

Atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans* e estabilidade de produtos naturais contendo extrato de *Mikania glomerata* Sprengel

Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and stability of the natural products containing extract from *Mikania glomerata* Sprengel

Denise Heleno de Souza¹
 Célia Hitomi Yamamoto²
 José de Jesus Ribeiro Gomes Pinho²
 Maria Silvana Alves²
 Aílson da Luz André de Araújo²
 Orlando Vieira de Sousa²

RESUMO

palavras-chave

Mikania

Própolis

Streptococcus mutans

Mikania glomerata Sprengel (Asteraceae), conhecida como guaco, é usada popularmente como broncodilatador, antiasmático e expectorante, cujos efeitos são atribuídos à presença de cumarinas. O presente estudo avaliou o efeito de extratos e formulações (soluções antissépticas e xaropes) contendo guaco, com ou sem própolis, sobre o crescimento de *S. mutans* e a estabilidade das soluções anti-sépticas. A atividade antibacteriana dos extratos e formulações sobre *S. mutans* ATCC 25175 foi realizada pelo método de difusão em ágar e, posteriormente, através da aplicação desse mesmo procedimento, determinou-se a estabilidade das soluções anti-sépticas submetidas à temperatura ambiente e sob refrigeração (8°C - 10°C), mensalmente, por um período de três meses. Os extratos de guaco e de própolis e as soluções anti-sépticas inibiram o crescimento de *S. mutans*. No primeiro mês, com exceção da solução anti-séptica com guaco 5%, todas as demais inibiram o crescimento do microrganismo testado. No segundo mês, somente as soluções anti-sépticas contendo própolis produziram inibição bacteriana. Após três meses de armazenamento, as soluções contendo própolis, em temperatura ambiente, foram ativas e estáveis. Os resultados mostram que formulações contendo guaco, com ou sem própolis, foram ativas sobre *S. mutans*, mas podem perder a estabilidade em decorrência da temperatura. No entanto, estes achados demonstram que os produtos naturais podem ser uma alternativa importante no combate à formação da cárie e placa dentária.

ABSTRACT

keywords

Mikania

Propolis

Streptococcus mutans

Mikania glomerata Sprengel (Asteraceae), known as guaco, is commonly used as bronchodilator, antiasthmatic, and expectorant, and the effects observed are attributed to coumarin. The aim of the present study was to evaluate the effect of the extracts and formulations (antiseptic solutions and syrup) containing guaco, with or without propolis, against *Streptococcus mutans*, and the stability of the antiseptic solutions. The antibacterial activity of the extracts and the formulations against *S. mutans* ATCC 25175 was assessed by agar diffusion, with the same procedure being used to determine the stability of the antiseptic solutions under room temperature and refrigeration (8° - 10°C) during a period of three months. The extracts containing guaco and propolis and the antiseptic solutions inhibited the growth of *S. mutans*. After the first month, except for the antiseptic solution with guaco 5%, all of them inhibited the microorganism tested. In the second month, only the antiseptic solution containing propolis produced the bacterial inhibition. In the last month, under room temperature, the solutions with propolis were active and stable. The results showed that the formulations containing guaco, with or without propolis, were active against *S. mutans*, but could lose stability depending on temperature. However, this report demonstrated that natural products could be an important alternative against oral infections, including tooth decay and dental plaque.

¹ Faculdade de Farmácia e Bioquímica, BIC-UFJF.

² Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

INTRODUÇÃO

Mikania glomerata Sprengel (Asteraceae), conhecida popularmente como guaco, é uma planta nativa da Mata Atlântica e cultivada em quase todo o território brasileiro (LORENZI, 2002; SOUZA, 2004). Suas folhas são usadas na medicina popular como tônico, depurativo, estimulante do apetite, anti-gripal, anti-inflamatório, entre outras indicações (MATOS, 2002; SOUSA, 2004). Na forma de xarope ou infusão, o guaco é empregado como broncodilatador, antiasmático, expectorante, antitussígeno e no tratamento de infecções respiratórias (SOUSA, 2004).

Estudos farmacológicos têm comprovado as propriedades antiespasmódica, broncodilatadora, anti-inflamatória (OLIVEIRA, 1985), antialérgica (FIERRO, 1999), antimicrobiana (DUARTE, 2005; YATSUDA, 2005) e antifúngica (MAIORANO, 2005). Ensaios realizados com ratos mostraram que altas doses do extrato de guaco não interferem na produção de gametas e na concentração de testosterona (SÁ *et al.*, 2003). As atividades farmacológicas podem ser atribuídas a diversas substâncias isoladas desta planta, entre elas cumarina, lupeol, ácido caurenóico e ácido cinamoilgrandiflorico (LUCAS, 1942; OLIVEIRA, 1984). Além destes constituintes, também foram descritos saponinas, óleos essenciais, diterpenóides, taninos, resinas e guacosídeos (OLIVEIRA, 1985; OLIVEIRA, 1998; VENEZIANI, 1999).

Considerando-se a utilização popular de plantas na terapêutica alternativa de processos infecciosos, especula-se a possibilidade da aplicação do guaco e da própolis sobre *Streptococcus mutans*. O *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva encontrada na cavidade oral humana e constitui um dos principais fatores do desenvolvimento de cáries devido a sua ação acidogênica e acidúrica (DAVEY, 1984). No entanto, não há estudos na literatura científica que evidenciem a ação de formulações fitoterápicas à base destes produtos no controle de cáries através da inibição do microrganismo citado. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de extratos e formulações contendo guaco, com ou sem própolis, sobre o crescimento de *S. mutans* e a estabilidade de soluções anti-sépticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência das amostras

Foram obtidas folhas de guaco provenientes do Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora. Uma excisada foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFJF sob n°42054.

Preparo dos extratos

Após secagem, com perda de 95% de sua umidade, as folhas de guaco foram trituradas em moinho elétrico e pul-

verizadas. Posteriormente, a amostra obtida foi submetida à maceração em etanol 30% durante 15 dias para obtenção do extrato fluido. Para preparo das formulações, extrato de própolis também foi obtido por maceração em solução etanólica 80% (30% p/v) durante 15 dias.

Preparo das formulações fitoterápicas

Foram preparadas formulações-base de xarope e de solução anti-séptica que, em seguida, foram acrescidas das concentrações dos extratos.

Formulação do xarope base:

Sacarose	80%
Nipagin	0,1%
Água destilada q.s.p	100 mL

Formulação de base para preparo da solução anti-séptica:

Sacarina	0,1%
Polissorbato	0,3%
Glicerina	5%
Natrosol	0,1%
Água destilada q.s.p.	100 mL

O extrato fluido de *M. glomerata* foi incorporado nas formulações-base de xarope e de solução anti-séptica bucal, nas concentrações de 5%, 10% e 20%. Em outra série de formulações-base, acrescida de extrato de *M. glomerata* 5%, 10% e 20%, foi adicionado extrato de própolis em uma concentração de 5%.

Estudo de estabilidade

Inicialmente, todas as formulações propostas foram submetidas à análise da atividade antibacteriana frente ao *S. mutans* ATCC 25175 para obtenção do tamanho do diâmetro do halo de inibição, se presente. Com base nos resultados observados, procedeu-se ao estudo de estabilidade das soluções anti-sépticas, através do armazenamento das mesmas em duas condições distintas de temperatura: 1) sob refrigeração (8°C a 10°C) e 2) à temperatura ambiente. Para tanto, realizou-se nova verificação da atividade antibacteriana mensalmente, durante um período de três meses.

Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, empregando o meio ágar padrão para contagem (OXOID®), conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira, 4ª ed., 1988. A suspensão de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foi preparada e padronizada de acordo com o procedimento descrito na United States Pharmacopoeia, 24ª ed., 2000. As amostras dos extratos e das formulações foram testadas, em triplicata, utilizando como suporte cilindros de aço inox (10mm de altura e

5mm de diâmetro interno) colocados sobre a superfície do meio de cultura. Em seguida, os cilindros foram preenchidos com 120µL de cada amostra a ser investigada. As placas foram incubadas em aerobiose, por 16 a 18 horas, a 35°C, e os diâmetros dos halos de inibição foram determinados em mm. Utilizou-se como padrão solução anti-séptica comercial à base de timol 0,064%, eucaliptol 0,092%, salicilato de metila 0,060% e mentol 0,042%.

Teste de identificação de cumarina

O monitoramento da cumarina nas formulações contendo extratos de *M. glomerata* foi realizado através de cromatografia em camada delgada, usando uma cromatoplaça de alumínio (MERCK) com sílica gel de 17cm, fase móvel constituída de hexano e acetona 10:3 (v/v) e 100µL das amostras. Extrato fluido do guaco e solução de cumarina padrão (Fluka) foram empregados para comparar a razão de fluxo (Rf) e a concentração dos constituintes cumarínicos, observada durante revelação na lâmpada ultravioleta a 365nm e na reação com KOH 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os resultados da atividade antibacteriana observados com amostras do extrato fluido do guaco, extrato bruto de própolis e extrato de própolis comercial. Pela análise desta tabela, o extrato fluido de guaco e o extrato bruto de própolis apresentaram maior atividade em relação ao extrato de própolis obtido no comércio. Em virtude da necessidade de elaboração das formulações anti-sépticas e xarope contendo guaco, com ou sem própolis, foi selecionado o extrato fluido do guaco como base nas preparações.

TABELA 1

Efeito dos extratos de guaco e própolis sobre o crescimento de *S. mutans*

Amostra	Zona de inibição do crescimento (mm)
Extrato fluido de guaco	14,5
Extrato bruto de própolis	16,6
Extrato de própolis comercial	<10

As soluções anti-sépticas inibiram o crescimento de *S. mutans* de acordo com a concentração do extrato fluido do guaco (Tabela 2). Conforme esta tabela observa-se que esta atividade foi potencializada na presença do extrato de própolis, sugerindo uma provável ação sinérgica entre os componentes dos extratos. Embora a formulação do xarope do guaco 20% tenha apresentado uma zona de inibição inferior a 10mm, as concentrações de 5% e 10% não foram ativas sobre a bactéria testada. A solução anti-séptica comercial padrão inibiu o crescimento de *S. mutans*, produzindo zona de inibição de 22,5mm.

TABELA 2

Atividade antibacteriana frente à *Streptococcus mutans* obtida com as formulações fitoterápicas contendo guaco

Formulações	Concentrações	Zona de inibição do crescimento (mm)
Solução anti-séptica	Guaco 5%	<10
	Guaco 10%	<10
	Guaco 20%	13
	Guaco 5% + Própolis 5%	11
	Guaco 10% + Própolis 5%	13,5
	Guaco 20% + Própolis 5%	16,5
Xarope	Guaco 5%	-
	Guaco 10%	-
	Guaco 20%	<10
Solução anti-séptica comercial	-	22,5

Em decorrência da ação sobre *S. mutans* detectada, as soluções anti-sépticas foram avaliadas quanto à estabilidade em temperatura ambiente e sob refrigeração (8°C a 10°C), mensalmente, por um período de três meses, tendo como parâmetro a inibição do crescimento bacteriano (Tabela 3). No primeiro mês, com exceção da solução anti-séptica com guaco 5%, todas as demais inibiram o crescimento de *S. mutans*. No segundo mês, somente aquelas contendo extratos de guaco e própolis inibiram o crescimento da bactéria testada em ambas as temperaturas. Este fato corrobora não só a ocorrência de sinergismo, mas também uma participação relevante do extrato de própolis no efeito antibacteriano. Embora as soluções de guaco possam inibir *S. mutans*, é possível que os constituintes do extrato de própolis tenham maior estabilidade, uma vez que a atividade antibacteriana foi mantida até o segundo mês de análise. Outro aspecto a ser considerado é a influência das condições ambientais sobre a estabilidade dos extratos, visto que a temperatura ambiente favoreceu a atividade sobre *S. mutans* após três meses de observação (Tabela 3).

TABELA 3

Atividade antibacteriana frente à *Streptococcus mutans* obtida com as soluções antissépticas armazenadas por um período de três meses

Temperatura	Solução anti-séptica	Zona de inibição do crescimento (mm)		
		1 mês	2 meses	3 meses
Ambiente	Guaco 5%	-	-	-
	Guaco 10%	<10	-	-
	Guaco 20%	11	-	-
	Guaco 5% + Própolis 5%	11	10	<10
	Guaco 10% + Própolis 5%	13	10	10
	Guaco 20% + Própolis 5%	14	12	11
8°C-10°C	Guaco 5%	-	-	-
	Guaco 10%	<10	-	-
	Guaco 20%	10	-	-
	Guaco 5% + Própolis 5%	10	<10	-
	Guaco 10% + Própolis 5%	11	<10	-
	Guaco 20% + Própolis 5%	11	10	-

A cromatografia de camada delgada revelou que o conteúdo de cumarina nas amostras analisadas foi proporcional às zonas de inibição de crescimento. O valor de Rf determinado foi de 0,68 correspondendo à cumarina presente no extrato fluido e na solução-padrão. Esta observação foi visualizada através da presença de uma mancha (banda) verde-fluorescente no ultravioleta e após revelação com hidróxido de potássio 5%. É possível que outros constituintes, além da cumarina, participem da atividade sobre *S. mutans*.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que as soluções anti-sépticas à base de extrato de guaco, com ou sem própolis, inibem o crescimento de *S. mutans*. Entretanto, a redução da temperatura parece estar relacionada com a diminuição da eficácia antimicrobiana das formulações estudadas. A incorporação do extrato de própolis nas formulações contendo extrato de guaco potencializou o efeito sobre *S. mutans*, sugerindo uma provável ação sinérgica entre os constituintes dos extratos. Estes achados mostram que os produtos naturais podem ser uma alternativa importante no combate à formação da cárie e placa dentária, possibilitando um maior acesso da população a produtos com baixo custo de mercado.

REFERÊNCIAS

DAVEY, A. L.; ROGERS, A. H. Multiple types of bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Arch Oral Biol**, v.29, n.6, p.435-60, 1984.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G.M.; SATORATTO, A. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v.97, n.2, p.305-11, 2005.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FIERRO, I. O.; SILVA, A.C.B.; LOPES, C.S. *et al.* Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **J Ethnopharmacol**, v.66, n.1, p.19-24, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco: *Mikania glomerata* Sprengel Composta. **Rev Flora Medicinal**, v.9, n.1, p.101-32, 1942.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J Ethnopharmacol**, v.102, n.3, p.364-70, 2005.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais** – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 1. ed. Fortaleza: UFC, 2002.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *et al.* O óleo essencial de *Mikania glomerata* Sprengel - o guaco oficial brasileiro. **LECTA**, v.17, n.1, p.21-6, 1999.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco do mato (*Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker). **An Farm Quim**, v.25, n.1-2, p.50-4, 1985.

OLIVEIRA, F. ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G. et al. Avaliação química de espécimes do gênero Compositae. **Rev Farm Bioquímica**, v.20, p.69-183, 1984.

SÁ, R. C. S. et al. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level. **Contraception**, v.67, n.4, p.327-31, 2003.

SOUZA, M.P.; MATOS, F.J.A.; MATOS, M.E.O. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2004.

UNITED States pharmacopoeia. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2000.

VENEZIANI, R. C. S.; OLIVEIRA D. C. R. O. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochem Syst Ecol**, v.27, n.1, p.99-102, 1999.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L. CURY, J.A. et al. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *streptococci mutans*. **J Ethnopharmacol**, v.97, n.2, p.183-9, 2005.

Enviado em 11/07/2007

Aprovado em 20/09/2007