



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS

PRISCILA JOSIENE FORTES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Arnica Montana***

JUIZ DE FORA

2023



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS

PRISCILA JOSIENE FORTES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Arnica montana*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado no Centro Universitário
Presidente Antônio Carlos, como
exigência parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.
Orientadora: Soraia Chafia Naback de
Moura

**JUIZ DE FORA
2023**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Arnica montana*

EVALUATION OF THE *IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Arnica montana*

Priscila Josiene Fortes de Oliveira¹, Aline Corrêia Ribeiro², Soraia Chafia Naback de Moura³¹

RESUMO: Introdução: A *Arnica montana* é uma planta medicinal da família *Asteraceae* que tem origem na Europa, usada em todo o mundo. Possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antimicrobianas, devido à presença de lactonas sesquiterpênicas, incluindo a helenalina. Estudos sobre sua eficácia como agente antimicrobiano, especialmente contra bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mostraram resultados divergentes. **Objetivo:** Determinar a possível ação antimicrobiana da *Arnica montana* no combate às bactérias Gram positivas e negativas, e identificar a presença de flavonóides. **Método:** Para a identificação dos flavonóides foi feita a reação de Shinoda. A avaliação da atividade antimicrobiana foi testada com as cepas padronizadas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em ágar, utilizando a tintura *in natura* e diluída. **Resultados:** A reação de Shinoda revelou a presença de flavonóides no extrato da *Arnica montana*, mas apesar disso, a tintura não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o mesmo foi encontrado em estudos anteriores que não evidenciaram atividade antimicrobiana significativa da *Arnica montana* em contextos semelhantes. Fatores como a complexidade da avaliação de substâncias antimicrobianas e a falta de um grupo de controle nos experimentos foram destacados como possíveis explicações para os resultados negativos encontrados. **Conclusão:** O estudo revelou que a tintura de *Arnica montana* adquirida no comércio local não foi eficaz contra as bactérias testadas, devido a fatores como a qualidade da planta e o processo de extração. Apesar de seu uso tradicional, a eficácia da arnica como agente antimicrobiano não foi

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC – Juiz de Fora –MG

² Farmacêutica, Professora do Curso de Farmácia do Centro presidente Antônio Carlos – UNIPAC, mestra.

³ Farmacêutica, Professora do Curso de Farmácia do Centro presidente Antônio Carlos – UNIPAC, mestra.

confirmada em estudos experimentais, contudo se faz necessário continuar a pesquisa e explorar outras fontes de possíveis antimicrobianos para lidar com a ameaça da resistência bacteriana.

Descritores: *Arnica montana*, flavonóides, ação antimicrobiana.

ABSTRACT: Introduction: *Arnica montana* is a medicinal plant from the Asteraceae family that originates in Europe it is used throughout the world. It has anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial properties, due to the presence of sesquiterpene lactones, including helenalin. Studies on its effectiveness as an antimicrobial agent, especially against bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, have shown divergent results. **Objective:** To determine the possible antimicrobial action of *Arnica montana* in combating Gram positive and negative bacteria, and identify the presence of flavonoids. **Method:** To identify the flavonoids, the Shinoda reaction was performed. The evaluation of the antimicrobial activity of *Arnica montana* was tested with the standardized strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using the agar diffusion method, using the fresh and diluted tincture. **Results:** The Shinoda reaction revealed the presence of flavonoids in the *Arnica montana* extract, but despite this, the tincture did not show antimicrobial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, the same was found in previous studies that also found no evidence of activity significant antimicrobial activity of *Arnica montana* in similar contexts. Factors such as the complexity of evaluating antimicrobial substances and the lack of a control group in the experiments were highlighted as possible explanations for the negative results found. **Conclusion:** The study revealed that the *Arnica montana* tincture purchased locally was not effective against the bacteria tested, due to factors such as the quality of the plant and the extraction process. Despite its traditional use, the effectiveness of arnica as an antimicrobial agent has not been confirmed in experimental studies, however, it is necessary to continue research and explore other sources of possible antimicrobials to deal with the threat of bacterial resistance.

Keywords: *Arnica montana*, flavonoids, antimicrobial action.

INTRODUÇÃO

A *Arnica montana* é uma planta medicinal da família *Asteraceae*, popularmente conhecida como arnica verdadeira, arnica das montanhas, originada da Europa, utilizada em diversas partes do mundo. No Brasil, o nome arnica é atribuído também para outras espécies da família *Asteraceae*, principalmente algumas do gênero *Lychnophora*¹.

A arnica pode ser utilizada por via oral e tópica, como anti-inflamatório, analgésico, rubefaciente em (traumatismos, entorses, artrites, nevralgias, hematomas), como antialérgico anti-eczematoso, adstringente, anti-bacteriano e anti-micótico. Seus princípios ativos são encontrados nas flores e estão presentes nos óleos essenciais, nos álcoois terpênicos, ácidos fenólicos, arotenóides, flavonóides, taninos, cumarinas, sais de magnésio, entre outros².

Apresenta como marcadores químicos as lactonas sesquiterpênicas do tipo helenalina em sua composição, com ações antibacteriana, antiprotozoária, anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica, quimioprolifáticas contra a esquistossomose³.

Para uso externo, a tintura deve ser utilizada somente diluída em água a fim de evitar dermatites com formação de eczema. Seus efeitos colaterais e farmacológicos ocorrem pela presença de lactonas sesquiterpênicas expressas em helenalina⁴.

O predomínio de microrganismos como *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) resistentes à inúmeros antimicrobianos vêm aumentando significativamente devido ao uso extensivo e indiscriminado⁵.

Estudos realizados para determinação da atividade antimicrobiana da *Arnica montana in vitro* com os microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* demonstraram divergências em seus resultados. Sendo assim, é de real importância o aprofundamento de estudos a respeito da planta para obtenção de resultados mais conclusivos que comprovem a real eficácia da *Arnica montana*⁶⁻⁸.

Devido ao uso abusivo e descontrolado dos antimicrobianos, se faz necessário o estudo de fitoterápicos, como uma alternativa no combate a bactérias Gram positivas e negativas, visto que essas podem causar doenças graves na população por meio de contaminação de alimentos e água.

O objetivo do presente estudo foi determinar a possível ação antimicrobiana da *Arnica montana* no combate às bactérias Gram positivas e negativas, e identificar a presença de flavonóides.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita através do método de difusão em ágar técnica de impregnação de disco, utilizando o extrato etanólico *in natura* e diluído de *Arnica montana*.

MÉTODOS

A tintura da *Arnica montana* foi adquirida em farmácia de manipulação, sendo produto comercializado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. A tintura atende a todas as especificações exigidas concernentes ao seu controle de qualidade conforme análises realizadas pelo fornecedor.

Teste de identificação genérica dos flavonóides

Reação de Shinoda: Em um tubo de ensaio contendo 2mL do extrato etanólico de arnica foram adicionados 6 fragmentos de magnésio metálico e 1mL de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de flavonóides⁹.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Microorganismos utilizados

Foram utilizadas as cepas padronizadas ATCC (*American Type Culture Collection*) obtidas no laboratório de Microbiologia da UNIPAC, sendo da espécie *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), para o teste de difusão em ágar, que analisou a sensibilidade a partir do extrato etanólico para avaliação antimicrobiana.

Método de difusão em ágar

O teste para identificação da atividade antimicrobiana foi feito pelo método de difusão em ágar, em duplicata. As placas contendo Ágar Mueller Hinton foram preparadas e deixadas em repouso em temperatura ambiente, em seguida foram acondicionadas sob refrigeração entre 2° e 8°C até o uso.

Para iniciar o TSA por impregnação do disco difusor, foi feita uma suspensão direta das cepas em tubos identificados com os respectivos microorganismos contendo 3mL de caldo Mueller Hinton e mantidos na estufa bacteriológica durante 24 horas com o objetivo de obter o crescimento das bactérias. Após a incubação, as amostras foram suspensas em 3mL de solução salina (0,9%) até a obtenção de uma turvação 0,5 da escala de Macfarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL – unidade formadora de colônias/mL).

Em seguida, as amostras foram semeadas com auxílio de um swab estéril, na superfície da placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton com

aproximadamente 4mm de espessura, de acordo com as recomendações da CLSI 2019 (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*). O procedimento foi realizado em duplicata.

Com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, os discos impregnados com a tintura-mãe de arnica *in natura* e com a tintura-mãe diluída nas proporções (1:2; 1:4; 1:6) foram aplicados sobre a placa de Petri contendo os microrganismos. Como controle positivo foram utilizados os antimicrobianos amicacina 30µg, cefoxitina 300µg, ciprofloxacino 500µg e como controle negativo foi utilizado um disco de papel de filtro umedecido com álcool a 70%. Logo após a distribuição dos discos na superfície das placas, estas foram mantidas invertidas dentro da estufa bacteriológica a uma temperatura de 37° C por um período de 24 horas.

O tamanho dos halos de controle positivo e de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, através de uma régua.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da reação química para identificação da presença de flavonóides no extrato da *Arnica montana* foi satisfatório. Na reação de Shinoda, observou o desenvolvimento da coloração vermelha, confirmando a presença de flavonóides no extrato da *Arnica montana*, conforme a figura 1.

Na reação Shinoda, os flavonóides reagem com o magnésio metálico é oxidado pelo HCl (ácido clorídrico) concentrado, gerando como produto o hidrogênio molecular, que é eliminado na forma de gás e cloreto de magnésio, formando os complexos, resultando na coloração avermelhada¹⁰.

Figura 1 - Reação de identificação de flavonoides



Fonte: Arquivo pessoal

A leitura do antibiograma seguiu critérios de análises e interpretação conforme o quadro abaixo:

Quando 1- Comportamento de microrganismos frente diferentes concentrações de <i>Arnica montana</i>, diâmetro do halo:		
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
Tintura Mãe	-	-
Diluição 1/2	-	-
Diluição 1/4	-	-
Diluição 1/6	-	-
Etanol 70%	-	-
Amicacina	16mm	20mm
Cefoxitina	26mm	30mm
Ciprofloxacino	32mm	26mm

Legenda: -: Ausência de halo

Fonte: Dados da pesquisa

Conforme os resultados exibidos no Quadro 1, foi possível evidenciar que a tintura da *Arnica montana* adquirida não apresentou atividade antimicrobiana sobre as linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

De acordo com o estudo de Silveira e colaboradores, o método de difusão em ágar - técnica de impregnação de disco - não oferece condições de igualdade para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas.

Analisando substâncias com diferentes capacidades de difusão e dissociação, algumas substâncias apresentam dificuldades de difusão e dissociação em ágar¹¹. Diversos fatores influenciam esta técnica como a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a difusão da substância no meio, a densidade do inóculo, o período de incubação, a temperatura e a estabilidade da substância em uso¹².

A ausência da ação antimicrobiana sobre as linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* mostrada neste trabalho se assemelha ao resultado apresentado por Valcanaia e et al, quando testaram extrato etanólico de *Arnica*

montana e não obteve crescimento significativo, comparado com a tintura de *Lychonofora ericoides* (arnica do serrado) que apresentou atividade antibacteriana⁶.

Um trabalho feito por Cruz e et al, não evidenciaram respostas frente às concentrações de duas espécies de Arnica (*Solidago chilensis* e *Arnica paulista*) utilizadas nos testes contra *S. aureus* e *E. coli*¹³.

Já para Amato e et al um experimento feito com arnica em patógenos orais, verificaram discreta ação antimicrobiana contra espécies de *Streptococcus*, *Actinomyces naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis*. Indicando a utilização de arnica como antisséptico para higiene da cavidade oral¹⁴.

Um estudo conduzido por Lauk e et al, investigaram a sensibilidade de bactérias isoladas de doença periodontal à arnica, usando extratos etanólicos de arnica. No entanto, uma lacuna importante no experimento foi a ausência de um controle negativo contendo álcool. Isso levantou dúvidas entre os pesquisadores, pois não puderam determinar se os efeitos observados foram causados pela arnica ou pelo álcool presente nos extratos utilizados no experimento¹⁵.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados elucidados foi possível comprovar que a tintura de *Arnica montana* adquirida no comércio local não apresentou eficácia contra as bactérias avaliadas. Isso pode ser explicado por muitos fatores, como lote da planta utilizado, eficiência do processo extrativo ou garantia de qualidade do fabricante.

É importante notar que o uso da arnica como medicamento fitoterápico ou homeopático é baseado principalmente em tradições populares e práticas históricas, contudo sua eficácia como antimicrobiano não foi confirmada em estudos experimentais. A resistência bacteriana aos antimicrobianos tradicionais é uma preocupação crescente na área da saúde, o que torna a busca por novas drogas e princípios ativos alternativos uma prioridade.

Portanto, embora a arnica possa não ter demonstrado propriedades antimicrobianas no presente estudo e em outros estudos experimentais, é importante continuar a pesquisa e explorar outras fontes de possíveis antimicrobianos para lidar com a ameaça da resistência bacteriana. A ciência

está constantemente em busca de novas abordagens terapêuticas e substâncias para combater as infecções de forma eficaz e segura.

REFERÊNCIAS

- 1) Mardari C, Danila D, Birsan C, Balaes T, Stefanache C, Tanase C. Plant communities with *Arnica montana* in natural habitats from the central region of romanian eastern carpathians. J. Plant Develop. 2015; 22: 95-105.
- 2) Morais DM, Augusto JMG, Datovo LRCB, Souza SAB, Bento TOS, Yoshida SY, et al. Desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida para veicular tintura de *Arnica montana*. Pesquisa e Ação [periódico na internet]. 2017; [2020 abril 29]; 3(1): [cerca de 6p.]. Disponível em: <https://revistas.brazcubas.br/index.php/pesquisa/article/view/257>.
- 3) Arnillas EAP. Obtenção e caracterização de formulação fitoterápica contendo tintura e extrato padronizados de *Arnica montana* L. e *Aesculus hippocastanum* L.[tese]. Belém: Universidade Federal do Pará Instituto de Ciências da Saúde; 2015.
- 4) Guerra CA. Alongamento e enraizamento *in vitro* e aclimatização de plântulas de arnica (*Lychnophora pohlii* Sch. Bip.) [dissertação]. Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2017.
- 5) Anselmo DB, Werle CH, Hoffmann FL. Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos e parasitos *Entamoeba coli* e *Ascaris lumbricoides* em merendas escolares. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2015; 74(4): 399-409.
- 6) Valcania AE, Vieira FC, Ávila GBB. Avaliação da atividade bactericida da *Arnica montana* e *Lychnophora ericoides*. In: 17º Congresso Nacional de Iniciação Científica; Anais. São Paulo: Centro Universitário Ítalo Brasileiro; 2017.
- 7) Rojas J, Velasco J, Buitrago A, Mender T, Rojas J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar. Rev. Fac. Farm. 2016; 58(1): 2-10.
- 8) Horta MP, Insua LC, Villafranca RC. Usos más frecuentes de *Arnica montana*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 2013; 18(2): 315-26.
- 9) Almeida VG. Composição química e efeito sobre mediadores inflamatórios de preparações de partes aéreas de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob (arnica-docampo) *in vitro*. [dissertação]. Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2015.

- 10) Sousa OV, Oliveira MS, Cunha RO, Costa BLS, Zancanella CR, Leite MN. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. Rev. Bras. Farmacogn. 2003;13:30-4.
- 11) Silveira LMS, Olea RSG, Mesquita JS, Cruz ALN, Mendes JC. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. Rev. Bras. Farm. 2009; 90(2):124-8.
- 12) Ribeiro MC, Soares MMSR. Microbiologia prática: roteiro e manual. São Paulo: Atheneu; 2000.
- 13) Cruz MFG; Souza VF, Moraes DCM, Rodrigues GMC, Paula FMSF. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro da *Solidago chilensis* e *Prorophyllum ruderale* (*Arnica brasileira* e *Arnica paulista*). Foco. v.4, n.4, p. 56-70, 2013.
- 14) Amato AL; Carvalho AC; Coutinho SDA. Estud. Biol. v. 29, n. 67, p.165-170, abr/jun2007.
- 15) 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.

