



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
BIOPATOLOGIA

MARIA AUXILIADORA GOMES DA CRUZ

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Morinda Citrifolia* SOBRE
Streptococcus mutans E *Candida albicans*.**

UBERABA

2013

MARIA AUXILIADORA GOMES DA CRUZ

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Morinda Citrifolia* SOBRE
Streptococcus mutans E *Candida albicans*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração: Biopatologia da Universidade de Uberaba como requisito para a obtenção de título de Mestre

Orientador: Prof. Drº Tony de Paiva Paulino

UBERABA

2013

MARIA AUXILIADORA GOMES DA CRUZ

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Morinda Citrifolia* SOBRE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração: Biopatologia da Universidade de Uberaba como requisito para a obtenção de título de Mestre.

Aprovada em : ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

DEDICATÓRIA

A Deus por me guiar nesta difícil arte de viver,
Trilhar caminhos e fazer escolhas.
Ao meu esposo pelo apoio, compreensão e pelo auxílio nas horas difíceis.
Ao meu filho pelo carinho, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. Tony de Paiva pela perseverança, pela dedicação, sinceridade e profissionalismo. Pelos Preciosos ensinamentos e paciência.

Ao Prof^o. Dr. Jose Bento pelo apoio, pela presença tranqüilizadora e pelo incentivo.

A Prof^a Dr^a Denise pela enriquecedora colaboração e exemplo a ser seguido pelo carinho e dedicação com que exerce a docência.

À Universidade de Uberaba e seus professores, a quem devo minha formação científica.

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo, pelas risadas e ensinamentos nesta arte de conviver de aceitar o que não podemos mudar e coragem para mudar aquilo que podemos mudar.

Ao aluno Gustavo aluno de iniciação científica pela dedicação, companheirismo, e apoio técnico.

Ao Renato pela colaboração, dedicação e apoio na execução laboratorial e finalização do projeto

A Emília pela colaboração e compromisso na finalização do projeto

A técnica do laboratório Aline pela colaboração.

A todos os professores pela colaboração e pelo bom convívio.

A todos os meus familiares e amigos, que torcem pelo meu sucesso.

Aos meus pais pela importância na minha formação intelectual e pessoal.

“...existem nos poemas, como tudo que é produzido com emoção,
algo que toca as pessoas, que faz com que, de repente,
percebam o mundo e sua própria existência de forma diferente.
e isso exerce função terapêutica”.

Moacyr Scliar

RESUMO

A carie é considerada uma doença multifatorial, e ocorre pela adesão e o acúmulo da placa bacteriana na superfície do elemento dental. A atividade bioquímica dos microrganismos presentes no biofilme possui grande influência para o seu desenvolvimento. O *Streptococcus mutans* e a *Candida albicans* são dois microrganismos influentes na ocorrência do biofilme, pois ambos estão presentes na microbiota oral, sendo o *S.mutans* considerado uma das bactérias mais cariogênicas e a *C.albicans* a causadora de candidíase oral. Os biofilmes formados por *C. Albicans* apresentam alguns aspectos semelhantes com os biofilmes bacterianos, incluindo a diminuição da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. Estes agentes encontrados nos enxaguatórios bucais, como a clorexidina e derivados vegetais têm sido utilizados para promover a inibição da atividade do biofilme dental. Nesta pesquisa avaliou-se, *in vitro*, a atividade antimicrobiana, antifúngica e antiaderente da *Morinda citrifolia* sobre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana e antifúngica foi avaliada após padronização da turbidez dos microrganismos em 10^6 UFC/mL. O crescimento do biofilme foi realizado em meio TSB suplementado com 50 mmol de sacarose para *S. mutans* e BHI suplementado com 1,5% de glicose para *C.albicans*. A técnica de Agar difusão em placas foi realizada em Agar sabouraud e TSA sem suplementação. O derivado vegetal de noni mostrou-se eficiente no controle do biofilme de *C.albicans* e *S.mutans*, assim como na inibição do tubo germinativo de *C.albicans*. No ensaio de difusão para *C.albicans* ele também foi eficiente na inibição de *Candida albicans*, entretanto, não possuiu a mesma ação eficiente contra *S.mutans*. O derivado vegetal do fruto da planta também se mostrou eficaz na inibição e no crescimento de ambos microrganismos quando analisado a formação do biofilme em placas de polietileno com lamínulas de vidro. Assim, podemos concluir que o extrato de noni apresentou uma grande eficiência antimicrobiana e inibitória no controle de *C.albicans* e em menor eficiência em *S.mutans*. Entretanto, ainda são necessários mais experimentos para elucidar os mecanismos de ação desta planta frente microrganismos patogênicos e quais compostos presentes no fruto de *Morinda citrifolia* são os responsáveis pelos efeitos antibacteriano e antifúngico.

Palavras chave: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. *Biofilme*. *Morinda citrifolia*

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial disease which occurs due to the adherence and accumulation of plaque on the surface of the enamel and dentin. Biochemical activities of microorganisms in the biofilm also have major influence on dental caries development. *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* are two influential microorganisms in the biofilm, as both are present in the oral microflora. *S. mutans* is also considered one of the most cariogenic bacteria and *C. albicans*, the cause of oral candidiasis. The biofilms formed by *C. Albicans* have some similar aspects with bacterial biofilms, including decreased susceptibility to antimicrobial agents. These agents, found in mouthwashes, such as chlorhexidine and vegetable derivatives have been used to promote the inhibition of dental biofilm activity. In this study we evaluated, in vitro, antimicrobial, antifungal and non adherent activity of *Morinda citrifolia* on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Antimicrobial and antifungal activity was assessed by standardized turbidity of microorganisms in 10⁶ CFU / mL. Biofilm growth was carried out in TSB medium supplemented with 50 mmol saccharose (MCS) and for *S. mutans* and BHI supplemented with 1.5% glucose for *C. albicans*. Agar diffusion plates was performed in Sabouraud agar and TSA without supplementation. Noni plant derivative proved to be efficient in controlling biofilm of *C. albicans* and *S. mutans*, as well as inhibiting *C. albicans* germ tube. In diffusion assay for *C. albicans*, it was also efficient for inactivation, however, it did not possess the same effective action against *S. mutans*. The vegetable derived from the seed of the plant also proved effective in inhibiting growth of both microorganisms when biofilm formation in polystyrene plate was examined. Thus, we concluded that the noni extract revealed large antimicrobial efficiency and inhibitory control in *C. albicans*, however showing less efficiency for *S. mutans*. Nonetheless, more experiments are needed to elucidate the mechanisms of this plant against pathogenic microorganisms front and which compounds are present in the *Morinda citrifolia* seed and responsible for antimicrobial and antifungal activity.

Keywords: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. *Morinda citrifolia*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Morinda citrifolia</i>	26
Figura 2	Estrutura da Xeronina	26
Quadro 1	Protocolo de tratamento do biofilme de <i>S. mutans</i>	31
Quadro 2	Protocolo de tratamento do biofilme de <i>C. albicans</i>	32
Quadro 3	Protocolo de tratamento para o experimento do disco de difusão em Agar de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i>	33
Figura 3	Gráfico da mensuração do pH do meio TSB.de <i>S. mutans</i> .	38
Figura 4	Gráfico do consumo de glicose do biofilme de <i>S. mutans</i> em diferentes tempos de incubação.	39
Figura 5	Gráfico do consumo de glicose do biofilme de <i>C. albicans</i> em diferentes tempos de incubação.	40
Figura 6	Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do derivado vegetal de <i>M. citrifolia</i> pelo método de disco de difusão em Agar.	41
Figura 7	Microscopia de luz do Biofilme de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> sob a ação de clorexidina e extrato vegetal de <i>M. citrifolia</i> .	43
Figura 8	Microscopia de luz do tubo germinativo de <i>C. albicans</i> .	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio do disco de difusão realizado em cepas de <i>S. mutans</i> com diferentes concentrações de <i>M. citrifolia</i>	41
Tabela 2	Ensaio do disco de difusão realizado em cepas de <i>C. albicans</i> com diferentes concentrações de <i>M. citrifolia</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
A	Absorbância
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CEC	Centre of Biological Engineering
Cels	Células
CO ₂	Dióxido de Carbono
dL	Decilitro
DV	Derivado vegetal
g	Grama
mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
nm	Nanômetros
OD	Densidade ótica
PBS	Phosphate buffered salina (PBS)
SBF	Soro Bovino Fetal
T.A	Temperatura ambiente
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	<i>Streptococcus mutans</i> e Cárie	16
2.2	<i>Candida albicans</i> e Candidíase	18
2.3	Tratamento e Resistência Bacteriana	19
2.4	Tratamento e Resistência Antifúngica	21
2.5	Tratamentos Alternativos	22
2.5.1	Antissépticos Bucais	22
2.5.2	Plantas Medicinais	23
2.5.3	<i>Morinda citrifolia</i>	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivo Específico	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Preparo do derivado vegetal	29
4.2	Condições de cultivo de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	29
4.2.1	<i>Streptococcus mutans</i>	29
4.2.2	<i>Candida albicans</i>	29
4.2.3	Preparo das células para os ensaios	30
4.3	Formação do biofilme em placa de polietileno	30
4.3.1	Biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	30
4.3.2	Biofilme de <i>Candida albicans</i>	30
4.4	Análises das atividades metabólicas dos microrganismos	31
4.4.1	Grupos de tratamento do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	31
4.4.2	Grupos de tratamento do biofilme de <i>Candida albicans</i>	32
4.4.3	Avaliação do pH do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> (<i>Acidogenia</i>)	32
4.4.4	Avaliação do consumo de glicose pelos biofilmes de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i>	32
4.5	Determinação da susceptibilidade dos microrganismos	33
4.5.1	Grupos de tratamento – Disco de Difusão	33

4.5.2	Preparação dos discos de difusão	34
4.5.3	Susceptibilidade de <i>Streptococcus mutans</i>	34
4.5.4	Susceptibilidade de <i>Candida albicans</i>	34
4.6	Efeito sobre a aderência dos microrganismos em lamínulas de vidro	35
4.6.1	Formação do biofilme de <i>Candida albicans</i> em placa de polietileno com lamínulas de vidro	35
4.6.2	Formação do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> em placa de polietileno com lamínulas de vidro	36
4.7	Efeito sobre a formação de tubo germinativo de <i>Candida albicans</i>	37
4.7.1	Grupos de tratamento – Tubo germinativo	37
4.7.2	Formação do tubo germinativo	37
4.8	Análise Estatística	37
5.0	RESULTADOS	38
5.1	Avaliação do pH do meio de cultivo de <i>Streptococcus mutans</i>	38
5.2	Avaliação do consumo de glicose do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	38
5.3	Avaliação do consumo de glicose do biofilme de <i>Candida albicans</i>	39
5.4	Determinação da susceptibilidade de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i> – Disco de Difusão	40
5.5	Efeito sobre a aderência de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i> em lamínulas de vidro	42
5.6	Efeito sobre a formação de tubo germinativo de <i>Candida albicans</i>	43
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIA	51