabelo@gmail.com

² Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará . E-mail; ariana_vasconcellor@hotmail.com

³ Discente curso Química- Universidade Estadual Vale do Acaraú E-mail; williamqpn1988@hotmail.com

⁴Coordenação de Biologia- Universidade Estadual Vale do Acaraú E-mail; elbezsoza@yahoo.com.br

⁵ Co-orientador. Profa. Dra. Curso de Química. Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. E-mail; rjane_7@hotmail.com

⁶Orientador. Prof. Dr. Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- E-Mail: