

Atividade antibacteriana *in vitro* de produtos naturais sobre *Lactobacillus casei*

In vitro antibacterial action of natural products on *Lactobacillus casei*

Ricardo Dias de Castro¹
Irlan de Almeida Freires²
Danilo Augusto de Holanda Ferreira³
Vanessa de Carvalho Jovito³
Marçal de Queiroz Paulo⁴

1 - Prof. Assistente do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba.
2 - Graduando do curso de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.
3 - Cirurgião-dentista pela Universidade Federal da Paraíba
4 - Prof. Adjunto do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba.

Correspondência:
Av. Cajazeiras, nº 475, Apto 102, Ed. Coral Gables, Manaíra, João Pessoa – PB.
CEP: 58038-040. Tel. (83) 9317-1071 – ricardodiasdecastro@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Os estudos de produtos naturais têm adquirido relevância significativa quando são pautados os benefícios trazidos à população e a facilidade de acesso a várias espécies de plantas medicinais com atividade terapêutica. Os produtos naturais, então, entram nesse processo como um componente da biodiversidade de importância econômica e para a saúde^{1,2}. Além da ação terapêutica comprovada de muitas espécies, estas representam parte integrante da cultura de um povo, sendo um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo do tempo^{3,4}.

Um dos principais fatores que vem engrandecendo as pesquisas e

RESUMO

Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas da *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira), da casca do caule da *Persea americana* Mill. (Abacateiro), e das cascas dos frutos do *Citrus limon* L. (Limoeiro) e *Sicana odorifera* L. (Cruá) frente a *Lactobacillus casei* (ATCC 7469). A atividade antibacteriana foi determinada a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de crescimento bacteriano. Os extratos foram testados por meio do método de difusão em ágar sangue, pela técnica dos poços. Não houve formação de halos de inibição de crescimento do microrganismo avaliado para o extrato do *Citrus limon* L. e *Sicana odorifera* L.. Porém, observou-se atividade antibacteriana para *Eugenia uniflora* L., sendo verificada CIM de 6,25mg/mL. O extrato da *Persea americana* L. apresentou CIM de 25mg/mL. Diante dos resultados expostos, pode-se concluir que, dentre os produtos naturais avaliados, apenas a *Eugenia uniflora* L. e *Persea americana* L. apresentaram atividade antibacteriana sobre o *Lactobacillus casei*.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; Biofilme Dental; Concentração Inibitória Mínima

ABSTRACT

It was aimed to evaluate, *in vitro*, the antibacterial activity of hydroalcohols extracts obtained from the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira), the peel of the stem of *Persea Americana* Mill. (Abacateiro), and the peel of the fruits of *Citrus limon* L. (Limoeiro) and *Sicana odorifera* L. (Cruá) against *Lactobacillus casei* (ATCC 7469). The antibacterial action was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of bacterial growth. Hydroalcohols extracts were tested by the diffusion method using blood agar, through wells technique. There was no formation of halos of inhibition of the bacterial growth for *Citrus limon* L. and *Sicana odorifera* hydroalcohols extracts. However, it was verified antibacterial activity for *Eugenia uniflora* L., which showed a MIC of 6,25mg/mL. The *Persea americana* L. extract had a CIM of 25mg/mL. Among the natural products evaluated only *Eugenia uniflora* L. and *Persea americana* L. showed antibacterial action against *Lactobacillus casei*.

Key words: Medicinal plants, Oral Biofilm, Minimal Inhibition Concentration.

potencializando a busca de plantas medicinais com uso terapêutico na odontologia é a constatação da atividade antimicrobiana de muitos desses vegetais, tendo em vista que as principais doenças da cavidade oral, cárie dentária e doenças periodontais, apresentam natureza infecciosa⁵.

A avaliação da atividade antibacteriana de diferentes extratos de plantas frente a microrganismos formadores do biofilme dentário vem sendo amplamente estudada, devido, principalmente, ao fato de essas bactérias serem de grande importância nos processos iniciais e de desenvolvimento da cárie dentária e gengivite⁴.

A cárie dentária tem relação direta, entre outros fatores, com a microbiota presente na estrutura dentária⁶⁻¹⁰. Dentre as espécies de bactérias atuantes nesse processo, uma se mostra bastante importante devido ao fato de estar relacionada com o comprometimento da lesão, sendo bastante presente em uma etapa já de cavitação da lesão, *Lactobacillus casei*¹¹.

Diante do exposto, o presente estudo tem como propósito avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas da *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira), da casca do caule da *Persea americana* Mill. (Abacateiro), e das cascas dos frutos do *Citrus limon* L. (Limoeiro) e *Sicana odorífera* L. (Cruá) frente a *Lactobacillus casei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da cepa e preparação do inoculo

Foi utilizada a linhagem de *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) cedida pela Fundação Carlos Chagas.

Suspensões da cepa teste foram preparadas em BHI caldo (Brain Heart Infusion Broth, DIFCO®, São Paulo, Brasil) e padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland, correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia - (UFC.mL⁻¹).

Preparo dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados a partir das folhas da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.; família Myrtaceae), da casca do caule do abacateiro (*Persea americana* Mill.; família Lauraceae), e das cascas dos frutos do limão (*Citrus limon* L.; família Rutaceae) e do cruá (*Sicana odorífera*; família Cucurbitaceae), fornecidas pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal da Paraíba. Cada extrato foi diluído em água

destilada estéril, gerando concentrações que variaram de 50 mg.mL⁻¹ (tubo 1) até 0,78 mg.mL⁻¹ (tubo 7), ficando distribuídos em sete tubos para cada substância. Realizou-se também a diluição da clorexidina (0,12 %), utilizada como controle positivo.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A partir do inóculo obtido em solução salina, foi feita a semeadura das placas de Petri contendo ágar sangue (Ágar Mueller Hinton, Lansing, Acumedia, acrescido de 5% de sangue) com o auxílio de *swab*, de modo que toda a extensão da placa fosse semeada.

Em cada placa semeada foram confeccionados sete poços de 6 mm de diâmetro para inserção de 50 µL das diluições dos produtos avaliados, realizando-se todo o procedimento em duplicata.

Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em microaerofilia para posterior mensuração dos halos de inibição em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo esta entendida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano.

RESULTADOS

Não houve formação de halos de inibição de crescimento bacteriano para o extrato hidroalcoólico do *Citrus limon* L. e *Sicana odorífera* L. Porém, observou-se atividade antibacteriana para *Eugenia uniflora* L. até a concentração de 6,25 mg.mL⁻¹, e para o extrato da *Persea americana* Mill. até 25 mg.mL⁻¹. As CIMs e medida dos halos de inibição estão expostos no Quadro 1.

controle positivo avaliados sobre *L. casei*, João Pessoa-PB,2010.

DISCUSSÃO

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de produtos naturais aplicados inclusive à odontologia, já que apresenta a maior diversidade vegetal do mundo, ampla sociodiversidade, com o uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente este conhecimento¹².

A atividade terapêutica dos produtos naturais avaliados neste estudo tem sido

Produtos avaliados	CIM	Medida do halo de inibição
<i>E. uniflora</i> - Pitangueira	6,25 mg.mL ⁻¹	10 mm
<i>P. americana</i> - Abacate	25 mg.mL ⁻¹	12 mm
<i>C. limon</i> - Cruá	SA	SA
<i>S. odorífera</i> - Limão	SA	SA
Clorexidina - Controle	0,00001875 mg.mL ⁻¹	15 mm

SA - sem atividade antibacteriana

Quadro 1. CIM e medida dos halos de inibição dos extratos dos produtos naturais e

descrita na literatura científica¹³⁻¹⁸. Porém, poucos estudos abordam a utilização desses produtos para inibição de crescimento de bactérias envolvidas com o processo de cárie, inclusive sobre o *L. casei*.

Nesse sentido, a escolha pela utilização desse microrganismo ocorreu em função de sua ampla participação em processos de progressão da doença, já que apresenta destacado potencial para produção de ácidos orgânicos, responsáveis pela desmineralização dos tecidos dentários^{7,9,11}.

Em estudo realizado por Holetz et al.¹⁹ (2002), foi analisada a atividade antimicrobiana de 13 extratos de plantas sobre algumas espécies de bactérias e fungos, entre eles o *Staphylococcus aureus*, a *Escherichia coli* e a *Candida albicans*. Tais microrganismos apresentaram-se sensíveis ao extrato das folhas da *Eugenia uniflora*. Dessa forma, verificou-se que a *Eugenia uniflora* possui atividade antimicrobiana relativamente ampla, devido ao fato de inibir o crescimento tanto de fungos como de bactérias, sendo esta última constatação também verificada no presente trabalho, através da atividade antibacteriana dessa substância sobre o *Lactobacillus casei*.

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas do abacateiro foi intensamente verificada por Reis²⁰ (2006), quando foi observada que a substância testada, tanto pela técnica dos poços quanto pela técnica dos discos, foi capaz de provocar inibição no crescimento bacteriano em todas as 12 espécies de microrganismos testados em diferentes concentrações, se mostrando mais eficiente frente à *Candida krusei*.

Com o propósito de se constatar ação terapêutica de outras partes do Abacateiro, procurou-se verificar se o extrato obtido a partir da casca do caule também poderia ser capaz de inibir o crescimento bacteriano do *L. casei*, e tal fato pôde ser observado dentre os resultados apresentados.

No que concerne à ausência de ação antibacteriana da *Sicana odorifera*, estudos podem ser realizados no intuito de testar essa planta contra outras espécies de bactérias, podendo também ser utilizados óleos essenciais, compostos isolados, outras partes da planta (folha, raiz, fruto), analisando se, de alguma forma, poderá haver algum efeito sobre o crescimento bacteriano.

Já em relação ao extrato da casca do limão, este não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, porém em pesquisa

realizada por Lima et al.²¹ (2006) foi observado que o óleo essencial dessa planta apresentou efeito positivo diante de quase metade das cepas de *Candida* analisadas.

É importante entender as limitações do teste de difusão em meio de cultura sólido²², método utilizado neste estudo, já que as propriedades químicas dos produtos naturais avaliados podem facilitar ou dificultar sua penetração no meio de cultura e, conseqüentemente, seu contato com o microrganismo, necessário para sua ação²³. É imprescindível considerar a realização de outros ensaios para determinação da atividade antibacteriana dos produtos avaliados.

Porém, a escolha por esse método de avaliação da atividade antimicrobiana ocorreu em função do fato de que o mesmo se constitui como *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, contribuindo substancialmente no desenvolvimento do campo da saúde, na medida em que são conhecidas substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos^{24,25}.

Nesse sentido, este estudo contribui para a descoberta e desenvolvimento de agentes químicos de origem natural com atividade farmacológica, que podem ser utilizados na prevenção e controle da cárie dentária, doença infecciosa e de alta prevalência em todo o mundo.

CONCLUSÃO

Os extratos hidroalcoólicos da *eugenia uniflora* L. e da *Persea americana* Mill. apresentaram atividade antibacteriana sobre *Lactobacillus casei*, sendo, portanto, válida a pesquisa por novas plantas que possuam atividade contra bactérias formadoras do biofilme dentário, em prevenção à cárie e à doença periodontal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários do LQPN por auxiliar na produção dos extratos das plantas utilizadas nesse estudo.

REFERÊNCIAS

1. Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel Filho V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de Fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova 2001; 24:147-152.
2. Rahman MA, Mossa JS, Al-Said MS, Al-Yahya MA. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. Fitoterapia 2004; 75:149-161.

3. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17:114-140.
4. Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17:466-476.
5. Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". *Rev Visão Acadêmica* 2001; 2:31-38.
6. Gibbons RJ. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. *J Dent Res* 1989; 68:750-760.
7. Souza FB, Gil JN. Doença cárie: nem infecciosa, nem transmissível. *RGO* 2001; 49:139-44.
8. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Padilha WWN. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2004; 4:33-38.
9. Wolff MS, Larson C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Braz Oral Res* 2009; 23:31-38.
10. Jeon J-G, Klein MI, Xiao J, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiology* 2009; 9:228-238.
11. Nogueira MA, Dias MG, Tagami PM, Lorscheide J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007; 28: 93-97.
12. Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16:678-689.
13. Helali MOH, Ibrahim M, Shafique MZ, Rahman MM, Biswas SK, Islam MS. Formulation, preparation and preservation of Lemon (*Citrus limon* L.) Cordial. *J Bio-Sci* 2008; 16:125-127.
14. Fiúza TS, Sabóia-Morais SMT, Paula JR, Tresvenzol LMF, Pimenta FC. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2008; 29:245-250.
15. Oliveira CB, Soares DGS, Bomfim IPR, Drumond MRS, Paulo MQ, Padilha WWN. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga). *Cienc Odontol Bras* 2009; 12:29-34.
16. Edem DO. Hypoglycemic Effects of Ethanolic Extracts of Alligator Pear Seed (*Persea americana* Mill) in Rats. *Eur J Sci Res* 2009; 33:669-678.
17. Borella J, Wandscheer ACD, Bonatti LC, Pastorini LH. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. *R Bras Bioci* 2009; 7:260-265.
18. Reichling J, Schnitzler P, Suschkea U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. *Forsch Komplementmed* 2009; 16:79-90.
19. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias BP. Screening of plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:1027-1031.
20. Reis MOR. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas *Persea gratissima* Gaertn – abacateiro – (Laraceae) [dissertação]. Franca: Universidade de Franca; 2006.
21. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Sousa EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16:197-201.
22. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18:301-307.
23. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17:108-113.
24. Leitão SG, Castro O, Fonseca EM, Julião LS, Tavares ES, Leo RRT et al. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16:6-11.
25. Barbosa-Filho JM, Nascimento-Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL et al. Natural products with antileprotic activity. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17:141-148.

Recebido em 13/03/2010
Aprovado em 11/06/2010