

AÇÃO ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L., e *Pimpinella anisum* L.

Pereira C.A., Vilela P.G.F., Oliveira L.D., Jorge A.O.C.

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP - Laboratório de Microbiologia e Imunologia
Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas - São José dos Campos, SP - Brasil
Cep: 12245-000 - Telefone: (12) 3947-9033/ e-mail: cricabio@gmail.com

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* L. (jambolão) e *Pimpinella anisum* L. (erva-doce) sobre cepas padrão de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Bacillus atropheus* (esporos). A Concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através do método de microdiluição em caldo BHI para as bactérias e Sabouraud dextrose para leveduras, com diluições seriadas dos extratos adicionadas em placas de 24 poços, posteriormente contaminadas com suspensões microbianas (10^6 céls/mL) e incubadas a 37°C/24h. A seguir, as amostras foram semeadas em ágar BHI para as bactérias e ágar Sabouraud dextrose para leveduras, e incubadas a 37°C/48h para determinar a Concentração microbicida mínima (CMM). Com exceção de *Bacillus atropheus* na sua forma esporulada que apresentou resistência a todos os extratos testados, o crescimento dos demais microrganismos foi inibido por diferentes concentrações destes agentes naturais. Porém, o extrato de *Pimpinella anisum* L. apresentou melhor ação antimicrobiana, inibindo através de concentrações mais baixas o crescimento dos microrganismos.

Palavras-chave: Ação antimicrobiana, *Psidium guajava*, *Syzygium cumini*, *Pimpinella anisum*
Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

Atualmente o emprego de plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças corriqueiras tem sido apoiado pela classe médica e por programas oficiais de saúde. O Brasil possui um número grande de espécies vegetais nativas que são consideradas medicinais (LIMA et al., 2006; BRANDÃO et al., 2006), mas muitas ainda não tiveram qualquer avaliação científica do seu uso medicinal, o que é essencial para que possam continuar a serem utilizadas com segurança pela população. No âmbito odontológico, as pesquisas com agentes naturais têm aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e maior biocompatibilidade, além de apresentarem valores mais acessíveis à população (CASTILHO et al., 2007).

Existe na cavidade bucal uma grande variedade de microrganismos que podem, por um desequilíbrio, tornarem-se patogênicos, muitos dos quais estão relacionados com cárie, doenças periodontais, infecções endodônticas e lesões de mucosa (PARADELLA et al., 2007).

Diante do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, há uma grande preocupação relacionada à qual tipo de tratamento utilizar no combate às infecções provocadas por microrganismos. O emprego de extratos brutos de plantas tem merecido a atenção de pesquisadores

de vários países, já que podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos quando comparados aos antimicrobianos (ANIBAL, 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana dos extratos glicólicos de *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), *Psidium guajava* L. (goiabeira) e *Syzygium cumini* L. (jambolão) sobre cepas padrão de *Bacillus atropheus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Metodologia

Foram utilizados neste estudo extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* L. (jambolão) e *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), adquiridos da empresa Multi Vegetal (Campinas, São Paulo, Brasil), acompanhados de laudo de identificação. Na preparação de cada extrato foram utilizados 75% de massa seca, obtida através da folha de *Psidium guajava* L. e *Syzygium cumini* L. ou frutos de *Pimpinella anisum* L., diluída em propileno glicol, resultando numa concentração de 750 mg/mL.

A atividade antimicrobiana dos extratos glicólicos foi avaliada em cepas padrões de *Bacillus atropheus* (ATCC 65961), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922),

Staphylococcus aureus (ATCC 6538) e *Streptococcus mutans* (ATCC 35688). As cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

As bactérias foram semeadas em ágar Infusão cérebro coração, BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, USA), e incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. Para *B. atrophaeus* foram utilizados os esporos obtidos de acordo com a metodologia proposta por Kuroiwa et al. (2003). As leveduras de *C. albicans* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA), e incubadas por 24 horas a 37°C. Decorrido o período de incubação, os cultivos foram suspensos em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ajustados por espectrofotômetro (Micronal B582/Versão 3.0.4, São Paulo, Brasil) até a obtenção de suspensões padronizada contendo 10⁶ céls/mL, cujos parâmetros de densidade óptica e de comprimento de onda estão representados no quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados para obtenção de uma solução contendo 10⁶ céls/mL.

Microorganismo (n=6)	Densidade óptica (Abs)	Comprimento de onda (nm)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	307	0,178
<i>Candida albicans</i>	530	0,284
<i>Enterococcus faecalis</i>	760	0,289
<i>Escherichia coli</i>	590	0,324
<i>Staphylococcus aureus</i>	490	0,374
<i>Streptococcus mutans</i>	620	0,398

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o método de microdiluição em caldo (n=6), com diluições seriadas de 325 a 23,43 mg/mL (50 à 3,125%) dos extratos testados. Em cada orifício das placas de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA) foi adicionado 1 mL da diluição do extrato, acrescido de 1mL de caldo BHI (Difco, Detroit, USA) para as bactérias, e 1 mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) para as leveduras. Posteriormente, foi acrescentado 100 µL da suspensão padronizada de cada cepa do microrganismo a ser testado. As placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 37°C. Foi considerada como CIM a menor concentração dos extratos glicólicos testados que inibiu o crescimento visível dos microrganismos, ou seja, sem turvação do caldo e depósito microbiano.

O controle positivo foi constituído de caldo e o inóculo microbiano avaliado. O controle negativo foi constituído de caldo e extrato.

Em paralelo, também foi realizado o teste para avaliar a capacidade antimicrobiana do solvente propileno glicol.

Após o período de incubação, foram determinadas as concentrações microbicidas

mínimas (CMM). Alíquotas de 100 µL dos testes anteriores foram semeadas em placas de Petri contendo para as bactérias ágar BHI, e para as leveduras ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. A CMM foi definida como a menor concentração dos extratos glicólicos testados que não apresentou crescimento microbiano em meio sólido.

Os testes foram realizados em duplicata.

Em todos os ensaios com cepas *S. mutans* a incubação foi realizada em estufa com condições de microaerofilia (5% de CO₂) a 37°C.

Resultados

O teste de atividade antimicrobiana realizado com o solvente propileno glicol, isoladamente, não apresentou efeito inibitório ou microbicida sobre os microrganismos analisados. O controle positivo realizado apresentou excelente viabilidade das cepas utilizadas. O controle negativo não apresentou qualquer tipo de contaminação do caldo ou dos extratos testados.

De acordo com a metodologia utilizada no presente estudo, as CIM e CMM predominantes (moda) dos extratos glicólicos de *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), *Psidium guajava* L. (goiabeira) e *Syzygium cumini* L. (jambolão) sobre as diferentes cepas padrão utilizadas estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

Com exceção de *Bacillus atrophaeus*, na sua forma esporulada, que apresentou resistência a todos os extratos testados, o crescimento dos demais microrganismos foi inibido por diferentes concentrações destes agentes naturais. Já o efeito microbicida foi observado em concentrações maiores do que as de CIM.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) mais frequentes do extrato glicólico dos frutos de *Pimpinella anisum* L. (erva-doce), frente aos microrganismos *Bacillus atrophaeus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Microorganismo	CIM (mg/mL)	CMM (mg/mL)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	R*	R*
<i>Candida albicans</i>	93,75	187,50
<i>Enterococcus faecalis</i>	46,87	93,75
<i>Escherichia coli</i>	23,43	46,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	46,87	93,75
<i>Streptococcus mutans</i>	93,75	187,50

*R= Microrganismo foi resistente ao extrato de *Pimpinella anisum* L. (erva-doce).

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) mais freqüentes do extrato glicólico das folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira), frente aos microrganismos *Bacillus atrophaeus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Microrganismo	CIM (mg/mL)	CMM (mg/mL)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	R*	R*
<i>Candida albicans</i>	187,5	375
<i>Enterococcus faecalis</i>	187,5	375
<i>Escherichia coli</i>	187,5	375
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,43	46,87
<i>Streptococcus mutans</i>	93,75	187,5

*R= Microrganismo foi resistente ao extrato de *Psidium guajava* L. (goiabeira).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) mais freqüentes do extrato glicólico das folhas de *Syzygium cumini* L. (jambolão), frente aos microrganismos *Bacillus atrophaeus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Microrganismo	CIM (mg/mL)	CMM (mg/mL)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	R*	R*
<i>Candida albicans</i>	187,5	375
<i>Enterococcus faecalis</i>	93,75	187,5
<i>Escherichia coli</i>	46,87	93,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	93,75	187,5
<i>Streptococcus mutans</i>	46,87	93,75

*R= Microrganismo foi resistente ao extrato de *Syzygium cumini* L. (jambolão).

Discussão

Em decorrência do uso abusivo de antibióticos tradicionais e do crescente aumento da resistência microbiana, os microbiologistas clínicos têm demonstrado grande interesse na investigação de extratos de plantas, com potencial antimicrobiano (VOLPATO, 2005).

A escolha dos microrganismos desta pesquisa buscou abranger espécies usualmente utilizadas em estudos para avaliação de atividade antimicrobiana, bem como sua associação com diversas patologias que acometem a cavidade bucal. Já a escolha de microrganismo *B. atrophaeus* em sua forma de esporos foi para servir como parâmetro no estudo da eficácia dos extratos testados, uma vez que esta forma apresenta grande resistência aos antimicrobianos.

Para avaliar se as CIM obtidas apenas inibiram o crescimento microbiano em caldo, efeito microbiostático, ou mataram os microrganismos testados, capacidade microbicida, foram realizados ensaios para determinar a CMM em

meio de cultura sólido. Desta forma, pode-se observar que para os extratos testados as CIM obtidas apresentaram somente efeito microbiostático, uma vez que para conseguir completa eliminação, ou seja, morte dos microrganismos as concentrações requeridas foram bem maiores do que aquelas para CIM.

As CIM e CMM obtidas do extrato glicólico das folhas de *P. guajava* L no presente estudo estão de acordo com os obtidos por Holetz et al. (2002), que encontraram atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. guajava* L. sobre *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, indicando que as folhas desta planta poderiam ser utilizadas para tratar patologias causadas por tais microrganismos devido o seu efeito antimicrobiano. Sanches et al. (2005) também obtiveram efeito inibitório através dos extratos hidroalcoólico e aquoso de *P. guajava* L. sobre cepas padrão de *S. aureus*, porém os mesmos não foram ativos contra *E. coli*, divergindo dos resultados obtidos neste trabalho, onde o extrato glicólico das folhas dessa planta apresentou efeito inibitório ao crescimento desta bactéria.

No atual estudo o extrato glicólico das folhas de *S. cumini* L. apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. mutans*. Michelin et al. (2005), encontraram atividade antimicrobiana do extrato seco das folhas de *S. cumini* L. sobre cepas padrão e resistentes de *E. coli*, e cepas padrão de *S. aureus*, o que corrobora com os dados obtidos no presente estudo. Porém, ainda no experimento de Michelin et al (2005), o extrato de *S. cumini* L. não inibiu o crescimento de cepas padrão de *C. albicans*, diferentemente dos resultados encontrados no atual estudo, no qual o extrato glicólico das folhas dessa planta foi efetivo contra esta levedura. Nascimento et al.(2000) verificaram que o extrato alcóólico de *S. cumini* inibiu 57,1% dos microrganismos testados, dentre os quais estavam cepas resistentes e sensíveis de *S. aureus*, e cepas resistentes de *C. albicans* e *E. coli*.

Em relação a *P. anisum* L., estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana, antifúngica e antimalárica de alguns dos compostos desta planta (TABANCA et al., 2005).

O extrato glicólico dos frutos de *P. anisum* L. utilizado neste trabalho apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*. Gülçin et al. (2003) verificaram que os extratos aquoso e etanólico de *P. anisum* L., na concentração de 25%, foram efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, porém esses autores não obtiveram inibição do crescimento de cepas padrão de *E. coli* e *C. albicans*, o que difere dos resultados do atual estudo onde esta planta teve ação inibitória no crescimento de tais microrganismos.

Os trabalhos realizados por Holetz et al. (2002) e Sanches et al. (2005) com extratos hidroalcoólico e aquoso de *P. guajava* L inibiram o crescimento de *B. atrophaeus*, discordando dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que esta bactéria mostrou-se resistente a todas as concentrações de todos os extratos glicólicos utilizados. Por outro lado, os resultados da atual estudo estão de acordo com o trabalho de Nascimento et al. (2000), uma vez que esses autores não conseguiram inibição de crescimento de *B. atrophaeus* com o extrato de *S. cumini* L.

Os resultados obtidos no atual estudo estão coerentes com o histórico da atividade antimicrobiana das espécies vegetais estudadas, quanto à ação microbicida e à demonstração de que os microrganismos, com exceção do *B. atrophaeus*, mostraram-se sensíveis aos extratos glicólicos utilizados. No entanto, é importante ressaltar que a análise da atividade antimicrobiana nos diversos estudos aqui citados foi realizada por diferentes metodologias e concentrações, o que torna difícil uma análise comparativa fidedigna. Além disso, até a finalização desta pesquisa, não foram encontrados estudos que fizessem uso do extrato glicólico destas plantas. No entanto, os resultados do presente estudo foram satisfatórios aos objetivos da pesquisa. Em síntese, o atual estudo espera contribuir na avaliação da eficácia dos extratos vegetais frente aos microrganismos prevalentes na cavidade bucal e que podem desencadear inúmeras patologias.

Conclusão

Com exceção de *Bacillus atrophaeus* na sua forma esporulada que apresentou resistência a todos os extratos testados, o crescimento dos demais microrganismos foi inibido por diferentes concentrações destes agentes naturais. Porém, o extrato de *Pimpinella anisum* L. apresentou melhor ação antimicrobiana, inibindo através de concentrações mais baixas o crescimento dos microrganismos.

Referências

- ANIBAL, P.C. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de odontologia de Piracicaba, 2007. 71p.
- BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. Bras. Farmacogn.** V.16, p.408-420, 2006.
- CASTILHO, A.R.; MURATA, R.M.; PARDI, V. Produtos naturais em odontologia. **Rev. Saúde.** V.1, p.11-19, 2007.
- GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLU, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chem.** V.83, p.371-382, 2003.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS, B.P.F. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V.97, p.1027-1031, 2002.
- KUROIWA, K.; NAKAYAMA, H.; KUWAHARA, T.; TAMAGAWA, K.; HATTORI, K.; MURAKAMI, K.; et al. Augmenting effect of acetic acid for acidification on bactericidal activity of hypochlorite solution. **Lett. Appl. Microbiol.** V.36, p.46-49, 2003.
- LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev. Bras. Farmacogn.** V.16, p.300-306, 2006.
- MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.** V.15, p.316-320, 2005.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** V.31, p.247-256, 2000.
- PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Rev. Odontol. UNESP.** V.36, p.163-168, 2007.
- SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; SCHIAVINI, M.S.; NAKAMURA, C.V.; DIAS, B.P.F. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Braz. Arch. Biol. Technol.** V.48, p.429-436, 2005.
- TABANCA, N.; BEDIR, E.; FERREIRA, D.; SLADE, D.; WEDGE, D.E.; JACOB, M.R.; et al. Bioactive constituents from Turkish *Pimpinella* species. **Chem. Biodives.** V.2, p.221-232, 2005.
- VOLPATO, A.M.M. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico [Tese de doutorado]. Curitiba:Universidade Federal do Paraná, 2005. 111P.