

## Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos da planta *Pothomorphe Umbellata umbellata* sobre bactérias comumente encontradas em infecções dentais

### In Vitro evaluation of antimicrobial action by extracts of *Pothomorphe umbellata* on microorganisms associated to human tooth infections

Soares, Y. O.; Marques, A. A. F.;

\*Sponchiado Júnior, E. C

Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas. Av. Ministro Waldemar Pedrosa 1539, Praça 14, 69000-000, Manaus, AM, Brasil

### Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade antimicrobiana *in vitro*, pelo teste de difusão em Agar, de três partições do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata*: as frações hexânica, butanólica e acetato de etila sobre cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29210), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), freqüentemente encontrado em infecções dentais. As bactérias foram incubadas separadamente por 24 horas a 37 °C e em seguida suas concentrações foram ajustada na equivalência a escala 1 de Mac Farland. Após a diluição 1:10 as bactérias foram semeadas sobre placas de Petri e discos de papel absorvente previamente esterilizados foram embebidos nas diferentes frações a serem testadas e distribuídos sobre as placas. A leitura dos halos de inibição foi realizada após incubação por 24 horas a 37°C, os dados em milímetros foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico. Os resultados demonstraram que a fração hexânica inibiu somente o crescimento das bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli*, a fração butanólica inibiu somente o crescimento das bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e a fração acetato de etila inibiu todas as cepas testadas com exceção da *E. coli*.

### Abstract

This study aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial effectiveness of three solvent partitions of the crude extract of *Pothomorphe umbellata*: hexane, butanol and ethyl acetate fractions on the strains of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29210), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 10536) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) often found in dental infections. The antimicrobial activity was evaluated by testing for dissemination in agar. Bacteria were first incubated separately for 24 hours at 37 °C, and then their concentra-

\*Correspondência:

E-mail: spemilio@yahoo.com.br

**Unitermos:** Piperaceae, *Pothomorphe umbellata*, *Enterococcus faecalis*, Biotecnologia.

**Key Words:** Piperaceae, *Pothomorphe umbellata*, *Enterococcus faecalis*, Biotechnology.



tions were adjusted to the equivalence scale 1 of MacFarland. After dilution 1:10 the bacteria were grown on Petri dishes. Discs of previously sterilized paper towels were embedded in the different fractions and distributed on the plates. The reading of halos of inhibition was achieved after incubation for 24 hours at 37 °C. The data in millimeters were not subject to statistical parametric test. The results showed that the hexane fraction only inhibited the growth of bacteria *P. aeruginosa* and *E. coli*, the butanol fraction inhibited the growth of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, and ethyl acetate fraction inhibited all strains tested with the exception of *E. coli*.

## Introdução

Recentemente, a demanda por produtos fitoterápicos para fins preventivos e terapêuticos tem aumentado, fazendo com que as plantas tenham se tornado um crescente objeto de estudo para validação de eficácia terapêutica e segurança de uso, em uma ampla gama de modelos farmacológicos. Uma planta medicinal muito utilizada popularmente na região norte do país é a *Pothomorphe umbellata*. O gênero *Pothomorphe* é constituído de um número pequeno de espécies. Diversos autores acreditam que o número de espécies deste gênero não ultrapasse a meia dezena (YUNKER, 1960). No Brasil ocorrem duas delas. *Pothomorphe umbellata* e *Pothomorphe peltata*, ambas conhecidas pelos nomes vulgares de pariparoba e de caapeba e empregadas pelo povo no tratamento de diversas enfermidades, por suas atividades coleréticas, colagogas, gástricas, antiepiléptica, tratamentos de diabetes e tratamento de doenças do fígado (SPONCHIADO JR et al. 2007). Estas espécies têm sido estudadas quanto a algumas atividades farmacológicas, tais como antiedema, anti-PAF (Fator de Agregação Plaquetária), analgésica e antiulcerogênica (FASCINELLI et al., 1999), anti-malária (FERREIRA CRUZ et al., 2000), antioxidante (BARROS et al., 1996) e atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis* (SPONCHIADO JR et al. 2006). A seleção da planta *Pothomorphe umbellata* foi baseada nos resultados disponíveis referentes a algumas atividades farmacológicas, tais como ação anti-edema, anti-PAF (antiagregação plaquetária), analgésica e antiulce-

rogênica (FASCINELLI et al., 1999), antimalária (FERREIRA DA CRUZ et al., 2000), antioxidante (BARROS et al., 1996) e antimicrobiana (MONGELLI, 1995; PILLA, 2005; SPONCHIADO JR et al., 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade antimicrobiana *in vitro* de três partições do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata*: frações hexânica, butanólica e acetato de etila sobre cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29210), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), freqüentemente encontradas em infecções dentais.

## Material e Métodos

**Seleção e preparo do inóculo:** Os microrganismos utilizados foram: *E. faecalis*, obtido da *American Type Culture Collection* (ATCC 29210), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os microrganismos foram doados pelo Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas. Foram inoculados 100 µL de cada bactéria, separadamente, em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), previamente esterilizado a 121°C por vinte minutos. O tubo contendo a cepa foi incubado a 37 °C por 24 horas e, após esse período, a diluição foi ajustada ao tubo 1 da escala de MacFarland, correspondendo a uma concentração de  $3 \times 10^8$  células/mL.

**Teste de difusão em Ágar:** As frações resultantes das partições da tintura de *P. umbellata* foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Primeiramente, foram preparadas as amostras a serem analisadas por meio da dissolução de 10 mg de cada fração em 1 mL de propilenoglicol. Conforme descrito anteriormente, os inóculos preparados foram semeados sobre placas contendo meio sólido de Müller Hinton. Os discos de papel absorvente de 5,0 milímetros de diâmetro, esterilizados, foram colocados em pontos equidistantes na placa de Petri, e sobre cada disco foram dispensados 0,5 mL das respectivas frações. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A amostra controle será o disco embebi-

do em propilenoglicol utilizado isoladamente. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e em triplicata. A leitura das placas foram feitas por meio da análise do halo de inibição do crescimento bacteriano. As atividades antimicrobianas das frações foram mensuradas pela média dos experimentos, em milímetros.

## Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que a fração hexânica inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* e *E. coli*. A fração butanólica inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Já a fração acetato de etila inibiu todas as cepas testadas, com exceção da *E. coli* (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1 - Inibição induzida pelas frações de *P. umbellata* no teste de difusão em ágar**

Bactérias	Valor médio do halo de inibição (mm)		
	Fração metanólica	Fração butanólica	Fração acetato de etila
<i>S. aureus</i>	0	9,0	7,6
<i>E. faecalis</i>	0	1,3	9,6
<i>P. aeruginosa</i>	2,2	8,8	7,3
<i>E. coli</i>	6,0	0	0

**Figura 1 – Amostra do halo de inibição da fração acetato de etila contra a bactéria *E. faecalis*.**





Para avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de folhas de *P. umbellata*, foram empregados os testes de difusão em Agar. Este ensaio é amplamente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas nas pesquisas odontológicas (GENTIL et al., 2006), pois possui as vantagens de ser eficiente em detectar a atividade antimicrobiana de substâncias que tenham a capacidade de se difundir no meio de cultura, ser de baixo custo, e a técnica, além de reprodutível, é relativamente simples de ser realizada, dispensando equipamentos complexos para a análise dos resultados (VIANNA et al., 2005).

No presente estudo, o teste de difusão em ágar mostrou que a fração acetato de etila apresentou maiores halos de inibição quando comparada às frações hexânica e butanólica. A atividade antimicrobiana da fase acetato de etila de *P. umbellata* pode estar relacionada à presença de algumas substâncias já isoladas, pertencentes a várias classes de metabólitos secundários. Bergamo (2003) realizou o estudo fitoquímico das folhas de *Pothomorphe umbellata*, produzindo três frações a partir do extrato bruto, sendo elas: hexânica, metanólica e acetato de etila. Este estudo resultou no isolamento de onze substâncias, entre as quais as amidas arboreumina e arboreumina glicosilada, cinco flavonas (vitexina 2''-O-β-D-glucopiranosídeo, orientina 8-C orientina 8-C-β-D-glucopiranosídeo, 5-hidróxi-7,3',4'-trimetoxi-flavona e velutina), duas lignanas (sesamina e diidrocubequina), um fenilpropanóide (ácido p-cumárico), além do 4-nerolidilcatecol. Em particular, na fração acetato de etila foram isoladas três substâncias de caráter ácido, sendo elas: amida, C-glicosilflavonas e ácido p-cumarínico. Provavelmente alguns destes compostos desempenham um papel na atividade inibitória do crescimento de *E. faecalis* constatada em nosso trabalho, porém as correlações da eficácia com constituintes definidos da planta requereriam a aplicação de outras técnicas, como por exemplo, a bioautografia e a cromatografia. Contudo, os resultados preliminares obtidos dão suporte à continuidade do estudo, no sentido de evidenciar a correlação dose-efeito dos constituintes que exibem atividade antimicrobiana; bem como projetar os estudos farmacotécnicos que permitam o preparo de uma formulação ideal para ser utilizada com segurança e eficácia em tratamentos de dentes infectados.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelo auxílio financeiro.

## Referências

- BARROS, B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E.; MOREIRA, J.A.J.; ISHII, I.F.; FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Pariparoba). *Ciência e Cultura*, v. 48, n. 1-2, p. 114-116, 1996.
- BERGAMO, D.C.B. Avaliação química dos compostos não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcatecol em *Pothomorphe umbellata*. Araraquara, 146p. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2003.
- FASCINELLI, M.L.; GONZALEZ, F.G.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Estudo das atividades analgésica e antiulcerogênica de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.. In: Jornada Paulista De Plantas Mediciniais, v.4, Ribeirão Preto, 1999.
- FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; ADAMI, Y.L.; ESPINOLA-MENDES, E.C.; FIGUEIREDO, M.R.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei* – Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in brazilian endemic areas. *Experimental Parasitology*, v.94, p.243-247, 2000.
- GENTIL, M.; PEREIRA, J.V.; SOUSA Y.T.; PIETRO, R.; NETO, M.D.; VANSAN, L.P.; DE CASTRO FRANÇA, S. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytotherapy Research*, v.20, n.3, p.184-186, 2006.
- MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Actividad antimicrobiana e interacción com ei ADN de plantas medicinales de la Amazonia peruana. *Revista Argentina de Microbiología*, v.27, p.199-203, 1995.
- PILLA, C.M.P. Implementação de metodologias para avaliação da inibição de crescimento de espécies de *Candida* através de plantas medicinais. Ribeirão Preto, Dissertação (Mestrado) Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2005.



SPONCHIADO JR, E.C. Atividade antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata*. Manaus, 136p. (Tese Doutorado). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

SPONCHIADO JR, E.C.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, J.O.; FRANÇA, S.C. *Pothomorphe umbellata*. Revista Fitos, v.3, n.1, p.31-37, 2007.

VIANNA, M.E.; GOMES, B.P.; SENA, N.T.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; SOUZA FILHO, F.J. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Brazilian Dental Journal, v.16, n.3, p.175-80, 2005.

YUNKER, T. G. The Piperaceae of Brazil. Hohna, v. 3, p.144-148, 1960.