

Atividade antimicrobiana *in vitro* das folhas de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) contra micro-organismos da mucosa oral

In vitro antimicrobial activity of leaves of araçá (Psidium cattleianum Sabine) against oral micro-organisms

Felipe Queiroz ALVARENGA^a, Bárbara Caroline Ferreira MOTA^a, Vanessa de Andrade ROYO^{a*}, Rosângela da Silva de LAURENTIZ^b, Elytania Veiga MENEZES^a

^aUNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, Brasil

^bFaculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, Brasil

Resumo

Introdução: A espécie *Psidium cattleianum* Sabine tem despertado o interesse dos pesquisadores por apresentar, além de atividade cicatrizante, analgésica e antioxidante, propriedades antimicrobianas frente a micro-organismos da mucosa oral que podem atuar como agentes cariogênicos. **Objetivo:** Foi avaliada, neste trabalho, a atividade antimicrobiana de extratos bruto e fracionados das folhas do araçá, além do seu perfil cromatográfico. **Material e método:** Para avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizada a técnica de microdiluição, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e repique do inóculo em Ágar Muller Hinton (Himedia), para averiguação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). O extrato foi testado nas concentrações entre 10 e 500 µg/mL. O perfil cromatográfico foi realizado pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Resultado:** Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise descritiva e foi possível observar a atividade inibitória dos extratos do *P. cattleianum* contra *S. mutans* e *S. oralis*. **Conclusão:** A atividade antimicrobiana dos extratos de *P. cattleianum* contra micro-organismos orais justifica maiores estudos para a utilização medicinal dessa espécie, como, por exemplo, sua utilização em enxaguantes bucais.

Descritores: Agentes cariogênicos; plantas medicinais; perfil cromatográfico; microdiluição.

Abstract

Introduction: The specie *Psidium cattleianum* Sabine has aroused the interest of researchers to exhibit, healing activity, analgesic, antioxidant, antimicrobial properties against the micro-organisms of the oral mucosa that can act as cariogenic agents. **Objective:** It was analyzed in this study the antimicrobial activity of crude extracts and fractions and chromatographic profile of araçá. **Material and method:** For antimicrobial activity, we used the technique of on broth microdilution for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and replating of inoculum in Muller Hinton (Himedia) agar for finding the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The extract was tested at concentrations between 10 and 500 µg/mL. The chromatographic profile was performed by the method of High Performance Liquid Chromatography. **Result:** The results were submitted to a descriptive analysis was possible to observe the inhibitory activity of the extracts of *P. cattleianum* against *S. oralis* and *S. mutans*. **Conclusion:** The antimicrobial activity of *P. cattleianum* extracts against oral microorganisms justifies the use of this species as a medicinal plant.

Descriptors: Cariogenic agents; medicinal plants; chromatographic profile; microdilution.

INTRODUÇÃO

A busca por medicamentos a partir de compostos naturais tem se estabelecido com grande relevância científica, pois objetiva a descoberta de atividades biológicas para o uso contra diversas patologias humanas. Dentre as inúmeras espécies aspiradas está a

Psidium cattleianum Sabine, que é uma planta medicinal com atividades biológicas descritas para tratar patologias gástricas, intestinais e dores, dentre outras. É uma planta nativa do Cerrado brasileiro, ocorrendo em vasta área, abrangendo desde a Região Nordeste até

o sul do Brasil. Conhecida como aracá ou aracá-do-campo, nome originário do tupi-guarani, que significa 'fruta com olhos voltados para o céu'. É uma espécie arbustiva, podendo atingir até 2,5 m de altura, e apresenta frutos globosos, macios quando estão maduros, sabor doce e ácido muito apreciado pelos regionalistas¹⁻⁷.

Estudos demonstraram a ação dos micro-organismos (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus rhamnosus*) no processo cariogênico^{8,9}, sendo importante a descoberta de novos compostos capazes de prevenir, controlar e/ou eliminar essa doença. O aracá é uma planta cuja prospecção fitoquímica revelou a presença de compostos das classes dos taninos, flavonoides, saponinas, terpenos e/ou esteroides, substâncias estas com potencial biológico para a aplicação da espécie como planta medicinal para a finalidade em estudo³.

O interesse microbiano surgiu com a intenção de avaliar o poder anticariogênico dessa espécie, pois a cárie é uma doença odontológica crônica provocada pelo processo de desmineralização do dente, proveniente da ação bacteriana e dos seus processos fermentativos. Neste artigo, será explorada a capacidade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico 70% e partições das folhas de *P. cattleianum* sobre os micro-organismos da mucosa oral.

MATERIAL E MÉTODO

Coleta e Identificação

As folhas de *P. cattleianum* Sabine foram coletadas no mês de dezembro de 2011, na cidade de Glaucilândia, interior de Minas Gerais, Brasil. O material foi seco à sombra, espontaneamente, por um período de sete dias, aproximadamente. Em seguida, foi pulverizado em moinho de facas e armazenado em frascos de vidro âmbar a -10 °C. Foi elaborada uma exsiccata e enviada para o pesquisador Dr. Rubens Manoel dos Santos, da Universidade Estadual de Montes Claros – Minas Gerais (UNIMONTES-MG); a espécie foi então identificada e depositada no Herbário dessa mesma instituição, sendo protocolada com o voucher n.º 3533.

Preparo dos Extratos

Pelo processo de maceração exaustiva, utilizaram-se 200 g de folhas secas pulverizadas em 1.000 mL de etanol/água (7:3 v/v)⁵. A mistura foi deixada por sete dias protegida da luz, homogeneizando-se eventualmente o extrato em dias alternados. Após o período, o extrato foi filtrado e evaporado, sendo depois refrigerado em frasco âmbar a -10 °C. O procedimento de filtração, secagem e armazenamento foi realizado com o resíduo do extrato por três semanas consecutivas e o rendimento obtido para o extrato bruto das folhas de *P. cattleianum* foi de 36,48 g (18,24%).

As frações dos extratos da folha de *P. cattleianum* foram obtidas a partir da extração sólido-líquido, em que 1 g do extrato bruto foi agitado vigorosamente em uma alíquota de 30 mL dos solventes orgânicos em ordem decrescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool isobutílico). Os extratos fracionados foram evaporados em evaporador rotativo (Tecnal); após secos, foram pesados e armazenados em microtubos protegidos da luz a -10 °C. Para o cálculo do rendimento, foram realizadas

dez extrações sucessivas de 1 g, totalizando 10 g do extrato bruto seco das folhas, pelo mesmo método. Os rendimentos calculados foram 0,251 g (2,51%) para a fração hexânica; 0,670 g (6,70%) para a fração diclorometânica; 0,266 g (2,66%) para a fração acetato de etila, e 0,321 g (3,21%) para a fração isobutanólica.

Atividade Antimicrobiana

As cepas microbianas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril comparando-os com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0%), por meio da leitura das absorvâncias a 625 nm.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em caldo Muller Hinton, utilizou-se a técnica de microdiluição em placas de poliestireno, submetidas ao processo de esterilização química com hipoclorito de sódio a 5% por 24 horas e esterilização com luz ultravioleta por 30 minutos¹⁰⁻¹². Os extratos brutos e as partições foram preparados na concentração de 500 µg/mL em solução salina Tween 80 a 5% e esterilizados pelo processo de filtração em membranas de acetato celulose (0,22 µm). No ensaio, foram diluídos para atingir as concentrações: 500, 400, 300, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20 e 10 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizado o digluconato de clorexidina nas concentrações de 0,12%, 0,20% e 1,0%; como controle negativo, foi utilizado o meio de cultura (Caldo Muller Hinton) com solução salina 0,85% de NaCl e Tween 80 a 5%. Foram realizados os testes de esterilidade do meio e do solvente, e o teste de viabilidade da cultura em triplicata.

Após o preparo das microplacas, pipetando-se o meio, os extratos, os controles e o inóculo, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 horas a 37 °C. Os testes para cada uma das cepas testadas foram realizados em microplacas diferentes para evitar contaminações. Em cada cavidade, foram adicionados 100 µL do caldo Mueller Hinton (MH). Em seguida, foram acrescidos volumes de extrato para obter concentração entre 10 e 500 µg/mL e 50 µL do inóculo. Após o período de incubação, em cada orifício, foram adicionados 10 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02%. As microplacas foram reincubadas por mais 60 minutos e, após esse período, foram observadas e analisadas de forma descritiva. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência do crescimento microbiano e a cor vermelha ou rosa indicou presença do metabolismo bacteriano no meio. Após a leitura visual das microplacas contendo resazurina e a determinação da CIM, todos os orifícios em que não foi observado o crescimento bacteriano foram repicados em placas contendo Agar Mueller Hinton e incubados por 24 horas a 37 °C, para determinação da CBM, conforme metodologia descrita por Murari et al.¹³.

A CBM foi determinada pela ausência de crescimento bacteriano após incubação; a inibição do crescimento bacteriano na CIM e a observação do desenvolvimento bacteriano em placa foram consideradas como ação bacteriostática do extrato testado. A inviabilização do crescimento do micro-organismo com a menor

concentração de um determinado composto com ação bactericida foi definida como Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Neste ensaio, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters), equipado com injetor automático e detector de diodo. As condições cromatográficas para a realização do experimento que tem caráter exploratório foram as seguintes: coluna cromatográfica C18 de alto desempenho (Phenomenex), 250 × 4,6 mm, 10 µm, modo de eluição isocrático, volume de injeção de 10 µL, vazão da fase móvel de 1,0 mL/min, sendo que a fase móvel foi composta por uma mistura de água em metanol na proporção de 80:20, acidificada a 1% com ácido acético. Os extratos fracionados foram solubilizados em metanol a 1 mg/mL e foram utilizados como amostra para o teste.

RESULTADO

Os extratos brutos e as partições da folha de *P. cattleianum* Sabine foram testados contra quatro micro-organismos, e os resultados estão expressos na Tabela 1.

O EBHF exerceu ação antimicrobiana contra os micro-organismos *S. oralis* (CIM 200 µg/mL e CBM 400 µg/mL) e *S. mutans* (CIM 200 µg/mL e CBM 300 µg/mL). Nas partições EHF, observou-se atividade antimicrobiana contra *S. oralis* (CIM 200 µg/mL e CBM 200 µg/mL) e contra o *S. mutans* (CIM 150 µg/mL e CBM 300 µg/mL); o EDF contra o *S. oralis* (CIM 200 µg/mL e CBM 300 µg/mL); o EAF contra o *S. mutans* (CIM 400 µg/mL e CBM 400 µg/mL), e o EIF revelou-se capaz de inibir o crescimento bacteriano de *S. oralis* (CIM 400 µg/mL e CBM 500 µg/mL) e *S. mutans* (CIM 200 µg/mL e CBM 300 µg/mL). Porém, os resultados não demonstraram atividade antimicrobiana dos extratos contra as cepas de *L. rhamnosus* e *S. salivarius*.

Pelo método de CLAE, foram observados os seguintes resultados para as frações do EBHF: na fração hexânica, foram eluídos oito compostos, sendo três destes majoritários com Tempo de Retenção (TR) de 2,673 min., 2,917 min. e 3,185 min., com áreas de 44,93%, 21,71% e 23,41%, respectivamente. Na fração diclorometânica,

observou-se a presença de apenas três compostos, sendo dois majoritários, com áreas de 48,76% (TR = 2,711 min.) e 49,44% (TR = 3,084 min.). Na fração acetato de etila, foram eluídas seis substâncias, havendo predomínio de duas destas, de forma muito semelhante às da fração diclorometânica com TR = 2,694 min. (34,84%) e TR = 3,102 min. (46,03%). Na fração isobutanólica, de maior polaridade, foram observados oito compostos eluídos com presença de dois majoritários, com tempos de retenção muito semelhantes às outras frações, sendo TR de 2,688 min e 3,513 min., ocupando 39,75% e 33,06% de área, respectivamente.

DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana do EBHF do araquá vai ao encontro da tendência atual de se desenvolver e testar plantas de uso medicinal, descrita a partir de levantamentos etnobotânicos. *P. cattleianum* Sabine é uma espécie promissora, pois vários estudos comprovaram a eficácia de sua atividade biológica para tratar lesões teciduais, favorecendo o processo de cicatrização e as atividades antioxidante, antinociceptiva e antitumoral, dentre outras. Pesquisas realizadas com a casca de *P. cattleianum* revelaram atividade antimicrobiana contra micro-organismos da mucosa oral, o que pode ser utilizado para o desenvolvimento de produtos antissépticos com poder anticariogênico. Pela facilidade de obtenção do extrato das folhas do araquá e por apresentar um rendimento significativo, justificamos a motivação deste estudo para avaliar a capacidade bactericida e bacteriostática da folha, uma vez que os testes fitoquímicos revelaram a presença de taninos e flavonoides para ambas as partes da planta³⁻⁷.

Pesquisadores comprovaram, por meio de experimentos em animais, que as bactérias eram responsáveis pelo surgimento de lesões cariogênicas e, um pouco mais tarde, descreveram a ação decisiva e indispensável das bactérias no processo de formação da cárie dental pelo metabolismo bacteriano, pela formação de ácido e pela conseqüente desmineralização do esmalte dental¹⁴. Dentre os micro-organismos descritos envolvidos no processo de formação da cárie dental, está *S. mutans*, que é responsável pela formação do principal tipo de cárie em humanos, a cárie de sulco e de fissuras. Também foi comprovada a atividade cariogênica de

Tabela 1. CIM e CBM (µg/mL) do extrato bruto e frações da folha de *P. cattleianum* Sabine

Extrato	Micro-organismos							
	<i>S. salivarius</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. mutans</i>		<i>L. rhamnosus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
EBHF	NI	NI	200	400	200	300	NI	NI
EHF	NI	NI	200	200	150	300	NI	NI
EDF	NI	NI	200	300	NI	NI	NI	NI
EAF	NI	NI	NI	NI	400	400	NI	NI
EIF	NI	NI	400	500	300	300	NI	NI

EBHF – Extrato bruto hidroalcoólico da folha; EHF – Extrato hexânico da folha; EDF – Extrato Diclorometânico da folha; EAF – Extrato Acetato de etila da folha; EIF – Extrato isobutanólico da folha; NI – Não ocorre inibição nas concentrações testadas.

S. mutans em cáries de superfície lisa e em dentina, sendo esta última mais complicada, pois as bactérias causam lesão necrótica mole em áreas mais profundas da superfície dental⁸.

O EBHF foi capaz de inibir o crescimento de *S. mutans* e *S. oralis*, corroborando com os estudos de Alvarenga et al.³, que verificaram a atividade antimicrobiana dos extratos brutos da casca de *P. cattleianum* Sabine, associando tal atividade à presença de compostos secundários presentes nesta espécie, entre os quais são predominantes os taninos, flavonoides e saponinas. Comparando-se a atividade antimicrobiana do EBHF com a atividade dos extratos fracionados, observou-se que as ações bactericida e bacteriostática de todos os extratos foram muito semelhantes; desta forma, pode-se concluir que o fracionamento do extrato bruto não alterou significativamente a atividade antimicrobiana de *P. cattleianum*, fato que viabiliza a utilização do EBHF, cuja obtenção é mais fácil.

A análise cromatográfica exploratória realizada com as frações orgânicas do extrato das folhas de *P. cattleianum* constatou a presença de dois compostos majoritários, com tempo de retenção e área muito semelhantes, compostos estes apresentando picos com padrão análogo de absorção em espectros ultravioleta em torno de 240-280 nanômetros. Sugerimos, então, a presença de compostos com potencial ação biológica já descrita para essa espécie, como, por exemplos, os taninos e flavonoides^{3,15,16}, que apresentam atividade inibitória contra micro-organismos, além de efeito antioxidante, dentre outras atividades^{9,17,18}.

Dessa forma, os resultados deste trabalho corroboram para a utilização do extrato bruto de folhas de *P. cattleianum* sobre os micro-organismos do biofilme dental. Acredita-se que o extrato em estudo pode ter potencial antibacteriano para uso em formulações farmacêuticas ou para desenvolvimento de produtos, como enxaguante bucal, pomadas de uso tópico e sua adição em formulações de creme dental, para prevenção da cárie. Mas, para tanto, é necessário, primeiramente, que sejam realizados estudos com biofilmes para confirmar os resultados encontrados.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UNIMONTES, à Pro-Reitoria de Pesquisa, às Pro-Reitorias de Pós Graduação da UNIMONTES e UNESP, ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

- Brandão M, Laca-Buendia JP, Macedo JF. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG; 2002.
- Pino JA, Marbot R, Vázquez C. Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. J Agric Food Chem. 2001 Dec;49(12):5883-7. <http://dx.doi.org/10.1021/jf010414r>. PMID:11743779.
- Alvarenga FQ, Mota BCF, Leite MN, Fonseca JMS, Oliveira DA, Royo VA, et al. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. J Ethnopharmacol. 2013 Oct;150(1):280-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.044>. PMID:24021301.
- Medina AL, Haas LIR, Chaves FC, Salvador M, Zambiasi RC, Silva WP, et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. Food Chem. 2011 Oct;128(4):916-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>.
- Jun NJ, Mosaddik A, Moon JY, Jang K-C, Lee D-S, Ahn KS, et al. Cytotoxic activity of β -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. Rec Nat Prod. 2011;5(3):242-6.
- Im I, Park KR, Kim SM, Kim C, Park JH, Nam D, et al. The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway. Nutr Cancer. 2012;64(2):255-66. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.642455>. PMID:22211962.
- Desoti VC, Maldaner CL, Carletto MS, Heinz AA, Coelho MS, Piati D, et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. Arq Ciências Saúde UNIPAR. 2011 Jan-Abr;15(1):3-13.
- Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. Salusvita. 2006;25(2):239-52.
- Soares-Silva LH, Proença CEB. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. Bot J Linn Soc. 2008 Sep;158(1):51-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00727.x>.
- Lima MR, Luna JS, Santos AF, Andrade MC, Santa'Ana AE, Genet JP, et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2006 Apr;105(1-2):137-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.026>. PMID:16356672.
- Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby e Grimes. Rev Bras Farmacogn. 2007 Jun;17(2):215-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200014>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Wayne: CLSI; 2008. Document M 31-A3.
- Murari AL, Carvalho FH, Heinzmann BM, Michelot TM, Hörner R, Mallmann CA. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. Quim Nova. 2008;31(5):1081-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500026>.
- Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial. 2007 Dez;12(6):119-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-54192007000600012>.
- Row KH, Jin Y. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. Bioresour Technol. 2006 Mar;97(5):790-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.001>. PMID:15919205.
- Patel S. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats. Rev Environ Sci Biotechnol. 2012;11(3):243-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-012-9269-8>.
- Frömming KH, Ditter W, Horn D. Sorption properties of cross-linked insoluble polyvinylpyrrolidone. J Pharm Sci. 1981 Jul;70(7):738-43. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600700707>. PMID:7264917.
- Ramos-Tejada MM, Durán JDG, Ontiveros-Ortega A, Espinosa-Jimenez M, Perea-Carpio M, Chibowski E. Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. Colloids Surf B Biointerfaces. 2002 Apr;24(3-4):297-308. [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00284-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00284-3).

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Vanessa de Andrade Royo, Departamento de Biologia Geral, UNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros, Prédio 7, FADENOR, sala 201, Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro-Vila Mauricéia, 30401-084 Montes Claros - MG, Brasil, e-mail: vanroyo31@gmail.com

Recebido: Junho 22, 2015

Aprovado: Março 8, 2016