

Maria Fernanda Froner (Aluna IC)¹, Vanessa Salvadego de Queiroz (Co-Orientadora)¹, Luzia Lyra (Apoio Técnico)¹, Angélica Zaninelli Schreiber (Orientadora)¹

¹Laboratório de Investigação em Fungos, Departamento de Patologia Clínica – FCM

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CEP: 13083-887, Campinas, São Paulo, Brasil

Palavras-Chave: *Análise Microbiológica, Óleos Essenciais, Extratos Vegetais, Streptococcus mutans*

INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans é considerado o mais importante agente no desenvolvimento da cárie dental, uma vez que está presente em número significativo no biofilme dental antes e durante o aparecimento da lesão de cárie (Loesche *et al*, 1986). Tem grande habilidade de degradação de carboidratos com conseqüente formação de polissacarídeos, além de ser acidogênico e acidúrico (Fujiwara *et al*, 1995).

A doença cárie é um processo dinâmico, biofilme-açúcar dependente, que ocorre devido à fermentação dos carboidratos e produção ácida nos depósitos microbianos (biofilme dental) e que resulta em distúrbio do equilíbrio entre o mineral do dente e o fluido do biofilme adjacente (Thylstrup & Fejerskov, 1999).

A clorexidina (CHX) representa o mais efetivo e bem documentado agente antimicrobiano, sendo considerado o agente quimioterapêutico mais potente contra *S. mutans* e a cárie dental (Hildebrandt *et al*, 1996). Esse agente, em uma concentração de 0,12 %, é considerado o padrão ouro no controle do biofilme, é particularmente efetivo contra gengivite e é utilizado como adjunto no tratamento contra a periodontite (Scheie *et al*, 2003).

Por sua vez, os fitoterápicos ricos em fenóis, chamados de polifenóis, que só existem no reino vegetal onde exercem a nobre e valorosa função de defesa das plantas, apresentam um poderoso efeito antioxidante e uma marcada ação antimicrobiana (Castro *et al*, 2009).

OBJETIVO

Avaliar, *in vitro*, o efeito de alguns óleos essenciais e extratos vegetais ricos em fenóis, sobre células planctônicas de uma cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e de uma cepa de isolado clínico de *S. mutans* (H-1139-2/09), os quais poderão, futuramente, servir como alternativas de enxaguatórios bucais a base de produtos naturais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos para estudo: cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e cepa de *S. mutans* (H-1139-2/09), de isolado clínico de paciente do HC/UNICAMP.

Substâncias avaliadas: *Aegiphila lhotzkiana*, *Bredemeyra floribunda*, *Campomanesia phaea*, *Lippia alba*, *Lychnophora ericoides*, *Myrcia multiflora*, *Psidium australe*, *Siparuna guianensis*, *Vernonia balansae*, *Zingiber officinalis* e Clorexidina (CHX) (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA) - utilizada como controle positivo.

Testes de Triagem por Disco Difusão: Os testes por disco difusão para os *S. mutans* foram realizados utilizando discos de papel de filtro estéreis e impregnados com os óleos essenciais e os extratos vegetais ricos em fenóis, de acordo com as normas do CLSI M2 A8. Esses testes serviram como triagem para avaliação da presença de atividade antibacteriana das substâncias avaliadas para as duas cepas de *S. mutans* avaliadas no presente estudo, sendo que aquelas que apresentaram halo inibitório seguiram para as análises de CIM e CBM.

Método de Microdiluição: A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias em análise foi realizada de acordo com o CLSI M7 A6, utilizando o DMSO como diluente. Em uma das duplicatas foi adicionado o corante Resazurina (Alamar Blue) a 0,01% antes da incubação (Pettit *et al*, 2009, Kucharzyk *et al*, 2010), como coadjuvante para a leitura dos resultados. Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), de todos os poços das placas de microdiluição onde não houve crescimento microbiano visível, foi retirada uma alíquota que foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton.

RESULTADOS

Os dados obtidos para os Testes de Disco de Difusão (Halo Inibitório) dos Óleos Essenciais em relação à cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e *S. mutans* Clínico (H-1139-2/09), assim como os resultados dos Testes de CIM e CBM desses Óleos Essenciais em relação à cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e *S. mutans* Clínico (H-1139-2/09), encontram-se sintetizados abaixo nas Tabelas de 1 a 3.

Tabela 1: Resultados dos Testes de Disco Difusão (Halo Inibitório) dos Óleos Essenciais em relação ao *S. mutans* UA 159 e *S. mutans* Clínico (mm).

| Nome Científico | <i>S. mutans</i> UA 159 | <i>S. mutans</i> Clínico |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Lippia alba</i> | 22 | 20 |
| <i>Myrcia multiflora</i> | 22 | 20 |
| <i>Siparuna guianensis</i> | 20 | 17 |
| <i>Zingiber officinalis</i> | 22 | 18 |

Testes de Disco Difusão com Óleos Essenciais a 50.000 ug/mL

Tabela 2: Resultados dos Testes de CIM dos Óleos Essenciais em relação ao *S. mutans* UA 159 e *S. mutans* Clínico (ug/mL)

| Nome Científico | <i>S. mutans</i> UA 159 | <i>S. mutans</i> Clínico |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Lippia alba</i> | 400 | 800 |
| <i>Myrcia multiflora</i> | 100 | 200 |
| <i>Siparuna guianensis</i> | 200 | 400 |
| <i>Zingiber officinalis</i> | 1.600 | 3.200 |

CIM/CBM de Óleos Essenciais entre 25.600 e 12,5 ug/mL

| Nome Científico | <i>S. mutans</i> UA 159 | <i>S. mutans</i> Clínico |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Lippia alba</i> | 800 | 1.600 |
| <i>Myrcia multiflora</i> | 200 | 400 |
| <i>Siparuna guianensis</i> | 400 | 800 |
| <i>Zingiber officinalis</i> | 3.200 | 6.400 |

CIM/CBM de Óleos Essenciais entre 25.600 e 12,5 ug/mL

Tabela 3: Resultados dos Testes de CBM dos Óleos Essenciais em relação ao *S. mutans* UA 159 e *S. mutans* Clínico (ug/mL)

Considerando que não foi possível a visualização direta dos resultados da CIM dos extratos vegetais, mesmo com a utilização de corante em uma das duplicatas, pois a cor dos mesmos é intensa e ocorre a precipitação nos poços, o que dificulta e/ou impossibilita essa leitura. Por isso, os resultados para esses extratos foram expressos por meio dos Testes de Disco Difusão e Testes de CBM.

Os resultados dos Testes de Disco Difusão (Halo Inibitório) dos Extratos Vegetais em relação à cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e *S. mutans* Clínico (H-1139-2/09) e os resultados dos Testes de CBM desses Extratos Vegetais em relação à cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e *S. mutans* Clínico (H-1139-2/09), encontram-se sintetizados abaixo nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Resultados dos Testes de Disco Difusão (Halo Inibitório) dos Extratos Vegetais em relação ao *S. mutans* UA 159 e *S. mutans* Clínico (mm).

| Nome Científico | <i>S. mutans</i> UA 159 | <i>S. mutans</i> Clínico |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Aegiphila lhotzkiana</i> | 21 | 19 |
| <i>Bredemeyra floribunda</i> | 20 | 18 |
| <i>Campomanesia phaea</i> | 20 | 17 |
| <i>Lychnophora ericoides</i> | 18 | 17 |
| <i>Myrcia multiflora</i> | 20 | 18 |
| <i>Psidium australe</i> | 15 | 15 |
| <i>Siparuna guianensis</i> | 19 | 15 |
| <i>Vernonia balansae</i> | 18 | 14 |
| <i>Zingiber officinalis</i> | 16 | 14 |

Testes de Disco Difusão com Extratos Vegetais a 50.000 ug/mL

Tabela 5: Resultados dos Testes de CBM dos Extratos Vegetais em relação ao *S. mutans* UA 159 e *S. mutans* Clínico (ug/mL).

| Nome Científico | <i>S. mutans</i> UA 159 | <i>S. mutans</i> Clínico |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Aegiphila lhotzkiana</i> | 400 | 800 |
| <i>Bredemeyra floribunda</i> | 400 | 800 |
| <i>Campomanesia pubenses</i> | 1.600 | 1.600 |
| <i>Lychnophora ericoides</i> | 1.600 | 3.200 |
| <i>Myrcia multiflora</i> | 50 | 100 |
| <i>Psidium australe</i> | 200 | 400 |
| <i>Siparuna guianensis</i> | 100 | 200 |
| <i>Vernonia balansae</i> | 800 | 800 |
| <i>Zingiber officinalis</i> | 400 | 800 |

CIM/CBM de Extratos Vegetais entre 25.600 e 12,5 ug/mL

CONCLUSÕES

Por meio da avaliação dos resultados desse estudo, pode-se concluir que:

- A cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) apresentou maior sensibilidade aos óleos e extratos testados que o isolado clínico de *S. mutans* (H-1139-2/09).
- a espécie que apresentou menor CBM foi a *Myrcia multiflora*, sendo que seu extrato etanólico apresentou valores de CBM de 50 e 100 ug/mL para a cepa padrão de *S. mutans* (UA159/ATCC600710) e para o isolado clínico de *S. mutans* (H-1139-2/09), respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Castro, M. L. Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da própolis do tipo 6. Piracicaba, 2009 – Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.
- Fujiwara, T., Tamesada, M., Bian Z., Kawabata S., Kimura S., Hamada, S. Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence. *Microbial Pathogenesis*, 1996. 20: 225-233.
- Hildebrandt GH. Effects of repeated treatment with sustained-release chlorhexidine mouth guards on salivary levels of *mutans Streptococci*. *Caries Res.* 1996; 30: 445-453.
- Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI). Metodologia dos Testes de Suscetibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. Documento M7-A6 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI). Método para Teste de Suscetibilidade a Antibacterianos Disco-Difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. Documento M2-A8 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- Loesche, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 1986; 50: 353-380.
- Thylstrup A, Fejerskov O. Textbook of clinical cariology. 2.ed. (1994). 3.impres. (1999) Copenhagen: Munksgaard, 1999.