

Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária

Viviane Araújo da SILVA^a, Carlos Rangel de Moura OLIVEIRA^a,
Andréa Fernanda Ramos de FREITAS^a, Maria Regina Macedo COSTA^a,
Hilzeth de Luna Freire PESSÔA^a, Maria do Socorro Vieira PEREIRA^a

^aDepartamento de Biologia Molecular, UFPB – Universidade Federal da Paraíba,
58050-900 João Pessoa - PB, Brasil

Silva VA, Oliveira CRM, Freitas AFR, Costa MRM, Pessôa HLF, Pereira MSV. Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Müll. on bacteria that cause dental caries. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(2): 69-72.

Resumo

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* (marmeleiro) frente a bactérias que fazem parte do biofilme dental, como *Streptococcus salivaris*, *mutans*, *mitis*, *sanguis* e *sobrinus*. Os ensaios foram realizados pela técnica de difusão em meio sólido com base no tamanho dos halos de inibição. Os mesmos procedimentos foram utilizados com a clorexidina. Os resultados mostraram que todas as amostras ensaiadas foram sensíveis ao extrato com CIM (mg.mL⁻¹) de 1:16 (0,62%), 1:32 (0,31%), 1:64 (0,15%), 1:32 (0,31%), 1:16 (0,62%), respectivamente. *S. mitis* foi a linhagem mais sensível. Os resultados mostram a potencialidade do extrato do *Croton sonderianus* na inibição do crescimento bacteriano de micro-organismos formadores do biofilme dental, sugerindo a possibilidade do emprego desse extrato como meio alternativo no controle desses patógenos na prática odontológica.

Palavras-chave: *Croton sonderianus*; cárie dentária; ação antimicrobiana.

Abstract

This study aims to evaluate the antimicrobial activity of the extract of *Croton sonderianus* (marmeleiro) against bacteria that are part of the biofilm, such as *Streptococcus salivaris*, *mutans*, *mitis*, *sanguis*, *sobrinus*. The tests were carried out by diffusion technique on solid medium based on the size of inhibition zones. The same procedures were used with chlorhexidine. The results showed that all samples tested were sensitive to the extract with MIC (mg.mL⁻¹) of 1:16 (0.62%), 1:32 (0.31%), 1:64 (0.15%) 1:32 (0.31%), 1:16 (0.62%), respectively. *S. mitis* strain was more sensitive. The results show the potential of the extract of *Croton sonderianus* in growth inhibition of microorganisms forming the biofilm suggesting the possibility of using this extract as an alternative means to control these pathogens in dental practice.

Keywords: *Croton sonderianus*; dental caries; antimicrobial action.

INTRODUÇÃO

O biofilme dentário com característica de acidogenicidade é o fator etiológico primário da cárie dentária, no qual estão presentes principalmente bactérias do gênero *Streptococcus*, como também *Lactobacillus*. Os *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis* são comumente encontrados no biofilme, estando presentes no estágio inicial de formação da cárie dentária, tornando o meio mais adequado para colonização dos *S. mutans* (correspondendo a 95% da microbiota inicial de *Streptococcus*); note-se que os dois últimos são acidogênicos (*Streptococcus* produtores de baixo pH). Os *Streptococcus mutans* são considerados um dos principais

patógenos envolvidos no desenvolvimento da cárie, tendo um papel importante na iniciação das lesões, enquanto que os *Lactobacillus* atuam na progressão da cárie, uma vez que a lesão já tenha sido iniciada^{1,2}.

Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene no combate à carie e na remoção do biofilme dental, diversos agentes antimicrobianos vêm sendo estudados no controle do biofilme. Em face do exposto, diversas substâncias têm sido utilizadas, por meio de enxágue bucal, na redução da microbiota cariogênica³.

Dentre os antimicrobianos sintéticos utilizados atualmente, destaca-se a clorexidina, uma bisbiguanida catiônica com propriedades tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, cuja molécula simétrica possui dois anéis 4 cloro-fenil e dois grupos etano pentânicos, ligados por uma cadeia central do hexametileno, sendo quimicamente classificada como digluconato de clorexidina^{4,5}.

Segundo Marsh⁶, essa droga antimicrobiana sintética pode ser considerada o agente antimicrobiano mais efetivo, porque possui largo espectro de atividade frente a fungos, leveduras e uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, controlando cáries, biofilme e gengivite. Em relação às bactérias, aquelas Gram-positivas são mais susceptíveis que as Gram-negativas.

Croton sonderianus (Euphorbiaceae) é conhecido popularmente como 'marmeleiro preto'. Esta planta é comumente encontrada na região Nordeste, especialmente no Estado do Ceará. A literatura etnofarmacológica registra que as cascas desta planta são utilizadas como medicação para combater problemas estomacais, ora mastigando-se diretamente pequenos pedaços das cascas, ora na forma de chá; cita-se também o emprego do chá no tratamento de hemorroidas inflamadas e nos casos de hemorragia uterina⁷. O Gênero *Croton*, segundo maior da família Euphorbiaceae, inclui aproximadamente mil espécies, das quais algumas são conhecidas como fonte de diterpenos, principalmente diterpenos do tipo clerodano furânico. Também são relatados diterpenos do tipo cleistanano, beierano, caurano e lábdano⁸.

Com base no exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* sobre linhagens bacterianas causadoras de cárie dentária.

MATERIAL E MÉTODO

1. Preparação dos Extratos do *Croton sonderianus* Müll. Arg.

Para obtenção do extrato etanólico bruto do *Croton sonderianus* Müll., folhas da planta foram desidratadas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C, durante 3 a 4 dias, sendo em seguida submetidas a um processo de pulverização em moinho mecânico, reduzindo-se a pó. O material vegetal seco e pulverizado, com peso de 430 g, foi submetido à maceração exaustiva com 2 L de etanol (EtOH) a 95% por 72 horas, sendo este processo repetido por três vezes, para obter a máxima extração dos constituintes químicos. A solução extrativa resultante, após filtração, foi concentrada com o auxílio de evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 40 °C, obtendo-se 94,6488 g do extrato etanólico bruto (EEB). As variadas concentrações do extrato do *Croton sonderianus* foram obtidas diluindo o EEB em água destilada, pois o extrato é hidrossolúvel.

2. Linhagens Bacterianas

Utilizaram-se no presente trabalho linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mitis* (ATCC 9811), *Streptococcus*

mutans (ATCC 25175), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609) e *Streptococcus salivaris*. Todos foram obtidos mediante solicitação, na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tozello" (Campinas-SP), sendo a última destas linhagens obtida no Instituto Adolfo Lutz-SP.

3. Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato do *Croton sonderianus* Müll. Arg.

A determinação da atividade antimicrobiana em placas do extrato do *Croton sonderianus* Müll. deu-se pelo método de difusão em meio sólido⁹, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion - DIFCO, Michigan, Estados Unidos) e incubadas a 37 °C por um período de 18-24 horas. Após esse período de 24 horas do crescimento bacteriano, 100 µL deste foram adicionados a 10 mL de solução salina para obter uma concentração bacteriana inicial de 10⁻¹. Placas de Ágar Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, Estados Unidos), preparadas anteriormente, foram cobertas com a solução salina que corresponde a 10⁻¹ do crescimento bacteriano. Nas placas já cobertas, foram confeccionados, no meio de cultura, cinco orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro, que receberam numerações de 1 a 10, os quais correspondiam ao número da diluição da substância teste (Extrato a 10% até a diluição de 1:512). Nos orifícios, foi colocado um volume de 50 µL da solução do extrato nas diluições. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24 horas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela atividade antimicrobiana, com base no diâmetro dos halos de inibição, sendo estes superiores a 11 mm¹⁰. Como controle positivo dos experimentos, foi utilizada a Clorexidina. Os experimentos foram realizados em triplicata e a análise estatística foi feita calculando-se a média dos halos de inibição.

RESULTADO

A Tabela 1 representa a atividade antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre as linhagens ensaiadas. Observa-se que todas as linhagens testadas foram sensíveis ao extrato do *Croton sonderianus* Müll., sendo *Streptococcus mitis* a linhagem mais sensível ao extrato com CIM (Concentração Inibitória Mínima) de 1:64. A Tabela 2 representa a atividade antimicrobiana da Clorexidina frente às linhagens ensaiadas.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, os fitofármacos têm assumido um papel importante como meio terapêutico alternativo na Odontologia, mediante as suas propriedades antimicrobianas frente às afecções bucais, principalmente as decorrentes do biofilme dental¹¹. Estudos mostraram que o extrato da *Punica granatum* Linn (romã) apresentou atividade antibacteriana contra linhagens de *Streptococcus mitis*, *sanguinis*, *mutans*, *sobrinus* e *Lactobacillus casei*¹².

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* sobre linhagens de *Streptococcus*

Diluição	Média dos Halos de Inibição (mm)				
	<i>S. salivarius</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>
1:1	18	17	20	16	17
1:2	16	15	15	15	16
1:4	14	15	15	15	15
1:8	14	14	14	14	14
1:16	13	13	13	12	12
1:32	0	11	12	12	0
1:64	0	0	12	0	0
1:128	0	0	0	0	0
1:256	0	0	0	0	0
1:512	0	0	0	0	0

Tabela 2. Atividade antimicrobiana da Clorexidina sobre linhagens de *Streptococcus*

Diluição	Média dos Halos de Inibição (mm)				
	<i>S. salivarius</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>
1:1	16	20	22	17	17
1:2	15	18	20	14	15
1:4	14	15	15	13	14
1:8	13	14	14	12	12
1:16	0	13	13	12	11
1:32	0	13	0	10	0
1:64	0	12	0	0	0
1:128	0	0	0	0	0
1:256	0	0	0	0	0
1:512	0	0	0	0	0

Neste estudo, observa-se, por meio da Tabela 1, que todas as linhagens de *Streptococcus* testadas foram sensíveis ao extrato do *Croton sonderianus*, sendo: *S. salivarius* e *S. sobrinus* foram sensíveis ao extrato até a diluição de 1:16, *S. mutans* e *S. sanguinis* até a diluição de 1:32 e *S. mitis* foi a linhagem mais sensível ao extrato com formação de halos de inibição até a diluição de 1:64.

Quando se compara a sensibilidade das amostras frente ao extrato do *Croton sonderianus* e a clorexidina (Tabelas 1 e 2), observa-se que as linhagens *S. salivarius* e *S. mitis* foram mais sensíveis ao extrato do *Croton sonderianus*. *S. salivarius* apresentou halos de inibição até a diluição 1:8 da clorexidina, enquanto para o extrato houve formação de halos até a diluição 1:16. Já *S. mitis* foi sensível com contato com a clorexidina até a diluição 1:16, enquanto com o extrato a linhagem foi sensível até a diluição 1:64.

Estudos anteriores relatam que o extrato do *Croton sonderianus* possui o ácido 3,4-*seco*-traquilobanoico, um dos

constituintes químicos isolados das raízes de *C. sonderianus*, o qual é responsável por sua atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, e atividade fungicida contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Polyporus sanguineus*¹³.

A química do gênero *Croton* tem sido bastante explorada e os estudos fitoquímicos efetuados têm conduzido ao isolamento de alcaloides flavonoides, triterpenoides e uma grande variedade estrutural de diterpenoides, os quais podem estar relacionados com essa atividade antimicrobiana contra diversos microorganismos¹⁴.

O extrato benzênico da madeira de *Croton sonderianus* mostrou-se ativo frente a *Staphylococcus aureus* e, em sua composição, foram encontrados a *scopoletina*, que é uma hidroxycumarina, e vários diterpenos¹⁵. Santos et al. (2005), utilizando o método da difusão em ágar, realizaram testes de antibiose com o extrato hidroalcoólico da raiz do

Croton sonderianus e encontraram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*¹⁶.

CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, pode-se concluir que o extrato do *Croton sonderianus* apresenta boa atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus*

sobrinus, *Streptococcus salivarius* e *S. mitis*, sendo esta última a linhagem mais sensível. Esses resultados são promissores e estudos mais aprofundados podem indicar a possibilidade do uso dessa planta no tratamento de patologias orais causadas por essas bactérias.

AGRADECIMENTOS

A CAPES/UFPB/REUNI, pela concessão das Bolsas de Mestrado.

REFERÊNCIAS

1. Höfling JF, Spolidório DMP, Pereira CV, Rosa EAR, Moreira D. Association between streptococcus mutans/streptococcus sobrinus in students of different social levels and their relationship with the cariogenic activity in these populations. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999; 13: 173-80.
2. Shivakumar KV, Vidya SK, Chandu GN. Dental caries vaccine. Indian J Dent Res. 2009; 20(1): 99-106.
3. Jardim P S, Jardim, EGJ. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. RGO. 1998; 41: 79-84.
4. Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Editora Santos; 2005.
5. Lindhe J. Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
6. Marsh P. The role of the daily use of mouthrinses in maintaining oral health. J Dent. 2010; 38 (Suppl 1): S11-S15.
7. Mors, WB, Pellegrino J, Santos Filho MF. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção de *Schistosoma mansoni*. An Acad Bras Cienc. 1967; 38: 325-30.
8. Craveiro AA, Silveira ER, Braz Filho R, Mascarenhas YP. Sonderianin, a new furanoid diterpene *Croton sonderianus* Muell. Arg. Phytochemistry. 1981; 20: 852-54.
9. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1965; 45: 493-6.
10. Catão RMR, Antunes RMP, Arruda TA, Pereira MSV, Higino JS, Alves JA, et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anal Clin. 2006; 38: 111-4.
11. Akpata ES, Akinrimisi EO. Antibacterial activity of extracts from some Africans chewing sticks. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1997; 44: 717-22
12. Pereira, JV, Pereira, MSV, Sampaio, FC, Sampaio, MCC, Alves, PM, Araújo, CRE, et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16: 88-93.
13. McChesney JD, Clark AM, Silveira ER. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrichylobanoic acids. J Nat Prod. 1991; 54: 1625-33.
14. Farnsworth NR, Soejarto, DD. Global Importance of Medicinal Plants. In: Akerele, O, Heywood V, Syngé H, editors. Conservation of medicinal plants. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1991. p. 25-51.
15. Mors WB, Pellegrino J, Santos Filho MF. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção de *Schistosoma mansoni*. An Acad Bras Cienc. 1967; 38: 325-30.
16. Santos PML, Schripsema J, Kuster RM. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris*. Rev Bras Farmacogn. 2005; 15: 321-25.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Viviane Araújo da Silva
Rua Otaviano Dustam Monteiro, n. 41, Funcionários II, 58078-340 João Pessoa - PB, Brasil
e-mail: viviane.biologia@hotmail.com

Recebido: 28/02/2011

Aceito: 30/04/2011