

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE IN VITRO DO EXTRATO VEGETAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

Geovanni Pereira Mitre¹; Felipe José Almeida Loureiro¹; Maria Sueli da Silva Kataoka²; João de Jesus Viana Pinheiro²; Tatiany Oliveira de Alencar Menezes²

¹Graduação, ²Doutorado
Universidade Federal do Pará (UFPA)
felippeloureiro@gmail.com

Introdução: A busca de novas substâncias com propriedades medicinais tem sido constantemente realizada e possui nas espécies vegetais sua principal fonte de obtenção. A partir da extração de óleos vegetais e seus estudos, propriedades como atividade antimicrobiana e antifúngica são constantemente descritas; achados que são valiosos para que novas opções de tratamento sejam estabelecidas. *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecida como cravo-da-índia, é uma espécie que possui destaque quanto a propriedades fitoterápicas. Apresenta ação antibacteriana, antiinflamatória e importante ação antifúngica. Associado ao estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, a avaliação da citotoxicidade é o passo seguinte para o estabelecimento de um composto que possa vir a ser uma opção terapêutica, de origem natural, mais acessível e com menos efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos. O sistema biológico mais utilizado para testes de toxicidade in vitro é o cultivo celular, constituindo um valioso instrumento para observar a reação celular em relação a diversos materiais e substância. **Objetivos:** Avaliar a atividade antifúngica, antibacteriana e citotoxicidade in vitro do extrato vegetal de cravo-da-índia. **Métodos:** A atividade antifúngica e antibacteriana foi realizada por meio do método de difusão em meio sólido. Os microorganismos (*Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultivo ágar Sabouraud, sendo em seguida adicionados discos de papel (6mm) impregnados com o extrato vegetal. As placas foram incubadas por 48h e posteriormente realizou-se a leitura dos halos de inibição. Para a citotoxicidade, fibroblastos gengivais foram semeadas numa densidade de 3×10^3 células por poço, em placas de cultivo de 96 poços e mantidas por dois dias em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, para adesão e proliferação celular. Estas foram então expostas ao extrato vegetal nas diferentes proporções de 1 µL/ml; 2,5 µL/ml; 5 µL/ml; 7,5 µL/ml; 10 µL/ml e como controle utilizou-se meio de cultivo. Para verificação da viabilidade celular foi aplicado o ensaio do MTT que se baseia na conversão deste sal em cristais de formazam (insolúvel em água e de coloração púrpura) pela atividade mitocondrial das células viáveis. Deste modo, após a exposição ao extrato vegetal removeram-se as soluções testadas e adicionou-se a solução de MTT a 5 mg/mL em meio de cultivo, incubando as células por 4 horas para a atividade da enzima succinato-desidrogenase presente nas mitocôndrias das células metabolicamente ativas. Após esse período, a solução foi removida e os cristais de formazam foram solubilizados com DMSO. Em seguida a placa foi levada ao leitor ELISA para quantificação fotométrica da absorbância, utilizando o software Microplate Manager e adotando o filtro de medição com 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores numéricos obtidos por meio da análise realizada no leitor de absorbância determinaram uma média da atividade mitocondrial (metabolismo celular). **Resultados e Discussão:** Foi observado que os microorganismos se mostraram sensíveis aos compostos presentes no extrato, apresentando, no teste, halos de inibição de 25, 22 e 17 mm para *C. albicans*, *E. Coli* e *S. Aureus*, respectivamente. O percentual de viabilidade celular em todas as concentrações testadas, em comparação ao controle, apresentaram valores acima de 50%. Frente à possibilidade de novas opções de tratamento para

combater infecções, a obtenção de novos compostos de origem vegetal se mostra uma alternativa frente à latente resistência antibiótica e como uma aliada no tratamento de doenças. Além de possuir definidas propriedades medicinais, o extrato de *Syzygium aromaticum*, nas concentrações testadas, não foi citotóxico. A utilização desses compostos na medicina tradicional ao longo dos anos faz a receptividade do fármaco seja maior na população e por serem de origem natural, espera-se que seu custo seja menor do que os medicamentos sintéticos. A possibilidade de novos mecanismos de ação é outra importante vantagem que os fitoterápicos possuem, para que sejam associados a tratamentos onde os fármacos tradicionais não estejam agindo de forma eficiente. Um importante grupo de pacientes beneficiados pelas propriedades do óleo de *S. aromaticum* são os pacientes HIV+, que apresentam infecções oportunistas. Dentre estas infecções a manifestação de *C. albicans* é muito prevalente, com sítio comum na cavidade oral. Pesquisas já demonstram a capacidade fungicida do extrato de *S. aromaticum* sobre cepas desta espécie. O que justifica também a utilização de fibroblastos gengivais, que são células comumente utilizadas em ensaios de citotoxicidade, além de serem componentes do tecido conjuntivo da mucosa onde ocorre com grande prevalência estas infecções. O óleo essencial desta espécie é uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, com propriedades de odor e sabor característicos e consistência oleosa, que apresenta como componente majoritário o eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol. O β -Cariofileno e o Acetato de eugenol são outros componentes presentes com porcentagem considerável na mistura. O eugenol geralmente representa 60 a 80% do volume do óleo essencial. Estudos realizados com o eugenol demonstram que este possui atividade antimicrobiana em baixas concentrações, com Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) que variam de 0.1 a 1 μ l/ml para microrganismos da cavidade oral, como *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *E. fecalis*. Concentrações estas que são menores que as que foram testadas para citotoxicidade. **Conclusão:** O extrato vegetal apresentou atividade antimicrobiana sobre os microorganismos e o teste de citotoxicidade demonstrou que o extrato bruto de cravo-da-índia não teve ação citotóxica sobre fibroblastos gengivais.

Referências:

1. Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *Eur J Dent* 2013;7:71-7.
2. Dwivedi V, Shrivastava R, Hussain S, Ganguly C, Bharadwaj M; Comparative Anticancer Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) - an Indian Spice - Against Cancer Cell Lines of Various Anatomical Origin; 2011;12:89-93.
3. Pinto, E. et al; Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 2009;58(11):1454-62.
4. Reichling, J. et al; Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview *Forsch Komplementmed.* 2009; 16(2):79-90.
5. Rojas, J. et al. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *J Trop Biomed.* 2004;4(2):90-96.