

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO JAMBOLÃO (*SYZYGIUM CUMINI*), ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR

MARIANA LUIZA SILVA DE LIMA <sup>1\*</sup>  
PAULA MARIA BARCELLOS <sup>1</sup>  
RAFAELA DE OLIVEIRA JUNQUEIRA<sup>1</sup>  
GILMÁRCIO ZIMMERMANN MARTINS<sup>2</sup>  
FÁBIO OLIVIERI DE NOBILE<sup>3</sup>  
CÁTIA REZENDE<sup>4</sup>

1. Discente do curso de Farmácia do UNIFEB, Barretos, SP
2. Docente da disciplina de Farmacognosia do Curso de Farmácia do UNIFEB, Barretos, SP.
3. Docente da disciplina de Nutrição de Plantas do Curso de Agronomia do UNIFEB, Barretos, SP
4. Docente da disciplina de Microbiologia Clínica do Curso de Farmácia do UNIFEB, Barretos, SP

Autor responsável: M.L.S.Lima. E-mail:maluiza.lima@gmail.com

## RESUMO

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido pesquisada em diversas espécies. O uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado no tratamento terapêutico. O Jambolão (*Syzygium cumini*) é uma planta da família *Myrtaceae*, oriunda da Índia oriental, e suas folhas são ricas em taninos e saponinas.

O objetivo desse estudo foi o de avaliar a possibilidade de efeito antimicrobiano de extrato hidroalcoólico das folhas do jambolão (*Syzygium cumini*). Utilizaram-se 3 cepas bacterianas, Gram positiva e Gram negativa. A avaliação da atividade antimicrobiana foi através da inoculação da placas Mueller Hinton com inóculo bacteriana de 0,5 McFarland, onde foram perfurados 5 poços em cada placa, onde se depositaram 3 concentrações diferentes do extrato de jambolão, 1 controle positivo e um controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O extrato apresentou atividade antimicrobiana em 2 bactérias testadas.

O desenvolvimento de novos testes químicos, farmacológicos e clínicos realizados com *Syzygium cumin*, pode contribuir muito com a pesquisa de novos antimicrobianos de origem vegetal, pois o jambolão demonstrou um potencial terapêutico.

**Palavras-chave:** Jambolão. Antimicrobiano. Difusão. Poços

## ABSTRACT

The antimicrobial activity of medicinal plants has been investigated in several species. The use of plant extracts and phytochemicals of antimicrobial activity may acquire meaning in the therapeutic treatment. The jambolan (*Syzygium cumini*) is a family plan *Myrtaceae*, originated in eastern India, its leaves are rich in tannins and saponins. The aim of this study was to evaluate the possibility of antimicrobial effect of hydroalcoholic extract of leaves of jambolan (*Syzygium cumini*). We used three strains of bacteria, Gram positive and Gram negative. The antimicrobial activity was by inoculation of Mueller Hinton plates with bacterial inoculum of 0.5 McFarland, where five wells were drilled in each plate, where they deposited three doses of extract jambolan, a positive control and a negative control. The plates were incubated at 37° C for 24 hours. The extract showed antimicrobial activity in two bacteria. The development of new chemical tests, pharmacological and clinical studies with *Syzygium cumin*, can contribute greatly to the search for new antimicrobials of plant origin, as the jambolan demonstrated a therapeutic potential.

**Keywords:** Jambolan. Antimicrobial. Diffusion. Wells.

## INTRODUÇÃO

Apesar de as indústrias farmacêuticas produzirem um número expressivo de antimicrobianos nas últimas décadas, o problema da resistência microbiana é crescente e considerado de saúde pública. Agregado a este fato, é incerto a perspectiva futura de novas drogas. Torna-se urgente adotar medidas de controle do uso de antibióticos e pesquisar novas drogas, sintéticas e naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, através de substâncias ativas, sintetizadas pelo metabolismo secundário da planta (NASCIMENTO et al., 2000; LOGUERCIO, 2005). Sendo assim, inúmeros estudos são desenvolvidos na tentativa de comprovar a eficácia da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitoquímicos, para que possa futuramente ter significado terapêutico (DJIPA et al., 2000; FERESIN et al., 2001; KHAN et al., 2001; RAMESH et al., 2002).

A *Syzygium cumini* é uma planta da família *Mirtaceae*, popularmente conhecida como jambolão, oriunda da Índia oriental e bastante conhecida na medicina popular indiana e paquistanesa por seus efeitos hipoglicemiantes (PRINCE et al., 1998). Tem como sinônimia os nomes de *Eugenia jambolana* (Lam.), *Myrtus cumini* L., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC e *Eugenia cumini* Druce (MARCHIORI & SOBRAL, 1997).

De acordo com os costumes regionais, no Brasil, é comum a utilização do suco dos frutos e chá de suas folhas por pacientes diabéticos devido ao efeito anti-hiperglicêmico. Além dessa propriedade, é anti-inflamatório, antimicrobiano, adstringente, diurético. Sua casca também pode ser utilizada no tratamento de aftas, de estomatites, de afecções de garganta e de outras doenças orais (DJIPA et al., 2000; DORMAN & DEANS, 2000; SOARES et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2000; SHAFI et al., 2002).

As folhas do jambolão são ricas em taninos com mecanismo de ação antimicrobiana. As principais hipóteses desse mecanismo são: inibição de enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; ação sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e complexação com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Agentes antimicrobianos oriundos de plantas podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos clinicamente importantes, sendo sugeridos como uma nova opção na terapêutica de infecções, melhorando o prognóstico do paciente (MOURA et al, 2006).

Substâncias antimicrobianas de plantas são detectadas, principalmente, por meio da observação de sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos expostos a estes compostos; os resultados são influenciados pela técnica desenvolvida e pelos microrganismos padrões utilizados (HENTZ, 2007).

Segundo VITAL et al. 2004 a determinação da atividade antimicrobiana é uma análise microbiológica *in vitro* essencial na avaliação de substâncias antimicrobianas pelas indústrias farmacêuticas. A técnica de difusão em ágar, descrita por Bauer e colaboradores em 1966, está entre as técnicas mais empregadas no controle de qualidade microbiológico.

Devido à contínua necessidade de se descobrir novos fármacos com atividade antimicrobiana associado ao fato do jambolão (*Syzygium cumini*) ser um vegetal popular em nossa região, pretendeu-se verificar a atividade antimicrobiana do mesmo através da técnica de difusão em poços com o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp, importantes bactérias na comunidade e ambiente hospitalar e confirmar a reprodutibilidade da técnica empregada, através da comparação com dados da literatura.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Caracterização Vegetal:** Foram usadas folhas secas de *Syzygium cumini* obtidas no Sítio Bom Sucesso na cidade de Viradouro, São Paulo, colhidas em 15/09/2010 e caracterizadas pelas características organolépticas, como odor e sabor e identificação macroscópica: folhas opostas, cálice com limbo quase inteiro ou lobado.

**Preparação de Extrato Hidroalcoólico:** Cerca de 166,5 g de folhas secas do vegetal foram trituradas utilizando o moinho de facas, originando um pó verde. Metade da massa foi transferida para dois Erlenmeyers com 1,8L de solução hidroalcoólica 96,4% (Iraja®), iniciando-se o processo de maceração. Após 7 dias, o sobrenadante foi filtrado com papel filtro (CAAL®), porosidade igual a 6.00 micra, obtendo-se um extrato hidroalcoólico de coloração verde escuro. Submeteu-se o filtrado ao roto-evaporador com pressão reduzida em temperatura de aproximadamente 60 °C, para a evaporação do solvente. Todo material foi encaminhado à estufa a 45 °C para o processo de secagem. Após a etapa de secagem, a amostra consistiu em uma pasta de coloração esverdeada totalizando 30 g com rendimento de 18,1%. Retirou-se todo etanol para evitar que sua atividade bacteriostática mascarasse propriedades antimicrobianas do

extrato vegetal. Três concentrações do extrato foram padronizadas para o ensaio de difusão: 100mg/mL, 200mg/mL e 300mg/mL.

### Avaliação da Atividade Antimicrobiana

**Microrganismos Indicadores:** Três cepas ATCC foram utilizadas nos ensaios de sensibilidades, por apresentarem estabilidades genéticas e recomendadas para a monitorização, sendo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 E *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (SEJAS et al., 2003).

**Método de difusão em ágar:** o ensaio foi realizado em triplicata com base na técnica em camada dupla em ágar (GROVE & RANDALL, 1955), para que a fidedignidade fosse mantida e impedir interferências ou manipulação dos resultados ocorressem. Placas de Petri 150 X 10 mm, contendo 25 mL de ágar Mueller Hinton (HIMEDIA®). Suspensões bacterianas (cepas ATCC) foram padronizadas com 0,5 da escala de MacFarland, em 2,5 mL de caldo Mueller Hinton. Em seguida, o volume total da suspensão foi misturado com 12,5 mL de ágar Mueller Hinton, previamente esterilizado, em temperatura de 50°C. A mistura foi vertida na placa de Petri, contendo uma camada de ágar Mueller Hinton. As placas foram deixadas em temperatura ambiente para gelificação da camada superior de ágar. Posteriormente, com canudos de plásticos estéreis foram realizados orifícios de 6 mm de diâmetro. Nos poços identificados, depositaram-se 40 µL dos controles positivo e negativo e de extrato com as concentrações padronizadas. Os controles positivos utilizados foram: estreptomicina 0,1 mg/mL, sulfato de polimixina B 0,02 mg/mL e penicilina G 0,1 mg/mL. O controle negativo consistiu de água destilada estéril.

As placas permaneceram a temperatura ambiente por 2 horas, para a absorção das soluções dispensadas nos poços. Papel de filtro, na tampa da placa, foi utilizado a fim de evitar a formação de água de condensação. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 ° C, observou-se a formação dos halos de inibição, que foram medidos. Esses valores foram comparados com as medidas do halo de inibição do controle positivo e através do resultado sugeriu-se a presença ou ausência da atividade antimicrobiana.

### RESULTADOS

As concentrações do extrato de *Syzygium cumin* analisadas pelo método padronizado de difusão em poços provocaram a inibição microbiana pela constatação da formação dos halos de inibição ao redor dos poços onde foram dispensadas. Estes dados estão apresentados na Tabela 1.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que houve atividades do extrato dos extratos frente aos microrganismos ATCC testados.

O controle negativo não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados e controle positivo demonstrou inibição aos microrganismos conforme esperado.

Houve diferença significativa entre as medidas dos halos observados nas concentrações de 100mg/mL, 200 mg/mL e 300 mg/mL, aumento proporcional à concentração crescente do extrato de *Syzygium cumin*.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que em todas as bactérias estudadas o extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumin* se mostrou eficaz em todas as concentrações testadas.

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumin* pelo método de difusão em Agar-técnica de poço (well) Tabela 1.

|                                 | Média das Medidas do Halo de Inibição |          |           |           |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------|-----------|-----------|
|                                 | Concentração do extrato               |          |           |           |
| Bactérias                       | Controle positivo                     | 100mg/mL | 200 mg/ML | 300 mg/mL |
| <i>E.coli</i> ATCC 25922        | 15 mm <sup>1</sup>                    | 18 mm    | 24 mm     | 26 mm     |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923     | 18 mm <sup>2</sup>                    | 19 mm    | 23,7 mm   | 29 mm     |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27833 | 13,4 mm <sup>3</sup>                  | 17,3 mm  | 20,3 mm   | 21,3 mm   |

Controles (+): média de três ensaios, soluções de controle de antibióticos: (1) Estreptomicina, (2) Penicilina G, (3) Polimixina B.

## DISCUSSÃO

A resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos é um problema de saúde pública mundial, requerendo não somente a pesquisa e o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também de novos protocolos para o tratamento de infecções bacterianas (CUNICO et al, 2004).

A Farmacopéia Brasileira (1988) normatiza os parâmetros de análise aos diversos antimicrobianos, sendo indicada a técnica de difusão em ágar.

Outros autores preconizam a técnica de difusão em poços ou papel de disco na avaliação de atividades antimicrobianas. Loguercio e colaboradores (2000) utilizaram o método de difusão em disco, para determinar a atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini*).

Cunico e colaboradores (2004) utilizaram o método de difusão em ágar de Kirby-Bauer, com discos estéreis impregnados com 10 mL de etanol, 10 mL do extrato bruto de etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana*.

Silva e colaboradores (2009) utilizaram o método de difusão em disco para avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Anacardium occidentale*.

Malinowski e colaboradores (2007) aplicaram o método de difusão com perfuração de poços para avaliar o perfil antimicrobiano dos extratos aquosos e hidroalcoólico de folhas de *Artemisia vulgaris*.

Loguercio e colaboradores (2005) utilizaram o método de difusão em disco, para avaliar a atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini*) demonstrando atividade antimicrobiana.

De acordo com Oliveira (2005), a comparação entre a medida do halo de inibição dos controles positivos e as das soluções testadas não é aplicável, uma vez que existem variáveis não controladas relacionadas à capacidade de difusão do extrato da planta avaliada, podendo sugerir atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana demonstrada pelo extrato hidroalcoólico de Jambolão (*Syzygium cumini*), levando a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, nas concentrações padronizadas, pode ser atribuída à composição química da planta (taninos, saponinas, glicosídeos, peptídeos e terpenóides) (OLIVEIRA, 2005).

Estudos semelhantes, com extrato aquoso e alcoólico (95%), demonstraram inibição em concentrações variáveis contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e a maioria das Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*) (CHATTOPADHYAY, SINHA E VAID 1998).

Loguercio e colaboradores (2005), utilizando o método de difusão em disco, demonstraram atividade tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas, com maior destaque em relação às primeiras.

LOGUERCIO et al. (2005), com a mesma técnica descrita, utilizando óleos essenciais extraídos das folhas de jambolão e outras espécies do gênero encontraram valores próximos aos apresentados neste trabalhos e em outros estudos, utilizaram cepas ATCC de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurum*. Três bactérias testadas foram as mesmas deste trabalho, sendo que os resultados coincidiram para *E. coli* e *P. aeruginosa*, o que se demonstra reprodutibilidade do experimento.

Com base neste resultado e de outros estudos, as inibições ocasionadas pelo extrato de jambolão nas concentrações testadas frente aos microrganismos, não confirma a atividade antimicrobiana *in vivo*. Entretanto, para esse fim, pesquisas buscando correlacionar concentrações inibitórias mínimas (CIM), toxicidade e outros parâmetros se fazem necessário.

Nas regiões tropicais, especialmente o Brasil, existem uma vasta diversidade de plantas medicinais, com possibilidade de geração de uma relação custo-benefício menor à população, promovendo saúde a partir de plantas. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de novos testes químicos, farmacológicos e clínicos realizados com *Syzygium cumin*, pode contribuir muito com a pesquisa de novos antimicrobiano de origem vegetal.

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste estudo, o extrato hidroalcoólico das folhas de jambolão (*Syzygium cumin*) na avaliação antimicrobiana, utilizando o método da difusão em ágar – poço, apresentou atividade antibacteriana em relação a três cepas bacterianas testadas, o qual permite sugerir que o extrato hidroalcoólico possui uma perspectiva potencial de estudos futuros para melhor descrição das substâncias encontradas na planta, com vista em um uso racional. Além disso, a técnica empregada neste estudo apresentou resultados condizentes com da literatura, demonstrando ser reprodutível e confiável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B. K.; VAID, L. K. Antibacterial activity os Suzugium species. *Fitoterapia*, v.69, n.4, p.356-367, 1988.
- CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 14, n. 2, p.97-103, 2004.

- DIJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; LECLERCQ, J.Q. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, v.72, n. 1-2, p 307-313, 2000.
- DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J.Appl Microbiol.*, v. 88, n.2.p. 308-316, 2000.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia, 1955.
- HENTZ, S. M; SANTIN, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. *Evidência*, v. 7, n. 2, p. 94, 2007.
- LOUGUERCIO, A. P.; BATISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, v. 35, n.2, p.373, 2005.
- MALINOWSKI, L. R. L.; ROSA, E. A. R.; PICHETH, C. M. T F.; CAMPELO, P. M. S. Atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e hidro-alcoólico de folhas de *Artemisia vulgaris*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88(2), p. 64, 2007.
- MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. Deondrologia das angiospermas murtales. Santa Maria:Universidade Federal do Matogrosso do Sul. 1997.
- MOURA, C. L. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubiginosa* e *Pfaffia glomerata* em microrganismos da cavidade bucal. 2006. 17 p. Dissertação da Pós Graduação em Promoção de Saúde de Universidade de Franca.
- OLIVEIRA, G. F. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas do Jambolão (*Syzygium cumini*). 2005. 73 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Promoção a Saúde) Universidade de Franca-Unifran, Franca.
- SILVA, A. B.; MONTEIRO, L. T.; GALDINO, R. M. N. Atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Anacardium occidentale* Linn. 2009. 1 p. Dissertação (IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão)Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE-Pernambuco.
- VITAL, T. M.; REIS, C.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A.; CUNHA, L. C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.2, p. 219-227, 2004.