

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR DA AMAZÔNIA

CHRISTIAN MIRANDA RIBEIRO¹
KAIRA GEILIANE DA SILVA SOUZA²
TIAGO AUGUSTO CHAGAS RIBEIRO²
ANTONIA BENEDITA RODRIGUES VIEIRA³
LÚCIA CARLA VASCONCELOS MENDONÇA²
WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA^{1,2}
JOSÉ MARIA DOS SANTOS VIEIRA^{1,2}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Federal do Pará
2. Faculdade de Farmácia/ Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Federal do Pará
3. Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal do Pará

Autor responsável: J.M.S.VIEIRA.
E-mail: jmvieira@ufpa.br

INTRODUÇÃO

Por um longo período de tempo, plantas têm sido uma das fontes de produtos naturais para a manutenção da saúde humana. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás, sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e ungüentos, preparados a partir de parte das plantas (ROBERTS et al., 1997).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002). Porém, desde o advento dos antibióticos, o uso de derivados de plantas como antimicrobianos tem sido virtualmente inexistente (COWAN, 1999).

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma imensa variedade de diferentes antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, incentivando a busca de novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas. Além disso, a alta incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumenta a importância da procura e da descoberta de compostos terapêuticos alternativos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte para obter-se uma variedade de drogas (PRASHAR et al., 2003).

Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e a avaliação de produtos naturais como terapêuticos e principalmente com atividade antimicrobiana devem ser estimulados no intuito de criar novas drogas. Dentro desse contexto, os estudos com plantas utilizadas na medicina popular representam prioridade na Amazônia, pela variedade e riqueza de sua flora.

No Brasil encontram-se cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela Organização das Nações Unidas, facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças (DRUMOND et al., 2004). Na Amazônia existe grande diversidade vegetal, onde se encontram muitas plantas com propriedades medicinais e, que durante milênios são utilizadas pelas comunidades nativas.

O projeto "Padronização de Preparações Tradicionais à Base de Plantas Medicinais para o Desenvolvimento de Fitoterápicos" realizado pelo Programa Pobreza e Meio Ambiente (POEMA) do Núcleo de Meio Ambiente (NUMA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) caracterizou algumas espécies vegetais de uso medicinal tradicional visando o aproveitamento em fitoterápicos. A triagem das plantas através de questionário etnofarmacêutico, selecionou espécies vegetais utilizadas para doenças que possam ter como agentes bactérias ou fungos (BARBOSA & PINTO, 2001). A partir desta seleção foi avaliada, no presente trabalho, a atividade antimicrobiana de seis espécies utilizadas na medicina popular da Amazônia: *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Bryophyllum calycinum* Salisb (pirarucu), *Eleutherine plicata* Herb (marupazinho), *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmelin (Unha de gato),

Arrabidaea chica (HKB) Verlot (pariri) e *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry (cipó d'alho).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Identificação:

As plantas foram coletadas no horto de plantas medicinais da EMBRAPA Amazônia Oriental e identificadas no Laboratório de Botânica desta Instituição sendo uma excisata depositada no Herbário da EMBRAPA Amazônia Oriental. As seis espécies vegetais, distribuídas em família, nome local, órgão testado e uso popular estão descritas no Tabela 1.

Preparação dos extratos:

As análises foram realizadas segundo as metodologias utilizadas pelo Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia (BARBOSA et al 2004). Para a obtenção dos extratos etanólicos bruto as folhas frescas de goiabeira, pirarucu, unha-de-gato, pariri, cipó d'alho e bulbos de marupazinho, após a limpeza, foram deixadas por 7 dias à temperatura ambiente e 2 dias em estufa de ventilação separadamente para secagem. O material vegetal foi então triturado e macerado por duas semanas, isoladamente, em 1500 mL de etanol a 95%. Em seguida, os macerados foram filtrados e concentrados à baixa pressão a 50°C em evaporador rotatório. O concentrado foi colocado em estufa por 24 h a 45°C. A partir destes concentrados foram preparadas as soluções para testes de atividade antimicrobiana.

Microorganismos:

Os microrganismos testados foram cepas padrão *American Type Collection Culture* (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Candida albicans* (ATCC 10231) recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2003a).

Preparação do inoculo:

Os inóculos foram preparados tomando-se 3 a 4 colônias da cepa isolada em ágar Muller-Hinton e diluídas em solução salina a 0,85% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland (CLSI, 2003a).

Avaliação Preliminar da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos bruto foi empregado o método de disco difusão em ágar, baseado na técnica descrita por (BAUER et al. 1996). Cada suspensão de microrganismo foi semeada (em triplicata), com auxílio de um *swab* descartável, em toda a superfície de meio ágar Muller Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro (Whatman – tipo 3), de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL de cada extrato das plantas testadas em uma concentração de 500 mg/mL dissolvidos em DMSO. Após incubação das placas a 35°C por 24 h foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o halo formado ao redor dos discos contendo os extratos. Foi considerado como resultado final de cada extrato a média das 3 medidas e como suscetível halo igual ou acima de 8 mm de diâmetro (PAREKH & CHANDA, 2007; SANTOS et al 2007).

Tabela 1. Espécie vegetal, família, nome local, órgão testado e uso popular

Espécie vegetal	Família	Nome local	Órgão testado	Uso popular
<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Goiabeira	Folhas	Inflamações da boca, desordens intestinais
<i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb	Crassulaceae	Pirarucu, Folha da fortuna	Folhas	Analgésica, antimicrobiana, antidiabética,
<i>Eleutherine plicata</i> Herb	Iridaceae	Marupazinho, Marupá, Marupaí	Bulbo	Diarréias e amebíases
<i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) Gmelin	Rubiaceae	Unha-de-gato	Folhas	Gastrite, úlcera, diarreia, artrite
<i>Arrabidaea chica</i> (HKB) Verlot	Bignoniaceae	pariri, crajiru, cipó-cruz	Folhas	Antiinflamatório, agente adstringente, anemia
<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	Bignoniaceae	Cipó d'alho, cipó-alho	Folhas	Anti-reumáticos, antiartríticos, resfriados

Determinação da concentração inibitória mínima:

Os extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da CIM pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI 2003b; BERTINI et al 2005; LIMA et al 2006; SANTOS et al 2007).

Os testes foram realizados em caldo Muller Hinton contidos em placa "Sensitive microtiter" de 96 poços, esterilizada, e utilizadas em análises de ELISA. Uma alíquota de 10 µL de cada extrato nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,63 mg/mL foi depositada em cada poço da placa contendo caldo Muller Hinton e suspensão de microrganismos para um volume final de 200 µL em cada poço. Foi realizado controle do extrato, do caldo Muller Hinton, das suspensões de microrganismos, de clo-ranfenicol e de nistatina.

As placas foram cobertas com parafilme e incubadas a 35°C por 24 horas. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 650 nm (LIMA et al 2006). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos de plantas quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos, desde que se trabalhe com uma fração já determinada (ALIGIANIS et al., 2001). Entretanto, como trabalhamos com extrato bruto das plantas, seguimos o critério sugerido por HO-LETZ et al., (2002) (Tabela 2). A maior concentração de extrato empregada no presente trabalho, foi de 500 mg/mL, uma vez que em concentrações mais altas, as soluções dos extratos não permitiram uma absorção total nos discos, além da intensa coloração que prejudicava a leitura dos resultados. Para HOLETZ et al., (2002) extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 500 mg/mL possuem fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas.

Apenas o extrato de *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry (cipó d'álho) não apresentou atividade contra nenhum dos organismos testados (Tabela 1), não justificando, portanto, sua utilização no tratamento de doenças infecciosas causadas por estes microrganismos (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*).

Na verificação preliminar da atividade antimicrobiana das folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira) (Tabela 3) foi observada atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* e antifúngica frente a *C. albicans*. Na determinação da concentração inibitória mínima, o EEB de goiabeira foi ativo até a concentração de 125 mg/mL frente aos microrganismos testados (Tabela 2). Embora o extrato de goiabeira possa ter apresentado CIM na mesma concentração contra todos os microrganismos testados, os halos formados nos testes de difusão contra *C. albicans* foram maiores, sugerindo uma melhor ação contra fungos. O extrato de *P. guajava* foi relatado com atividade antimicrobiana para *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* por HOLETZ et al 2002 e por GNAN & DEMELLO, 1999. Já os resultados de GONÇALVES et al 2005 constataram ação contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* e *S. aureus*, não constando ação frente à *E. coli* e *P. aeruginosa*. A atividade contra *C. albicans* foi relatada também por PESSINI (2003), ALVES et al. (2006) e NAIR & CHANDA (2007), enquanto que MARTINEZ et al (1997) não encontraram esta atividade em amostras de Cuba.

Na verificação preliminar da atividade antimicrobiana o extrato de *Bryophyllum calycinum* Salisb apresentou atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, entretanto, não revelou atividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* e contra o fungo leveduriforme *Candida albicans*. (Tabela 3).

Quando realizada a determinação da concentração inibitória mínima, o extrato de pirarucu foi ativo até a concentração de 250 mg/mL frente a *P. aeruginosa* e 500 mg/mL contra *S. aureus* (Tabela 3).

Na verificação preliminar da atividade antimicrobiana o extrato de *Eleutherine plicata* Herb (marupazinho) apresentou atividade contra *S. aureus* e *C. albicans*. (Tabela 3). O marupazinho mostrou melhor atividade contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* com CIM de 62,5 mg/mL, já o CIM contra *C. albicans* foi de 250 mg/mL (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios para aceitação da atividade antimicrobiana de extratos brutos e plantas (HOLETZ et al., 2002).

CIM DO EXTRATO BRUTO	RESULTADO
Abaixo de 100 mg/mL	Boa atividade antimicrobiana
Entre 100 e 500 mg/mL	Moderada atividade antimicrobiana
Entre 500 e 1000 mg/mL	Fraca atividade antimicrobiana
Acima de 1000 mg/mL	Inativo

Na verificação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmelin (unha-de-gato) foi observada atividade antibacteriana apenas contra *S. aureus* (Tabela 3) apresentando um CIM de 62,6mg/ml (Tabela 4).

Já o extrato etanólico bruto de *Arrabidaea chica* (HKB) Verlot (pariri) apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *coli*, e antifúngica frente à leve-

mente *C. albicans*. (Tabela 3). Com CIM de 62,5 para *S. aureus*, de 250mg/ml para *E. coli* e de 500mg/ml para *C. albicans*.

Considerando os critérios sugeridos por HOLETZ et al (2002) os melhores resultados obtidos foram contra *S. aureus*, para *Eleutherine plicata*, *Uncaria guianensis* e *Arrabidaea chica* representando um CIM abaixo de 100 mg/ml (62,5mg/ml).

Tabela 3. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos de *Psidium guajava* (goiabeira), *Bryophyllum calycinum* (pirarucu), *Eleutherine plicata* (marupazinho), *Uncaria guianensis* (unha de gato), *Arrabidaea chica* (pariri) e *Mansoa alliacea* (cipó d'alho) através da técnica de disco difusão em ágar.

Espécie Vegetal	Microorganismo	Atividade antimicrobiana	Halo (mm)
Psidium guajava	S. aureus	+	(12mm)
	E. coli	-	-
	P. aeruginosa	+	(11 mm)
	C. albicans	+	(17 mm)
Bryophyllum calycinum	S. aureus	+	(11 mm)
	E. coli	-	-
	P. aeruginosa	+	(14 mm)
	C. albicans	-	-
Eleutherine plicata	S. aureus	+	(19 mm)
	E. coli	-	-
	P. aeruginosa	-	-
	C. albicans	+	(12 mm)
Uncaria guianensis	S. aureus	+	(12 mm)
	E. coli	-	-
	P. aeruginosa	-	-
	C. albicans	-	-
Arrabidaea chica	S. aureus	+	(14 mm)
	E. coli	+	(10mm)
	P. aeruginosa	-	-
	C. albicans	+	(10 mm)

Tabela 4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL dos extratos etanólicos brutos de *Psidium guajava*, *Bryophyllum calycinum*, *Eleutherine plicata*, *Uncaria guianensis* e *Arrabidaea chica* através da técnica de microdiluição em caldo.

Espécie Vegetal	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Psidium guajava	125mg/mL	-	125mg/mL	125mg/mL
Bryophyllum calycinum	500mg/mL	-	250mg/mL	-
Eleutherine plicata	62,5mg/mL	-	-	250mg/mL
Uncaria guianensis	62,5mg/mL	-	-	-
Arrabidaea chica	62,5mg/mL	250mg/mL	-	500mg/mL

CONCLUSÃO

Neste estudo, observaram-se plantas com atividade antimicrobiana *in vitro* comprovada (goiabeira, unha-de-gato, pirarucu, marupazinho e pariri). Embora os resultados obtidos fundamentem o uso destas plantas como antimicrobiano na terapêutica popular, não é recomendada, sem estudos mais avançados, a sua utilização no tratamento de infecções severas.

Estes resultados apresentam uma expressiva contribuição para a caracterização da atividade antimicrobiana das plantas utilizados na medicina popular da Amazônia, colaborando com a busca por novas substâncias, a partir de fontes naturais, que ajudem a combater a expansão da resistência microbiana.

Sugere-se a continuação de estudos contra microrganismos multiresistentes isolados de processos clínicos e a ação em menores concentrações associados com antibióticos, para observar o possível efeito sinérgico dessa associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHIM, S.I.; ALMAGBOUL, A.Z.; OMER, M.E.A.; ELEGAMI, A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia* 73: 713-715, 2002.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4168-4170. 2001.
- ALVES, P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, L.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; LIMA, E.O. *et al.* Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. *Rev. Bras Farmacogn* 16(2): 192-196, 2006.
- BARBOSA, W.L.R.; QUINARD, E.; TAVARES, I.C.C.; PINTO, L.N.; OLIVEIRA, F.Q.; OLIVEIRA, R.M. *Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais*. 2ª. Edição revisada. Revista Científica da UFPA <http://www.ufpa.br/rcientifica> Vol. 4, 2004.
- BARBOSA, W.L.R.; PINTO, A.P. *Levantamento Etnofarmacêutico da Fitoterapia Tradicional de Igarapé-Miri*, IN: VII Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2001, MANAUS – AM. CD-ROM VII SBPC. MANAUS: SBPC, 2001.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.
- BERTINI, L.M.; PEREIRA, F.A.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUHA, F.A.; CAVALCANTI, E. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, 17(3/4):80-83, 2005.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. CLSI. 2003a.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. CLSI. 2003b.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582. 1999.
- DRUMOND, M.R.S.; CASTRO, R.D.; ALMEIDA, R.V.D.; PEREIRA, M.S.V.; PADILHA, W.W.N. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 4(1): 33-38, 2004. GNAN, S.O. & DEMELLO, M.T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 103-108, 1999.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. *Arq. Inst. Biol.* 72(3): 353-358, 2005.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 1027-1031, 2002.
- LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.; SANTANA, A.E.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 137-147, 2006.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.Jr.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. 25: 429-438, 2002.
- MARTINEZ, M.J.; MOLINA, N.; BOUCOUR, E. Evaluacion de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. *Rev. Cubana del Plant Med* 2(1): 12-14, 1997.(1997).
- NAIR, R.; CHANDA, S. *In vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. *Braz J Microbiol*, 38(3): 2007.
- PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turk J. Biol.* 31: 53-58. 2007.
- PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS-FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl. 1): 21-24, 2003.
- PRASHAR, A. HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*. 63: 569-575. 2003.
- ROBERTS, J.L.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognózia e Farmacobiocologia*. São Paulo: Editorial Premier, 1997.
- SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochiliocarpus* (Gomes) Barnaby & Grimes. *Revista Brasileira de Farmacognózia*, 17(2): 215-219. 2007.