

Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental

Antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* on dental caries microorganisms

Resumo

Objetivo: O *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) é uma leguminosa do cerrado brasileiro, considerada como planta medicinal devido à sua ação cicatrizante, anti-inflamatória, hemostática, anti-séptica e anti-diarréica. Este trabalho avaliou a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto do barbatimão contra microorganismos da cárie dental.

Metodologia: Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico bruto de barbatimão sobre as cepas padrão *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei* foi utilizado o método da diluição em caldo.

Resultados: O extrato hidroalcoólico bruto de barbatimão foi ativo frente aos microrganismos *S. mitis* e *L. casei*. A CIM do extrato do barbatimão variou de 350 a >400 µg/mL.

Conclusão: A ação antibacteriana observada sugere o uso do extrato de barbatimão como adjuvante no controle da cárie dental.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; barbatimão; *Stryphnodendron adstringens*; microorganismos bucais; cárie

Abstract

Purpose: *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") is a medicinal plant of the Leguminosae family from the Brazilian "cerrado". This plant is used in folk medicine because of its healing, anti-inflammatory, antiseptic, and hemostatic effects. The aim of this work was to evaluate the antibacterial activity of the "barbatimão" crude hydroalcoholic extract against cariogenic microorganisms.

Methods: The broth dilution method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the "barbatimão" hydroalcoholic extract against *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Lactobacillus casei*.

Results: The "barbatimão" hydroalcoholic extract showed antibacterial activity against *S. mitis* e *L. casei*, with MIC ranging from 350 to >400 µg/mL.

Conclusion: These results suggest that the "barbatimão" hydroalcoholic extract might be used as an adjuvant measure to control dental caries.

Key words: Antimicrobial activity; "barbatimão"; *Stryphnodendron adstringens*; oral microorganisms; dental caries

Sara Pimenta Soares^a
Adriana Helena Chicharo Vinholis^a
Luciana Assirati Casemiro^a
Marcio Luis Andrade Silva^b
Wilson Roberto Cunha^b
Carlos Henrique Gomes Martins^b

^a Curso de Odontologia, UNIFRAN, Franca, SP, Brasil

^b Mestrado em Ciências, UNIFRAN, Franca, SP, Brasil

Correspondência:
Adriana Helena Chicharo Vinholis
Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada – LaPeMA
Av. Dr. Armando Salles Oliveira, 201
Pq Universitário
Franca, SP – Brasil
14404-600
E-mail: drivinholis@netsite.com.br

Recebido: 14 de janeiro, 2007
Aceito: 26 de março, 2008

Introdução

Atualmente nota-se um aumento do interesse pelas plantas medicinais, fruto da grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficácia de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos medicamentos alopáticos e à busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo humano (1). Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais, obtidos a partir de uma ou mais plantas e utilizados para o tratamento de várias doenças. Inúmeras são as vantagens para o uso terapêutico, como o baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (2).

Stryphnodendron adstringens é uma leguminosa do cerrado brasileiro considerada como planta medicinal, sendo encontrada no Brasil nos estados do Pará até São Paulo, passando por Mato Grosso e Sul de Minas (3). É conhecida como barbatimão e recebe diversas denominações populares, que variam de acordo com a região: alaratomemo, barba-detimam, charãozinho-roxo, ilatimó, ulatimó, casca do Brasil, casca-da-virgindade e casca-da-mocidade (3-7). Esta planta tem sido utilizada na medicina popular e possui ação cicatrizante, antiinflamatória, hemostática, anti-edematogênica, anti-séptica e anti-diarréica. É utilizada no tratamento de úlceras, hemorragias vaginais e gonorréia (4). Possui como constituintes químicos alcalóides, flavonóides, terpenos, estilbenos, esteróides, inibidores de proteases (como a tripsina) e taninos (8).

Taninos são os componentes majoritários do barbatimão, sendo que estes compostos têm sido associados com efeitos antimicrobianos. Os taninos vegetais são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis dividem-se em galotaninos e elagitaninos, que produzem, respectivamente, ácido gálico e ácido elágico após hidrólise. Estes taninos se apresentam em menor quantidade em madeiras do que os taninos condensados (9). No processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações os taninos formam uma camada protetora sobre a mucosa ou tecido lesado, através do complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeos. Na úlcera gástrica, provavelmente ocorre um processo similar, onde a camada protege a mucosa gástrica (6). Existem três propriedades gerais dos taninos que são responsáveis pela maior parte das atividades farmacológicas destas substâncias: a formação de complexos com íons metálicos (ferro, alumínio, cálcio, cobre, etc), a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de formar complexos com outras moléculas tais como proteínas e polissacarídeos (10).

Estudos anteriores mostraram ação anti-edematogênica de solução de barbatimão a 1% (17), atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e hipotensora dos extratos acêtonicos e semipurificados da casca de barbatimão (11). Orlando (7) observou atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto da casca do barbatimão para *Enterococcus faecalis*, *Kocuria rhizophila*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus*

aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. No método de difusão em ágar, os halos de inibição do crescimento microbiano variaram de 8,3mm a 25,3mm. No método da concentração inibitória mínima, o extrato foi capaz de inibir o crescimento microbiano nas concentrações que variam de 70 a 200mg/mL e foi mais eficiente sobre as leveduras, *N. gonorrhoeae* e *P. aeruginosa*.

Um pequeno número de pesquisas foi realizado para avaliar a atividade antimicrobiana do barbatimão sobre microrganismos relacionados a doenças bucais, como a cárie dental. Por exemplo, Schuch (1999) (12) demonstrou que plantas como o cravo-da-índia, calêndula, barbatimão, rama-de-batata e alecrim apresentam atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, inferindo que poderiam ser eficazes no tratamento da cárie dental. Todas as plantas possuíam atividade antimicrobiana, porém o melhor resultado foi obtido com o uso de cravo-da-índia. Oliveira et al. (2004) (13) verificaram a eficácia antimicrobiana dos extratos etanólicos de barbatimão e guaçatonga na formação de halos de inibição para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces actinomycetecomitans* e *Candida albicans*, em menor escala. Já na comparação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de barbatimão e de hipoclorito de sódio a 1% e 2,5%, verificou-se a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* com o hipoclorito, mas o barbatimão não inibiu *E. coli* (14).

Diante do grande interesse em se desenvolver medicamentos à base de plantas naturais em Odontologia e da escassez de informações a respeito de suas propriedades, esse trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de barbatimão sobre microrganismos da cárie dental.

Metodologia

Obtenção do Vegetal

As cascas secas e pulverizadas do *Stryphnodendron adstringens* foram adquiridas no mês maio de 2004, do lote 3847 da empresa Comércio de Ervas, Temperos e Condimentos Nacionais e Importados (São Paulo, SP, Brasil), a qual forneceu o laudo de controle de qualidade.

Obtenção do extrato

Foi realizada a maceração do pó com uma solução hidroalcoólica (96:4v/v) durante 5 semanas. O extrato foi filtrado e levado a uma temperatura de 45°C, para a evaporação do solvente. No final da quinta semana, o extrato bruto obtido foi colocado em estufa (40°C) para secagem, obtendo-se o assim o extrato hidroalcoólico bruto de barbatimão. O extrato foi obtido no Núcleo de Pesquisa em Química da Universidade de Franca (7).

Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Enterococcus*

faecalis (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC33478) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578). As cepas empregadas pertencem ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (Franca, SP, Brasil).

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se a técnica da microdiluição em placa, modificada de Andrews (15). O extrato hidroalcoólico bruto foi avaliado nas concentrações de 50 a 400mg/mL. Como controle positivo utilizou-se a solução de digluconato de clorexidina (Sigma, Steinheim, Alemanha) nas concentrações de 0,0115 a 5,9mg/mL e, como controle negativo, o DMSO (1 a 10%) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram realizados o controle de esterilidade do caldo, do solvente e da cultura. Padronizou-se o inóculo comparando-o com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1mL de cloreto de bário a 1,0%+9,9mL de ácido sulfúrico a 1,0%) por meio da verificação das absorvâncias em 625nm.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 30µL de resazurina (Sigma, Steinheim, Alemanha) preparado em solução aquosa (0,01%). Este sistema revelador permite a observação imediata, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento microbiano e a cor vermelha sua presença. As microplacas foram reincubadas por 30 minutos e após este período foram observadas e analisadas de forma descritiva.

Resultados

O extrato hidroalcoólico de barbatimão apresentou atividade antibacteriana sobre todos os microrganismos testados, com os melhores resultados para as cepas *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei* (350µg/mL). A CIM variou de 350 a >400µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de barbatimão e de seu controle positivo (clorexidina), em µg/mL.

Microrganismo	Extrato de Barbatimão CIM	Digluconato de Clorexidina CIM
<i>E. faecalis</i>	>400	0,3688
<i>S. salivarius</i>	>400	0,0922
<i>S. mutans</i>	>400	0,0922
<i>S. sanguinis</i>	>400	0,1844
<i>S. sobrinus</i>	>400	0,1844
<i>S. mitis</i>	350	0,3688
<i>L. casei</i>	350	0,0922

Discussão

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico das cascas do barbatimão vai de encontro à tendência atual de se desenvolver e testar medicamentos produzidos a partir de plantas naturais (16). O barbatimão é uma planta promissora, uma vez que apresenta atividade cicatrizante, antiinflamatória, hemostática, anti-séptica, anti-diarréica e anti-edematogênica e tem sido usado no tratamento de úlceras, hemorragias vaginais e gonorréia (9,12-14,17). Ainda assim, poucos pesquisadores avaliaram sua atividade antimicrobiana (7,11), principalmente sobre bactérias bucais (13,16), fato que motivou a realização do presente estudo. O barbatimão é muito utilizado na medicina popular, sendo a casca a principal parte da planta utilizada. As pesquisas com atividade antimicrobiana também são preferencialmente realizadas com a casca, uma vez que esta contém alta concentração de taninos (20%) responsáveis pelas propriedades medicinais desta planta (5,18,19).

De acordo com os resultados obtidos, o extrato hidroalcoólico bruto de barbatimão apresentou atividade sobre *S. mitis* e *L. casei*, na concentração de 350µg/mL; sendo que estes resultados foram os mais favoráveis deste trabalho. Orlando (2006) (7) avaliou a atividade antimicrobiana do mesmo extrato e observou sua ação em concentrações de 200µg/mL sobre *E. faecalis*, *K. rhizophila*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. flexneri*. A diferença encontrada em relação à CIM do barbatimão sobre os diferentes microrganismos deve estar relacionada com as condições inerentes ao próprio microrganismo, pois o extrato bruto do barbatimão e o método de avaliação da atividade antibacteriana foram os mesmos nos dois estudos. As bactérias selecionadas para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de barbatimão e que se mostraram susceptíveis ao mesmo são constituintes do biofilme dentário, porém suas inclusões nesse consórcio microbiano se dão em diferentes tempos. O *S. mitis* é uma das primeiras bactérias que são aderidas ao esmalte, juntamente com o *Streptococcus sanguis*. Elas favorecem a colonização da superfície dentária por outras bactérias. Já o *L. casei* encontra-se nas cavidades de cárie já instaladas (20). Sendo assim, os resultados positivos deste trabalho revelam uma proposta promissora para o desenvolvimento de produtos capazes de agir no desenvolvimento do biofilme dentário, causando sua inibição e, conseqüentemente, prevenindo a cárie dentária.

Neste trabalho, o controle positivo utilizado foi o digluconato de clorexidina. Os resultados obtidos com os extratos não foram comparados diretamente com o digluconato de clorexidina, pois não se pode comparar uma substância pura (clorexidina) e o extrato bruto de barbatimão (mistura complexa). A ação do extrato de barbatimão sobre os microrganismos foi demonstrada anteriormente (6,9,16,21) e se deve à riqueza em taninos como seu componente principal. Entretanto, em estudos de atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais, seu potencial não se deve exclusivamente a uma única substância, mas sim a um

conjunto delas (21). O uso de um extrato bruto de uma espécie vegetal que possui efeito bactericida satisfatório poderia dispensar a realização de processos de isolamento de substâncias ativas, reduzindo etapas químicas e, conseqüentemente, custos financeiros. Isto viabilizaria uma possível utilização do extrato bruto como fitoterápico (16).

Conclusões

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, acredita-se que o extrato hidroalcoólico bruto do barbatimão pode ter potencial antibacteriano para uso na prevenção da cárie dentária.

Referências

1. Gossell-Williams M, Simon OR, West ME. The past and present use of plants for medicines. *West Indian Med J* 2006;55:217-8.
2. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 2000;33:79-89.
3. Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1984. p. 267-269.
4. Camargo MTLA. Medicina Popular. São Paulo: Almed; 1985.
5. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum; 2002.
6. Mello JC. Plantas em Destaque: Barbatimão (CórTEX). *Rev. Racine*. 1998;46:42-3.
7. Orlando SC. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão) [dissertação]. Franca (SP): Universidade de Franca; 2005.
8. Vasconcelos MCA, Rodvalho NCM, Pott VJ, Ferreira AMT, Arruda ALA, Marques MCS, Castilho RO, Bueno NR. Avaliação de atividade biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). *Rev Bras Farmacogn* 2004; 14:121-7.
9. Queiroz CRAA, Morais SAL, Nascimento EA. Caracterização dos taninos da aroeira preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Rev Árvore*, 2002;26:493-7.
10. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *J Nat Prod* 1996;59:205-15.
11. Audi EA, Toledo CEM, Santos FS, Bellanda PR, Prado WA, Nakamura TU et al. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. *Acta Fam Bonaerense* 2004;23:328-33.
12. Schuch TC. Plantas contra cárie. 1999. Disponível em: <http://www.geocities.com/buchaul/fnews08.htm>. Acesso em 17 de outubro de 2006.
13. Oliveira RR, França EC, Segura ME, Santos VR. Susceptibilidade de microorganismos patogênicos da cavidade bucal a extratos de *S. adstringens* e *C. sylvestris*. *Braz Oral Res* 2004;18 (Suppl):95.
14. Oliveira DA, Sponchiado Junior EC, Castilho C, Pereira JV, Pietro RCLR, Souza Neto MD. Avaliação da ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio e barbatimão em diferentes concentrações. *J Bras Fitomed* 2005;3:12-5.
15. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:5-16.
16. Cunha LS. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas do cerrado, substâncias isoladas e derivados semi-sintéticos frente a microrganismos bucais [dissertação]. Franca (SP): Universidade de Franca; 2006.
17. Coutinho H, Pinto DS, Ribeiro JE, Friedman H. Ação anti-*edematosa* do *Stryphnodendron barbadetiman* (Barbatimão) a 1% em comparação a clorexidina a 0,12%. *Rev odonto cienc* 2004;19:201-6.
18. Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum; 2000.
19. Santos SC, Costa WF, Batista F, Santos LR, Ferri PH, Ferreira HD et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Rev bras farmacogn* 2006;16:552-6.
20. Buischi YP. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo (SP): Artes Médicas; 2000.
21. Cowan MM. Plants products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:564-82.