

A UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E ALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* L. COMO AGENTE ANTIBACTERIANO

Alexandre Tourino MENDONÇA¹

Amanda Rosa CARVALHO²

Maristela Costa FERREIRA³

Maurício Cezar RESENDE JÚNIOR⁴

¹Doutor em Ciências dos Alimentos e professor da UninCor/FCTE, alexandretourino@gmail.com

²Graduada em Farmácia, Responsável Técnica por Laboratórios e Clínicas UninCor/FCTE, amandarosacarvalho@hotmail.com

³Graduada em Farmácia, maristelateen@hotmail.com

⁴Doutor em Recursos Hídricos e professor da UninCor/FCTE, extensão@hotmail.com

Recebido em: 27/03/2016 - Aprovado em: 25/05/2016 - Disponibilizado em: 30/07/2016

RESUMO: A utilização de plantas medicinais para tratamento de enfermidades é conhecida desde as mais antigas civilizações. O conhecimento empírico pela população em relação ao emprego destas plantas é o que constitui melhor aceitação e divulgação do uso da fitoterapia como parte ou total da terapêutica. As infecções bacterianas apresentam um crítico cenário atual, responsáveis pelos mais diversos problemas de saúde. Agentes químicos e biológicos podem paralisar, remover ou inibir os micro-organismos causadores de patogenia. A resistência de patógenos a antimicrobianos existentes é um dos problemas de saúde pública atuais. O uso irracional destes medicamentos fez com que bactérias previamente suscetíveis, se tornassem resistente a eles. A necessidade de descoberta de novos compostos antimicrobianos é de importância para a saúde pública. A pesquisa de antibióticos em plantas medicinais é uma alternativa para descoberta de novos agentes capazes de sensibilizar bactérias multirresistentes. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e alcoólico das folhas da *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.* O teste de sensibilidade destas cepas ao extrato hidroalcoólico e alcoólico foi desenvolvido por disco difusão em placas de Petri, com Agar Müller Hinton com as cepas semeadas. Nos discos foram distribuídas diferentes concentrações do extrato, a sensibilidade foi observada pelo tamanho dos halos de inibição formados. Foram apresentados resultados positivos de ação antibacteriana dos extratos nas cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*

Palavras-chave: *Eugenia uniflora* L.. Atividade Antimicrobiana. Plantas Medicinais. Disco difusão. Bactérias multirresistentes.

ABSTRACT: The use of medicinal plants for treatment of diseases has been known since the most ancient civilizations. Empirical knowledge by the population in relation to the use of these plants is what cause better acceptance and dissemination of the use of phytotherapy as part or total of therapy. Bacterial infections have a critical current scenario, responsible for various health problems. Chemical and biological agents can paralyze, remove or inhibit the pathogen. The resistance of pathogens to existing antimicrobial is one of the current public health problems. The irrational use of these drugs has made previously susceptible bacteria become resistant to them. The need for discovery of new antimicrobial is of importance to public health. A survey of medicinal plants of antibiotics is an alternative for discovery of new agents capable of sensitizing multidrug-resistant bacteria. The objective of this study is to evaluate the antimicrobial activity of the hydroalcoholic and alcoholic extract of the leaves of *Eugenia uniflora* L., in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas sp.*. The sensitivity test these bacteria to hydro-alcoholic and alcoholic extract was developed by disk diffusion in Petri dishes with agar Müller Hinton with sown bacteria. In disks are distributed different concentrations of the extract, the sensitivity was observed by the size of inhibition zones formed. Were presented positive results of antibacterial activity of the extracts in the *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas sp.*

Keywords: *Eugenia uniflora* L.. Antimicrobial activity. Medicinal Plants. Disk diffusion. Multidrug-resistant bacteria.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento de enfermidades é conhecida desde as mais antigas civilizações. O conhecimento empírico pela população em relação ao emprego destas plantas é o que constitui melhor aceitação e divulgação do uso da fitoterapia como parte ou total da terapêutica. As mais diversas plantas vêm sendo testadas pelo mundo inteiro e auxiliam significativamente como primeiros cuidados com a saúde.

O Brasil possui uma grande biodiversidade e por isso a busca por novos compostos isolados da vegetação é comumente frequente neste país. São comercializadas em feiras, mercados e até plantadas em quintais de casas, utilizados amplamente como anti-inflamatório, analgésicos, antirreumático, hipoglicemiante e antibiótico.

As infecções bacterianas apresentam um crítico cenário atual, responsáveis pelos mais diversos problemas de saúde como infecções do trato urinário, hospitalares e alimentares. Agentes químicos e biológicos podem paralisar, remover ou inibir os micro-organismos causadores de patologia.

A resistência de patógenos a antimicrobianos é um dos problemas de saúde pública atuais. O uso irracional destes medicamentos fez com que bactérias previamente suscetíveis, se tornassem resistentes a eles. São inúmeros os problemas

acarretados devido a este quadro de resistência.

A necessidade de descoberta de novos compostos antimicrobianos é de importância para a saúde pública. A pesquisa de antibióticos em plantas medicinais é uma alternativa para descoberta de novos agentes capazes de sensibilizar bactérias multirresistentes.

Estas plantas possuem vários compostos ativos, o que abrange em grande amplitude, os estudos de descobertas de novas terapêuticas. Estes compostos são sintetizados pelas plantas durante o metabólito secundário, sendo utilizados como agente de defesa contra predadores como micro-organismos e insetos.

A *Eugenia uniflora* L. apresenta-se como um arbusto ou árvore semidecídua, de 4 a 10 m de altura, copa estreita de tronco liso de cor pardo clara. As folhas são simples, cartáceas, de 3 a 7 cm de comprimento, com aroma característico. As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os frutos são do tipo drupa. Globosos e sulcados, brilhantes e de cor vermelha, amarela ou preta, com polpa carnosa e agridoce, contendo 1 a 2 sementes (LORENZI; MATOS, 2002; apud LORENZONI et. al, 2011).

Objetiva-se neste trabalho Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas e caules da *Eugenia uniflora* L., frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*,

através da análise do halo formado a partir da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pela sensibilidade das bactérias citadas ao extrato hidroalcoólico e alcoólico de folhas da pitangueira, haja vista que são patógenos presentes na flora normal humana, em ambientes hospitalares, possuem potencial para desenvolverem resistência a antibióticos sintéticos e são causas de infecções comuns como do trato urinário, respiratório, ambiente hospitalar, meningite, otite e intoxicação alimentar.

METODOLOGIA

Material Vegetal

Utiliza-se folhas e caules de *Eugenia uniflora L.*, limpas e acondicionadas em sacos de papel por três dias a temperatura de 30°C em estufa com aeração.

Micro-organismos testados

Os micro-organismos testados são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*, doados do Laboratório IPD – Instituto de Prevenção e Diagnóstico, localizado na cidade de Varginha.

Preparação do Extrato

Os extratos são obtidos segundo a Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1959), utilizando-se o processo de maceração. O álcool etílico hidratado (30% de água) foi utilizado como solvente, devido a

sua baixa toxicidade, não inibindo o bioensaio, seu ótimo desempenho no processo extrativo e sua viabilidade econômica (ANTUNES, 2001 *apud* NASCIMENTO, 2013). Também é utilizado o álcool absoluto afim de comparação dos resultados.

Pesa-se as folhas previamente secas e trituradas, totalizando 100 gramas e utiliza-se 50 gramas para verter 50mL de álcool 70% e os outros 50 gramas são vertidos em 50 mL de álcool absoluto na proporção de 1:1, iniciando o processo de maceração. Coloca-se o extrato em recipiente estéril de vidro âmbar, durante oito dias, em temperatura ambiente, ao abrigo de luz e umidade, com agitações periódicas. Logo após, inicia-se o processo de filtração e acondicionamento em vidro âmbar, sob o abrigo de luz e umidade, em temperatura ambiente (FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1959, *apud* NASCIMENTO, 2013).

Diluição dos extratos

Utiliza-se seis tubos de ensaio estéreis, identificados com suas respectivas concentrações. No primeiro tubo adiciona-se 2mL do extrato puro (100%) com auxílio de pipetas e ponteiras estéreis, retira-se do primeiro tubo 1mL e adiciona-se ao segundo tubo que contém 1mL de solução salina 0,9% (concentração 50% de extrato), assim segue-se a diluição até o tubo seis com concentração de 3,125%.

Preparação dos inóculos

Os inóculos foram preparados e padronizados em solução fisiológica esterilizada, comparando-se a turbidez com o tubo nº0,5 da escala MC Farland a fim de se obter cerca de 10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2005).

Difusão em disco

Na placa de Petri contendo Ágar Mueller Hinton, como meio de cultura, espalha-se, com o auxílio de “swabs” estéreis, o inóculo preparado com a salina estéril.

Na placa de Petri identifica-se o local onde serão colocados os discos impregnados com o extrato em diferentes concentrações, com espaço de 20mm entre os discos e 15mm da borda externa da placa, distribui-se os discos com ajuda de uma pinça estéril.

As placas então foram incubadas a 28-35°C por 24 horas e após este período, foram medidas as zonas de inibição, em milímetro. Cada ensaio foi realizado em duplicata para cada cepa selecionada. O resultado final é determinado pelo cálculo da média aritmética do tamanho dos halos de inibição (mm) encontrados (BAUER *et al.*, 1996 *apud* NASCIMENTO, 2013), utilizando paquímetro universal para medir os halos formados.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

A atividade biológica do produto será considerada positiva quando a média dos halos de inibição for igual ou superior a 8mm de diâmetro (SAKAR *et al.*, 1988; WONG-LEUNG *et al.*, 1988; NAQUI *et al.*, 1991; CATÃO, 2007; CATÃO *et al.*, 2010; PALMEIRA *et al.*, 2010; *apud* NASCIMENTO, 2013).

A determinação da concentração inibitória é a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiológico.

RESULTADOS

Foram realizados dois tipos de extratos: um extrato com álcool 70% e outro com álcool absoluto, para avaliar a eficiência da atividade antimicrobiana da *Eugenia uniflora L.*

Os resultados obtidos nos ensaios de difusão em discos realizados com os extratos de *Eugenia uniflora L* (pitangueira), demonstraram atividade antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*, visto que após leitura da placa foi possível observar halos superiores a 8mm.

Tabela I - Extrato hidroalcoólico contendo álcool 70%

Planta - Pitangueira	Concentração	Diâmetro do halo (mm)		
		100%	17mm	17mm
	50%	14mm	10mm	-
	25%	8mm	9mm	-
	12,5%	8mm	-	-
	6,25%	-	-	-
	3,125%	-	-	-
		S.A	E.C	P.S

CARVALHO; FERREIRA; TOURINO 2015
(S.A- *Staphylococcus aureus*, E.C-*Escherichia coli*, P.S-*Pseudomonas sp.*)

Tabela II – Extrato contendo álcool absoluto.

Planta - Pitangueira	Concentração	Diâmetro do halo (mm)		
		100%	9mm	8mm
	50%	8mm	8mm	8mm
	25%	-	-	-
	12,5%	-	-	-
	6,25%	-	-	-
	3,125%	-	-	-
		S.A	E.C	P.S

CARVALHO; FERREIRA; TOURINO 2015
(S.A- *Staphylococcus aureus*, E.C-*Escherichia coli*, P.S-*Pseudomonas sp.*)

Tabela III – Controle de discos contendo respectivamente: salina, álcool absoluto e álcool 70%

Discos controle	Diâmetro do halo (mm)		
Salina	-	-	-
Álcool absoluto	5mm	4mm	-
Álcool 70%	5,5mm	6,5mm	-
	S.A	E.C	P.S

CARVALHO; FERREIRA; TOURINO 2015
(S.A- *Staphylococcus aureus*, E.C-*Escherichia coli*, P.S-*Pseudomonas sp.*)

Nas diluições que apresentaram atividade antimicrobiana no extrato contendo álcool 70%, observou-se a formação de halos nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% para *Staphylococcus aureus*; 100%,

50% e 25% para *Escherichia coli* e 100% para *Pseudomonas sp.* Os tamanhos dos diâmetros dos halos apresentaram-se maiores que os formados nos discos controle.

No extrato contendo álcool absoluto, observou-se a formação de halos nas concentrações 100% e 50% para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*, o que comprova a efetividade do extrato da pitanga como agente antibacteriano, já que no disco controle contendo álcool absoluto pode-se observar a formação do halo inferior a 8mm.

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a ação antimicrobiana dos extratos bruto e hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora L.*, frente a cepas de *E.coli*, *S.aureus* e *Pseudomonas sp.* Observou-se que os dois extratos comportaram-se como antibióticos em diferentes concentrações, considerando a média do diâmetro do halo formado no antibiograma.

De acordo com o controle realizado com a solução salina estéril, álcool 70% e álcool absoluto, o resultado apontado é que estes não interferiram na ação antimicrobiana dos extratos.

Devido à volatilização do álcool absoluto durante a maceração e melhores resultados apresentados com o extrato obtido através do álcool 70%, sugere-se que as

próximas pesquisas utilizem como extrator o último citado.

A efetividade da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico se destacou através da avaliação da concentração mínima inibitória (CMI), pela inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus*. Já o extrato bruto apresentou a mesma CMI para as cepas de *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Na literatura pesquisada, alguns resultados semelhantes foram apresentados por BEZERRA *et. al* (2012) diferindo em tamanho dos halos formados no antibiograma, NASCIMENTO (2013) que utilizou fruto, talos e folhas para o preparo dos extratos e SILVA (2010) que utilizou extrato e óleo essencial de *Eugenia uniflora L.* como agente antimicrobiano frente cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com os existentes em pesquisas publicadas, nota-se que o potencial antimicrobiano dos extratos de *Eugenia uniflora L.* não é igual para todos, visto que esta ação é devida a produção de metabólitos secundários, que segundo (GOTHIEB, 1981 *apud* LORENZONI, 2013) são afetados pelo meio externo e interno do vegetal como, por exemplo, espécie, variedade, estresse ambiental a que foi submetida à planta, estágios de crescimento e maturação, além da metodologia analítica empregada na determinação dos mesmos. Graças à atividade

desses metabólicos secundários, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros.

Notou-se que os extratos apresentaram ação antibacteriana tanto em bactérias Gram positivas, representadas pela *Escherichia coli* quanto em bactérias Gram negativas, aqui representadas pelo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*

CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos, conclui-se que o extrato alcoólico bruto e hidroalcoólico da folha da *Eugenia uniflora L.* (pitanga), apresenta atividade antibacteriana nas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*

Todas as bactérias apresentaram sensibilidade aos extratos na concentração de 100%.

A concentração mínima inibitória ao extrato hidroalcoólico para *Staphylococcus aureus* foi de 12,5%, para *Escherichia coli* foi de 25% e para *Pseudomonas sp.* 50%.

O álcool 70% utilizado como extrator apresentou melhor eficácia devido ao tamanho do diâmetro do halo formado, mostrando-se maiores quando comparados com os do extrato com álcool absoluto.

Sugere-se a realização de novos trabalhos voltados para a pesquisa do perfil

fitoquímico da *Eugenia uniflora L.*, para assim identificar o metabólito secundário produzido pela pitangueira que apresenta ação antibacteriana, visto que na literatura pesquisada há poucos trabalhos publicados para tal finalidade, afim de isolamento e produção de novos medicamentos antimicrobianos sintéticos ou naturais.

AGRADECIMENTO

Seremos eternamente gratas a Deus, por nos capacitar e proporcionar a realização

REFERÊNCIAS

ANDRADE Susana R. A; **Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos sobre cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri*; Campina Grande – Paraíba 2013.**

BEZERRA, Natália A; **Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora L.***, Campina Grande – Paraíba, 2012.

BRUN Graziela R. – MOSSI, Altemir J; **Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana do Óleo Volátil de Pitanga (*Eugenia uniflora L.*)**, PERSPECTIVA, Erechim. v.34, n.127, p. 135-142, setembro/2010.

HARVEY, R. A; CHAMPE, P. C; FISHER, B. D; **Microbiologia Ilustrada**. 2ª Edição. Porto Alegre; Artmed, 2008.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A; **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512p., 2002.

do sonho de sermos farmacêuticas. Agradecemos ao nosso orientador Dr Alexandre Tourino Mendonça pelo auxílio na elaboração deste artigo. Agradecemos também ao Laboratório IPD – Instituto de Prevenção e Desenvolvimento, na pessoa do Professor Orildo Pereira, pela doação das bactérias e placas de ágar Müeller Hinton. Somos gratas aos nossos pais, irmãos e namorados pelo incentivo e paciência.

LORENZONI, Luciana de Souza; GANDINE, Simony M. S; SOUZA, Tércio da Silva; JUNIOR, Alexandre Cristiano Santos; ULISSES, Alessandra de Fátima; **Estudo Fitoquímico e Antibacteriano do Extrato Etanólico de *Eugenia uniflora L.* (Myrtaceae)**; Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - V.9, n.17; p. 2796; Goiânia – Goiás; 2013.

LORENZONI, Luciana de Souza; BERNARDO, Flávia P. A; MOULIN, Tatiane, GANDINE, Simony M. S; **Utilização do extrato bruto de *Eugenia uniflora L.* (PITANGA) em teste antibacteriano *in vitro***; Espírito Santo, 2011.

NASCIMENTO, André Luiz D. R, **Ação Antimicrobiana do Extrato de *Eugenia uniflora L.* (Pitanga) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* e *Escherichia coli***, Campina Grande – Paraíba 2013.

SILVA, Nathália Cristina Cirone; **Estudo Comparativo da Ação Antimicrobiana de Extratos e Óleos Essenciais de Plantas Medicinais e Sinergismo com Drogas Antimicrobianas**; Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu – São Paulo, 2010.

TAVARES, Walter; **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos** - 2ª Edição; São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L; **Microbiologia** – 10ª Edição; Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

TRABULSI, Luiz R; ALTERTHUM, Flávio; **Microbiologia** - 5ª Edição, São Paulo: Atheneu, 2008.