



Atividade antimicrobiana da folha de *Luehea candicans* MART et ZUCC. (MALVACEAE)

Antimicrobial activity of *Luehea candicans* MART et ZUCC. (MALVACEAE) LEAF

Maicon Matos Leitão^{1*}, Rafael Pereira da Silva de Souza¹, Carine Cavalcanti Faria de Lima¹, Luis Fernando Benitez Macorini¹.

¹Curso de Biomedicina, Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

Resumo

*Autor correspondente:
Maicon Matos Leitão, Centro
Universitário da Grande
Dourados – UNIGRAN.
E-mail:
mleitao02@hotmail.com

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico de *Luehea candicans* MART et ZUCC. As cepas utilizadas neste estudo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 12883) *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar, por meio da técnica de poços. Já a CIM foi avaliada em microplaca de 96 poços, realizando a microdiluição do extrato e leitura em espectrofotômetro a 610 nm. Após a avaliação da CIM foi determinada a CBM, adicionando 10 µL de cada diluição em ágar Mueller Hinton (AMH) e levados a estufa a 36°C por 24h. O extrato de *Luehea candicans* MART et ZUCC apresentou efetividade antimicrobiana frente a todas as cepas testadas o que indica potencial terapêutico.

Palavras-chave: Fitoterápico;
Difusão em ágar; Concentração
inibitória mínima.

Abstract

Key-words: Phytotherapy; Agar
diffusion; Minimum inhibitory
concentration.

This study aimed to evaluate the antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the hydroalcoholic extract from *Luehea candicans* MART et Zucc. Bacterial strains utilized in this study were *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 12883) *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Antimicrobial activity was assessed by agar well diffusion method. MIC was determined by microdilution of the extract in a 96 well microplate with posterior reading in a 610nm spectrophotometer. After the MIC determination, we calculated the MBC by adding 10 µl of each dilution in Mueller Hinton agar (AMH) with posterior incubation at 36 ° C for 24h. The extract *Luehea candicans* MART et Zucc presented antimicrobial effectiveness against all strains tested. Thus, it has therapeutic potential.

1. Introdução

O cerrado brasileiro possui uma infinidade de plantas medicinais com potencial antimicrobiano. Muitas destas plantas já foram evidenciadas, porém ainda existem várias outras que podem possuir um potencial medicinal importante e de relevância para as ciências biomédicas (Pinho et al., 2012).

A espécie *Luehea candicans*, conhecida popularmente como mutamba-preta ou açoita-cavalo, pertence à família Malvaceae, que compreende no Brasil a 70 gêneros e 757 espécies, distribuída em todo território nacional (Bovini et al., 2014). Essa espécie é nativa, e ocorre principalmente nas regiões centro-oeste e sudeste do país (Esteves, 2015). O relato sobre o uso terapêutico desta planta prende-se apenas ao seu potencial medicinal em relação à atividade antiproliferativa, antibacteriana e antifúngica de suas folhas e galhos (Silva, 2004).

A busca pela medicação a base de plantas vem crescendo bastante, devido aos resultados negativos recorrentes do uso da medicina convencional, ocasionados principalmente pelo aumento de microrganismos resistentes gerados pelo uso incorreto de antimicrobianos (Palmeira et al., 2010).

A pesquisa de princípios ativos com propriedades terapêuticas em plantas medicinais tem como característica uma rápida obtenção de medicamentos, com um baixo custo, de modo que se torna mais acessível à população, sendo esses medicamentos utilizados no atendimento das necessidades básicas da saúde (Furlam, 1998 *apud* Mendes et al., 2011).

Neste contexto inclui-se a bioprospecção, que pode ser definida como a exploração sustentável da biodiversidade em busca de recursos genéticos e bioquímicos que, associados ao conhecimento científico, possuam um potencial industrial e/ou farmacológico (Santos, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que a maior parte da população mundial depende da medicina popular, em países desenvolvidos, de 70% a 90% da população fazem uso de práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde (WHO, 2011). No Brasil, cerca de 82% da população faz uso de terapias a base de plantas medicinais, seja pela tradição indígena ou em função do conhecimento da medicina popular (Brasil, 2012).

Sendo assim, a pesquisa envolvendo plantas medicinais é de suma importância para a obtenção de novas substâncias ativas para o desenvolvimento de novos medicamentos. Essa abordagem terapêutica é utilizada desde os primórdios, onde várias descobertas foram feitas ao acaso, de modo intuitivo ou empírico (Mendes et al., 2011).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *Luehea candicans* Mart et Zucc.

2. Material e Métodos

2.1. Material Botânico

Folhas de *Luehea candicans* foram coletadas, secas e trituradas. Após o procedimento foi acrescentado solução hidroalcoólica 80 %, na proporção 1:3 g/ml. O material permaneceu em repouso por 7 dias. Em seguida, foi filtrado, rotaevaporado, congelado e liofilizado.

2.2. Atividade Antimicrobiana

Os microrganismos testados foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 37°C por 48h para reativação das cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 12883) *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Após este período os microrganismos foram semeados em placa contendo ágar *Mueller Hinton* e incubados novamente a 37°C por 24h em estufa bacteriológica (Antunes et al., 2006).

Após o crescimento, o inóculo microbiano foi padronizado em salina em uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, equivalente a 1×10^8 UFC/mL, e semeado na superfície das placas de ágar *Mueller Hinton* com auxílio de *swabs* estéreis de forma homogenia. Em seguida, foram realizadas perfurações de 6 mm de diâmetro com tubos de alumínio estéreis e adicionados em cada cavidade o equivalente a 100 µl do extrato na concentração de 50 mg/ml e como controle foi usada a tetraciclina (4 mg/ml).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando a formação de halos de inibição ao redor das cavidades padronizadas (NCCLS, 2003; Antunes et al., 2006). Os testes para cada microrganismo foram realizados em triplicada.

2.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram adicionados 100 µl de caldo *Mueller Hinton* (CMH) em microplaca de 96 poços e adicionado 100 µl do extrato realizando a microdiluição. Os cultivos bacterianos foram ativados por meio de subcultivos em ágar *Mueller Hinton* durante 24h à 37°C.

Após o crescimento, os microrganismos foram padronizados em salina em uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland e diluídos 1:10 também em salina. Após a diluição, volumes de 10 µL foram transferidos para as cavidades de microplaca esterilizada, contendo volume final de 100 µL de caldo *Mueller Hinton* acrescido das diferentes concentrações finais do extrato, resultando em um inóculo final de aproximadamente 10×10^5 UFC/mL e, posteriormente, levada a estufa a 37°C por 24h. O teste foi realizado em triplicata. As CIMs (concentrações inibitórias mínimas) foram determinadas por meio de leitura em espectrofotômetro a 610nm em microplaca observando a menor concentração na qual o extrato inibiu completamente o crescimento microbiano.

2.4. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinar a CBM foi retirada uma alíquota de amostras dos poços onde não ocorreu crescimento microbiano e foram semeadas em ágar *Mueller Hinton*. As placas foram incubadas à temperatura de 37°C por 24h. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento dos microrganismos nas placas de Petri.

3. Resultados

No teste de atividade antimicrobiana por difusão em ágar, o extrato hidroalcoólico da folha de *Luehea candicans*

apresentou efetividade frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, não apresentando ação antimicrobiana sobre a estirpe de *Salmonella typhimurium*.

O halo de inibição formado pelo extrato frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* foi de 18 mm, frente ao *Staphylococcus epidermidis* 15,6 mm, para *Klebsiella pneumoniae* foi de 21,5 mm e à cepa *Proteus mirabilis* igual a 15,6 mm. O resultado obtido sobre a estirpe de *Salmonella typhimurium* foi negativo, caracterizado pela ausência de halo de inibição (Tabela 1).

A concentração inibitória mínima (CIM) necessária

para inibir o crescimento bacteriano obtida para a cepa *Staphylococcus aureus* foi de 25 mg/mL, assim como para os microrganismos *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella typhimurium*. Já para a estirpe de *Klebsiella pneumoniae*, a CIM obtida foi de 3,12 mg/mL de extrato.

O resultado do teste de concentração bactericida mínima (CBM), caracterizada pela menor concentração capaz de eliminar completamente o microrganismo, não havendo crescimento do mesmo na subcultura de ágar Mueller Hinton, foi de 25 mg/mL para todos os microrganismos testados. (Tabela 2).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Luehea candicans* Mart et Zucc (EHLc).

Microrganismos	Extrato (mm)	Tetraciclina (mm)
<i>S. aureus</i>	18 ± 0,5	44,0 ± 0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	15,6 ± 0,6	50,0 ± 0,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21,5 ± 1,0	10,0 ± 0,1
<i>Salmonella typhimurium</i>	S/i	38,6 ± 0,2
<i>S. epidermidis</i>	15,6 ± 0,1	44,6 ± 0,5

S/i – Sem inibição; valores representados em média ± EPM; EHLc – extrato hidroalcoólico de *Luehea candicans*.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Luehea candicans* Mart et Zucc.

Microrganismos	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	25	25
<i>Proteus mirabilis</i>	25	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,12	25
<i>Salmonella typhimurium</i>	25	25
<i>S. epidermidis</i>	25	25

4. Discussão

Os microrganismos testados obtiveram resultados bastante semelhantes nos três testes realizados. Porém, dentre os mesmos, destaca-se a estirpe de *Klebsiella pneumoniae*, por ter demonstrado um valor significativo de inibição superior nos testes de difusão em ágar e concentração inibitória mínima, com capacidade de inibição de crescimento microbiano em 3,12 mg/mL de extrato e halo de inibição igual a 21,5 mm.

As bactérias testadas são pertencentes a microbiota normal do corpo humano. Porém, todas são causadoras de infecções, podendo ser consideradas leves como espinhas, furúnculos, celulites, infecções de feridas, gastroenterites, ou mais graves como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, insuficiência renal, febre tifoide e outras (Murray et al., 2015).

A pesquisa realizada por Silva (2004) avaliou a composição e o teor de metabólitos secundário do extrato bruto metanólico das folhas de *Luehea candicans*. O estudo evidenciou a presença de flavonoides, triterpenos, esteroides e outros compostos químicos. Possivelmente os flavonoides são os principais responsáveis pela ação antimicrobiana

deste estudo, visto que possuem capacidade de complexação com a parede celular bacteriana que, quanto mais lipofílico, maior a capacidade de rompimento da mesma (Müller, 2006).

Além disso, também foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico das folhas de *L. candicans* frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, e os fungos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. O teste não apresentou resultado positivo frente as bactérias testadas. Porém, apresentou resposta significativa contra a cepa *Candida krusei*, onde o extrato demonstrou uma capacidade fungicida (Silva, 2004).

Ao contrário dos resultados apresentados pelo extrato metanólico, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Luehea candicans* obteve resultados positivos, isso pode estar relacionado com a maior extração de compostos flavonoides por serem moléculas com características mais polares facilitando o processo de extração (Souza-Sartori et al., 2013).

Nesse contexto, conclui-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Luehea candicans* Mart et Zucc apresenta atividade antimicrobiana frente a todas as cepas

testadas, sendo elas diferentes estirpes de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Contudo, pode-se realizar novos ensaios a fim de certificar que a atividade antimicrobiana do extrato seja eficaz e segura no seu uso como fitoterápico, além de corroborar e assegurar os resultados obtidos neste trabalho.

Declaração: Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas experimentais de acordo com a Declaração Universal do Direito dos Animais. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

5. Referências

- Antunes RMP, Lima EO, Pereira MSV, Camara CA, Arruda TA, Catão RMR, Barbosa TP, Nunes XP, Dias CS, Silva TMS. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 517-524, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Atenção à Saúde. Cadernos de Atenção Básica: Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica, 2012. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf>. Acesso em: 31 de Agosto de 2014.
- Bovini MG, Esteves G, Duarte MC, Takeuchi C, Kuntz J. *Malvaceae* in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB156>>. Acesso em: 31 de Agosto de 2014.
- Esteves G. *Luehea* in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9095>>. Acesso em: 31 de Agosto de 2015.
- Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, Mendonça LCV, Silva RMF, Rolim-Neto PJ, Barbosa WLR, Vieira JMS. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32, 121-125, 2011.
- Müller JB. Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martius, 2006 [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS.
- Murray P, Rosenthal KS, Pfäller MA. *Microbiologia Médica*. São Paulo, Brasil: Elsevier Brasil, 2015.
- NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute). M2-A8: Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 31 de Agosto de 2014.
- Palmeira JD, Almeida JM, Ferreira SB, Souza JH, Catão RMR, Antunes RMP, Figueiredo MC, Pequeno AS,

- Arruda TA. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42, 33-37, 2010.
- Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*, 42, 2012.
- Santos SN. Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga. 2012. [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo – USP. Piracicaba/SP.
- Silva DA. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* Mart et Zucc. (Tiliaceae). 2004. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá/PR.
- Souza-Sartori JA, Scalise C, Baptista AS, Lima RB, Aguiar CL. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. *Bioscience Journal*, 29, 297-307, 2013.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). The world medicines situation 2011: Medicines prices, availability and affordability, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf>. Acesso em: 30 de Agosto de 2014.

Editor Associado: Ana Paula Salles de Assis