

# AValiação DE EXTRATOS NATURAIS SOBRE CEPA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* NA FORMAÇÃO, *IN VITRO*, DA PLACA DENTÁRIA

Pereira, D.F.A.; Silva, P.V.; Rangel, R.N.; Teodoro, G.R.; Khouri, S.; Canettieri, A.C.V.

Universidade do Vale do Paraíba – Faculdade da Ciências da Saúde  
Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – São José dos Campos/SP – CEP12244-000  
[danielfreitas@apcd.org.br](mailto:danielfreitas@apcd.org.br) ; [soniak@univap.br](mailto:soniak@univap.br) ; [acanettieri@directnet.com.br](mailto:acanettieri@directnet.com.br)

**Resumo-** Estudos realizados com plantas medicinais têm demonstrado que as mesmas podem ter efeito bacteriostático e/ou bactericida podendo assim, atuar no controle da formação da placa bacteriana. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito, *in vitro*, do guaco, da pitanga e do tomilho na dinâmica da formação de placa pelo *Streptococcus mutans* (ATCC25175) sobre uma bengala de vidro. As formas de preparo avaliadas foram: infusões de guaco, de pitanga e de tomilho a 5g/100mL (5%), 7,5g/100mL (7,5%) e 10g/100mL (10%). A análise da formação ou não de placa, foi realizada visualmente, pela microscopia óptica e de varredura, sobre a superfície da bengala após incubação, em microaerofilia, a 37°C por 24 e 48h e seu posterior plaqueamento em ágar Sangue, para análise da atividade antibacteriana das infusões (UFC/ml). As análises qualitativas demonstraram que houve uma redução na formação da placa bacteriana, *in vitro*, utilizando diferentes proporções de guaco, pitanga e tomilho, apresentando, este último um efeito bactericida sobre a cepa estudada. Os resultados obtidos sugerem que, o uso de substâncias naturais pode ser uma nova perspectiva na prevenção e terapêutica na área odontológica.

**Palavras-chave:** extratos naturais, placa bacteriana, *Streptococcus mutans*.

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde

## Introdução

O uso da fitoterapia na Odontologia é de extrema relevância, pela carência de medicamentos nos postos municipais e pela dificuldade de acesso da população carente aos medicamentos dispendiosos. Estes fatores levaram alguns estudiosos à investigação do emprego da fitoterapia no tratamento e prevenção de patologias bucais, por apresentar efeitos colaterais mínimos e estar ao alcance de todos (SILVA, 2001). Segundo Torres et al. (1996), em função do tempo, as pessoas se desmotivavam em relação à limpeza dos dentes. Os autores sugeriram o uso de agentes antimicrobianos sintéticos ou oriundos de plantas, numa tentativa de manter o índice de placa reduzido compatível com a saúde bucal.

Extratos de plantas utilizadas na prática odontológica mostraram resultados efetivos sobre o controle da formação da placa bacteriana (PALENIK et al., 1979). Estudos realizados com plantas mostraram que as mesmas podem ter efeitos bacteriostático, bactericida e/ou fungicida, podendo interferir na síntese de polissacarídeos (dextrano) agindo nas enzimas que produzem estas substâncias ou sobre a estrutura dentária (PAOLINO et al., 1985).

O *Streptococcus mutans* é o principal organismo cariogênico, devido a sua capacidade de adesão à estrutura dentária e formação da placa dentária. A remoção mecânica da placa é um fator importante na prevenção de cárie e na doença periodontal, porém podem existir

dificuldades na remoção feita pelo próprio paciente. Produtos odontológicos contendo substâncias naturais poderiam ser introduzidos no mercado, desde que amparados em estudos laboratoriais e clínicos, como agentes de controle na adesão e/ou na proliferação bacteriana na superfície dentária (GEBARA et al., 1996).

Embora tenha ocorrido uma melhora substancial na saúde bucal, em vários locais e em todos os grupos sociais, uma enorme quantidade de pessoas ainda sofre de problemas odontológicos pela desmotivação em relação a higienização dentária (TORRES et al., 1996). Os enxaguatórios bucais, atualmente comercializados, apresentam custo elevado, para a maioria da população brasileira. Sendo assim, o presente trabalho visa avaliar o efeito, *in vitro*, de três extratos naturais (guaco, pitanga, tomilho) na dinâmica da formação de placa bacteriana pelo *Streptococcus mutans* sobre uma estrutura sólida, assim como, estudar o efeito desses extratos sobre a cepa estudada.

## Materiais e Métodos

### Preparo das Infusões de Guaco, Pitanga e Tomilho

As folhas de guaco, tomilho e pitanga, adquiridas comercialmente, foram pesadas na quantidade de 5g, 7,5g e 10g, colocadas em frascos de Durhan e esterilizadas.

Em seguida, foi adicionado em cada frasco, 100ml de água destilada esterilizada e fervida. Os frascos foram tampados por dez minutos, desta

maneira obteve-se as seguintes proporções (p/v): 5g/100mL (5%), 7,5g/100mL (7,5%) e 10g/100mL (10%). Posteriormente, foi realizada a prova de esterilidade das infusões semeando cerca de 0,1 mL em placas de ágar sangue. As placas foram incubadas à 37°C, sendo verificado a presença ou não de crescimento microbiano, após 24 e 48h de incubação.

#### Verificação da presença de formação de placa bacteriana pela microscopia

Foi utilizado cerca de 5 mL caldo sacarosado juntamente com uma bengala de vidro esterilizada (superfície sólida). Neste meio foi preparado o inóculo da cepa padrão de *Streptococcus mutans* - ATCC25175 de acordo com a turbidez 0,5 da escala de Mac Farland.

Em seguida foi adicionado, separadamente, cerca de 10mL das infusões, em diferentes proporções, de guaco, pitanga e tomilho (5%, 7,5% e 10%) nos tubos de caldos sacarosados. Para o controle positivo foi adicionado cerca de 10 mL de água destilada estéril e para o controle negativo cerca de 10mL de hipoclorito de sódio à 1%. Logo após a preparação dos tubos, estes foram incubados em microaerofilia a 37°C por 24 e 48 horas.

Decorrido o período de incubação, as bengalas de vidro foram cuidadosamente retiradas com alça de platina e colocadas em placas descartáveis estéreis para avaliação da ação dos extratos naturais sobre a cepa de *Streptococcus mutans* na formação, *in vitro*, da placa bacteriana. Esta avaliação foi realizada, qualitativamente, através da microscopia óptica e de varredura.

#### - Microscopia Óptica

As bengalas de vidro, dos diferentes grupos, foram observadas em microscópio óptico, Leica – modelo DMIL, com aumento de 300x.

#### - Microscopia Eletrônica de Varredura

As bengalas de vidro, dos diferentes grupos foram colocadas em placa metálica para o banho eletrolítico de ouro em vacuolizadora DENTRON DESK II.

Os corpos de prova foram analisados em microscópio eletrônico de varredura, JEOL modelo JSM-5310, em aumento de 5000x.

#### Avaliação da Atividade Bactericida e/ou Bacteriostática

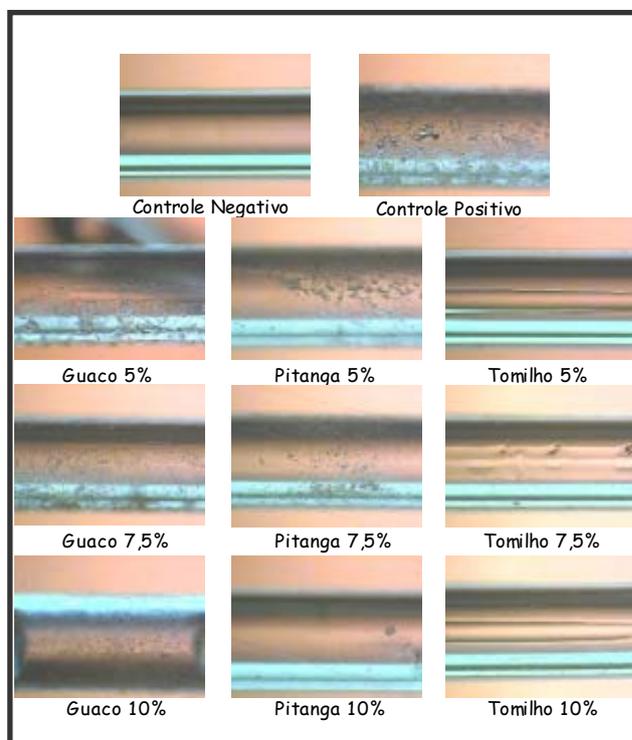
Após o período de incubação dos caldos sacarosados, dos diversos grupos, os tubos foram agitados e cerca de 0,1mL de cada grupo preparado, foi semeado em placas de ágar Sangue e incubadas nas mesmas condições acima descritas. Para verificação da ação bactericida ou bacteriostática, após 24 e 48h de incubação foi avaliada a formação e o número

unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) dos diferentes caldos sacarosados.

## Resultados

Os plaqueamentos resultaram na formação de colônias em ambas as infusões de guaco e pitanga, porém nas infusões de tomilho percebeu-se efeito bactericida após 48h de incubação.

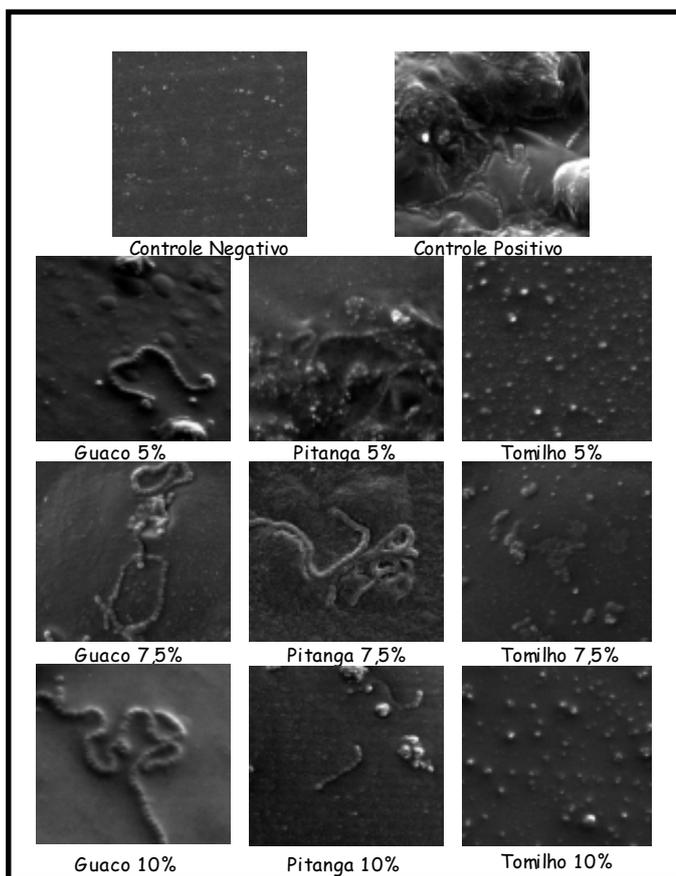
As placas bacterianas, visualizadas em microscopia óptica, apresentaram-se como aglomerados que se distribuíam sobre a superfície vítrea. Observou-se a diminuição no tamanho desses aglomerados microbianos para os grupos guaco e pitanga à medida que se aumentou a concentração das infusões (Quadro 1). As bengalas do grupo tomilho não apresentaram placa bacteriana nas três concentrações estudadas.



Quadro 1: Placa bacteriana visualizada em microscopia óptica, formada sobre as bengalas de vidro. Aumento original de 300x.

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura observamos no grupo controle positivo uma estrutura amorfa (matriz intermicrobiana) que envolvia diversas cadeias de estreptococos (Quadro 2).

No grupo guaco e pitanga, a placa bacteriana formada diferia do grupo controle positivo, pois se apresentava com uma menor quantidade de matriz intermicrobiana e cadeias de *S. mutans*. Já no grupo tomilho não se observou a formação de placa bacteriana, assemelhando-se, então ao controle negativo.



Quadro 2: Fotos de microscopia de varredura. Aumento original de 5000x.

## Discussão

Os *S. mutans* são os principais agentes etiológicos da cárie dentária. Estes microrganismos produzem, à partir da sacarose, glucanos e frutanos, mecanismo este de virulência que permite a aderência dos microrganismos a uma superfície sólida (WHILEY; BEIGHTON, 1998). Frente aos métodos de controle da placa bacteriana, o controle químico é amplamente aceito, principalmente quando utilizados em pacientes de alto risco à cárie e aqueles impossibilitados de realizar uma satisfatória higiene bucal através de meios mecânicos (DEAN; HUGHES, 1995).

Neste presente estudo, utilizou-se extratos de plantas naturais das quais obteve-se infusões a partir de folhas secas em diversas proporções, sendo estas avaliadas sobre o mecanismo de formação da placa bacteriana do *S. mutans*.

Segundo Yatsuda et al. (2005), em estudos realizados com extratos fracionados de guaco tendo a curamina como principal fração, observaram que esta é uma das plantas mais utilizadas pela população em geral. Eles constataram que a planta possuía propriedades eficazes no controle da formação da placa bacteriana, pois apresentam ação de inibição da

aderência dos *S. mutans* e redução no crescimento dessas bactérias, em determinadas concentrações.

Essa diminuição na aderência de *S. mutans* a uma superfície sólida foi observada, no presente estudo, à medida que se aumentou a proporção da infusão de guaco, porém após 24 e 48h do plaqueamento não verificou-se efeito bactericida.

De acordo com Koo et al. (2000) e Duarte et al. (2003), a inibição da aderência por extratos fracionados de guaco é decorrente da ação sobre as glicosiltransferase (GTF1), enzimas responsáveis pela síntese de glucanos extracelulares, impedindo assim a aderência dos *S. mutans* na superfície do dente.

A *Eugenia uniflora*, popularmente conhecida como pitanga, vem sendo usada na medicina na forma de infusão das folhas e de óleo essencial. (MORAIS et al., 1994). Na avaliação das atividades farmacológicas da infusão das folhas de pitanga foi observada ação hipotensiva, diurética e vasodilatadora (CONSOLINI et al., 1999; MORIOKA et al., 2000) e, no óleo essencial, atividade antifúngica (EL-SHABRAWY, 1995) e antibacteriana sobre *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *N. gonorrhoeae* (FADEYI; AKPAN, 1989).

Schapoval et al. (1994), estudando infusos e decoctos de folhas de pitanga, relataram efeito antiinflamatório com a infusão elaborada a partir de folhas frescas. Tanto infusos como decoctos nas concentrações de 5%(p/v) não exibiram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e *Candida albicans*

Auricchio et al. (2003), analisaram as propriedades das folhas de pitanga e concluíram que as preparações de uso popular, infusões e decoctos das folhas, favoreciam a extração dos taninos, constituinte fenólico da pitanga, que também apresentavam atividade antimicrobiana.

No presente estudo, as diferentes proporções das infusões de pitanga apresentaram efeitos similares às infusões de guaco.

Essawi; Srouf (2000), selecionaram diversas plantas medicinais para avaliar a atividade antibacteriana e notaram que o tomilho era a planta mais ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Gebara et al.(1996), mostraram que o tomilho, foi empregado na medicina popular como agente anti-séptico e apresentava ação antibacteriana contra *S.mutans* e *S.sobrinus*, além de inibir a adesão dos mesmos à superfície dentária.

O tomilho, na presente avaliação, apresentou inibição na aderência do *S. mutans* ao vidro bem como ação antibacteriana após plaqueamento.

Quando se compara estudos com plantas medicinais é notória a dificuldade de avaliação entre os resultados, pois as variáveis vão desde aspectos edáficos – climáticos que influência na

composição química, como o estágio de desenvolvimento do vegetal quando da coleta, parte da planta estudada, forma de preparar o material para estudo e até os protocolos seguidos nos experimentos (AURICCHIO; BACCHI, 2003). Mesmo assim diversos produtos a base de plantas podem ser incorporados com sucesso em dentifrícios e anti-sépticos bucais (VANDER WEIJDEM et al., 1998).

Enfim, mesmo que o potencial de uma planta seja revelado em estudos prévios, é fundamental repetir essa avaliação no contexto etno-cultural das comunidades, para que sejam evidências seguras e apropriadas para estabelecimento da relação dose-efeito procurado.

### Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que o tomilho inibiu a aderência sacarose dependente do *Streptococcus mutans* ao vidro bem como apresentou ação antibacteriana (redução de 100% da UFC/mL);

A pitanga e o guaco modificaram a conformação da placa bacteriana, *in vitro*, apresentando uma menor agregação bacteriana em relação ao controle positivo;

Assim, o uso de enxaguatórios bucais naturais pode ser uma nova perspectiva na prevenção de cárie, auxiliando na redução da formação da placa bacteriana.

### Agradecimentos

Maria Lúcia B. de Mattos L.A.S. C.T.E. INPE/SJC  
Dra. Renata Amadei Nicolau IP&D UNIVAP/SJC

### Referências

- AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** V.62, n.1, p.55-61, 2003.
- CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. Z. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J. Ethnopharmacol.** V.69, n.1/3, p.307-314, 1999.
- DEAN, J.A.; HUGHES, C.V. Métodos mecânicos e quimioterápicos caseiros de higiene oral. In: DONALD, R.E.; AVERY, D.R. **Odontopediatria**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1995. P.176-194.
- DUARTE, S. et al. Effect of a novel type os propolis and its chemical fraction on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biol. Pharm. Bull.** V.26, p.527-531, 2003.
- EL-SHABRAWY, A. O. Essential oil composition and tannin contents of the leaves of *Eugenia uniflora* L. grown in Egypt. **Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.** V.33, n.3, p.17-21, 1995.
- ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.** V.70, p.343-349, 2000.
- FADEYI, M. O.; AKPAN, U. E. Antibacterial activities of the leaf extracts of *Eugenia uniflora* Linn. (Synonym *Stenocalyx michelli* Linn.) Myrtaceae. **Phytother. Res.** V.3, n.4, p.154-155, 1989.
- GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo in vitro da ação antibacteriana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo** V.10, n.4, p.251-256, 1996.
- KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch. Oral Biol.** V.45, p.141-148, 2000.
- MORAIS, S. M.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Análise comparativa de óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) procedentes de regiões diversas. In: Simpósio Plantas Medicinais do Brasil, 13, 1994, Fortaleza, **Anais...**, Fortaleza, 1994.
- MORIOKA, K.; NOJIMA, H.; KUROSAKI, F.; MOMOSE, Y. Hypotensive action of nangapiry, a paraguayan natural medicine, in rodents. **Fitomedicina** V.7, n.2, p.99-103, 2000.
- PALENIK, C.J. et al Effect of water soluble componets derived from cocoa on plaque formation. **J. Dent. Res.** V.58, n.7, p.1749, 1979.
- PAOLINO, V.J. et al. Inhibition by cocoa extracts of biosynthesis of extracelular polysaccharide by human oral bacteria. **Arch. Oral Biol.** V.30, p.359-363, 1985.
- SCHAPOVAL, E.E.S. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **J. Ethnopharmacol** V.44, p.137-142, 1994.
- SILVA, R.C. Plantas medicinais na saúde bucal. 1ed., 136p., 2001.
- TORRES, C.R.G. et al. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. **Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos** V.3, n.2, p.251-256, 1996.
- VANDER WEIJDEN, G.A. et al. The effect of herbal extracts in na experimental mouthrinse on stablished plaque and gingivitis. **J. Clin. Periodontol.** V.25, p.399-403, 1998.
- WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. **Oral Microbiol. Immunol.** V.13, p.195-216,1998.
- YATSUDA, R. et al.Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **J. Ethnopharmacol.** V.97, p.183-189, 2005.