

Estudo da atividade antimicrobiana do extrato fluido da *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe – Determinação da concentração mínima inibitória

Antimicrobial study of *Curcuma zedoaria* fluid extract. Minimum inhibitory concentration determination

Maria Aparecida Nicoletti¹, Adriana Bugno², Eliane Maria de Almeida Orsine³ & Odair Zenebon⁴

RESUMO – A atividade antimicrobiana do extrato fluido da *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória para os microrganismos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Tricophyton mentagrophytes*

PALAVRAS-CHAVE – *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, determinação de concentração mínima inibitória.

SUMMARY – The antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe was estimated through the minimum inhibitory concentration for the following microorganisms: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Tricophyton mentagrophytes*.

KEYWORDS – *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, minimum inhibitory concentration determination.

INTRODUÇÃO

A *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe é planta perene muito cultivada e consumida na Ásia¹ e, atualmente cultivada no estado de São Paulo⁷, onde adaptou-se muito bem. Seu emprego em medicina popular é muito antigo, principalmente em razão de suas propriedades aromáticas (presença de cineol, canfeno, α -pineno, cânfora, entre outros compostos), sendo empregada como digestiva, estimulante hepática, auxiliar em irritações de vias aéreas superiores, no tratamento de halitose, além de apresentar atividade antiinflamatória e antimicrobiana^{6,8,12,13,17}.

Apresenta composição bastante complexa por apresentar óleo essencial e óleo resina, com inúmeros compostos de natureza terpênica identificados, além de outros constituintes^{1,2,5,7,9,11,14}.

Da planta, a parte normalmente utilizada é o rizoma, após secagem e pulverização. Encontra-se comercialmente disponível sob a forma de pó, cápsula ou extrato fluido, sendo administrada por via oral em razão de suas propriedades medicinais como eupéptica, carminativa e colagoga.

O objetivo do trabalho é a avaliação do potencial antimicrobiano do extrato fluido desta planta vislumbrando-se, assim, a possibilidade de sua introdução em formas farmacêuticas de uso tópico e/ou cosmecêuticas. Foi realizada a avaliação da capacidade antifúngica do extrato fluido frente aos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Tricophyton mentagrophytes*, e, também, avaliação da ca-

pacidade antibacteriana frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*.

MATERIAL E MÉTODOS

a. Extrato fluido

A *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe utilizada foi identificada no Instituto de Botânica (São Paulo/SP) cujo material referência se encontra depositado neste herbário sob número de registro 338498.

Caracterização dos rizomas pulverizados - (classificação da tenuidade de partículas constituintes do pó):

7% > 0,420mm;
7,0% = 0,250 |— 0,420mm;
24% = 0,177 |— 0,250mm;
37% = 0,149 |— 0,177mm
e 25,00% < 0,149mm³.

O extrato fluido foi elaborado por percolação fracionada utilizando como líquido extrator álcool a 70° (grau alcoólico determinado a 15°C)⁴.

b. Preparo e padronização das suspensões de microrganismos^{10,15,16}

b.1 – *Microrganismos utilizados (pertencentes à Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz – SP):*

Fungos

Aspergillus niger ATCC 16404

Candida Albicans ATCC 10231

Tricophyton mentagrophytes ATCC 9533

Recebido em 11/3/2002

¹Profª Doutora do Curso de Farm. e Bioq. da Univ. Paulista. Rua Dr. Bacelar, 1212 - CEP 04026-000 - São Paulo - Capital. E-mail: maria-nicoletti@uol.com.br

²Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 - CEP 01246-902 - São Paulo - Capital. E-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br

³Professora Doutora do Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Paulista. Rua Dr. Bacelar, 1212 - CEP 04026-000 - São Paulo - Capital.

⁴Diretor da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355. CEP 01246-902 - São Paulo - Capital.

Bactérias

Escherichia coli ATCC 10536
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442
Salmonella choleraesuis ATCC 10708
Staphylococcus aureus ATCC 6538

b.2 – Meios de cultura (preparados a partir do meio de cultura desidratado conforme as instruções do fabricante – DIFCO):

Agar Caseína de soja
Agar Saboraud dextrose
Caldo Caseína-soja

b.3 – Preparo e padronização das suspensões de microrganismos: as bactérias foram repicadas na superfície inclinada de ágar caseína soja e incubadas a 30-35°C por 24 horas, enquanto que os fungos foram repicados na superfície inclinada de ágar Sabouraud dextrose e incubados a 20-25°C, por 5 dias. A massa celular resultante foi recolhida em 9mL de solução salina 0,9% (p/v), estéril, e submetida à contagem de microrganismos viáveis pela técnica de "Pour Plate". A partir da suspensão original de cada microrganismo, cujo número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi determinado, foram efetuadas diluições em solução salina a 0,9% (p/v), estéril, até obtenção de suspensão contendo 10^3 UFC/mL.

b.4 - Preparo da amostra: a partir do extrato fluido da *Curcuma zedoaria* (1.000mg/mL) foram preparadas soluções contendo 500mg/mL, 200mg/mL e 100mg/mL.

b.5 - Preparo do líquido extrator: o líquido extrator utilizado na preparação do extrato fluido da *Curcuma zedoaria* foi diluído em solução salina 0,9% p/v estéril, da mesma forma que o extrato fluido.

b.6 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato fluido da *Curcuma zedoaria* – Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI): a inoculação dos microrganismos foi feita juntamente com o meio de cultura líquido, transferindo-se 0,1mL da suspensão microbiana contendo 10^3 UFC/mL para tubos contendo 9mL de caldo caseína soja, separados em séries de 3 tubos.

A cada série foram transferidas alíquotas de 1mL de cada uma das soluções em teste (I a V). Após homogeneização, todos os tubos utilizados na avaliação da concentração mínima inibitória para bactérias foram incubados a 30-35°C por 24 horas, e os tubos utilizados na avaliação para fungos foram incubados a 20-25°C por 120 horas, quando foi efetuada observação macroscópica do crescimento microbiano.

I – Amostra

Em uma 1ª série, foram transferidas alíquotas de 1mL do extrato fluido puro; na 2ª série, alíquotas de 1mL do extrato na concentração de 500mg/mL; na 3ª série, alíquotas de 1mL do extrato fluido na concentração de 20mg/mL

e na 4ª série, alíquotas de 1mL do extrato na concentração de 100mg/mL. Desta forma, as concentrações do extrato fluido testadas foram 100mg/mL, 50mg/mL, 20mg/mL e 10mg/mL.

II – Líquido extrator

Para verificar a influência do líquido extrator empregado na elaboração do extrato fluido (álcool a 70°) nos resultados obtidos, alíquotas de 1mL de cada uma das diluições do líquido extrator foram transferidas para séries de tubos inoculados.

III – Diluente (solução salina 0,9% p/v estéril)

Alíquotas de 1mL do diluente foram transferidas para uma série de tubos, para verificar se o diluente não apresenta atividade antimicrobiana e, portanto, não interfere no resultado obtido.

IV – Controle positivo

Para controle positivo, foi utilizada uma série de tubos de meio de cultura líquido inoculado.

V – Controle negativo

Para o controle negativo, foi utilizada uma série de tubos de meio de cultura líquido inoculado, onde foram transferidas alíquotas de 1mL de solução padrão de griseofulvina e em outra, alíquotas de 1mL de solução padrão de fluconazol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A - Amostras

TABELA I
Concentração mínima inibitória dos microrganismos testados

Microrganismo	Concentração mínima inibitória
Fungos	
<i>Aspergillus niger</i>	20mg/mL
<i>Candida albicans</i>	20mg/mL
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	20mg/mL
Bactérias	
<i>Escherichia coli</i>	100mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100mg/mL
<i>Salmonella choleraesuis</i>	100mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	20mg/mL

B – Líquido extrator

Apresenta ação antimicrobiana somente quando utilizado não diluído.

C – Diluente (solução salina 0,9% p/v estéril)

Nenhum tubo apresentou crescimento microbiano.

D – Controle Positivo

Todos os tubos apresentaram crescimento microbiano.

E – Controle Negativo

Nenhum tubo apresentou crescimento microbiano.

Existem inúmeros fatores que predispoem às dermatofitoses, e também, à candidíase. Entre os principais podem ser citados a AIDS, pós-operatórios, administração prolongada de antimicrobianos, quimioterapia, doenças hematológicas malignas, queimaduras, além de ou-

tros. A candidíase superficial pode ocorrer em pele, cabelo, unhas e membranas mucosas. O *Tricophyton mentagrophytes* ocorre com frequência em *tinea pedis*, *barbae* e *corporis* sendo muito observado em pacientes imunodeprimidos. *Aspergillus niger* é um dos microrganismos responsáveis pela otomicose. A utilização de medicamentos alternativos de uso tópico, que contenham o extrato da *Curcuma zedoaria*, aos convencionais empregados para manifestações causadas pelos microrganismos objeto de estudo poderão se constituir em opções viáveis quanto à efetividade do efeito terapêutico, além de serem, economicamente, mais acessíveis.

O extrato fluido da *Curcuma zedoaria* apresenta possibilidade de ser utilizado como alternativa terapêutica como antifúngico de uso tópico em micoses produzidas pelos fungos testados. Sua ação antibacteriana é mais efetiva, entretanto, contra o *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- Benigni, R., Capra, C., Cattorini, P.E. *Piante medicinale – chimica, farmacologia e terapia*. II. vol., Milano: Inverni & Della Beffa, 1964. p. 1.805-1806.
- Coimbra, R., Silva, E.D. *Notas de fitoterapia*. Rio de Janeiro: L.C.S.A., 1958, p.369.
- Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte 1.
- Farmacopéia dos Estados Unidos Do Brasil. 2ª ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.
- Guenther, E. *The essential oils*. New York: D. Van Nostrand Co., 1952. v.5, p.125-6.
- Gupta, S.K., Banerjee, A.B., Achari, B. Isolation of ethyl p-methoxynamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. *Lloydia*, 39:4, 218-222, 1976.
- Kato, E.T.M., Fischer, D.C. Comparative pharmacognosy on the rhizome and root of *Curcuma zedoaria* (Bergius) Roscoe: crude drug, essential oil and fluid extract. *LECTA*, 14:2, 9-26, 1996.
- Matsuda, H., Ninomiya, K., Morikawa, T., Yoshikawa, M. Inhibitory effect and action mechanism of sesquiterpenes from zedoariae rhizoma on D-galactosamina/lipopolysaccharide-induced liver injury. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8:4, 339-344, 1998.
- Phan, M.G., Van, N.H., Phan, T.S. Chemical composition of the extract from rhizomes of *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. Study of sesquiterpenoids. *Hoa Hoc Cong Nghiep Hoa Chat*, 4, 9-11, 1997.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 35, 275-283, 1992.
- Shibuya, H., Yoshihara, M., Kitano, E., Nagasawa, M., Kitagawa, I. Qualitative and quantitative analysis of essential oil constituents in various zedoariae rhizoma (gajutsu) by means of gas liquid chromatography mass spectrometry. *J. Pharm. Soc. Japan Yakugaku Zasshi*, 106, 212-216, 1986.
- Steiner, R.P. *Folk medicine. The art and the science*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1986. p.197.
- The Indian materia medica. Bombay: K.M. Nadkarni, 1927. p.279-80.
- Tonnesen, H.H., Karlsen, J. High performance liquid chromatography of curcumin and related compounds. *J. Chromat.*, 259, 367-371, 1983.
- Wadt, N.S.Y. Ohara, M.T., Sakuda-Kaneko, T.M., Bacchi, E.M. Atividade antimicrobiana de *Leonurus sibiricus* L. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 5:2, 167-174, 1996.
- Yamamoto, C.H., Consiglieri, V.O., Brada, M.V.L., Chaves, P.H.C., Gianoto, E.A. Atividade antimicrobiana do extrato de *Mikania smilacina* DC. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2/3/4, 62-66, 1987/1989.
- Yamara, J., Matsuda, H., Sawada, T., Kushida, H., Shibuya, H., Kitagawa, I. Effect of crude drugs on experimental liver damages. I. The active principle of zedoariae rhizome. *J. Pharm. Soc. Jap. Yakugaku Zasshi*, 102:3, 306-309, 1982.