

## Atividade antimicrobiana do *Ginkgo biloba* em bactérias de interesse clínico

## Antimicrobial activity of *Ginkgo biloba* in bacteria of clinical interest

### RESUMO

Priscila Souza  
[prisou@alunos.utfpr.edu.br](mailto:prisou@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Cleverson Busso  
[cleversonbusso@utfpr.edu.br](mailto:cleversonbusso@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Letícia Scussel de Farias  
[letisf27@gmail.com](mailto:letisf27@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Lorena Clara Cruz  
[lorenaclara.lc@gmail.com](mailto:lorenaclara.lc@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

O ginkgo (*Ginkgo biloba*, ginkgoaceae) é uma das espécies de árvores mais antigas do mundo, de origem chinesa, é referida como um fóssil vivo. O extrato alcoólico desta planta foi avaliado quanto a atividade antimicrobiana em linhagens de bactérias de isolados clínicos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*. Além da avaliação antimicrobiana, foi encontrado a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) através do método de microdiluição em caldo e “spot test”, respectivamente. Os resultados para CIM mostraram que o extrato possui ação inibidora contra todas as cepas, *P. aeruginosa* apresentou maior sensibilidade com CIM de 15,6µL/mL, *E. coli* e *C. perfringens* foram inibidas a 62,5µL/mL e *S. aureus* a 125 µL/mL. Já para a CBM, alíquotas foram cultivadas em meio sólido onde foi considerado bactericida quando não houve crescimento bacteriano visível. O teste de CBM demonstrou que o extrato teve maior atividade bactericida para *P. aeruginosa* com morte total bacteriana. O extrato de *Ginkgo biloba* apresenta resultados promissores quanto a atividade bacteriostática e bactericida em isolados clínicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias patogênicas. Extratos naturais. Antimicrobianos

### ABSTRACT

*Ginkgo biloba*, ginkgoaceae) is one of the oldest tree species in the world, of Chinese origin, is referred to as a living fossil. The alcoholic extract of this plant was evaluated for antimicrobial activity in strains of bacteria from clinical isolates: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium perfringens*. In addition to the antimicrobial evaluation, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were found using the broth microdilution method and spot test, respectively. The results for MIC showed that the extract has an inhibitory action against all strains, *P. aeruginosa* showed greater sensitivity with MIC of 15.6µL / mL, *E. coli* and *C. perfringens* was inhibited at 62.5µL / mL, already *S. aureus* was 125 µL / mL. Already for CBM, aliquots were grown in a solid medium where it was considered bactericidal when there was no visible bacterial growth. The MBC test showed that the extract had greater bactericidal activity for *P. aeruginosa* with total bacterial death. The extract of *Ginkgo biloba* shows promising results regarding bacteriostatic and bactericidal activity in clinical isolates.

**KEYWORDS:** Pathogenic bacteria. Natural extract. Antimicrobials

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

O Ginkgo (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) é uma das espécies de árvores mais antigas do mundo, de origem chinesa, é referida como um fóssil vivo. É símbolo de paz e longevidade. (LORENZI, 2002)

O extrato das folhas de *G. biloba* tem sido utilizado na China como um medicamento tradicional para tratar algumas doenças como: asma, bronquite, disfunção cardíaca, problemas de memória, concentração, confusão, depressão, ansiedade, tontura e dor de cabeça. No Brasil o estudo com *G. biloba* ainda é recente, mas estudos realizados confirmam aplicações do extrato da planta com o intuito de promover maior circulação sanguínea no cérebro, combater vertigens e para melhorar a concentração e a memória (MELO,2004; STEVEN, 2008; BIRKS,2009)

Devido as características do Ginkgo, fazem-se necessários maiores estudos quanto à atividade antimicrobiana do extrato desta planta, sobretudo, o efeito antibacteriano sobre cepas de interesse clínico, principalmente aquelas onde é encontrada resistência contra antibióticos conhecidos. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *G. biloba* sobre bactérias de isolados clínicos.

## METODOLOGIA

### Linhagens:

As cepas utilizadas neste experimento foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. As cepas foram obtidas a partir de isolados clínicos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Clostridium perfringens* (ATCC 3624).

### Extrato de Ginkgo biloba.

O extrato alcóolico de *Ginkgo biloba* foi produzido através da diluição de 1g do chá de *Ginkgo biloba* em 25mL de álcool 99,5%, essa solução foi levada ao shaker sob agitação de 200 rpm e 40°C durante 24 horas.

A solução foi filtrada a vácuo para separação dos sólidos e realizou-se a rotaevaporação a 37°C. Após a evaporação do solvente foi feita uma ressuspensão do extrato restante no balão do rotaevaporador adicionando-se 10mL do solvente e ajustou-se o volume final do extrato obtido. Em seguida, envasou-se o extrato alcóolico de *Ginkgo biloba* em frascos âmbar e os armazenou em freezer.

### Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Os testes de CIM foram realizados segundo padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS,2003). CIM é determinada como a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento microbiano.

Para a determinação da CIM, células viáveis das bactérias foram semeadas em meio ágar MH 48h antes do experimento. Após o crescimento, foi realizado um novo inóculo das bactérias em caldo MH e o material incubado em uma incubadora Shaker (150rpm) por 06h a 35°C.

Após o período de incubação, as células foram ajustadas de acordo com a escala 0,5 Mc Farland e distribuídas em microplacas de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Cada uma dessas placas destinou-se a análise de dois microrganismos. As linhas A, B e C foram destinadas a análise de uma bactéria, as linhas D, E e F a outra bactéria. As linhas G e H foram divididas e destinadas ao controle das bactérias do meio utilizado e do extrato. Em cada um dos poços das microplacas foram adicionados 100µL de caldo MH, em seguida, adicionou-se 100µL do extrato de *G. biloba* para obtenção da concentração inicial de 50%. As concentrações subsequentes do extrato alcoólico foram obtidas com a diluição seriada partindo da concentração inicial de 50% (Coluna 1) até 0,24% (Coluna 12), pela transferência de 100µL do conteúdo do primeiro poço até o último.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e posteriormente acrescentado em cada poço 20µL de uma solução aquosa Resazurina, e as microplacas incubadas novamente a 35°C por mais 2 horas. A leitura para a determinação da CIM do extrato foi realizada visualmente de acordo com Martins (2008), a cor azul nos indica que não há células viáveis, já a cor rosa indica que há células viáveis não inibidas pelo extrato de *G. biloba*.

#### **Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) nas bactérias**

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração do extrato com capacidade bactericida.

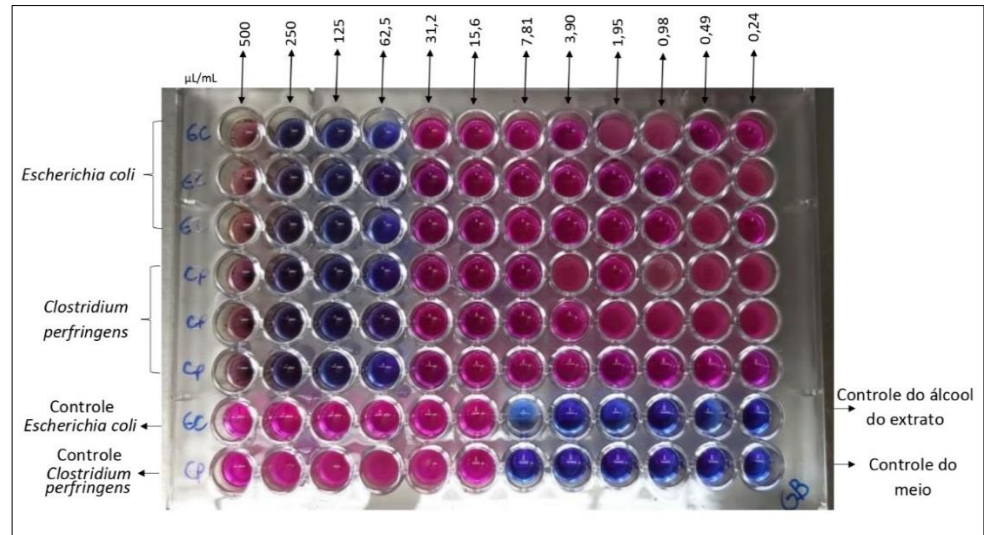
Para a determinação da CBM utilizou-se o método “spot test”. A partir dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível, no teste da CIM. Desta forma, alíquotas foram semeadas com auxílio de um papel milimetrado na superfície de uma placa de petri contendo ágar MH. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, após esse período foi possível observar qual concentração do extrato foi capaz de impedir o crescimento.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os testes de microdiluição seriada do extrato de *Ginkgo biloba* demonstraram que compostos apresentou ação inibitória contra todas as cepas avaliadas, representado pela coloração azulada do meio (Figuras 1 e 2). A bactéria *P. aeruginosa* teve maior sensibilidade, com uma CIM de 15,6µL/mL (Figura 2). As bactérias *E.coli* e *C. perfringens* apresentaram inibição com a concentração de 62,5µL/mL do extrato, porém, para que ocorra a inibição de *S. aureus* é necessária uma concentração de 125 µL/mL do extrato, demonstrando que esta bactéria apresenta menor resistência ao produto (Figuras 1 e 2)

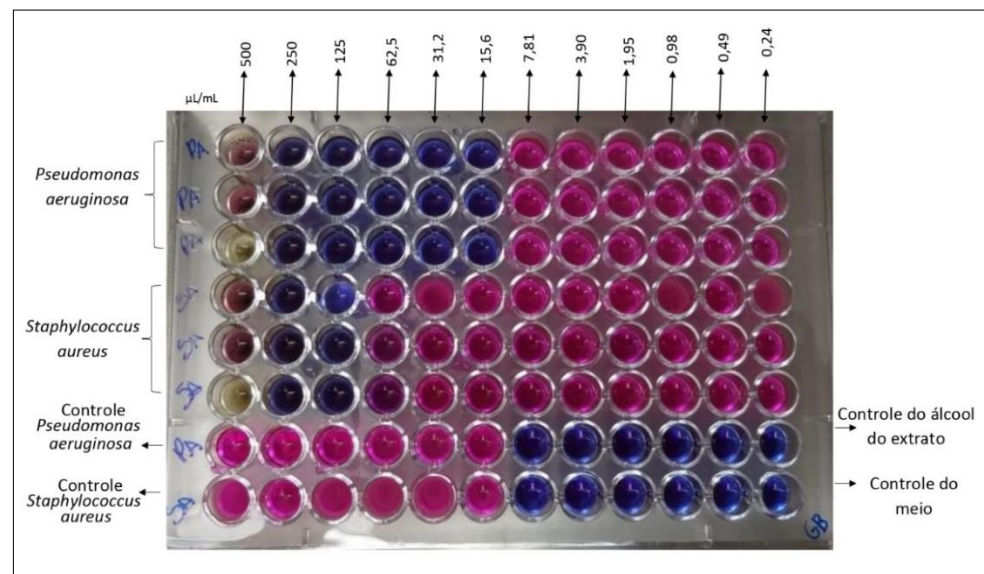
As figuras 1 e 2 mostram os resultados da CIM das bactérias testadas.

Figura 1- CIM do extrato de *Ginkgo biloba* sob as bactérias *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. O grupo controle corresponde ao caldo MH, álcool do extrato e a bactérias



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 2 - CIM do extrato de *Ginkgo biloba* sob as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O grupo controle corresponde ao caldo MH, álcool do extrato e a bactérias

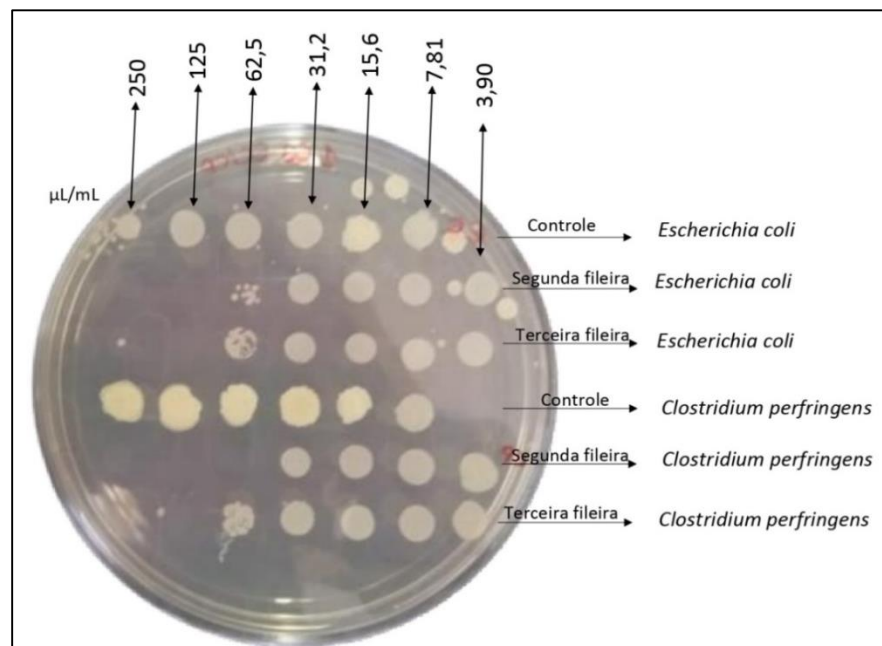


Fonte: Autoria própria (2020)

Com a obtenção dos resultados da CIM, foi possível estabelecer qual concentração teve eficiência bactericida. Nas figuras 3 e 4 é possível visualizar a atividade bactericida dos microrganismos avaliados. Na concentração de

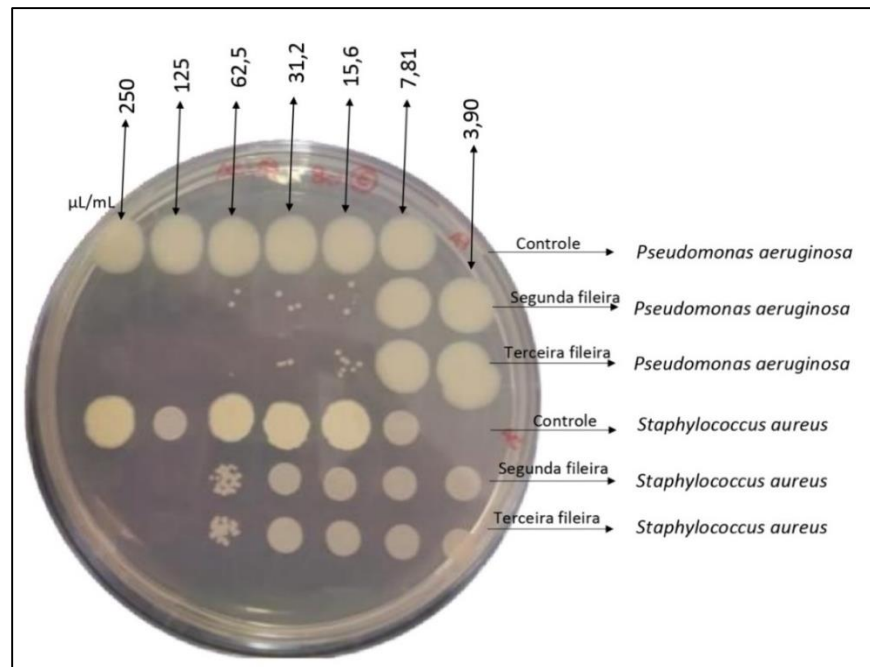
62,5µL/mL observa-se ausência total de formação de colônias/crescimento de *P. aeruginosa*, evidenciando a morte total bacteriana nesta concentração (atividade bactericida). No entanto para as outras três bactérias (*E. coli*, *S. aureus* e *C. perfringens*) observa-se uma CBM de 125 µL/mL, desta forma, é necessário uma maior concentração de extrato vegetal para que ocorra morte celular desses inóculos demonstrando que nem sempre concentrações bacteriostáticas são similares aquelas bactericidas. Como os extratos vegetais apresentam vários constituintes fitoquímicos, faz-se necessário uma maior concentrações do composto para otimizar o efeito bactericida de um destes constituintes com reconhecida atividade antibacteriana (MAYAUD et al., 2008).

Figura 3 - CBM do extrato de *Ginkgo biloba* sob as bactérias *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 4 - CBM do extrato de *Ginkgo biloba* sob as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Autoria própria (2020)

Quando se compara na tabela 1 os resultados obtidos com a CIM e a CBM com antibióticos tradicionalmente conhecidos, observa-se que o extrato vegetal de *G. biloba* apresenta valores superiores tanto na inibição quanto na morte celular. Compostos isolados de plantas diferentemente dos antibióticos apresentam vários constituintes e grandes diferenças estruturais, o que os tornam menos efetivos em concentrações menores quando comparados com aqueles, que são sintetizados puros geralmente a partir de microrganismos e/ou industrialmente (GONÇALVES et al., 2005). No entanto, os extratos naturais além de apresentarem efeitos sinérgicos também são conhecidos por terem menores efeitos colaterais (SALEEM et al., 2010).

De acordo com Chavasco et al. (2014) e Simonetti et al. (2016) valores de CIM inferiores a 100 μL/mL representam uma boa atividade antimicrobiana; valores situados entre 100 e 500 μL/mL indicam atividade moderada, entre 500 e 1000 μL/mL equivalem a uma fraca atividade antimicrobiana. Desta forma, o extrato vegetal de *Ginkgo biloba* apresentou uma forte ação inibitória para as bactérias testadas.

Tabela 1 – CIM e CBM do extrato de *Ginkgo biloba* para as bactérias avaliadas.

Bactérias	Extrato <i>Ginkgo biloba</i>		CIM (µg/mL)	
	CIM (µl/mL)	CBM (µl/mL)	Gentamicina	Ampicilina
<i>E. coli</i>	62,5	125	0,19	3,12
<i>S. aureus</i>	125	125	0,09	0,09
<i>P. aeruginosa</i>	15,6	62,5	0,9	Resistente
<i>C. perfringens</i>	62,5	125	*	*

Fonte: Autoria própria (2020) e Cleverson Busso (2017) . (\*) Não avaliado

## CONCLUSÕES

Considerando que o extrato vegetal de *Ginkgo biloba* apresentou atividade inibitória nas cepas testadas inferior a 100 µL/mL, e que segundo a literatura esses valores são considerados como bons inibidores, sugere-se que este composto apresente características promissoras na complementação natural de antimicrobianos. Vale destacar que o composto foi efetivo contra uma bactéria resistente ao antibiótico ampicilina. A segurança quanto ao seu uso principalmente em áreas como controle biológico, alimentos e antissépticos deve ser melhor investigada.

## REFERÊNCIAS

BIRKS J, GRIMLEY . E. J. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia (Review). Cochrane Database of Systematic Reviews.2009.

CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado. Revista Instituto Medicina tropical de São Paulo, 2014.

GONÇALVES, A & Filho, A & Menezes, H. (2004). Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MARTINS, M. E. Aplicação de Bioensaios de toxicidade para avaliação da eficiência do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (Rahlf) na detoxificação do aldicarbe. Escola de engenharia de São Carlos. São Carlos,2008. p.15.

MAYAUD L, CARRICAJO A, ZHIRI A, AUBERT G (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol* 47: 167-173.

MELO, J. G et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). Avaliação da qualidade de amostras comerc. Recife, PE. 2004.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural product reports*, v.27, n.2, p.238–254, feb.2010.

SIMONETTI, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Campinas, 2016.

STEVEN T. D. K et al. Ginkgo biloba for Prevention of Dementia. A Randomized Controlled Trial. Original contribution.2008.