

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE *Zingiber zerumbet* (L.) SMITH (GENGIBRE AMARGO)

Carlos Dannel Freitas PINHEIRO¹
Carlos Cleomir de Souza PINHEIRO²
Gemilson Soares PONTES³

¹Bolsista IC INPA-PIBIC/CNPq; ²Colaborador INPA/LTIQPN; ³Orientador INPA/CPCS

INTRODUÇÃO

O potencial antimicrobiano dos princípios ativos presentes em extratos e óleos essenciais, produzidos através de plantas, são reconhecidas empiricamente há séculos (Jansen *et al.* 1987). No entanto, a insuficiência de dados científicos em relação a essas atividades pode trazer sérios riscos à saúde. Logo, o conhecimento sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado grande interesse científico (Ferreira *et al.* 2011)

A zerumbona, extraída a partir dos óleos essenciais da espécie medicinal *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (gingibre amargo), possui um excelente mecanismo de ação e um princípio ativo importante com potencial antinocepcivo e antiinflamatório, o que foi verificado em testes *in vivo* realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Pinheiro 2005). Assim, é provável que também apresente uma atividade antimicrobiana, ainda muito pouco explorada. Desta forma, o presente trabalho tem como o objetivo avaliar a atividade antibacteriana e citotóxica dos extratos produzidos a partir do *Zingiber zerumbet*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os rizomas de *Z. zerumbet* foram coletados em área rural de Manaus-Amazonas. A exsicata foi enviada ao herbário do INPA para ser identificada pelo Prof. Dr. Paul Maas (Departament of Plant Ecology and Evolucionary Biology) – herbarium University of Utrecht. O material encontra-se depositado no herbário sob nº 186913. Para a obtenção do óleo essencial, foi realizada por hidrodestilação. A extração foi feita durante 6 h, contadas a partir da ebulição da amostra. O óleo essencial foi coletado do condensador, armazenado em frascos âmbar sob congelamento, de acordo com a metodologia de Matos (1980). Os óleos essenciais e extratos obtidos foram submetidos à recristalização e armazenados em frascos âmbar e submetidos às análises cromatográficas e espectroscópicas.

Para a atividade antibacteriana, foram utilizadas cepas provenientes de isolados clínicos e cepas padrões das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (12.ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigênica ST-Butantã; 48. *Pseudomonas aeruginosa*-CDC EDL-1284; *Staphylococcus aureus* atcc 80958). A solubilidade em solventes orgânicos e inorgânicos foi testada para adicionar o veículo de inoculação (Tween 20, H₂O destilada). Os extratos vegetais foram avaliados, apresentando soluções em diferentes concentrações (2,1; 0,5; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL).

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo o método de difusão em ágar e difusão por cavidade-placa (Bauer *et al.* 1966; McCutcheon *et al.* 1992; Habsad *et al.* 2000; Hernández *et al.* 2000). As cepas bacterianas utilizadas foram inoculadas em 3mL de caldo de nutriente em um tubo de ensaio estéril (Lorian 1979), incubado a 37°C por 24 horas. Após esse período, as cepas bacterianas foram utilizadas nos testes microbiológicos. O inóculo utilizado corresponde ao tubo nº 5 da escala de Mac Farland, concentração determinada com o auxílio do

espectrofotômetro (aproximadamente 10^7 UFC/ mL; volume de inoculação utilizado foi 50 uL para difusão em placa e 3 uL para cavidade em placa).

A curva da cinética de morte microbiana foi realizada em um período de 48 horas. Um inóculo de 1×10^7 da cepa bacteriana de *S. aureus* foi cultivado a 37 °C em 3 ml de caldo Muller Hinton em agitação (200 rpm/min), na presença dos extratos vegetais de *Z. zerumbet* nas concentrações 300, 500 e 800 µg/mL e um grupo controle negativo Tween 20 a 10%. Em seguida, alíquota de 1 mL da cultura bacteriana foi coletada nos seguintes intervalos de tempo de incubação: 0, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h. Posteriormente, semeadas em placas de ágar nutriente (Mueller-Hinton), em diluições seriadas. O número viável de células bacterianas foi feito por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) presentes na placa (Kumar *et al.* 2010).

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio MTT(3-4,5-dimetil,tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide). Foi usado a linhagem celular Huh7 para avaliação da citotoxicidade dos extratos. As células (5×10^3 por poço) foram cultivadas em 0,2 mL de meio de (DMEM com 10 % PBS, antibióticos e antifúngicos) em uma placa de 96 poços, tratadas com os extratos de *Z. zerumbet* (0; 3; 0,6; 0,125; 0,5; 1 e 2 mg/mL) e então, incubadas por 72 horas. Em seguida, foi adicionado MMT e as células foram novamente incubadas por mais 4 horas a 37° C, em 5% de CO₂. No final da incubação, a densidade ótica foi medida utilizando um leitor de placas (ELISA), em um filtro de 570 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia gasosa do óleo essencial apresentou a porcentagem de área de 84,79% para Zerumbona. Após essas análises com diferentes concentrações do óleo essencial, foi verificada a concentração inibitória mínima (CIM) de 450 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (isolado clínico) e para a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 80958). As cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (12.ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigenica ST-Butantã; 48. *Pseudomonas aeruginosa*-CDC EDL-1284) apresentaram atividade bacteriostática parcial, reduzindo cerca de 60% do crescimento bacteriano. Tal atividade presente nos extratos é de grande relevância, devido à possibilidade futura do uso desses extratos como coadjuvante na terapia combinada com outros antibióticos (Schliesser *et al.* 1981). Como o extrato apresentou atividade bactericida apenas para cepa de *Staphylococcus aureus*, foi realizada a cinética de morte bacteriana apenas com esta cepa. Os resultados preliminares demonstraram que após 2 horas de incubação o extrato de gengibre amargo já apresenta ação antibacteriana em todas as concentrações testadas, provocando uma redução máxima das colônias a partir da concentração de 500 µg/ml entre 12 e 24 horas de incubação (redução de mais 95% do total de CFU/mL).

Em relação à verificação da atividade citotóxica do extrato contra células normais de linhagem primária, não foi possível ainda obter os resultados (experimentos em andamento), visto que as células da linhagem VERO, foram adquiridas há poucos dias e estão em processo de padronização do crescimento celular. Contudo, como tínhamos disponível a linhagem secundária HuH7, proveniente de um hepatocarcinoma, foi verificada a atividade citotóxica do extrato em relação à células neoplásicas. Os resultados preliminares demonstraram que óleo essencial proveniente do gengibre amargo apresentou uma atividade citotóxica a partir da concentração 0,125 mg/mL, visto que, após 24 horas de exposição a essa concentração, praticamente 100% da células morreram, o que mostra o potencial anti-cancerígeno do gengibre amargo. Assim, os resultados obtidos confirmam a atividade antibacteriana e anticancerígena do gengibre amargo, demonstrando seu potencial no tratamento de infecções bacterianas graves e de neoplasias, o que já havia sido sugerido por trabalhos anteriores (Huang *et al.* 2005)

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível confirmar a atividade antibacteriana e antineoplásica do gengibre amargo, o que mostra seu potencial no tratamento de diversas patologias e corrobora a importância científica e médica da espécie medicinal estudada. Contudo, testes adicionais serão necessários para confirmar e elucidar melhor o amplo espectro de ação da zerumbona proveniente do *Z. zerumbet*.

REFERÊNCIAS

- Bauer, A.I.; Kirb, W.M.; Sherris, J.C. *et al.* 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, (36): 493-696.
- Ferreira, F. S. *et al.*, 2011. Atividade Antibacteriana *in vitro* de extratos de *Rhizophora mangle* L. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, 3(13): 16-24.
- Habsah, M.; Amaran, M.; Mackeen, M.M.; Lajis, N.H.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N.; Rahman, A.; Grafar, A. 2000. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(72): 403-410.
- Hernández, N.E.; Tereschuk, M.L.; Abdala, L.R. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi Del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 1(73): 317-322.
- Jansen, A.M. *et al.* 1987. Antimicrobial activity of essential oils. Aspects of test methods. *Planta Medica*, 1(40): 395-398.
- Huang, G.C.; Chien, T.Y.; Chen, L.G.; Wang, C.C. 2005. Antitumor effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388D cells *in vitro* and *in vivo*. *Planta Medica*, 71(3): 219-224.
- Kumar, S.N. 2010. *In Vitro* Antibacterial Screening of Six Proline-Based Cyclic Dipeptides in Combination with β -Lactam Antibiotics Against Medically Important Bacteria. *Appl Biochem Biotechnol*, 1(14): 08-28.
- Lorian, V.E.; Waluschka, A. 1979. Five-Hours System for Identification of bacteria. *The American of Journal Medical. Technology*, 45(7): 618-627.
- Matos, F.J.A. 1980. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 129-212 pp.
- Mccutcheon, A.R.; Ellis, S.M.; Hancock, R.E.W.; Towers, G.H.N. 1992. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(37): 213-223.
- Pinheiro, C.C. 2005. *Estudo químico e farmacológico das raízes de Zingiber zerumbet (L) Smith (Zingiberaceae), cultivada em Manaus/AM*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas. 58 pp.
- Schliesser, T.; Strauch, D. 1981. *Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch - und Milchwirtschaft*. Stuttgart: Enke Verlag, 455pp.