

Atividade antimicrobiana do extrato de *Chenopodium ambrosioides* e *Ruta graveolens* sobre *Streptococcus mutans*

Antimicrobial activity of Chenopodium ambrosioides extract and Ruta graveolens on Streptococcus mutans

Actividad antimicrobiana del extracto de Chenopodium ambrosioides y Ruta graveolens sobre Streptococcus mutans

Diego Romário da **SILVA**¹
Sabrina Avelar de Macêdo **FERREIRA**²
Tainá Souza **SILVA**³
Pedro Henrique **SETTE-de-SOUZA**⁴
Andréa Cristina Barbosa da **SILVA**⁵

¹Doutorando na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

²Cirurgiã-Dentista pela Universidade Estadual da Paraíba, UEPB

³Mestre e doutora em Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba IFPB, Campus Catolé do Rocha

⁴Mestre e Doutorando em Odontologia (área de concentração em Clínicas Odontológicas) pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB),
Professor Assistente da Universidade de Pernambuco (UPE) Campus Arcoverde

⁵Mestrado em Odontologia (Odontologia Preventiva Infantil) pela Universidade Federal da Paraíba e doutorado em Biotecnologia (Biotecnologia em Saúde) pela Rede Nordeste de Biotecnologia/ RENORBIO/UFPB,
Professora Efetiva do Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (Campus Araruna)

Resumo

As plantas medicinais e aromáticas são usadas pela população para o tratamento de doenças desde a antiguidade. Esse conhecimento empírico é usado como orientação para condução de estudos de definição das propriedades biológicas dessas plantas. Apesar da rica biodiversidade da flora brasileira, os estudos nacionais nesta área ainda são incipientes. O objetivo deste estudo foi analisar a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico de duas plantas do Curimataú paraibano (*C. ambrosioides* e *R. graveolans*) contra *S. mutans*. Os extratos hidroetanólicos foram obtidos por masseração e concentrados em rotaevaporador. A susceptibilidade microbiana foi realizada por meio da técnica da microdiluição em caldo para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM). *C. ambrosioides* e *R. graveolans* não apresentaram atividade antimicrobiana para *S. mutans* em concentrações $\leq 400 \mu\text{g/mL}$. As plantas estudadas não apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans* nas concentrações analisadas. A análise das frações do extrato e/ou suas moléculas isoladas podem permitir vislumbrar resultados diferentes.

Descritores: Plantas Medicinais; *Streptococcus mutans*; Cárie Dentária.

Abstract

Medicinal and aromatic plants are used by the population for the treatment of diseases since antiquity. This empirical knowledge is used as a guideline for conducting studies to define the biological properties of these plants. Despite the rich biodiversity of Brazilian flora, national studies in this area are still incipient. The objective of this study was to analyze the antimicrobial activity of the hydroethanolic extract of two plants of Curimataú region from Paraíba (*C. ambrosioides* and *R. graveolans*) against *S. mutans*. The hydroethanolic extracts were obtained by rotaevaporation. The microbial susceptibility was carried out using the broth microdilution technique to obtain the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). *C. ambrosioides* and *R. graveolans* did not present antimicrobial activity for *S. mutans* in concentrations $\leq 400 \mu\text{g/mL}$. The plants studied did not present antimicrobial activity against *S. mutans* at the concentrations analyzed. The analysis of the fractions of the extract and / or its isolated molecules can allow to glimpse different results.

Descriptors: Plants, Medicinal; Dental Caries; *Streptococcus mutans*.

Resumen

Las plantas medicinales y aromáticas son usadas por la población para el tratamiento de enfermedades desde la antigüedad. Este conocimiento empírico se utiliza como orientación para la conducción de estudios de definición de las propiedades biológicas de estas plantas. A pesar de la rica biodiversidad de la flora brasileña, los estudios nacionales en esta área todavía son incipientes. El objetivo de este estudio fue analizar la actividad antimicrobiana del extracto hidroetanólico de dos plantas del Curimataú paraibano (*C. ambrosioides* y *R. graveolans*) contra *S. mutans*. Los extractos hidroetanólicos fueron obtenidos por rotavirus. La susceptibilidad microbiana fue realizada por medio de la técnica de la microdilución en caldo para obtener la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). *C. ambrosioides* y *R. graveolans* no presentaron actividad antimicrobiana para *S. mutans* en concentraciones $\leq 400 \mu\text{g/mL}$. Las plantas estudiadas no presentaron actividad antimicrobiana contra *S. mutans* en las concentraciones analizadas. El análisis de las fracciones del extracto y / o sus moléculas aisladas pueden permitir vislumbrar resultados diferentes.

Descriptores: Plantas Medicinales; *Streptococcus mutans*; Caries Dental.

INTRODUÇÃO

Apesar da prevalência de cárie ter diminuído nos últimos anos¹, os indivíduos são suscetíveis ao longo da vida². Dessa forma, com o crescimento da população e aumento da longevidade, os índices de cárie não tratada tendem a se manter, ainda, em níveis consideráveis³.

A cárie resulta da atividade conjugada de uma série de microrganismos acidogênicos sobre as superfícies dentárias⁴, sendo o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) o mais associado à doença⁵. Estas bactérias são capazes de formar biofilmes, que são comunidades de microrganismos com uma organização estrutural e funcional, que podem ser cerca de 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que os microrganismos planctônicos⁶.

Vários agentes microbianos, como triclosan, xilitol e clorexidina são utilizados como auxiliar no controle do biofilme dental. Atualmente, a clorexidina é o antimicrobiano considerado padrão ouro para esse fim. Ela é utilizada na prática clínica em concentrações de 0,12 % e 0,2%, que mata a grande maioria dos microrganismos no biofilme. Porém, a morte das células não é o efeito desejável, pois podem causar um desequilíbrio na microbiota bucal⁷. Além disso, a clorexidina apresenta efeitos indesejáveis que impedem a sua utilização por tempo prolongado, como a alteração do paladar, a descamação da mucosa, xerostomia e o manchamento dos dentes⁸.

Agentes antimicrobianos ideais seriam aqueles capazes de manter o biofilme dental em níveis compatíveis com a saúde oral sem causar desequilíbrio na microbiota, que poderia favorecer o crescimento de microrganismos transitórios⁹. É evidente a necessidade de terapias de controle do biofilme com esta abordagem. Assim, é possível que os produtos naturais possam suprir a necessidade de novas alternativas terapêuticas, fornecendo princípios ativos com mecanismos de ação mais específicos e com menores efeitos adversos. Além disso, o uso de plantas com finalidade terapêutica tem ampla aceitação popular e apoio da Organização Mundial de Saúde, incentivando pesquisas científicas baseadas na fitoterapia¹⁰.

Desse modo, apesar da pesquisa com fitoterápicos ainda não abranger toda a grande biodiversidade vegetal do país, nos últimos anos, essa linha de pesquisa tem ganhado enfoque em diversas áreas da saúde. Dessa forma, estudos têm buscado o potencial antimicrobiano de extratos de plantas contra diversas bactérias, causadoras de infecção em humanos¹¹.

Baseado nisso, objetivamos neste estudo avaliar se os extratos hidroetanólicos de *Chenopodium ambrosioides* e *Ruta graveolens* possuem potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* e possibilidade para um futuro uso no controle da cárie dentária.

MATERIAL E MÉTODO

○ Seleção das plantas utilizadas na pesquisa

A seleção das plantas foi realizada de acordo com os dados obtidos em pesquisa anterior, que consistiu em levantamento etnobotânico das plantas com potencial terapêutico antimicrobiano indicadas por raizeiros e utilizadas pela população no município de Araruna-PB. Com base nas indicações para fins terapêuticos destas plantas, e devido à pequena quantidade de pesquisas realizadas com estes vegetais para aplicações em afecções bucais, optamos por fazer os testes com as seguintes plantas: *Chenopodium ambrosioides* (Mastruz) e *Ruta graveolens* (Arruda).

○ Obtenção dos extratos etanólicos brutos (EEB) do mastruz e da arruda

As folhas solhas da *C. ambrosioides* e da *R. graveolens* foram coletadas em sítios particulares de moradores da cidade de Araruna, PB.

O material vegetal foi desidratado sob exposição ao sol durante 72 h, obtendo-se 45 g do material seco, o qual foi submetido à extração com etanol (96 %), na proporção de 1:20 (m/v) sob maceração por 72 h, sendo este processo repetido por três vezes, obtendo-se a solução extrativa. A solução foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45 °C, sendo obtidos, aproximadamente, 4,4g de extrato etanólico bruto do mastruz (EEBM) e da arruda (EEBA), com rendimento de 9,7 % em relação ao peso seco da planta.

○ Análise de susceptibilidade atividade antimicrobiana

A susceptibilidade microbiana foi analisada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica da microdiluição em caldo utilizando a cepa *Streptococcus mutans* UA 159. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguiu as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute¹². Diluições seriadas dos extratos das plantas foram feitas em BHI para a obtenção de diferentes concentrações que variaram de 400µg/mL até 15µg/mL. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços contendo 100 µL/poço de meio de cultura BHI. A clorexidina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como controle positivo. Foi considerado um inóculo de 1x10⁶ UFC/mL, que no poço caiu para 5x10⁵ UFC/mL, padronizado em espectrofotômetro. As placas foram incubadas a 27°C, por 24 horas. A CIM foi definida por método visual de turbidez no fundo dos poços. Em seguida, adicionou-se 30 uL de

resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,01% nos poços. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três momentos diferente, totalizando nove análises. Este estudo recebeu apoio financeiro da Universidade Estadual da Paraíba, sob a forma de taxa de bancada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar, por meio da análise visual da reação da resazurina, que os extratos da *C. ambrosioides* e *R. graveolens* não apresentaram atividade antimicrobiana (Tabela 1), pelo método utilizado e nas concentrações testadas, sobre os *S. mutans* planctônicos. As cepas foram sensíveis à clorexidina (controle positivo). Como o resultado antimicrobiano dos extratos foi negativo, optou-se por não realizar os testes em biofilme, uma vez que as bactérias organizadas em biofilme apresentam maior resistência antimicrobiana que suas formas livres⁶.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de *C. ambrosioides* e *R. graveolens* frente a microrganismos planctônicos

Amostra/Microrganismo	<i>S. mutans</i> UA 159 (CIM µg/mL)
<i>C. ambrosioides</i>	< 400
<i>R. graveolens</i>	< 400

A biodiversidade da vegetação brasileira pode proporcionar resultados animadores a respeito da atividade antimicrobiana das plantas. Embora algumas plantas não apresentem atividade sobre uma bactéria específica, pode ser que ela tenha potencial bactericida e/ou bacteriostático sobre outros microrganismos. Foram analisadas as plantas da CPMA (Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas) e concluiu-se que 11 das 80 espécies de plantas medicinais da CPMA, utilizadas na medicina popular brasileira, apresentam atividade antimicrobiana¹³. Esse dado mostra o caráter promissor da busca por novos antimicrobianos nas plantas medicinais e aromáticas. Desse modo, prospectamos baseado no conhecimento empírico da população local, a atividade antimicrobiana nas plantas mais citadas, sendo este estudo o primeiro a analisar essas duas espécies de plantas da região do Curimataú paraibano quanto a sua atividade antimicrobiana para um microrganismo bucal.

A ausência da atividade antimicrobiana dos extratos testados pode ter relação com a forma de obtenção deles. Apesar de serem utilizados na medicina popular, a *C. ambrosioides* e *R. graveolens* sofreram um processo de extração por etanol, e não por água como geralmente acontece na medicina tradicional. Além disso, a eficácia dos extratos pode ser afetada, pelo local de crescimento da planta, hora em que a planta foi coletada, luminosidade, altitude, temperatura ambiente e nível pluviométrico. Neste caso, as mesmas plantas coletadas em lugares e situações diferentes podem ainda mostrar resultados diferentes¹⁴. Isso explica o fato dessas plantas terem sido relatadas como potenciais antimicrobianos em alguns estudos. É possível que em concentrações elevadas, acima das testadas neste estudo, *C. ambrosioides* e *R. graveolens* possam apresentar atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e outros microrganismos orais. Entretanto, concentrações altas poderiam gerar efeitos adversos semelhantes ou maiores do que os dos agentes químicos atualmente conhecidos para o controle do biofilme dental.

Nesse contexto, a *Chenopodium ambrosioides*, um arbusto aromático utilizado no combate de doenças parasitárias¹⁵, foi relatada como tendo atividade moluscicida para extrato etanólico de suas folhas¹⁶ e potencial antimalárico¹⁷. A *Ruta graveolens*, possui ação antihelmíntico, febrífuga, emenagoga e abortativa¹⁴. Foi demonstrado o efeito antimicrobiano de nanopartículas de

R. graveolens frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*¹⁸ e diferentes frações do extrato contra *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*¹⁹. Esses estudos evidenciam o potencial antiparasita para essas duas plantas e a ação antimicrobiana da *R. graveolens* para microrganismos causadores de infecções nosocomiais. Esses dados suportam a hipótese de que *C. ambrosioides* e *R. graveolens* possuem potencial para o desempenho de diferentes atividades biológicas. Dessa forma, novos testes com as frações preparadas a partir destes extratos, bem como com suas moléculas isoladas ou encapsulamento na forma de nanopartículas, podem permitir vislumbrar novos resultados, contra o *S. mutans* e/ou outros microrganismos orais.

CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos das plantas *Chenopodium ambrosioides* e *Ruta graveolans*, coletadas no interior paraibano, não apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* UA159 nas concentrações testadas. Desse modo não possuem potencial para indicação para uso futuro no controle do biofilme dental.

REFERÊNCIAS

1. Bernabé E, Sheiham A. Age, period and cohort trends in caries of permanent teeth in four developed countries. *Am J Public Health*. 2014; 104(7):e115-21. doi: 10.2105/AJPH.2014.301869.
2. Broadbent JM, Foster Page LA, Thomson WM, Poulton R. Permanent dentition caries through the first half of life. *Br Dent J*. 2013; 215(7):E12. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.991.
3. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015; 94(5):650-8. doi: 10.1177/0022034515573272.
4. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine*. 2002; 20(16):2027-44.
5. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50(4):353-80.
6. Marsh P, Martin MV. *Microbiologia Oral*. 4. ed. São Paulo: Editora Santos; 2005.
7. Wade WG. New aspects and new concepts of maintaining "microbiological" health. *J Dent*. 2010; 38 Suppl 1:S21-5. doi: 10.1016/S0300-5712(10)70007-5.
8. Pegoraro J, Silvestri L, Cara G, Stefenon L, Mozzini CB. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. *J Oral Invest*. 2014; 3(1):33-37. doi: 10.18256/2238510X/j.oralinvestigations.v3n1p33-37.
9. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent*. 2010; 38 Suppl 1:S11-5. doi: 10.1016/S0300-5712(10)70005-1.
10. Amorim MMR, Santos LC. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. *RBGO*. 2003; 25(2):95-102.
11. Natarajan D, Srinivasan R, Shivakumar MS. *Phyllanthus wightianus* Müll. Arg.: A Potential Source for Natural Antimicrobial Agents. *Bio Med Research International*. 2014; 2014:135082. doi:10.1155/2014/135082.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, vol. 29 of CLSI document M07-A8, Wayne, Pa, USA, 8th edition, 2009.
13. Duarte MCT. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais, Multiciencia. 2006.
14. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Mediciniais do Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Nova Odessa. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.
15. Cruz GV, Pereira PV, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, Aragão-Filho WC, Maciel MC, Silva LA, Amaral FM, Barroqueiro ES, Guerra RN, Nascimento FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111(1):148-54.
16. Hmamouchi M, Lahlou M, Agoumi A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. *Fitoterapia*. 2000;71(3):308-14.
17. Cysne DN, Fortes TS, Reis AS, de Paulo Ribeiro B, Dos Santos Ferreira A, do Amaral FM, Guerra RN, Marinho CR, Nicolete R, Nascimento FR. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitol Res*. 2016
18. Sivakamavalli J, Deepa O, Vaseeharan B. Discrete nanoparticles of *Ruta graveolens* induces the bacterial and fungal biofilm inhibition. *Cell Commun Adhes*. 2014; 21(4):229-38. doi: 10.3109/15419061.2014.926476.
19. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*. 2005; 76(3-4):344-7.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Diego Romário da Silva
diegoromario@gmail.com

Submetido em 10/01/2018

Aceito em 15/02/2018