



Atividade antibacteriana e antiaderente do extrato de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre micro-organismos do biofilme dentário

Antibacterial activity and *Mimosa caesalpiniaefolia* extract nonstick Benth on dental biofilm microorganisms

Felipe Henrique de Souza Lima⁽¹⁾, Gustavo Shilmaney Damasceno⁽²⁾,
Luana Luzia Santos Pires⁽³⁾, João Gomes da Costa⁽⁴⁾; Thiago José Matos Rocha⁽⁵⁾;
Aldenor Feitosa dos Santos⁽⁶⁾

⁽¹⁾Estudante, Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL, Brasil. felipelima@hotmail.com

⁽²⁾Estudante, Centro Universitário Cesmac, Maceió-AL, Brasil. dasmacenogustavo@hotmail.com

⁽³⁾Docente, Centro Universitário Cesmac. Maceió-AL, Brasil. llspires@yahoo.com.br

⁽⁴⁾Docente e pesquisador da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas e membro permanente do Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais pelo Centro Universitário Cesmac. Maceió-AL, Brasil. thy_rocha@hotmail.com

⁽⁵⁾Docente e pesquisadora da Universidade Estadual de Alagoas e membro do Programa de Pós-graduação em Análise de Sistemas Ambientais pelo Centro Universitário Cesmac. Maceió-AL, Brasil. aldenirfeitosa@gmail.com

Todo o conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos seus autores.

Recebido em: 25 de agosto de 2018; Aceito em: 30 de agosto de 2018; publicado em 02 de 09 de 2018. Copyright© Autor, 2018.

RESUMO: A cárie dentária e doenças periodontais são as duas ameaças comuns à saúde bucal e importantes problemas de saúde pública por causa de seu impacto sobre os indivíduos. O *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos. Erradicação de biofilmes microbianos é uma tarefa difícil. Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antiaderente do extrato de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre micro-organismos do biofilme dentário. Trata-se de um estudo analítico experimental *in vitro*. O teste de triagem e a CIM foram analisados pelo método de microdiluição em caldo. As linhagens cariogênicas e formadoras de biofilme dental analisadas foram *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Foi visto que na durante a atividade antibacteriana do extrato das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* sobre linhagens cariogênicas e formadas de biofilme dental que a espécie estudada apresentou Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus mitis* ATCC 9811. O extrato etanólico das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* apresentou ação antimicrobiana significativa e atividade inibitória mínima da aderência *in vitro* sobre as linhagens de *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans*, presentes no biofilme bacteriano.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme Dentário, Placa Bacteriana, Extratos Naturais.

ABSTRACT: Dental caries and periodontal diseases are the two common threats to oral health and important public health problems because of your impact on individuals. *S. mutans* is considered the main Etiologic Agent of dental caries in humans. Eradication of biofilm is a difficult task. Facing the limitations of mechanical methods of hygiene. This work aimed to evaluate the antibacterial activity and *Mimosa caesalpiniaefolia* extract nonstick Benth on dental biofilm microorganisms. It is an analytical study *in vitro* trial. The screening test and the CIM were analyzed by the method of microdiluição in broth. The lines cariogênicas and dental biofilm-forming analyzed were *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* 27609 and *Lactobacillus casei* ATCC ATCC 7469. It has been seen that in during the antibacterial activity of the extract of the leaves of *Mimosa caesalpinifolia* on cariogênicas lines and formed of dental biofilm that the species studied showed minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal Concentration about *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus mitis* ATCC 9811. The ethanolic extract of leaves of *Mimosa caesalpinifolia* presented significant antimicrobial action and minimum inhibitory activity *in vitro* on the adherence of *Streptococcus mitis* strains and *Streptococcus mutans*, present in the bacterial biofilm.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme Dentário, Placa Bacteriana, Extratos Naturais.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária e doenças periodontais são as duas ameaças comuns à saúde bucal e importantes problemas de saúde pública por causa de seu impacto sobre os indivíduos e a sociedade, da sua prevalência e os custos para o tratamento (OSE et al., 2011).

A cárie dentária tem etiologia multifatorial, fundamentada em três fatores: hospedeiro, dieta e micro-organismos; atuando sobre estes o tempo. A formação do biofilme dentário ocorre por meio de processos complexos, que proporcionam a instalação de uma comunidade microbiana diversa, cooperativa, dinâmica, de alto potencial patogênico, podendo, muitas vezes, ser resistente a agentes antimicrobianos (ABREU-PINHEIRO et al., 2012).

O processo de formação de biofilme começa com o revestimento da superfície do dente através da película salivar, formada por componentes salivares, e é a base para a formação de biofilme induzida pelo micro-organismo na cavidade oral (BARNABÉ et al., 2014). O *Streptococcus mitis* e o *Streptococcus sanguis* são as bactérias pioneiras na formação do biofilme. A presença do *Streptococcus mutans* e do *Streptococcus sobrinus* é mais prevalente nas etapas iniciais da cárie. O *Lactobacillus casei* é encontrado na evolução da cavitação (OLIVEIRA et al., 2013).

O *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos. Fatores de virulência, tais como a composição de sua superfície celular e a produção de bacteriocinas, têm sido investigados em relação ao seu potencial cariogênico (ABREU-PINHEIRO et al., 2012). As células de *S. mutans* individuais ou agregadas se fundem com uma película por mecanismos dependentes ou não de sacarose e essa capacidade de fusão é o principal iniciador do processo de agregação de outras bactérias em uma matriz de polissacarídeo no esmalte dentário (BARNABÉ et al., 2014).

Erradicação de biofilmes microbianos é uma tarefa difícil. Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene, agentes antimicrobianos têm sido propostos, com a finalidade de inibir a formação e o crescimento bacteriano, e conseqüentemente a adesão de micro-organismos à superfície do dente, em particular de bactérias cariogênicas (MACÊDO-COSTA et al., 2009).

Diversas substâncias, a exemplo de enzimas, fluoretos, compostos clorados do fenol e detergentes catiônicos (clorexidina), têm sido utilizados como inibidores do mecanismo de formação e crescimento do biofilme dental, porém seus efeitos colaterais

não são poucos, como: pigmentação nos dentes, desequilíbrio da microbiota e alteração do paladar (MACÊDO-COSTA et al., 2009).

Em Odontologia, pesquisas com produtos naturais têm crescido nos últimos anos, devido à procura por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e com maior biocompatibilidade, além de valores mais acessíveis à população (ABREU-PINHEIRO et al., 2012).

O estudo de compostos e extratos naturais tem sido realizado, visando à obtenção de agentes antimicrobianos, que possibilitem a prevenção de doenças bucais, ajudando a reduzir a formação de placa, cárie e úlceras (OSE et al., 2011). Os extratos de plantas possuem em sua composição, substâncias anticariogênicas, que podem suprimir o crescimento de bactérias na cavidade bucal, inibindo a síntese de glucano a partir da sacarose pela glicosiltransferase (MACÊDO-COSTA et al., 2009).

Devido a esses fatores, o presente estudo sugere a investigação de novos agentes antibacterianos e antiaderentes naturais a partir de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae*, conhecida popularmente como sabiá ou sansão-do-campo. É uma árvore de 4 a 8 metros de altura, rica em taninos, que ocorre naturalmente na região Nordeste do Brasil, em áreas da Caatinga do Piauí, Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia e Ceará, além de ter sido introduzida com êxito em regiões dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo (LUCENA-VIEIRA et al., 2005).

A partir dos resultados desse estudo aliados aos testes de citotoxicidade, poderão ser realizadas novas pesquisas com elaboração de colutórios e cremes dentais, incorporando o extrato de *M. caesalpiniaefolia* às práticas de saúde para facilitar e popularizar os tratamentos de saúde bucal.

PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Trata-se de um estudo analítico experimental *in vitro*, que foi realizado no setor de microbiologia do laboratório da Farmácia Escola do Centro Universitário CESMAC.

Amostras da folha e casca do caule de *Mimosa caesalpiniaefolia* foram coletadas no município de Maceió-Alagoas e após a coleta, o material vegetal foi enviado para o Instituto do Meio Ambiente para identificação botânica.

As folhas foram secas à sombra em local aberto e a casca do caule será submetida à secagem em estufa a 50°C por 6 horas. Em seguida, esses materiais vegetais secos foram, separadamente, triturados e macerados em etanol absoluto. Após o processo de maceração, todos os materiais vegetais obtidos serão submetidos à filtração e rotaevaporação visando à obtenção dos extratos etanólicos brutos.

As linhagens cariogênicas e formadoras de biofilme dental analisadas foram *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469 obtidas no laboratório de micro-organismos de referência da Fundação Oswaldo Cruz.

O teste de triagem e a CIM foram analisados pelo método de microdiluição em caldo. O inóculo foi preparado a uma concentração de 5×10^5 UFC/mL, a partir da suspensão 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), obtidas de colônias frescas de bactérias. Uma alíquota (10 µL) desta suspensão de bactéria foi transferida para cada um dos 96 poços da microplaca com 100 µL de caldo nutritivo de infusão de cérebro e coração (BHI). Cem microlitros da solução de diferentes extratos serão adicionados aos poços em triplicata e incubados a 37°C por 24 horas. A concentração final do extrato foi de 100 µg/mL em Dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. Os resultados foram analisados visualmente com auxílio de reagente redox 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT) (0,5 mg/mL) para observar crescimento bacteriano. Gluconato de clorexidina a 0,12% em sua formulação comercial (Periogard®) foi utilizado controle positivo e DMSO 1% como controle negativo, além dos controles de esterilidade e de crescimento. O extrato que apresentou atividade foi submetido a diluições seriadas em caldo BHI para avaliar a CIM, considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (ABREU-PINHEIRO et al., 2012).

A determinação da CBM foi realizada pela semeadura de alíquotas de 10 µL em meio ágar sangue, da última CIM e da concentração imediatamente anterior (2CIM). A leitura se deu após incubação das placas a 37°C por 24 horas. Sendo considerada CBM a concentração em que não se observe crescimento bacteriano do subcultivo [2].

Foi realizado utilizando cristal violeta em microplacas de 96 poços. Nas microplacas foram adicionados 80 µL de suspensão bacteriana, 80 µL de extrato aquoso (concentração de 0,4 mg/mL ou 4,0 mg/mL nos poços) e 40 µL de caldo de tripton de soja (TSB) serão adicionados. Após o período de incubação a 37°C durante 24 horas, o conteúdo dos poços foi removido e os poços lavados três vezes com solução salina estéril. As bactérias restantes foram fixadas a 60°C durante 1 hora. A camada aderente do

biofilme formada será corada com 0,4% de cristal violeta por 15 minutos à temperatura ambiente. As células aderidas foram solubilizadas com 99,5% de DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm. O controle de formação do biofilme foi considerado para representar 100% de formação do biofilme, e os extratos foram substituídos por 80 µL de água em microplacas de 96 poços. Valores superiores a 100% representam uma estimulação da formação de biofilme em comparação com o controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se a atividade do extrato das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* sobre as linhagens cariogênicas. Esses resultados são de grande valia em prol do uso de plantas medicinais na odontologia, principalmente as com atividade antimicrobiana, pois são relevantes não apenas pelo benefício à saúde e pelo custo relativamente baixo, mas também pela grande disponibilidade com que são encontradas pela população.

Tabela 1 - Atividade antibacteriana do extrato das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* sobre linhagens cariogênicas e formadas de biofilme dental.

BACTÉRIAS	DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES	
	CIM	CBM
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	50ug/uL	100ug/uL
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 9811	25ug/uL 100ug/uL	
Controle Positivo (clorexidina)		12ug/uL

CIM – Concentração inibitória mínima; CBM – Concentração bactericida mínima.

Observa-se a eficiência do extrato quando comparado à clorexidina demonstrando ação até a última diluição (1:512). A possibilidade de inibir a formação de biofilme na superfície do acrílico com produtos naturais provocaria menos efeitos adversos para o paciente e seria mais acessível à população. Sabe-se que a formação do filme, em pacientes usuários de prótese dentários, está ligada a má higiene oral (PEREIRA, 1999; ALVES, 2009; SILVA et al., 2006), o que está intimamente relacionado a educação

sanitária dos pacientes, e que dentro dos grupos de risco, destaca-se os usuários com menores condições socioeconômicas que são vítimas de patologias causadas por biofilme, pois não tem acesso a informação e aos métodos de prevenção e tratamento (VASCONCELOS, 2010).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) do extrato etanólico das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* sobre bactérias formadoras de biofilme.

BACTÉRIAS	EXTRATO <i>Mimosa caesalpinifolia</i> (CIMA)	CLOREXIDINA 0,12%
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	1:256	1:16
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 981	1:512	1:16

CONCLUSÃO

O extrato etanólico das folhas de *Mimosa caesalpinifolia* apresentou ação antimicrobiana significativa e atividade inibitória mínima da aderência in vitro sobre as linhagens de *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans*, presentes no biofilme bacteriano, apresentando-se como opção terapêutica para as infecções orais. Sendo acessível a população por ser uma planta disponível na medicina popular.

REFERÊNCIAS

1. JOSE, M. et al. Ethnomedicinal Herbs Used in Oral Health and Hygiene in Coastal Dakshina Kannada. J Oral Health Comm Dent, p. 119–123, 2011.
2. ABREU-PINHEIRO, M. et al. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. RBPS, v. 25, n. 2, p. 1-5, 2012
3. BARNABÉ, M. et al. The influence of Brazilian Plant Extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. Journal os applied oral science, p. 366-72, 2014.
4. OLIVEIRA, G. P. et al. Antimicrobial activity in vitro of the oral cavity. Revista Fitos, v. 8, n. 2, p. 95-102, 2013.
5. MACÊDO-COSTA, M. R. et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente do extrato de mimosa tenuiflora (Willd). Poir. sobre microrganismos do biofilme

- dentário. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e clinica integrada, v. 9, n. 2, p. 161-165, 2009.
6. LUCENA-VIEIRA, E. et al. Composição química de forrageiras e seletividade de bovinos em bosque-de-sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) nos períodos chuvosos e seco. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 34, n. 5, p. 1505-1511, 2005.
 7. TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidemidis* planktonic and biofilm lifestyles. Journal of Ethnopharmacology, p. 327-335, 2011.
 8. ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, n.2, p.222-224, 2009.
 9. SILVA, M. M.; VERGANI, C. E.; GIAMPAOLO, E. T.; NEPELENBROEK, K. H.; SPOLIDORIO, D. M.; MACHADO, A. L. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. International Journal of Prosthodontics, v. 19, n. 3, p. 288-93, 2006.
 10. PEREIRA, C. V. Ação das amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase dentária – estudo in vitro. Revista Passo Fundo, v. 4, p.33-39, 1999.
 11. VASCONCELOS, L. C. de - Avaliação da higiene oral em usuários de prótese dentária: importância no controle da estomatite protética. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para conclusão. 2010. 74 páginas.