



Atividade Antimicrobiana da *Uncaria Tomentosa* (Willd) D. C.

Diego Silva e Sá^{1*}; Grazielle Esteves Ribeiro²; Luciana Rosa Alves Rufino³; Nelma de Mello Silva Oliveira³; João Evangelista Fiorini³

¹ Curso de Farmácia- Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

² Curso de Biomedicina- Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

³ Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos (UNIFENAS) – Alfenas, MG, Brasil.

RESUMO

A *Uncaria tomentosa* (Willd) D. C. (unha de gato) é uma planta amplamente utilizada na medicina popular, originária da Amazônia. Possui atividades biológicas, como anti-inflamatória, antimutagênica e antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *U. tomentosa*, seco e hidroalcoólico, obtido comercialmente, utilizando-se 12 cepas de microrganismos (6 Gram-positivas e 6 Gram-negativas). Os testes antimicrobianos foram realizados em ágar BHI pela técnica de difusão em ágar. Também foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM). Os testes demonstraram que os extratos inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo o extrato hidroalcoólico mais eficiente que o extrato seco. Conclui-se que o extrato de *U. tomentosa* possui atividade antimicrobiana podendo ser utilizado como uma alternativa terapêutica de baixo custo.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Unha de Gato. Extrato seco. Extrato hidroalcoólico.

INTRODUÇÃO

A *Uncaria tomentosa* é uma trepadeira, com folhas compostas, opostas e ovais podendo ser encontrada em toda a Amazônia (Simões et al., 2004). É uma planta medicinal amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de várias enfermidades como, câncer, gastrite, reumatismo, artrite e certas afecções epidérmicas, como a candidose oral (Gattuso et al., 2004; Jurgensen et al., 2005; Kloucek et al., 2005; Martino, 2006; Paiva et al., 2009; Dreifuss et al., 2010).

Estudos fitoquímicos observaram a presença de alcaloides oxindólicos, N-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glicosilados, taninos e flavonoides, sendo estes responsáveis por suas atividades biológicas (Heitzman et al., 2005; Bertol et al., 2012).

Apesar de inúmeros estudos sobre suas propriedades terapêuticas, há uma carência de comprovações científicas sobre sua atividade antimicrobiana. Sendo assim, tornam-se necessários estudos que comprovem esta ação.

O conhecimento sobre espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos como o limitado espectro de ação e seus efeitos colaterais (Mota, 2005; Silveira, 2006), além da aquisição de resistência múltipla aos mesmos. As infecções bacterianas estão disseminadas pelo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento e, por isso, os estudos sobre a atividade antimicrobiana de plantas representam um grande desafio para a descoberta e a identificação de novos fármacos (Ramos et al., 2008; Guimarães et al., 2010).

O presente trabalho objetivou analisar a atividade antimicrobiana do extrato seco e hidroalcoólico de *U. tomentosa*, através do teste de difusão em ágar e determinação da CIM e CMM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de realização dos experimentos

Os testes foram realizados no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da UNIFENAS, Campus de Alfenas-MG.

Procedência dos extratos de *U. tomentosa*

Foram utilizados extrato em pó da *U. tomentosa*., comercializados em uma farmácia da cidade de Alfenas - MG, proveniente das folhas e também o extrato hidroalcoólico fornecido por um comércio de produtos naturais, proveniente da casca da planta, sendo estes previamente padronizados.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Microrganismos e preparo do inóculo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos e hidroalcoólicos de *U. tomentosa*, foram utilizados os microrganismos relacionados na Tabela

1, oriundos do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microorganismos/UNIFENAS, todos rotulados na American Type Culture Collection (ATCC).

As cepas foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C, por 24h. Para o preparo do inóculo, as culturas de cada microrganismo foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de salina esterilizada de forma a obter-se turbidez equivalente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland.

Tabela 1. Microrganismos utilizados nos ensaios com *U. tomentosa*.

MICRORGANISMOS	
Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13046)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12226)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

No teste de diluição foram inoculados 0,1 mL da suspensão microbiana em uma série de tubos, contendo uma variação de concentrações de 5 a 80 mg/mL dos extratos *U. tomentosa*. Após 24 horas de incubação a 37°C, foram examinados visualmente para comprovação da turvação. Os tubos que se apresentaram visivelmente límpidos foram considerados positivos. Em seguida foram transferidos 0,1 mL para placas contendo ágar BHI para determinação da CMM. Após incubação fez-se a leitura através da contagem de colônias para verificação da presença ou ausência do crescimento microbiano. Foram preparados controles positivos e negativos dos componentes que intervêm no procedimento (NCCLS, 2011).

Para os microrganismos que apresentaram CIM foi realizado o teste de difusão em ágar. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Teste de difusão em ágar

Foi realizado em ágar BHI, pela técnica de poços. O pó do extrato seco de *U. tomentosa* foi obtido em cápsulas padronizadas em 200 mg/mL cada. O mesmo foi pesado em balança de precisão de modo que foram preparadas as soluções com as concentrações desejadas. Para obter a concentração de 80 mg/mL foi preparado uma solução de 5 mL. Foram pesados 400 mg e diluídos em 5 mL de água em seguida foram filtradas em sistema a vácuo utilizando

filtro Millipore 0,22 µm para esterilização. Em seguida foram adicionados 300 µL em cada poço correspondentes à 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 mg/mL. A atividade *in vitro* baseou-se na formação de halos de inibição de crescimento, para as diferentes concentrações da substância, de acordo com o método descrito por Bauer & Kirby (1966). Foram preparados controles negativos (água) e controles positivos (clorexidina 10%).

Estudos realizados por Santa Maria et al. (1997) revelaram ausência de inibição *in vitro* em concentrações de até 100 mg/mL, justificando a utilização das doses testadas neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de macrodiluição em caldo (CIM) demonstraram que o extrato seco de *U. tomentosa* inibiu o crescimento microbiano de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* variando de 20 a 30 mg/mL. Não foi eficiente para *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*. Já o extrato hidroalcoólico inibiu as cepas de *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* nas concentrações que variaram de 20 a 80 mg/mL. Não foi eficiente para *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus epidermidis* (Tab 2).

Somente as cepas de *Bacillus cereus* e *Streptococcus pyogenes* nas concentrações de 60 e 80 mg/mL, respectivamente, apresentaram Concentração Microbicida Mínima (CMM) para o extrato seco. Já para o extrato hidroalcoólico todos os microrganismos que apresentaram CIM, demonstraram atividade bactericida (CMM), exceto *Micrococcus luteus* (Tab. 2).

Somente *Bacillus cereus* e *Streptococcus pyogenes*, nas concentrações de 40, 60 e 80 mg/mL do extrato seco, apresentaram halos de inibição. Não houve formação de halos para os demais microrganismos. Nenhum microrganismo testado apresentou halos de inibição diante do extrato hidroalcoólico.

Os resultados obtidos confirmam os estudos de Kloucek et al. (2005), em que o extrato da *U. tomentosa* apresentou atividade antibacteriana contra: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em concentração de 16 mg/mL.

Herrera et al. (2010) avaliou a atividade antimicrobiana do gel de *U. tomentosa* contra patógenos endodotônicos e apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Ccahuana-Vasquez et al. (2007), utilizando o teste de difusão em ágar, das 106 estirpes isoladas da cavidade oral humana 22 eram de *S. aureus* e todas apresentaram CIM na concentração de 2% do extrato seco. Estes estudos corroboram com nossos, pois também houve inibição de *S. aureus*.

Não houve inibição para *Pseudomonas aeruginosa*, como para o extrato seco aqui testado.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima do Extrato Hidroalcoólico e do Extrato Seco da *U. tomentosa*.

MICROORGANISMOS	CIM ¹ mg/mL do extrato seco	CMM ² mg/mL do extrato seco	CIM ³ mg/mL do ex. hidroalcoólico	CMM ⁴ mg/mL do ex. hidroalcoólico
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	20	60	30	30
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	—*	—*	—	—
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13046)-	—	—	60	60
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	—	—	80	80
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	—	—	80	80
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	30	—	40	—
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	—	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	—	—	40	40
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	—	—	60	60
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	30	—	30	60
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC12226)	—	—	—	—
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	20	80	20	20

¹ Concentração Inibitória Mínima do extrato seco.

² Concentração Microbicida Mínima do extrato seco.

³ Concentração Inibitória Mínima do extrato hidroalcoólico.

⁴ Concentração Microbicida Mínima do extrato hidroalcoólico.

* Ausência de inibição.

Em pesquisas realizados por Diniz (2008), pela técnica de difusão em agar, o extrato das raízes de *U. tomentosa*, não apresentou atividade antibacteriana, estando em contradição com nossos estudos, em que houve inibição para a maioria das cepas.

Comparativamente o extrato hidroalcoólico proveniente da casca da planta, obteve maior atividade antimicrobiana que o extrato seco proveniente das folhas. Esta divergência de resultados e a diferença da ação dos diferentes extratos podem estar relacionada aos diferentes métodos de extração, bem como, diferentes condições ambientais, origem e partes utilizadas da planta e, por conseguinte diferentes concentrações e polaridades dos princípios ativos.

Em estudos comparativos com diferentes extratos da *U. tomentosa*, o extrato aquoso liofilizado da casca apresentou maior atividade antioxidante que o extrato seco obtido comercialmente, que ressalta a possibilidade do extrato da casca obter maior quantidade de princípios ativos (Marques, 2008).

Em relação ao antibiograma, os resultados obtidos podem ter ocorrido em consequência das desiguais polaridades dos princípios ativos, dificultando sua difusão no agar.

De acordo com Dotto et al. (2006), devido ao fato do meio de cultura possuir substâncias tamponadoras, mesmo que os princípios ativos presentes no extrato tenham se difundido, a magnitude de pH alcançada em torno do extrato pode ser insuficiente para exercer atividade antimicrobiana.

Estudos fitoquímicos possibilitaram o isolamento de alcaloides oxindólicos, *N*-oxi-ndólicos e indólicos,

triterpenos glicosilados, taninos e flavonoides do extrato de *U. tomentosa* (Heitzman et al., 2005; Bertol et al., 2012). Estes princípios ativos podem estar relacionados com a sua ação antimicrobiana, justificando nossos resultados, uma vez que flavonoides, terpenos (Gutkind et al., 1984; Perruchon, 2002; Singh & Singh, 2003; Simões et al., 2004; Weniger et al., 2005; Alencar et al., 2007) e taninos (Scalbert, 1991; Loguercio et al., 2005) possuem ação antimicrobiana comprovada.

A ação antimicrobiana dos taninos pode ser explicada por três hipóteses: A primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas, se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (Scalbert, 1991; Loguercio et al., 2005).

Entretanto Andresek e colaboradores (2004) afirmam que diferentes extratos com compostos de diferentes polaridades frequentemente apresentam uma tendência similar relacionada à atividade antimicrobiana, já que a droga vegetal pode conter vários princípios ativos com o mesmo efeito possibilitando interações sinérgicas e superior eficácia em relação aos compostos isolados.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os extratos secos e hidroalcoólico de *U. tomentosa* apresentam ação bactericida e bacteriostática diante de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,

porém não é eficaz para todos os microrganismos, sendo o extrato hidroalcoólico mais eficaz que o extrato seco.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of Uncaria tomentosa (Willd) DC.

The plant *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. (cat's claw), found in the Amazon region and widely used in popular medicine, has anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant activities. The aim of this study was to test the antimicrobial activity of two commercially prepared extracts of *U. tomentosa*, one dried extract of bark and the other hydroalcoholic leaf extract, against 12 strains of bacteria (6 Gram-positive and 6 Gram-negative). The antimicrobial tests were conducted by diffusion in BHI agar. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Microbicidal Concentration (MMC) were also determined. The tests showed that both extracts inhibited the growth of Gram-positive bacteria, but the hydroalcoholic extract was more effective and also inhibited Gram-negative bacteria. It is concluded that the *U. tomentosa* extract has an antimicrobial activity and can be used as a low-cost alternative treatment.

Keywords: Antimicrobial activity. Cat's claw. Dried extract. Hydroalcoholic extract.

REFERÊNCIAS

Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JÁ, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113:278-83

Andrensek A, Simonovska B, Vovk I, Fyhrquist P, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using Extrachrom. *Int J Food Microbiol.* 2004;92(2):181-87.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:493-96.

Bertol G, Franco L, Oliveira BH. HPLC Analysis of Oxindole Alkaloids in *Uncaria Tomentosa*: Sample Preparation and Analysis Optimisation by Factorial Design. *Phytochem Anal.* 2012;23: 143-51.

Ccahuana-Vasquez RA, Santos SSF, Koga-Ito C.Y, Jorge AOC. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res São Paulo.* 2007;21(1):46-50.

Diniz DN. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais sobre microrganismos do biofilme dental e leveduras do gênero *Candida*. 2008. 112 f. Tese

[Doutorado] Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

Dotto S R, Travassos R M C, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de medicações usadas em endodontia. *Rev Odonto Ciênc.* 2006; 21(53):266-9.

Dreifuss A A, Bastos-Pereira A L, Avila T V, Soley B S, Rivero A J, Aguilar J L, Acco A. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *J Ethnopharmacol.* 2010;130: 127-33.

Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* 2005;66(1):5-29.

Herrera D R, Tay L Y, Resende E C, Kozłowski V A, Santos E B. In vitro antimicrobial activity of phytotherapeutic *Uncaria tomentosa* against endodontic pathogens. *J Oral Sci.* 2010;52(3):473-6.

Gattuso M, Di Sapio O, Gattuso S, Pereyra E L. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. *Phytomedicine.* 2004;11(2-3):213-23.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím Nova.* 2010;33(3):667-79.

Gutkind G, Norbedo C, Mollerach M, Ferrado G, Torres DER. Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. *J Ethnopharmacol.* 1984;10:319-21.

Jurgensen S, Dalbo S, Angers P, Santos A R, Ribeiro-do-Valle RM. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharm Biochem Behavior.* 2005; 81(3):466-77.

Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antivacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(2):309-12.

Loguercio A P, Battistin A, Vargas A C V, Henzel A, Witt N M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygiumcumini* (L.) Skells). *Ciênc Rural.* 2005;35(2):371-6.

Marques, O. C. P. *Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de Uncaria tomentosa com atividade aintioxidante.* 2008. 181 f. Tese (Dissertação de Mestrado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

Martino L, Martino JL, Franceschelli S, Leone A, Pizza C, De Feo V. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(1):91-4.

Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005;42(6):465-70.

- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 2011.
- Paiva L C A, Ribeiro R A, Pereira J V, Oliveira N M C. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. Braz J Pharmacogn. 2009;19(2A):423-8.
- Perruchon S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. Cosmet Toilet. 2002;14(6):74.
- Ramos D antimycobacterial activity of 36 F, Leitão G G, Costa F N, Abreu L, Villarreal J V, Leitão S G. et al. Investigation of the plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. Rev Bras Ciênc Farm. 2008;44(4):669-74.
- Santa Maria A, Lopez A, Diaz MM, Albán J, Galán De Mera A, Vicente Orellana JA, Pozuello JM, Evaluantion of the toxicity of *Uncaria Tomentosa* by bioassays *In Vitro*. J Ethnopharmacol. 1997 aug;57(3):183-7.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 1991;30:3875-83.
- Silveira G P. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Quim Nova. 2006;29:844-55.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Florianópolis: Ed UFSC; 2004. p. 615-56.
- Singh B, Singh S. Anticicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. Phytother Res. 2003;17(7): 814-6.
- Weniger B, Lobstein A, UM B, Vonthoron-sénéchau C, Anton R, Usuga N J, Baram H, Lugnier C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. Phytother Res. 2005;19:75-7.

Recebido em 25 de agosto de 2012

Aceito para publicação em 02 de agosto de 2013

