



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Arnica montana*

In vitro antimicrobial activity of Arnica montana

Ana Lígia Amato¹, Aloísio Cunha de Carvalho², Selene Dall' Acqua Coutinho³

¹ Médica Veterinária - Projeto de Iniciação Científica realizado no CLININFEC (Grupo de Pesquisa em Clínica e Doenças Infecciosas Veterinárias da Universidade Paulista - UNIP, cadastrado no CNPq). São Paulo, SP - Brasil.

² Prof. do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista - UNIP. São Paulo, SP - Brasil.

³ Prof^a Dr^a dos Cursos de Graduação em Medicina Veterinária e Pós-Graduação em Imunopatologia Veterinária da Universidade Paulista - UNIP. São Paulo, SP - Brasil, e-mail: selene@uol.com.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi pesquisar uma possível ação antimicrobiana *in vitro* da *Arnica montana*. Foram testadas cepas-padrão (ATCC) de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* pelos métodos de diluição seriada em caldo (Concentração Inibitória Mínima) e difusão em ágar. Extrato etanólico de *A. montana* foi empregado nas seguintes concentrações finais: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 e 0,78 mL/mL, sendo os testes realizados em duplicata. Nos experimentos de diluição em caldo todas as cepas apresentaram crescimento nas diferentes concentrações de arnica, com exceção de *B. subtilis* frente a 100 µL/mL. Na difusão em ágar não houve inibição de crescimento dos microrganismos testados, com exceção de *P. aeruginosa*; entretanto, essa bactéria também teve seu crescimento inibido quando se utilizou disco de papel impregnado somente com etanol. Nas condições experimentais *A. montana* não demonstrou ação que possa indicar sua utilização como antimicrobiano.

Palavras-chave: *Arnica Montana*; Antimicrobiano; Antibiograma.

Abstract

The aim of this work was to search in vitro antimicrobial activity of Arnica montana. It has been tested standard strains (ATCC) of Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Bacillus subtilis and Candida albicans by broth serial dilution (Minimal Inhibitory Concentration) and agar diffusion test. Ethanolic extract of A. montana was used in the following final concentrations: 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.13; 1.56 and 0.78 mL/mL. All tests were carried out in duplicate. In serial dilution assay all

strains have presented growth at the different concentrations of A. montana, with exception of B. subtilis against 100µL/mL. In agar diffusion test did not have inhibition of the microorganisms, unless P. aeruginosa was tested; however, this bacterium also was inhibited when only ethanol was used. In these experimental conditions A. montana did not demonstrate good action against tested microorganisms.

Keywords: *Arnica Montana; Antimicrobial activity; Antibiogram.*

INTRODUÇÃO

Plantas com potencial terapêutico são empregadas pelo homem desde a antiguidade e têm se mostrado como uma alternativa à medicina tradicional (1, 2); portanto, é justificável a identificação dos componentes ativos e as atividades biológicas das plantas já em uso (3, 4).

A *Arnica montana* é uma planta herbácea perene, de aproximadamente 70 cm de altura, da família das Asteraceae e nativa das montanhas da Sibéria e da Europa Central (1). Atualmente, sua ocorrência espontânea é muito rara, sendo cultivada em diversos países, visando sua utilização terapêutica (1).

Sua atividade regeneradora de tecidos é conhecida desde tempos remotos e, ainda hoje, sua utilização é indicada para novos fins terapêuticos (2, 3). É postulado que a arnica tenha: 1) ação analgésica com efeitos no sistema nervoso central, provavelmente decorrentes da elevação do limiar da dor; 2) anti-inflamatória, por bloqueio da liberação de histamina, o que compromete a permeabilidade vascular aumentada e 3) antiedematosa, pela aceleração do tempo de reabsorção do edema (5). No entanto, existem controvérsias que apontam para a possibilidade de seu efeito biológico se restringir apenas à atividade antiedematosa (6). Também se questiona sua ação analgésica, pois pacientes que sofreram exérese de molares, não mostraram diferenças quando se comparou o emprego de arnica e placebo (7).

O uso tópico de arnica é indicado nas mais diversas enfermidades, particularmente naquelas com processos inflamatórios associados (2, 5, 6); entretanto, sua utilização sistêmica carece de comprovação experimental (2). É defendido que o uso sistêmico deva ser restrito, uma vez que preparações da planta apresentam alta toxicidade e podem provocar irritação da mucosa gástrica, hepatotoxicidade, taquicardia e depressão (8).

Foi demonstrada a ação antiparasitária da arnica, que possui compostos ativos contra *Plasmodium falciparum* (9) e com atividade estendível ao *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* (10). A despeito dessa atividade, pouco tem sido investigado em relação à sua atividade frente a patógenos de ocorrência mais comum. Dentre os poucos estudos reportados, sua ação foi avaliada contra microrganismos orais e foi verificada uma inibição moderada de algumas espécies de estreptococos cariogênicos (11). Como as comunidades médica e veterinária têm assistido a um crescimento nas taxas de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos e a uma necessidade veemente de novas moléculas terapêuticas, o objeto central desse estudo foi a pesquisa experimental da atividade antimicrobiana de *Arnica montana* frente cepas-padrão bacterianas e de *Candida albicans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

A atividade antimicrobiana da *A. montana* foi testada em cinco espécies de bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212), *Escherichia coli* (ATCC-25922) e *Bacillus subtilis* (ATCC-6633), e um fungo, *Candida albicans* (NTCC-10231). A seleção dos microrganismos baseou-se em experimentos similares realizados por outros pesquisadores (4, 12-14). Todos os testes foram realizados em duplicata.

Tintura-mãe de arnica

Foi utilizado extrato etanólico comercial de arnica, proveniente do Laboratório Boiron (França). A tintura-mãe é obtida a partir de uma

mistura de água e álcool, na qual plantas frescas totais são maceradas por um período de 10 a 21 dias, para a liberação dos princípios ativos. Após prensagem e filtração, são realizados testes pelo laboratório, quanto à ação da tintura-mãe assim obtida (15).

Concentração inibitória mínima (CIM) / Concentração bactericida mínima (CBM)

A CIM foi determinada através de testes de diluição seriada em caldo. O inóculo constituiu-se de colônias de bactérias, incubadas por 24--48 horas em *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-Difco), diluídas em solução fisiológica 0,85% e a concentração da suspensão ajustada ao tubo 0,5 da Escala de Mc Farland (4, 11, 16). O crescimento de *C. albicans* foi obtido em *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) (4). Os ensaios de diluição em caldo foram realizados empregando-se *Müller Hinton Broth* (Difco) para o crescimento de bactérias (11, 16) e *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) (4) para *C. albicans*, sem adição de soluções-tampão (4, 11, 16). A tintura-mãe de arnica foi diluída de forma a se testar as seguintes concentrações finais: 100,00µL/mL; 50,00µL/mL; 25,00µL/mL; 12,50µL/mL; 6,25µL/mL; 3,13µL/mL; 1,56µL/mL e 0,78µL/mL.

Realização do teste

Uma vez que não há padronização para a detecção de sensibilidade dos microrganismos a extratos de plantas, adaptou-se o que há descrito na literatura na realização deste projeto (4, 11, 16). Utilizaram-se oito tubos contendo caldo *Müller Hinton*, nos quais foram realizadas diluições seriadas na razão de 1:2. No primeiro tubo foram distribuídos 4,0mL do meio e nos demais 2,0mL. Adicionou-se ao primeiro tubo 0,4mL de tintura-mãe de *Arnica montana* e, após homogeneização, transferiu-se 2,0 mL ao segundo tubo e assim sucessivamente até o oitavo, obtendo-se então as concentrações de arnica (16) referidas acima. Mais dois tubos foram empregados, no nono foi adicionado meio de cultivo e 100µL/mL de álcool etílico de cereais 70% (dilúente da tintura de arnica) e no décimo apenas o meio de cultivo, para controle positivo do crescimento microbiano (11, 16). A cada um dos tubos foram adicionados 10µL/mL do inóculo do microrganismo (16). As bactérias e fungos foram incubados a 37°C respectivamente, durante 24 e 48 horas (4, 11, 16).

A CIM foi a menor concentração de arnica que inibiu o crescimento visível (turvação do meio de cultivo) (4, 16). A CBM foi determinada semeando-se a suspensão de cada um dos tubos do teste de CIM aonde o crescimento bacteriano foi inibido em ágar BHI e incubando-se este material pelo período já referido; a ausência de crescimento indicou ação bactericida efetiva (16).

Difusão em ágar

O inóculo, as diluições de arnica, a temperatura e os tempos de incubação foram os referidos anteriormente; os meios de cultivo foram os citados, entretanto na forma de ágar.

Realização do teste

Este teste foi realizado segundo a técnica de Kirby & Bauer, na qual discos impregnados com a droga a ser ensaiada são colocados sobre uma placa de Petri com ágar, onde o microrganismo a ser testado foi semeado (17).

Suspensão de microrganismos, ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland, foi espalhada sobre a superfície do ágar com auxílio de *swab* estéril; após 15 minutos, foram adicionados discos de papel impregnados com as diluições de arnica (17). Discos estéreis de papel de filtro (diâmetro de 6,3mm) foram embebidos, por cinco vezes consecutivas, com as diferentes diluições da tintura-mãe (16). Entre cada um dos procedimentos foi permitida a evaporação do solvente à temperatura ambiente, com exceção da última, quando os discos foram aplicados úmidos sobre a superfície do ágar (16). À semelhança do descrito para o teste de diluição em caldo, utilizou-se um disco contendo apenas álcool etílico de cereais 70%. As placas de bactérias e fungos foram incubadas a 37°C respectivamente, durante 24 e 48 horas (4, 11, 16).

A leitura foi realizada medindo-se o diâmetro do halo de inibição da droga. Executaram-se provas com antimicrobianos comerciais, como controle da sensibilidade dos microrganismos empregados.

RESULTADOS

No teste de CIM, verificou-se que, com exceção de *B. subtilis* frente a 100µL/mL, não houve inibição dos microrganismos às concentrações

de arnica testadas (Tabela 1). A CBM mínima, nesse caso, coincidiu com a CIM, pois quando a suspensão desse tubo foi semeada em ágar BHI, não ocorreu crescimento.

TABELA 1 - Comportamento de microrganismos frente diferentes concentrações de *Arnica montana*, em teste de Concentração Inibitória Mínima

Micror- ganismos	Concentrações de <i>Arnica montana</i>								Álcool Étilico 70%
	100 µL /mL	50 µL /mL	25 µL /mL	12,5 µL /mL	6,25 µL /mL	3,12 µL /mL	1,56 µL /mL	0,78 µL /mL	
<i>B. subtilis</i>	-*	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-

*Crescimento: +; Ausência de crescimento: -

Em relação à difusão em ágar, observou-se inibição de *P. aeruginosa* frente a todas as concentrações de arnica e ao etanol (Tabela 2), não se verificando diferenças entre o diâmetro dos halos das diferentes concentrações de arnica e do obtido apenas com o álcool de cereais (Tabela 2).

TABELA 2 - Comportamento de microrganismos frente diferentes concentrações de *Arnica montana*, em teste de difusão em ágar

Micror- ganismos	Concentrações de <i>Arnica montana</i>								Álcool Étilico 70%
	100 µL /mL	50 µL /mL	25 µL /mL	12,5 µL /mL	6,25 µL /mL	3,12 µL /mL	1,56 µL /mL	0,78 µL /mL	
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	12*	11	10	13	18	11	14	15	12
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Diâmetro do halo de inibição em mm; Ausência de halo de inibição

DISCUSSÃO

Em relação à *Arnica montana* os compostos ativos principais são as lactonas sesquiterpênicas, como a helenalina (1, 3) e, embora já tenham sido demonstrados seus efeitos antiedematoso e anti-inflamatório, são poucos os estudos sobre sua ação nos microrganismos.

A emergência de microrganismos multirresistentes tem impulsionado pesquisas de substâncias alternativas, que possam ser empregadas como antimicrobianos. Dessa forma, diversos óleos e

extratos de plantas vêm sendo testados quanto à sua capacidade de controlar e inibir o crescimento de bactérias e fungos (4, 13, 14, 18); entretanto, como ainda não existem técnicas padronizadas para a execução desses testes, resultados de inibição encontrados *in vitro* deverão ser melhor compreendidos antes que se possa indicar sua aplicabilidade terapêutica.

Em vista da falta de padronização, adaptou-se o que há descrito na literatura para a realização desta pesquisa. Os microrganismos utilizados neste projeto são frequentemente escolhidos para testes de sensibilidade (4, 12-14),

por serem agentes comuns de doenças e/ou apresentarem alto padrão de resistência aos antimicrobianos.

A CIM foi obtida pela técnica de macrodiluição, que permite visualização do crescimento dos microrganismos através da turvação do meio de cultura (16). Nesta pesquisa só se obteve inibição de crescimento de *B. subtilis* no teste de CIM, com concentração de 100 μ L/mL de arnica, não se detectando ação das diferentes concentrações da tintura nos microrganismos experimentados. Na mesma linha, em experimentos sobre a ação da arnica em patógenos orais, verificou-se ação antimicrobiana apenas discreta contra algumas espécies de *Streptococcus* (12), *Actinomyces naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis* (11). Entretanto, outros autores encontraram valores aceitáveis de CIM para *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* sp, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus* sp e *Actinomyces* sp, indicando a utilização de arnica como antisséptico para higiene da cavidade oral (19). Talvez as diferenças verificadas entre os pesquisadores reflitam a falta de padronização para esses testes, o que dificulta o cotejamento de resultados.

Quanto ao método de difusão em ágar, utilizou-se a técnica padrão internacional para testes de sensibilidade para bactérias frente aos antibacterianos (17), por ser de extrema facilidade de execução e, se houvesse ocorrido halos de inibição frente à arnica, estes poderiam ser comparados com os obtidos com os antibióticos convencionais. Nesta prova apenas *P. aeruginosa* teve inibição de crescimento frente aos extratos de arnica; entretanto, essa bactéria também apresentou sensibilidade ao álcool etílico de cereais, que é empregado na produção da tintura dessa planta. Os diâmetros dos halos obtidos frente à arnica e ao álcool etílico foram similares, revelando a importância desse controle alcoólico pois, se não tivesse sido utilizado, seriam falso-positivos os resultados de inibição de *P. aeruginosa* pela arnica. Iauk et al. (19) verificaram sensibilidade de bactérias isoladas de doença periodontal à arnica empregando extratos etanólicos, porém não utilizaram controle alcoólico, o que gera dúvidas se a ação foi decorrente da planta ou do álcool. Deve-se ainda aventar que a ausência de inibição dos microrganismos frente às diferentes concentrações de arnica pode ser decorrente da falta ou pequena difusão do extrato da planta no ágar.

Embora a arnica seja largamente usada como fitoterápico e homeopático, nas condições experimentais, não se verificou ação que possa indicar sua utilização como antimicrobiano. Entretanto, pesquisas nesse campo devem ser incentivadas e aprimoradas, na busca de drogas e princípios ativos alternativos, principalmente devido à crescente aquisição de resistência pelas bactérias e fungos aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados.

REFERÊNCIAS

1. Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa (Brasil): Imprensa Universitária; 1994.
2. Benez SM, Boericke W, Cairo N, Jacobs PH, Macleod G, Schroyens F et al. Manual de homeopatia veterinária. São Paulo: Robe; 2002.
3. Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Ismânia EFA, Júnior AS, et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:367-73.
4. Klaas CA, Wagner G, Laufer S, Sosa S, Loggia RD, Bomme U, et al. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers. Planta Med. 2002;68:385-91.
5. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol. 2004;35:275-80.
6. Carvalho AC, Bonamin LV. Efeitos da administração de *Arnica montana* (tintura-mãe e preparações dinamizadas 6CH) na atividade de diferentes agentes flogísticos em ratos. Rev Pesq Homeop. 2001;16:31-43.
7. Pereira PSS. Avaliação clínica da eficácia da *Arnica montana* no controle da dor, edema e trismo pós-operatório na cirurgia de terceiros molares mandibulares retidos [dissertação]. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília; 1999.
8. Daane SP. Potential for danger with *Arnica montana*. Ann Plast Surg. 2001;46:349-50.

9. François G, Passreiter CM. Pseudoguaianolide sesquiterpene lactones with high activities against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Phytoth Res*. 2004;18:184-6.
10. Schmidt TJ, Brun R, Willuhn G, Khalid SA. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Med*. 2002;68:750-1.
11. Koo H, Gomes BPA, Rosalen PL, Ambrosano GB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000;45:141-8.
12. Nardy R, Nascimento CM, Jorge AOC, Zelante PM. Análise da ação antimicrobiana das medicações Calendula, Arnica e Echinacea. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 17. Águas de Lindóia, 2000. Anais. p. 746. [Online] 2000. Disponível em URL: <http://www.odontologia.com.br/paineis.asp?id=746>
13. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol*. 2000;74:113-23.
14. Ali-Shtayeh MS, Yaghmour RMR, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol*. 1998;60:265-71.
15. Preparation of homeopathic drugs. [Online] 2007. [cited 2007 jan 02] Disponível em: URL: <http://www.boiron.com>
16. Pizsolitto AC, Pozetti GL. Avaliação comparativa da ação antibacteriana de tinturas-mãe de *Thuya occidentalis*. *Rev Pesq Homeop*. 1987;3:33-9.
17. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45:493-6.
18. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattitila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem*. 1998;46:3590-5.
19. Iauk L, Bue AML, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res*. 2003;17:599-604.

Recebido: 03/02/2007
Received: 02/03/2007

Aprovado: 12 /03/2007
Approved: 03/12/2007