

## EFEITO MICROBICIDA DO EXTRATO GLICÓLICO DE *Equisetum arvense* L. (cavalinha) SOBRE *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* E *Candida* spp.

**Vinícius Carlos de Castro, Jonatas Rafael de Oliveira, Polyana das Graças Figueiredo Vilela, Cláudio Antonio Talge Carvalho, Rosilene Fernandes da Rocha, Antonio Olavo Cardoso Jorge, Luciane Dias de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista – UNESP / Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Avenida Eng. Francisco José Longo, 777 – São José dos Campos, jroliveira16@hotmail.com.

**Resumo** - Este estudo se propôs a avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *E. arvense* L. (cavalinha) sob cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Foi aplicado o teste de microdiluição em caldo, segundo NCCLS, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de cavalinha. Posteriormente, a CIM, uma concentração abaixo e uma acima, foram semeadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) ou Sabouraud-dextrose para determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM). Observou-se eliminação microbiana nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,13 mg/mL do extrato de cavalinha, no entanto, a CMM<sub>50</sub> determinada para *S. mutans* foi 12,5 mg/mL, para *S. epidermidis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* 25 mg/mL e para *S. aureus* e *C. glabrata* 50 mg/mL. Contudo, levando em consideração a eliminação de todas as cepas a CMM de 50 mg/mL foi a mais efetiva. Com isso, concluiu-se que o extrato de cavalinha apresentou efetiva atividade microbicida contra todas as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*

**Palavras-chave:** *E. arvense*, cavalinha, antimicrobiano.

**Área do Conhecimento:** Microbiologia

### Introdução

*E. arvense* L. é conhecido popularmente no Brasil como cavalinha, é membro da família Equisetaceae e rico em vitaminas C, E, K, B1, B2, B6, ácido nicotínico, ácido fólico e ácido pantotênico (NAGAI *et al.*, 2005). Apresenta ampla distribuição pelo hemisfério norte, sendo utilizado como medicamento em diversas partes do mundo, além de em certas localidades ser consumida como alimento e no Japão ser servido sob a forma de chá (NAGAI *et al.*, 2005; RADULOVIC *et al.*, 2006).

A cavalinha apresenta diversas atividades, como efeito diurético, antimicrobiano de forte ação, antioxidante, anti-inflamatório, anticoncepcivo, analgésico, antiproliferativo, vasodilatador, podendo ainda ser utilizada no tratamento de infecções do trato urinário e osteoporose (GRAEFE; VIET, 1999; JOKSIC, 2003; SAKURAI *et al.*, 2003; TROUILLAS *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2004; MONTE *et al.*, 2004; RADULOVIC *et al.*, 2006; MILOVANOVIC *et al.*, 2007; CETOJEVIC-SIMIN *et al.*, 2010).

Tem-se observado que o surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais tem aumentado, como consequência disto o agravamento de infecções oportunistas também tem se intensificado. Com isso, torna-se relevante o levantamento de formas alternativas para o

controle de microrganismos, uma vez que, os resultados de trabalhos com produtos naturais tem sido promissores. O desenvolvimento de fármacos à base de componentes extraídos de vegetais seria uma alternativa para o tratamento de infecções, uma vez que, os próprios vegetais utilizam tais substâncias para sua própria defesa. Contudo, deve-se levar em conta a toxicidade destas substâncias para humanos, realizando para este fim testes que comprovam sua viabilidade.

Diante do mencionado, este estudo se propôs a avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *E. arvense* L. (cavalinha) sob cepas clínicas e cepas-padrão (ATCC) de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

### Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, conforme protocolo 008/2010-PA/CEP.

O extrato glicólico de *E. arvense* L. (cavalinha) foi preparado na concentração de 200 mg/mL, após aquisição comercial do pó seco do vegetal na empresa Oficina de Ervas (Ribeirão Preto, SP).

Foram utilizadas nove cepas clínicas e uma cepa-padrão (ATCC) de *S. aureus* (ATCC 6538),

*S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. mutans* (ATCC 35688), *C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. glabrata* (ATCC 90030), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. Com isso, avaliou-se a ação do extrato de cavalinha em 60 cepas.

As bactérias foram cultivadas em BHI (Himedia, Mumbai, Índia) e as leveduras em ágar Sabouraud-dextrose (Himedia, Mumbai, Índia), por 24 horas a 37°C, em condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) para as cepas de *S. mutans*.

Para o teste de microdiluição em caldo (NCCLS, 2002; 2003), primeiramente os inóculos foram preparados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e posteriormente a turbidez desta solução foi ajustada de acordo com a escala de McFarland de 0,5, para se obter a concentração de 5 x 10<sup>5</sup> células/mL de bactérias e 2,5 x 10<sup>3</sup> células/mL de leveduras. Para as microdiluições foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis com tampa (TPP, Suíça). Nas colunas de 1 a 10 foram feitas dez diluições do extrato (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 e 0,19 mg/mL) em meio de cultura, sendo Mueller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias e RPMI 1640 (Himedia, Mumbai, Índia) para as

leveduras. Posteriormente, foram inoculados nos poços do grupo tratado e do controle positivo 5 µL da suspensão bacteriana ou 100 µL da suspensão de leveduras. Foi deixado um poço para controle negativo (apenas meio de cultura) e os testes foram feitos em duplicata. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37°C, sob microaerofilia para *S. mutans*.

Após a obtenção da CIM (poço em turvação), foram semeados 100 µL desta concentração, de uma concentração acima e de uma abaixo em placas de ágar BHI ou Sabouraud-dextrose para a determinação da CMM do extrato de cavalinha. Passadas 48 h de incubação a CMM foi determinada em placas com ausência de crescimento de colônias.

Os dados foram analisados em relação ao percentual de cepas eliminadas em cada concentração do extrato.

## Resultados

Foi constatada atividade microbicida do extrato de cavalinha entre as concentrações de 100 e 3,13 mg/mL (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de cepas bacterianas e fúngicas eliminadas sob concentrações do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha)

Microrganismo	Concentração (mg/mL)									
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	10	10*	4	3	2	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	10	10	6*	2	1	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	10	10	10	7	3	3*	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10	10*	5	3	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	10	10	7*	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	10	10*	1	-	-	-	-	-	-	-

- concentração não efetiva; \*CMM obtida em cepa-padrão (ATCC).

A eliminação de todos os isolados ocorreu a 50 mg/mL, contudo a CMM<sub>50</sub> determinada para *S. mutans* foi 12,5 mg/mL, para *S. epidermidis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* foi 25 mg/mL e para *S. aureus* e *C. glabrata* 50 mg/mL.

## Discussão

No presente estudo, o extrato de cavalinha demonstrou atividade antimicrobiana contra todas as cepas avaliadas, para Pattnaik *et al.* (1997) e Tepe *et al.* (2004) esta capacidade biológica do

vegetal pode ser atribuída ao componente majoritário timol, um monoterpene fenólico.

Foi observado comportamento diferente entre grupos bacterianos e fúngicos. Cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram eliminadas nas concentrações entre 100 e 6,25 mg/mL., para *S. mutans* além destas concentrações, 30% das cepas foram eliminadas a 3,13 mg/mL, demonstrando maior sensibilidade ao extrato que qualquer outra cepa testada. Nos grupos das leveduras foi constatado que *C. tropicalis* e *C. glabrata* necessitaram de concentrações mais

elevadas para que fossem eliminadas, no entanto, cepas de *C. albicans* puderam ser eliminadas com até 12,5 mg/mL do extrato de cavalinha.

Cepas *S. mutans* apresentaram maior sensibilidade ao extrato de cavalinha, uma vez que, 70% dos isolados foram eliminados com a concentração de 12,5 mg/mL, embora tenha ocorrido eliminação total das cepas sob a concentração de 25 mg/mL. Diante disto, a utilização de componentes provenientes da cavalinha, com comprovada atividade bactericida, deveria ser pensada no intuito de serem utilizados na elaboração de produtos antisépticos de uso odontológico para controle de cárie dental, pelo fato de este microrganismo ser um dos agentes etiológicos desta infecção (PEREIRA *et al.*, 2006).

Radulovic *et al.* (2006), analisando a ação da cavalinha sob cepas de *S. aureus* e *C. albicans*, além de outros microrganismos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* e *Aspergillus niger*, verificaram que houve atividade antimicrobiana superior ou similar aos antibióticos convencionais ampicilina e doxiciclina, respectivamente. Milovanovic *et al.* (2007) também constataram que em *C. albicans* os efeitos da cavalinha foram superiores ao da nistatina, desta forma, comprovam juntamente com o presente estudo que o uso de substâncias naturais podem contribuir como forma alternativa para o controle de microrganismos que podem causar importantes infecções para os seres humanos.

Diante dos resultados satisfatórios em relação à atividade antimicrobiana do extrato de cavalinha, é possível perceber que esta planta medicinal tem forte potencial de atuação contra microrganismos oportunistas, contudo, trabalhos com outras espécies microbianas ou outros veículos que proporcionem as atividades biológicas dos componentes da cavalinha necessitam ser realizados, uma vez que, estudos que abordem este tema na literatura estão escassos. Outra preocupação que se deve ter é em relação a toxicidade deste vegetal para o indivíduo que o consuma sob a forma de medicação. Com isso, o ideal é a produção de agentes antimicrobianos de amplo espectro de ação com segura viabilidade para o uso clínico.

### Conclusão

O extrato glicólico de *E. arvense* L. (cavalinha) apresentou efetiva atividade microbicida eliminando todas as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

### Referências

- CETOJEVIC-SIMIN, D.D.; BRUNET, J.M.C.; BOGDANOVIC, G.M.; DJILAS, S.M.; CETKOVIC, G.S.; TUMBAS, V.T., et al. Antioxidative and Antiproliferative Activities of Different Horsetail (*Equisetum arvense* L.) Extracts. **J Med Food**. V.13, p.452–9, 2010.
- GRAEFE, E.U; VEIT, M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. **Phytomedicine**. V.6, p.239–46, 1999.
- JOKSIC, G.; STANKOVIC, M.; NOVAK, A. Antibacterial medicinal plants Equiseti herba and Ononidis radix modulate micronucleus formation in human lymphocytes in vitro. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. V.22, p.41–8, 2003.
- MARTINS, D.M.F.H.; SANTOS, JR.J.G.; RUSSI, M.; LANZIOTTI, V.M.N.B.; LEAL, L.K.A.M.; CUNHA, G.M.A. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. **Pharmacol Res**. V.49, p.239–43, 2004.
- MILOVANOVIC, V.; RADULOVIC, N.; TODOROVIC, Z.; STANKOVIC, M.; STOJANOVIC, G. Antioxidant, Antimicrobial and Genotoxicity Screening of Hydro-alcoholic Extracts of Five Serbian *Equisetum* Species. **Plant Foods Hum Nutr**. V.62, p.113–9, 2007.
- MONTE, F.H.; SANTOS, J.G.; RUSSI, M; BISPO; LANZIOTTI, V.M.; LEAL, L.K.; CUNHA, G.M.A. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. **Pharmacol Res**. V.49, p.239–43, 2004.
- NAGAI, T.; MYODA, T.; NAGASHIMA, T. Antioxidative activities of water and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. **Food Chem**. V.91, p.389–94, 2005.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 6th ed. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, USA, 2003.
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2. ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Estados Unidos, 2002.

- PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; BAPAJI, M.; KOLE, C.R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**. V.89, p.39–46, 1997.

- PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V.; SAMPAIO, F.C.; SAMPAIO, M.C.C.; ALVES, P.M.; ARAÚJO, C.R.F.; HIGINO, J.S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev Bras Farmacogn** . V.16, p.88-93, 2006.

- RADULOVIC, N.; STOJANOVIC, G.; PALIC, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. **Phytother Res**. V.20, p.85–8, 2006.

- SAKURAI, N.; IIZUKA, T.; NAKAYAMA, S.; FUNAYAMA, H.; NOGUCHI, M.; NAGAI, M. Vasorelaxant activity of caffeic acid derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*. **Yakugaku Zasshi**. V.123, p.593–8, 2003.

- TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M Zohary et P.H. Davis. **J Agric Food Chem**. V.52, p.1132–7, 2004.

- TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.A.; ALLAIS, D.P. Antioxidant, antiinflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chem**. V.80, p.399–407, 2003.