Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2009;30(2):183-186
ISSN 1808-4532

Análise da atividade antimicrobiana das folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae)

Soares, M.L.[1]; Bustamante, K.G.L.[1]; Figueiredo, A.D.L.[1]; Pimenta, F.C. [2]; Fiuza, T.S.[1]; Bara, M.T.F. [3]; Tresvenzol, L.M.F. [3]; Paula, J.R.[3]*.

[1] Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brasil
[2] Instituto de Patologia Tropical, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brasil
[3] Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Go, Brasil

Recebido 20/03/2009 / Aceito 22/09/2009

RESUMO

***Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae) é um arbusto, usado popularmente como adstringente, tônico, sedativo, diurético, no tratamento de hemorróidas, hérnia e em aplicações tópicas como anti-séptico na limpeza de ferimentos. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos das folhas de *D. elliptica* coletadas em Alexânia e Goiânia, Goiás, Brasil. Os extratos etanólicos brutos foram obtidos, por maceração a frio, a partir das folhas dessecadas e pulverizadas. A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando 25 cepas de microrganismos (Gram-negativos, Gram-positivos e levedura) através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando-se o inoculador de Steers. Os extratos obtidos de plantas coletados nas duas localidades inibiram o crescimento de todas as cepas avaliadas. O extrato da amostra coletada em Alexânia apresentou atividade antimicrobiana com CIM variando de 0,371 mg/mL a 0,743 mg/mL. O extrato da amostra coletada em Goiânia apresentou CIM variando de < 0,023 mg/mL a 11,9 mg/mL. Os extratos etanólicos brutos das folhas de *D. elliptica* foram mais ativos contra as bactérias Gram-positivas do que para as bactérias Gram-negativas.**

Palavras-chave: Cerrado. Concentração inibitória mínima. Plantas medicinais.

INTRODUÇÃO

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 (Nepomuceno et al., 2003). 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 (Estanislau et al., 2001).

A espécie *Davilla elliptica* St.-Hil., pertencente à família Dilleniaceae (Joly, 1998), é uma entre as inúmeras espécies vegetais que são investigadas quanto ao potencial medicinal. *D. elliptica* é um arbusto, também conhecida como cipó-caboclo e pau-de-bugre (Rodrigues & Carvalho, 2001; Rodrigues et al., 2002), que ocorre naturalmente no bioma Cerrado (Sano & Almeida, 1998; Silva et al., 2001). É usada na medicina popular brasileira como adstringente, tônico, sedativo, diurético (Rodrigues & Carvalho, 2001), no tratamento de hemorróidas, hérnia e em aplicações tópicas como anti-séptico na limpeza de ferimentos (Silva et al., 2001). Segundo Soares et al. (2005) essa espécie apresenta uma grande diversidade de substâncias do metabolismo secundário como flavonóides, saponinas, esteróides, taninos, cumarinas e triterpenóides.

Investigações farmacológicas realizadas com os extratos metanólico e etanólico da folhas da *D. elliptica* mostraram atividade imunoestimulatória em ratos, através da modulação da ativação de macrófagos (Carlos et al., 2005), enquanto o extrato hidroalcoólico das partes aéreas apresentou atividade antiinflamatória (Azevedo et al., 2007).

Em relação à atividade antimicrobiana, Michelin et al. (2005) mostraram que os extratos metanólicos das folhas e casca de *D. elliptica* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis, B.cereus, Shigella* spp e *Candida albicans*, e que apenas o extrato metanólico das folhas apresentou atividade contra *Enterococcus faecalis* e *Salmonella* spp. Lopes et al. (2007) observaram atividade antimicrobiana in vitro do extrato clorofórmico das folhas de *D. elliptica*, sugerindo efeito terapêutico potencial no controle microbiológico da tuberculose. Não foram encontrados dados na literatura pesquisada sobre a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das folhas de *D. elliptica* coletadas em Goiás, Brasil.

Levando-se em consideração a utilização popular da *D. elliptica* e a necessidade de pesquisar-se novas substâncias com atividade antimicrobiana, objetivou-se

Autor correspondente: José Realino de Paula - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás - UFG - CP.131 - CEP.74001-970 – Goiânia – GO - Brasil - e-mail: pjrpaula@gmail.com

neste estudo avaliar a ação antimicrobiana in vitro dos extratos etanólicos brutos de duas amostras de folhas da *D. elliptica* coletadas nos municípios de Alexânia e Goiânia, Goiás, contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e o fungo *C. albicans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os materiais botânicos foram coletados nos municípios de Alexânia, Goiás (16°12'52"S e 48°26'47"W a 855m de altitude) e em Goiânia, Goiás (16°34'04"S e 49°17'08"W a 766m de altitude), respectivamente em abril e julho de 2003. A identificação da espécie botânica foi realizada pelo Professor Heleno Dias Ferreira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, e as exsicatas encontram-se depositadas no Herbário dessa instituição, sob registro nº 27529 e 27530, respectivamente.

Preparação do extrato etanólico bruto

As folhas foram dessecadas em estufa com ventilação forçada a 40ºC e, em seguida, trituradas em moinho de facas. De acordo com metodologias adaptadas de Ferri (1996), o material pulverizado foi submetido a um processo de maceração a frio por no mínimo três dias, com agitação ocasional, utilizando etanol 95% PA como líquido extrator, na proporção 1:5 (p/v). Após a maceração foi realizada a filtração e o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo em temperatura inferior a 40ºC.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Microrganismos e preparo do inóculo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto de *D. elliptica*, foram utilizados os microorganismos relacionados na Tabela 1, oriundos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)/UFG, *American Type Culture Collection* (ATCC), da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto/USP e do Laboratório de Microbiologia Clínica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP.

As cepas foram repicadas em ágar Müeller Hinton e incubadas a 37°C, por 24 h. Para o preparo do inóculo, as culturas de cada microrganismo foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de salina esterilizada de forma a obter-se turbidez equivalente à metade da escala 1,0 de MacFarland.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método da diluição em ágar conforme recomendação do NCCLS (2003).

Tabela 1. Microrganismos utilizados nos ensaios com *D. elliptica*

MICRORGANISMOS	
Bactérias Gram-positivas	**Bactérias Gram-negativas**
Staphylococcus aureus ATCC 29737	*Escherichia coli* ATCC 25922
Staphylococcus aureus *	*Escherichia coli* ATCC 8739
Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Escherichia coli* ATCC 11229
Staphylococcus aureus *	*Agrobacterium tumefaciens* ATCC 33970
Rhodococcus equi ATCC 6939	*Salmonella choleraisuis* ATCC 10708
Micrococcus luteus ATCC 9341	*Salmonella typhimurium* ATCC 14028
Micrococcus roseus **	*Salmonella* sp. **
Clostridium sporogenes ATCC 11437	*Enterobacter cloacae* FT 502 ***
Bacillus stearotermophilus ATCC 1262	*Enterobacter cloacae* FT 505 ***
Bacillus subtilis ATCC 6633	*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
Bacillus subtilis ATCC 007	*Serratia marcescens* ATCC 14756
Bacillus cereus ATCC 14579	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
Fungo	
Candida albicans ATCC 10231	

*cepa obtida da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto/USP; **cepa obtida do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP; ***cepa obtida do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.

Para a determinação da CIM, o extrato etanólico bruto foi pesado em tubo de ensaio e solubilizado em 2 mL de etanol 95%. Uma alíquota de 1mL do primeiro tubo foi transferida para um segundo tubo contendo 1mL de etanol 95% e assim sucessivamente para outros tubos, obtendo-se concentrações de 11,9 mg/mL a 0,023 mg/mL dos extratos das duas amostras de *D. elliptica*. Em seguida, foram adicionados 19 mL de ágar Müeller Hinton aos tubos, sendo então, submetidos à agitação em vortex e vertidos em placa de Petri. Após a solidificação do meio foi realizada a semeadura das culturas de microrganismos com a utilização do inoculador de Steers (Steers, 1959), que continha em cada poço, 100µL da respectiva suspensão bacteriana. Placas contendo etanol a 95% e água destilada, preparadas nas mesmas condições, foram utilizadas como grupo controle. O controle com água destilada foi realizado para verificar a viabilidade dos microrganismos, e o controle com etanol a 95% para verificar a ausência da atividade inibitória do diluente. Não foram usados antimicrobianos como controles positivos, pois o objetivo do experimento foi determinar a concentração inibitória mínima dos extratos e frações e não comparar com os antimicrobianos utilizados terapeuticamente.

As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24h, após o qual a leitura foi realizada. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Foi considerada como CIM, a menor concentração capaz de inibir o crescimento das cepas dos microrganismos analisados.

RESULTADOS

Através do ensaio da atividade antimicrobiana, foi possível verificar atividade do extrato etanólico bruto das folhas das duas amostras de *D. elliptica* frente às cepas de todos os microrganismos avaliados. O extrato etanólico bruto obtido da amostra coletada em Alexânia apresentou CIM de 0,37 mg/mL para as bactérias Gram-positivas, CIM variando de 0,37 mg/mL a 0,74 mg/mL para as bactérias Gram-negativas e CIM de 0,37 mg/mL para a levedura *C. albicans* (Tabela 2).

O extrato etanólico bruto das folhas coletadas em Goiânia apresentou CIM variando de < 0,02 mg/mL a 0,74 mg/mL para as bactérias Gram-positivas, CIM variando de <0,02 mg/mL a 11,9 mg/mL para as bactérias Gram-

negativas e CIM < 0,02 mg/mL para a levedura C. albicans (Tabela 2).

Nos grupos controles realizados com água destilada e com etanol a 95%, os microrganismos cresceram adequadamente.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das folhas de *D. elliptica* frente a diferentes microrganismos.

MICRORGANISMOS	**Extrato etanólico bruto das folhas de *D. elliptica* CIM (mg/mL)**	
Bactérias Gram-positivas	Amostra I	Amostra II
Staphylococcus aureus ATCC 29737	0,37	0,74
Staphylococcus aureus *	0,37	0,74
Staphylococcus aureus ATCC 25923	0,37	0,37
Staphylococcus aureus *	0,37	0,74
Rhodococcus equi ATCC 6939	0,37	<0,02
Micrococcus luteus ATCC 9341	0,37	<0,02
Micrococcus roseus **	0,37	<0,02
Clostridium sporogenes ATCC 11437	0,37	0,74
Bacillus stearotermophilus ATCC 1262	0,37	1,49
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,37	11,9
Bacillus subtilis ATCC 007	0,37	0,74
Bacillus cereus ATCC 14579	0,37	0,74
Bactérias Gram-negativas		
Escherichia coli ATCC 25922	0,74	11,9
*Escherichia coli*ATCC 8739	0,74	11,9
Escherichia coli ATCC 11229	0,74	11,9
Agrobacterium tumefaciens ATCC 33970	0,74	1,49
Salmonella choleraisuis ATCC 10708	0,74	11,9
Salmonella typhimurium ATCC 14028	0,74	11,9
Salmonella sp. **	0,74	11,9
Enterobacter cloacae FT 502 ***	0,74	11,9
Enterobacter cloacae FT 505 ***	0,37	<0,02
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	0,74	11,9
Serratia marcescens ATCC 14756	0,37	11,9
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	0,37	0,18
Fungo		
Candida albicans ATCC 10231	0,37	<0,02

Amostra I: coletada no Município de Alexania-Go
Amostra II: coletada no Município de Goiânia - GO
CIM: Concentração Inibitória Mínima; * cepa obtida da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto/USP; **cepa obtida do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP; ***cepa obtida do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.

DISCUSSÃO

Os estudos, levando-se em conta o CIM, mostraram que o extrato etanólico bruto das amostras coletadas em Alexânia foi mais ativo frente à maior parte das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se comparado com o extrato etanólico bruto das amostras coletadas em Goiânia. As cepas Gram-positivas demonstram-se mais sensíveis aos extratos analisados do que as Gram-negativas. Como as duas amostras foram coletadas em épocas e locais distintos, é possível que a época do ano e a localidade influenciaram na atividade antimicrobiana de *D. elliptica*. Porém, há a necessidade de novos estudos a partir de um número maior de coletas nas duas localidades em diferentes épocas.

Estudo realizado por Soares et al. (2005) com as mesmas amostras foliares de *D. elliptica* revelou teores de flavonóides e taninos totais, respectivamente, de 1,20% e 9,89%, para a amostra de Alexânia, e de 1,48% e 13,96% para a amostra de Goiânia. Assim, observou-se que apesar da amostra de Alexânia possuir teores de flavonóides e taninos inferiores aos da amostra de Goiânia, a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas coletadas em Alexânia foi superior ao do extrato etanólico das folhas coletadas em Goiânia. Scalbert (1991) e Sotohy et al. (1995) relataram atividade antimicrobina dos flavonóides e taninos. Fukai et al. (2002) demonstraram atividade antimicrobiana de 19 tipos de flavonóides contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. Tereschuk et al. (1997) observaram que os flavonóides isolados das folhas de *Tagetes minuta* L inibiram o desenvolvimento do *B. subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Segundo Basile et al. (1999), os flavonóides constituem uma classe de compostos com atividade antimicrobiana reconhecida. Galina et al. (2005), em um estudo sobre a *Guazuma ulmifolia* Lam. destacam a atividade antimicrobiana dos taninos. Quanto às saponinas, Simões et al (2007) descreveram atividade molusquicida, antiviral e antifúngica.

Conclui-se que os extratos etanólicos brutos das duas amostras de *D. elliptica* apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e contra o fungo *C. albicans*, provavelmente devido à ação sinérgica entre os taninos, os flavonóides e as saponinas, o que pode justificar o uso popular dessa planta como antimicrobiana.

ABSTRACT

Investigation of antimicrobial activity of Davilla elliptica St.-Hil. leaves (Dilleniaceae)

***Davilla elliptica* St.-Hil.(Dilleniaceae) is a shrub, whose leaves are traditionally used in Brazilian popular medicine as an astringent, tonic, sedative and diuretic and to treat hemorrhoids and hernia and it is applied a topical antiseptic to clean wounds. The aim in this study was to assess the antimicrobial activity of crude ethanol extracts of *D. elliptica* leaves collected in the towns of Alexânia and Goiânia, state of Goiás, Brazil. The crude extracts were obtained by cold maceration, of the dried and pulverized leaves in ethanol. Antimicrobial activities against 25 strains of microorganisms (Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria and a yeast) were tested determining by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) in agar plates inoculated with using a Steers replicator. Extracts of from inhibited the growth of all strains evaluated. The extract of the sample collected in Alexânia showed antimicrobial activity with MICs ranging from 0.371 mg/mL to 0.743 mg/mL, while that collected in Goiânia showed MICs ranging from <0.023 mg/mL to 11.9 mg/mL. The *D. elliptica* crude leaf ethanol extracts evaluated were more active against Gram-positive than Gram-negative bacteria.**
Keywords: Cerrado. Minimum inhibitory concentration. Medicinal plants.

REFERÊNCIAS

Azevedo AO, Campos JJ, Galdino GS, Braga FC, Duarte IDG, Perez AC. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. J Ethnopharmacol. 2007; 113:354-6.

Basile A, Giordano S, López-Sáez JA, Cobianchi RC. Antibacterial activity of purê flavonoids isolated from mosses. Phytochemistry 1999; 52:1479-82.

Carlos IZ, Lopes FCM, Benzatti FP, Carli CBA, Marques MF, Jordão Júnior CM, Rinaldo D, Calvo TR, Santos LC, Vilegas W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. Rev Bras Farmacogn. 2005; 15(1):44-50.

Estanislau AA, Barros FAZ, Peña AP, Santos SC, Ferri PH, Paula JR. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. Rev Bras Farmacogn. 2001; 11(2):95-100.

Ferri PH. Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais. In: Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência. Jaboticabal: UNESP; 1996. 230p.

Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia 2002; 73 (6):536-9.

Galina KJ, Sakuragui CM, Rocha JCB, Lorenzetti ER, Mello JCP. Contribuição ao estudo farmacognóstico da mutama (Guazuma ulmifolia) – Sterculiaceae. Acta Farm Bonaer. 2005; 24:225-33.

Joly AB. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Editora Nacional; 1998.

Lopes FCM, Placeres MCP, Jordão Júnior CM, Higuchi CT, Rinaldo D, Vilegas W, Leite CQF, Carlos IZ. Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(6): 769-72.

Michelin DC, Iha SM, Rinaldo D, Sannomiya M, Santos LC, Vilegas W, Salgado HRN. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). Rev Bras Farmacogn. 2005; 15(3):209-11.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400; 2003. p.1-47.

Nepomuceno DC, Younes RN, Varella AD, Suffredini IB. Atividade antibacteriana e fracionamento direcionado do extrato orgânico obtido de *Tovomita* sp. Rev Bras Farmacogn. 2003; 14:3-4.

Rodrigues VEG, Carvalho DA. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: UFLA; 2001.

Rodrigues LA, Carvalho DA, Gomes LJ, Botrel RT. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em luminárias – MG. Bol Agropecu. 2002; 52:1-4.

Sano SM, Almeida SP. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CAPC; 1998.

Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 1991; 30:3875-83.

Silva SR, Silva AP, Munhoz CB, Silva Jr. MC, Medeiros MB. Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Brasília: WWF; 2001. 132p.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Porto Alegre: UFRGS; 2007. 1104 p.

Soares ML, Rezende MH, Ferreira HD, Figueiredo ADL, Bustamante KGL, Bara MTF, Paula JR. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). Rev Bras Farmacogn. 2005; 15(4):352-60.

Sotohy SA, Ismail AA, Mueller W. Further studies on the antimicrobial properties of some plant materials in relation to their tanin content. Proceedings of the Third Scientific Congress Egyptian Society for Catlle Diseases. Assiut, Egypt, 1995; 1:1-3.

Steers E, Foltz EL, Graves VS. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot Chemother. 1959; 9:307-11.

Tereschuk ML, Riera MVQ, Guillermo RC, Abdala LR. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of Tagetes minuta. J Ethnopharmacol. 1997; 56:227-32.