

Atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e hidroalcoólico de folhas de *Artemisia vulgaris*

Antimicrobial activity of aqueous and hidroalcoholic extracts from *Artemisia vulgaris*' leaves

Letícia Rocha Loures Malinowski¹; Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa²;
Cynthia Maria Telles Fadel Picheth³ & Patrícia Maria Stuelp Campelo⁴

RESUMO – Neste trabalho foram obtidos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico (HA) das folhas secas de *Artemisia vulgaris* e realizada a verificação dos metabólitos secundários, determinação da concentração de carboidratos e proteínas e testada a atividade antimicrobiana de ambos, aplicando duas metodologias. Na primeira foram utilizados cilindros metálicos nos quais as amostras foram dispensadas e dispostas em placas de meio de cultura agar e inoculadas com os microrganismos a serem avaliados. Na outra técnica, utilizou-se a metodologia do MIC (concentração inibitória mínima). O meio utilizado foi o caldo Müller-Hinton, no qual as bactérias foram inoculadas e dispensadas nos poços da placa onde se encontravam as amostras. O EA apresentou um rendimento maior de extração que o HA. Na avaliação da composição dos extratos, o teor de carboidratos foi maior que o protéico em ambos. Como metabólitos secundários, o EA apresentou alcalóides e cumarinas e o HA, alcalóides e esteróides e triterpenos. Nenhum dos extratos apresentou atividade antimicrobiana por nenhuma das metodologias empregadas, levando-se em consideração as concentrações e os micróbios testados.

PALAVRAS-CHAVE – *Artemisia vulgaris*, atividade antimicrobiana, extrato aquoso e extrato hidroalcoólico.

SUMMARY – In this work aqueous (EA) and hidroalcoholic (HA) extracts from dry leaves of *Artemisia vulgaris* had been obtained and were verified the secondary metabolites, determined the concentration of carbohydrates and proteins and tested the antimicrobial activity of both, using two methodologies. In the first, metallic cylinders had been used in which the samples had been put on in agar culture plates and inoculated with the microorganisms to be evaluated. In the other technique, it was used the MIC (minimum inhibitory concentration) methodology. It was used the Müller-Hinton broth in which the bacteria had been inoculated and put in the wells of the plate where the samples were. The EA show a bigger yield of extraction that the HA. Both extracts had presented more carbohydrates than proteins. As secondary metabolites, the EA presented alkaloids and coumarins and the HA shows alkaloids and steroids and triterpenes. None of extracts presented antimicrobial activity for none of the used methodologies, taking in consideration the tested concentrations and microbes.

KEYWORDS – *Artemisia vulgaris*, antimicrobial activity, aqueous extract, hidroalcoholic extract.

INTRODUÇÃO

A flora brasileira tem sido discutida, quer sob o aspecto da sua relevância para biodiversidade do planeta, quer sob o ponto de vista econômico e social (Bassani *et al.*, 2005).

A utilização de plantas medicinais, sendo um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população, vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando eficácia e segurança. A importância das plantas medicinais, pela sua contribuição como fonte natural de fármacos isolados, proporciona grandes chances de se obter uma molécula protótipo para síntese química de medicamentos. No entanto, inúmeras

plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior estudo para comprovação de seus efeitos e segurança de uso, uma vez que a literatura científica indica que muitas dessas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (Yunes *et al.*, 2003).

Muitas plantas medicinais são usadas na forma de extrato bruto com o objetivo de tratar doenças comuns sem ter qualquer evidência científica de sua eficácia (Leal-Cardoso & Fonteles, 1999), baseando-se apenas na cultura popular. Urge, portanto, a intensificação das pesquisas que visem o domínio nacional do conhecimento sobre esses vegetais em todos os aspectos, desde a eficácia até à toxicidade (Bassani *et al.*, 2005).

Entre os milhares de plantas que vêm sendo estudadas por seu caráter medicinal, pode-se citar o gêne-

Recebido em 31/01/2007

¹Bacharel em Biologia pela PUCPR; ²Prof. Adjunto de Microbiologia do Curso de Odontologia/PUCPR;
³Prof.ª. Adjunta de Microbiologia Clínica do Curso de Farmácia/UFPR; ⁴Prof.ª. Adjunta de Bioquímica do Curso de Farmácia/PUCPR

ro *Artemisia*, pertencente à família Compositae (Asteraceae), que é muito pesquisado pelas suas propriedades antibacterianas e antifúngicas.

Mangena & Muyima (1999) testaram a ação antibacteriana do óleo essencial de *A. afra*, o qual inibiu, principalmente, as bactérias *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* e *Acinetobacter johnsonii*. Juteau *et al.* (2003) estudaram a ação antifúngica de *A. absinthium* contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, ocorrendo a inibição de crescimento das duas leveduras.

A *Artemisia vulgaris* (Artemísia) vem sendo estudada por suas inúmeras propriedades curativas, das quais se pode citar, principalmente, o uso para aliviar cólicas intestinais e menstruais e como digestivo (Lorenzi *et al.*, 2002). Popularmente ela é muito utilizada em "banhos de assento", para combater infecções urinárias e contaminações fúngicas. Alguns testes já foram realizados com os extratos aquoso e clorofórmico da Artemísia, demonstrando uma ação anti-hipertensiva na circulação mesentérica e no mesentério isolado de ratos (Tigno *et al.*, 2000) e a habilidade do extrato de elicitar uma resposta imune humoral e celular, mediada por células T *in vitro* (Schmid-Grendelmeier *et al.*, 2003). De acordo com esses testes e seus resultados, o estudo com a Artemísia é promissor tanto em relação aos possíveis efeitos clínicos como pela ampla utilização popular.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo, extrair os principais hidrossolúveis e hidroalcoósolúveis das folhas de *A. vulgaris*, verificar os metabólitos secundários, dosar o teor de carboidratos e proteínas e testar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos obtidos.

MÉTODOS

A planta foi coletada no bairro São Lourenço, Curitiba, PR. No laboratório, elas foram lavadas e secas em estufa a 30°C. Depois, as folhas foram separadas manualmente dos caules e trituradas grosseiramente em um *mixer*.

Para a obtenção dos extratos aquoso (EA) e hidroalcoólico (HA), 20g de folhas moídas foram misturadas com 300ml de água destilada (EA) ou etanol 90% (HA) e colocadas em banho-maria a 90°C, sob refluxo, por 90 min quando então os extratos foram filtrados por algodão, sendo a extração repetida mais duas vezes. Em seguida, os extratos iguais foram reunidos, congelados e liofilizados para a realização dos testes. Levando em consideração que a temperatura utilizada para realizar as extrações possa interferir na estrutura nativa das proteínas extraídas, o que conseqüentemente interferiria em suas funções, e uma vez que vários estudos têm revelado várias propriedades biológicas dos carboidratos, o EA foi precipitado com etanol gelado, centrifugado e feita a diálise do material precipitado (carboidratos) contra água corrente. Em seguida foi realizada a técnica gelo/degelo para separar os polissacarídeos solúveis dos insolúveis em água fria. Também foi realizada a extração metanol-água que foi utilizada nos testes de atividade antibacteriana pelo MIC. Este extrato foi feito sob refluxo a 60°C, por duas horas. O volume foi evaporado até secar em rotaevaporador e depois ressuspendido em água (120ml), congelado e liofilizado.

Para verificar a composição monossacarídica das frações, 10mg de cada material (EA bruto, sobrenadante e precipitado) foi hidrolisado (Hough *et al.*, 1972), reduzido e acetilado (Wolfson & Thompson, 1963a e b) para análise por cromatografia líquida gasosa realizada no Laboratório de Química de Carboidratos, do Depto. de Bioquímica da UFPR.

A determinação qualitativa dos metabólitos secundários foi realizada de acordo com metodologia específica para cada um. A pesquisa de alcalóides foi realizada com o reagente de Dragendorff; de flavonóides, através da reação de Shinoda; de cumarinas, segundo Heemann (2002); de antraquinonas, pela reação de Borntraeger e a pesquisa de esteróides e triterpenos, pela reação de Liebermann-Burchard.

A dosagem quantitativa de carboidratos foi realizada através do método de Dubois e cols (1956), método também denominado de fenol-ácido sulfúrico. O método utilizado para a dosagem quantitativa de proteínas foi o de Bradford (1976).

Para o teste de atividade antibacteriana, foram utilizadas as seguintes cepas:

- *Escherichia coli* (ATCC 25922),
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212),
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933),
- *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305),
- *Streptococcus mutans* (CCT 3440),
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633),
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),
- *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031).

Cada cêpa foi inoculada em um tubo contendo 2ml de meio de cultura BHI (infuso de cérebro e coração). Os tubos foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas para o crescimento das bactérias. A verificação do desenvolvimento bacteriano foi confirmada pela turvação do caldo, que foi diluído até concentração celular próxima do tubo 0,5 da escala de MacFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml).

Para a inoculação das placas contendo meio de cultura sólido Agar Müller-Hinton, foi introduzido um *swab* estéril em cada uma das suspensões e aplicado suavemente em todas as direções na superfície da placa. Depois de secas, foram dispostas perpendicularmente à 3 cilindros de aço inoxidável (10mmx6mm) estéreis sobre as superfícies inoculadas de cada placa. Em cada cilindro foram dispensados 100µl dos extratos, na concentração de 5mg/cilindro. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. As placas foram tampadas e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. As leituras foram realizadas através da medição dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento que deveriam aparecer em torno dos cilindros. Para o teste de atividade antifúngica foram empregadas as cepas *Candida albicans* (CBS 562), *C. dubliniensis* (CD 36), *C. tropicalis* (CBS 94), *C. parapsilosis* (CBS 604), *C. krusei* (CBS 573), *C. guilliermondii* (CBS 566) e *Saccharomyces cerevisiae* (CBS 1177). Cada cêpa foi inoculada em meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (SDB), distribuído no volume de 2ml por tubo. O crescimento foi realizado na estufa a 28°C, por 24 h. O desenvolvimento das cepas foi acompanhado até a obtenção de suspensão celular com concentração próxima a 5×10^5 UFC/ml (escala 0,5 de MacFarland). Em cada suspensão foi introduzido um *swab*, que depois de umedecido, foi esfregado suavemente sobre a

superfície das placas com o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose. Depois de secas, repetiu-se o mesmo processo do teste de atividade antibacteriana (Carillo-Muñoz *et al.*, 1999).

Para a comprovação dos resultados obtidos e para excluir o efeito da difusão dos extratos pelo ágar, uma outra metodologia foi utilizada e testada.

A metodologia aplicada foi àquela proposta por Murray *et al.* (1995), através da técnica da concentração inibitória mínima (MIC) onde se testou o efeito dos extratos aquoso (sobrenadante de gelo-degelo), hidroalcoólico (HA) e metanol-água, contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O meio de cultura utilizado foi o caldo Müller-Hinton no qual as amostras previamente solubilizadas foram misturadas. As concentrações finais das amostras foram 7,7; 7,1 e 10,0mg/poço para os extratos HA, metanol-água e sobrenadante de EA, respectivamente. Todos os tubos foram autoclavados por 30min. a 1 atm. O inóculo foi preparado a partir da diluição 1:10 da Escala de MacFarland, obtendo-se a concentração final de 5×10^5 UFC/ μ l. As bactérias desenvolveram-se no meio de cultura ágar-sangue e foram repicadas 24h antes do teste, sendo mantidas em estufa a 35°C. Então, para a preparação das suspensões, 100 μ l do caldo+bactéria foi inoculado em 900 μ l do caldo Müller-Hinton. Para a realização do teste, 100 μ l de caldo (controle) ou do caldo preparado com os extratos (testes) foram dispensados em poços separados de uma placa de cultura de células (96 poços). Sobre cada um foram dispensados 5 μ l das bactérias já listadas. A placa foi vedada com *parafilm* e mantida em estufa a 35°C por 24h. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. As leituras foram feitas pela verificação do aparecimento de botões bacterianos no fundo de cada poço, o que indica o crescimento das bactérias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações realizadas neste trabalho foram: extração aquosa (EA), extração hidroalcoólica (HA) e extração metanólica. As duas primeiras foram mais estudadas que a última, devido a esta ter sido realizada no final dos experimentos, apenas para tentar encontrar uma atividade antimicrobiana para a planta. Os rendimentos obtidos com as extrações realizadas podem ser observados na **Tabela I**.

Como o EA foi pré-purificado e recebeu tratamentos adicionais em relação ao HA e ao metanol:água, era de se esperar que o rendimento das suas frações fosse reduzido em relação aos últimos, por perdas durante o processo. Porém, como o rendimento foi significativa-

TABELA I
Rendimento obtido pelas extrações aquosa (EA) e suas frações, hidroalcoólica (HA) e metanol-água a partir das folhas secas de *A. vulgaris*

	Rendimento (%)
EA	12,57
Precipitado de EA	0,70
Sobrenadante de EA	3,59
HA	13,06
Metanol-água	12,06

mente menor, pode-se supor que a composição de EA bruto seja predominante de moléculas com baixa massa molar, que são perdidas durante a precipitação etanólica, uma vez que este processo promove a separação de moléculas de alta massa molar, e durante o processo de diálise que foi realizado com uma membrana com "cut-off" de 12 kDa.

Com relação à determinação de proteínas e carboidratos, o resultado pode ser observado na **Tabela II**. Através da análise por GLC observou-se a presença dos mesmos monossacarídeos em todos os extratos e nas frações de EA (arabinose, glicose, manose e galactose), porém, em diferentes proporções. Com relação aos metabólitos secundários, ambos apresentaram baixas concentrações de tais componentes, sendo que EA apresentou alcalóides e cumarinas e HA, alcalóides e esteróides e triterpenos.

O teste de atividade antimicrobiana não apresentou os resultados esperados, uma vez que a indicação do uso popular da planta como antimicrobiana estimularam a realização do trabalho. Os microorganismos utilizados foram escolhidos por serem as bactérias e fungos rotineiramente empregados para esse tipo de estudo e por serem os agentes mais freqüentes causadores de infecção urinária, tais como a *Escherichia coli*. Porém, na técnica utilizando os cilindros metálicos sobre a placa de ágar inoculada com as bactérias, não se observou atividade inibitória do crescimento bacteriano. Como essa técnica necessita de uma difusão das amostras pelo ágar para então exercer a ação, a falta de atividade poderia ser atribuída à falta de difusibilidade dos extratos. Dessa forma, para evitar essa propriedade, foi realizada a técnica da concentração inibitória mínima (MIC). Como nesta técnica o extrato é dissolvido diretamente no caldo de cultura para realizar os testes, o efeito de difusão é eliminado. Mas, mesmo assim, as técnicas diferenciadas comprovaram que os extratos foram inofensivos aos micróbios.

Resultado semelhante foi obtido por Heemann (2002), que testou a atividade antibacteriana da fração hidrossolúvel do extrato etanólico das partes aéreas de *Pterocaulon interruptum*, planta da mesma família que a artemísia, impregnando em discos de antibiograma concentrações de 50 a 400 μ g do extrato, frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

As concentrações testadas neste trabalho foram muito baixas quando comparadas a outros estudos, devido a dificuldades de solubilização em água dos extratos obtidos. Mas deve-se destacar que as doses testadas foram mais altas que aquelas utilizadas pela população, que normalmente utiliza "banho-de-assento" com o chá da planta e nos testes realizados neste trabalho foi utilizada a maior concentração possível de ser solubilizada em água. Mesmo assim, adaptações metodológicas, principalmente com relação à solubilização das amos-

TABELA II
Quantificação de carboidratos e proteínas das extrações aquosa (EA) e suas frações, e hidroalcoólica (HA) a partir das folhas secas de *A. vulgaris*

	Carboidratos (μ g/ml)	Proteínas (μ g/ml)
EA	392,65	322,19
HA	296,55	189,47
Precipitado de EA	53,40	18,15
Sobrenadante de EA	285,45	63,53

Os testes foram realizados em triplicata, utilizando a metodologia de Dubois *et al* (1956) para a dosagem de carboidratos e de Bradford (1976) para a dosagem de proteínas.

tras testadas para aumentar a concentração nos experimentos e ao tipo de metodologia empregada, devem ser realizadas.

CONCLUSÕES

A avaliação do rendimento das extrações demonstra que a EA foi mais eficiente com relação à extração dos metabólitos primários (carboidratos e proteínas) que o HA e houve uma variação em relação aos metabólitos secundários. Os testes de atividade antimicrobiana foram negativos quanto à inibição do crescimento dos micróbios pelos extratos em ambos os testes realizados. Portanto, neste trabalho, verificou-se a ineficácia dessa planta em sua utilização medicinal como antimicrobiana, dentro das concentrações, das metodologias e dos micróbios testados.

AGRADECIMENTOS

À técnica do Laboratório de Bioquímica da PUC/PR, Cleide Mariano de Brito Zeglan, à PUC/PR, pelo suporte técnico e financeiro e ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelas análises de CLG e empréstimo de equipamentos.

REFERÊNCIAS

1. Bassani, V.L.; Gonzáles, O.G.; Petrovick, P.R. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. *Revista Fitos*, 2005 (01): 14-15.
2. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976 (72): 248-54.

3. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 1956 (28): 350-56.
4. Carrillo-Muñoz, A.J.; Abarca, L.; Quindós, G.; Arévalo, P.; Bornay, F. *et al.* Multi-center evaluation of Neo-Sensitabs, a standardized diffusion method for yeasts susceptibility testing. *Sociedade Iberoamericana de Micologia*, 1999 (16):92-6.
5. Heemann, A.C.W. Estudo fitoquímico, botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). 2002, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.
6. Juteau, F.; Jerkovic, I.; Masotti, V.; Milos, M.; Mastelic, J. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med.*, 2003 (69):158-61.
7. Leal-Cardoso, JH; Fonteneles, MC. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *An Acad Bras Cienc*, 1999 (71): 207-13.
8. Lorenzi, H; Matos, F J A. Plantas medicinais no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 544 p.
9. Mangena, T; Muyima, N.Y.O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* e *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters Applied Microb.*, 1999 (28):291-6.
10. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: AFM Press, 6 ed., 1995.
11. Schmid-Grendelmeier, P; Holzmann, D; Himly, M.; Weichel, M.; Tresch, S. *et al.* Native *A. vulgaris* 1 and recombinant *A. vulgaris* 1 are able to induce humoral and T cell-mediated *in vitro* and *in vivo* responses in mugwort allergy. *J Allergy. Clin. Immunol.*, 2003 (111):1328-36.
12. Tigno, X T; Guzman, F; Flora, A M. Phytochemical analysis and hemodynamic actions of *Artemisia vulgaris* L. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2000 (23):167-175.
13. Yunes, R.A. Composição química e atividade biológica das folhas de *Cynara scolymus* L. (*alcachofra*) cultivada no Brasil. *Química Nova*, 2003 (26): 331-34.

Endereço para correspondência

Patrícia Maria Stuelp Campelo

Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, 80000-000 - Curitiba/PR

e-mail: p.campelo@pucpr.br