

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (GENGIBRE AMARGO) EM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Carlos Daniel Freitas PINHEIRO¹
Cristovão Alves da COSTA²
Carlos Cleomir de Souza PINHEIRO³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador CSAS/INPA; ³Co-Orientador LTIQPN/INPA

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a antibióticos é uma preocupação de caráter mundial e tem chamado atenção para a necessidade urgente de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas drogas e de novas estratégias de tratamento de infecções bacterianas. Diversos microrganismos patogênicos aos seres humanos podem apresentar resistência aos antimicrobianos por meio de diferentes mecanismos de resistência (Brunton *et al.* 2007). Devido ao uso indiscriminado de antibióticos, a cada dia surgem novos microrganismos multirresistentes, o que torna o tratamento curativo de infecções bacterianas cada vez mais difíceis (Sousa Junior *et al.* 2004).

Desta forma, torna-se evidente a necessidade de uma busca contínua por novas alternativas de tratamento de infecções bacterianas. Estudos com a espécie medicinal *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (gingibre amargo) realizados pelo nosso grupo de pesquisa indicam que a zerumbona extraída dos óleos essenciais da planta possui um excelente mecanismo de ação e um princípio ativo importante como potencial antinocepcivo e anti-inflamatório em testes realizados *in vivo* com animais (Pinheiro 2005). Portanto, de posse desses dados, o presente estudo avaliou o potencial antimicrobiano de extratos orgânicos do gengibre amargo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do *Zingiber zerumbet* (L.) Smith

Os rizomas de *Z. zerumbet* foram coletados em área rural de Manaus-Amazonas. A exsicata enviada ao herbário do INPA. O material encontra-se depositado no herbário sob n^o 186913.

Técnicas de Extrações que foram utilizadas

Hidrodestilação

Para a extração por hidrodestilação foi utilizado o aparelho de Clevenger acoplado a um balão de 2000 mL. O *Zingiber* em pó (2 kg) e 4 L de água foram colocados no balão e levado para manta aquecedora. A extração foi feita durante 6 horas contadas a partir da ebulição da amostra, conforme a metodologia de Matos (1980).

Extração por Solventes

O material vegetal (rizomas) foi desidratado em estufa a 45 °C 72/horas e triturado em moinho elétrico. A partir desse foi feito extrato hidro alcoólico, em seguida foi feita a eliminação dos solventes. Os óleos essenciais obtidos foram submetidos à recristalização e armazenados em frascos âmbar e submetidos às análises cromatográficas e espectroscópicas, de acordo com a metodologia de Matos (1980).

Determinação da Atividade Antibacteriana

Cepas bacterianas

No presente estudo, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtidas de isolados clínicos (hemocultura) provenientes de pacientes atendidos em um laboratório particular da cidade de Manaus. Todas as cepas foram identificadas e caracterizadas bioquimicamente por meio de métodos automatizado (VITEK 2 compact, Biomerieux) padronizados de acordos com normas do CLSI. Uma vez que a identificação foi feita de forma precisa, as cepas bacterianas isoladas foram submetidas a testes antimicrobianos para determinar o perfil de sensibilidade e resistência a antibióticos comerciais disponíveis atualmente no mercado usando metodologia padronizada pela CLSI.

Padronização do inóculo

As cepas bacterianas utilizadas foram inoculadas em 3 mL de caldo nutriente em um tubo de ensaio estéril Lorian (1979). A amostra foi incubada a uma temperatura de 37 °C por 18-24 horas. Em seguida, os inóculos foram preparados através de suspensão direta de colônias com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland em 3,0 ml de solução

salina a 0,85%, de acordo com as normas técnicas padronizadas descritas pelo CLSI (2012).

Preparo do extrato ou substância isolada para os testes microbiológicos

Dos extratos, foram testadas as solubilidades em solventes orgânicos e inorgânicos, para adicionar o veículo de inoculação (Tween 20, H₂O). Os extratos vegetais foram avaliados em três estágios, apresentando soluções em diferentes concentrações, sendo o primeiro constituído por extratos ou substâncias com as massas de 1,2; 0,5; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL de Zerumbona (ICSP13A), ext. hidroalcolóico. No segundo estágio a concentração foi alterada para, 1,0 a 0,3 mg/mL. Já o terceiro estágio, as concentrações variavam de 1; 2 e 4 mg/mL da substância isolada e dos extratos brutos, para verificar se haviam efeitos nas diferentes massas (Bauer *et al.* 1976; Lorian *et al.* 1977).

Diluição em Ágar

Diferentes concentrações (4000 µg/mL a 100 µg/mL) dos extratos orgânicos foram adicionadas e homogeneizadas individualmente em Ágar Muller Hinton em seguida distribuídos em placas de Petri, previamente autoclavadas. Posteriormente, o inóculo bacteriano foi semeado nas placas que, em seguida, foram incubadas a 37 °C durante 18-24hs. Os testes foram realizados na câmara de segurança biológica, com auxílio dos equipamentos de segurança, de acordo com as normas de biossegurança preconizadas pela ANVISA.

Método de difusão cavidade-placa

Foram feitos orifícios equidistantes em placas de meio de Petri, com meio ágar Muller Hinton a 2% Em seguida os extratos vegetais foram dispensados nos orifícios em diferentes concentrações. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 37 °C durante 18-24 horas. Após este período, foi realizada a leitura das placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia Gasosa do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* (L.)

Das substâncias presentes, destaca-se uma como majoritária, com porcentagem de área de 84,79%, a Zerumbona, conforme a resultados semelhantes já relatados na literatura (Pinheiro 2005).

Atividade antimicrobiana do óleo essencial do extrato hidroalcolóico de *Zingiber zerumbet* (L.)

Após terem sido realizados testes utilizando diferentes concentrações dos extratos orgânicos, foi verificada uma atividade inibitória ≥ 1 mg/mL para *Staphylococcus aureus* tanto para o óleo essencial quanto para o extrato hidroalcolóico. No entanto, em relação às cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*, concentrações do óleo essencial e do extrato hidroalcolóico $\geq 1,5$ mg/mL apresentaram atividade bacteriostática, reduzindo o crescimento bacteriano em mais de 60%, o que é de grande relevância, devido ao seu possível uso como coadjuvante na terapia combinada com outros antibióticos (Schliesser e Strauch 1981). Não foi verificada nenhuma atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato hidroalcolóico para *Klebsiella pneumoniae*. Para validar tais resultados, os mesmos testes serão realizados com cepas padrões de cada espécie testada, usando um antimicrobiano comercial como controle para fins comparativos da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos.

CONCLUSÃO

Os extratos orgânicos testados no presente estudo demonstraram uma atividade inibitória para *Staphylococcus aureus* e uma atividade bacteriostática para as cepas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, porém não apresentaram atividade antimicrobiana em relação à *Klebsiella pneumoniae*. Assim, os dados aqui apresentados demonstram o potencial antimicrobiano do *Zingiber zerumbet* (L.) e, conseqüentemente, demonstram a possibilidade do seu uso como alternativa terapêutica no combate a infecções bacterianas. Contudo, testes adicionais são necessários para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), além da atividade citotóxica dos extratos utilizados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- Bauer, A.I.; Kirb, W.M.; Sherris, J.C. e Cols. 1976. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical. Pathology*, 1(36): 493-696.
- Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. 2007. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, *Goodman & Gilman*, 1821pp.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. 2012. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

- Lorian, V.E.; Waluschka, A. 1979. Five-Hours System for Identification of bacteria. *The American of Journal Medical. Tecchnology*, 45(7): 618-627.
- Matos, F.J.A. 1980. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. 129pp.
- 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. 58pp.
- Sousa Junior, M.A.; Ferreira, E.S.; Conceição, G.C. 2004. Betalactamase de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. *NewsLab* – edição 63–.
- Schliesser, Th.; Strauch, D. 1981. *Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch - und Milchwirtschaft*. Stuttgart: Enke Verlag,. 455pp.