



EXTRATO E FRAÇÕES OBTIDOS DE *Paullinia cupana* COM ATIVIDADE ANTIADESÃO FRENTE *Streptococcus mutans*

Karina Miyuki Retamiro (PIBIC/CNPq/Uem), João Carlos Palazzo de Mello (Orientador), e-mail: mellobrasil04@gmail.com, Celso Vataru Nakamura (Co-orientador), e-mail:cvnakamura@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Farmacêuticas

Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Farmácia

Palavras-chave: atividade antiadesão, *Paullinia cupana*.

Resumo

Paullinia cupana, conhecida popularmente como guaraná possui propriedades antimicrobianas que podem ser investigadas por seu potencial fitoterápico. O trabalho tem o objetivo de avaliar a inibição do biofilme e ação antimicrobiana do extrato bruto (EB), fração aquosa (FAQ) e fração acetato de etila (FAE) de *Paullinia cupana*. A concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada de acordo com o CLSI documento M100-S24 e M7-A9 com modificações. A diminuição da formação do biofilme foi avaliado pelo teste de aderência a lamínula utilizando as concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. O extrato bruto e fração acetato de etila apresentaram concentração inibitória mínima de 250 µg/mL e fração aquosa de 1000 µg/mL. O teste de aderência a lamínula apresentou melhor inibição pela fração aquosa na concentração de 250 µg/mL (19,7%). Nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL a fração aquosa e fração acetato de etila se mostraram similares, enquanto o extrato bruto se mostrou com menor atividade. O extrato bruto e frações acetato de etila de guaraná se mostraram com atividade antimicrobiana. No teste de aderência a lamínula, a fração aquosa e fração acetato de etila apresentaram ação inibitória do biofilme, sendo este concentração dependente.

Introdução

Estudos sobre produtos naturais demonstram a ampla diversidade de compostos capazes de interferirem no metabolismo de seres vivos pelas suas propriedades biológicas e químicas. *Paullinia cupana*, conhecida como guaraná, é uma árvore típica brasileira, da região norte do país, podendo ser encontrada em outros países como Peru e Venezuela. É uma planta rica em compostos como o grupo das metilxantinas, que apresenta compostos como os alcalóides, a teofilina e a teobromicina que atuam no SNC, estimulando-o. Além



das metilxantinas, encontra-se no guaraná, os taninos que é usado para tratamentos de hipertensão arterial, hemorragias, reumatismo e as catequinas, que possui efeito antioxidante.

Streptococcus mutans é considerada uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram positiva e de morfologia esférica, agrupados em cadeia. É considerada o principal patógeno da cárie devido às suas propriedades acidogênica (capacidade de produzir ácidos) e acidúrica (capacidade de tolerar e de se desenvolver em biofilme dental ácido). É encontrada em mais de 80% dos indivíduos, portanto é considerada um micro-organismo cariogênico para o homem.

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila da *Paullinia cupana* contra *Streptococcus mutans* além de observar sua ação na inibição da formação do biofilme.

Materiais e métodos

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do método de diluição em placas: a partir de uma cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, cultivados em caldo BHI por 24 h e em microaerofilia, padronizou-se a suspensão bacteriana comparando-se a turvação da suspensão bacteriana à encontrada na escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para preparação do inóculo. O extrato bruto e as frações acetato de etila e aquosa, foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e BHI, preparando-se uma solução teste (ST). Em uma placa de 96 poços pipetou-se um volume de 100 μ L de caldo BHI em cada poço, sendo em seguida adicionado um volume de 100 μ L de ST aos poços da primeira fileira, obtendo-se uma concentração inicial de 1000 μ g/mL. Em seguida, realizou-se diluições seriadas, homogeneizando e transferindo 100 μ L da primeira fileira até a décima fileira. As colunas 11 e 12 da placa, foram utilizadas como controle da bactéria (contendo somente caldo BHI e suspensão bacteriana) e das soluções teste. A todos os poços foram adicionados 5 μ L da suspensão de micro-organismos padronizada, e em seguida a placa foi incubada a 37 °C durante 24 h, em microaerofilia. A concentração inibitória mínima foi determinada como sendo a menor concentração da fração capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Em paralelo, realizou-se controle com clorexidina 2% (descrito em CLSI documento M100-S24 e M7-A9 com modificações).

Teste de aderência à lamínula: culturas de *Streptococcus mutans* de 24 h em BHI a 37 °C em microaerofilia (cultivados em estufa com 10% CO₂) foram centrifugados por 20 min e ressuspensas com tampão (3,0 mL) ajustando em escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL). Desta suspensão



bacteriana, 1,5 mL foram adicionados a 1,5 ml de extrato. Foram incubados a 37 °C em microaerofilia por 4 h, centrifugados e ressuspensos com BHI (3,0 mL). Foi feita diluição seriada em meio BHI: 10^{-1} e 10^{-2} . Em uma placa de 24 poços foi colocado 500 μ L da diluição 10^{-2} onde havia uma lamínula. A placa foi incubada por 2 h. Em seguida, a suspensão foi retirada de cada poço e adicionada em uma a lamínula com 200 μ L de BHI e incubada durante 24 h. Em seguida, a lamínula foi lavada com tampão (PBS), secas ao ar e coradas com cristal violeta 0,01% por 30 s. Foram retiradas e lavadas em água destilada, secas ao ar por 30 min. Dissolveu-se com 1 mL de álcool etílico 95% que em uma placa de 96 poços passou-se 200 μ L da solução. A leitura foi realizada pela absorbância, em leitor de ELISA à 594 nanômetros descrito por Yonezawa et al. (2009).

Resultados e Discussão

No experimento para a determinação da concentração inibitória mínimas para EB, FAQ e FAE de *Paullinia cupana* foram respectivamente: 250 μ g/mL, 250 μ g/mL e 1000 μ g/mL e a clorexidina.

Para o teste de aderência na lamínula (Figura 1), a fração aquosa na concentração de 250 μ g/mL, se mostrou mais eficaz (19,70%) na inibição do biofilme contra a fração acetato de etila (11,36%) e extrato bruto (13,6%). Essa diferença em 500 μ g/mL e 1000 μ g/mL não foi observada em relação a fração acetato de etila que por sua vez se mostrou equivalente em inibição. O extrato bruto foi indiferente quanto a inibição do biofilme pelo aumento da concentração de 500 μ g/mL para 1000 μ g/mL, além de mostrar menor atividade nas concentrações de 500 e 1000 μ g/mL em relação as frações. A clorexidina foi usada como controle para comparar o efeito dos extratos.

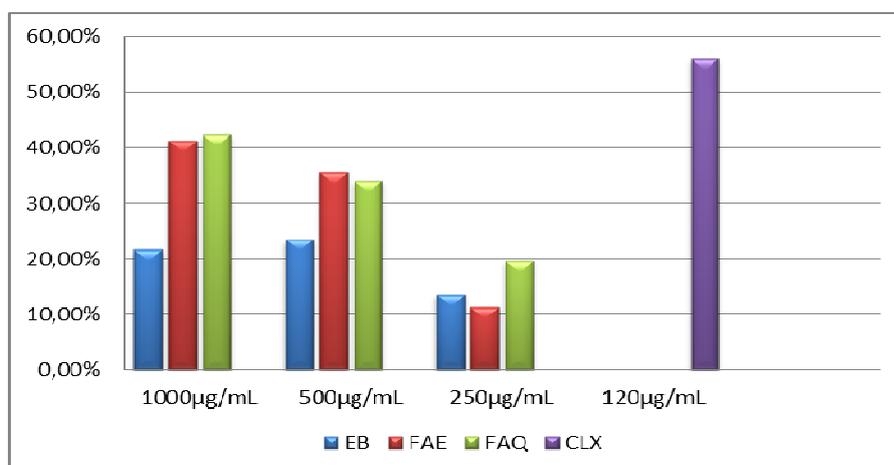




Figura 1 – Porcentagem de inibição do biofilme de *Streptococcus mutans* pelo teste de aderência a lamínula em diferentes concentrações do extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila de *Paullinia cupana*.

Conclusões

Foi determinado a concentração inibitória mínima dos extratos de *Paullinia cupana* frente a bactéria *Streptococcus mutans*, comprovando sua atividade antimicrobiana e sua capacidade de inibição da aderência bacteriana em superfície lisa, fator predisponente para o desenvolvimento da cárie e doenças periodontais.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio e Bolsa de iniciação científica.

Referências

YAMAGUTI, E. S. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**. v. 12, n. 8, p. 1950-63, 2007.

YONEZAWA, H.; Osaki, T.; Kurata, S.; Fukuda, M.; Kawakami, H.; Ochiai, K.; Hanawa, T.; Kamiya, S. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. **BMC Microbiology**. 2009 Sep 15;9:197. doi: 10.1186/1471-2180-9-197.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. M100/S24: performance standards for antimicrobial susceptibility. 22th informational supplement. **CLSI**, Wayne, PA.

Laboratory Standards Institute. 2012. M7/A9: methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bactéria that grow aerobically. Approved standard, 9th ed. **CLSI**, Wayne, PA.