

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Malva sylvestris* (Malvaceae)

Letícia GIOMBELLI^{1*}, Ariane C. HORN² & Jean COLACITE³

^{1*} Pós-Graduanda em Farmacologia Clínica da Universidade Paranaense – UNIPAR – Unidade Universitária de Toledo – Paraná - Rua Vereador Antônio Pozzan 1182 – Centro - 85950-000 – Palotina – Paraná – Brasil - Email: leticia_giombelli@hotmail.com

² Pós-Graduanda em Farmacologia Clínica da Universidade Paranaense – UNIPAR – Unidade Universitária de Toledo – Paraná - Rua Barão do Rio Branco - 1333, Ap. 11 – Centro - 85900-005 – Toledo – Paraná – Brasil – Email: ariane_horn@hotmail.com

³ Prof. Adjunto do Curso de Farmácia – UNIPAR – Universidade Paranaense - Unidade Universitária de Toledo – Paraná - Avenida Parigot de Souza – 3636 - Jardim Santa Maria - 85903-170 – Toledo – Paraná – Brasil – Email:jeancolacite@unipar.br

Recebido em: 05/06/2012 – Aceito para publicação em: 24/02/2013

RESUMO: Os estudos farmacológicos das plantas medicinais são de extrema importância para comprovação da eficácia do uso pela população e também para descobrir novos fitoterápicos. *Malva sylvestris*, é uma planta pertencente à família *Malvaceae*, possui folhas lobadas, orbiculares, com bordos ondulados. Ela é conhecida por suas propriedades emoliente, calmante, expectorante e antiinflamatória. O objetivo deste estudo foi analisar a ação antimicrobiana do extrato bruto das folhas de *Malva sylvestris*, extraíndo seus princípios ativos, determinando a concentração inibitória mínima e a concentração microbicida mínima do extrato bruto frente a diferentes microrganismos. Pode-se observar que a *Malva sylvestris* inibiu o crescimento somente do *Staphylococcus aureus*, porém não mostrou atividade microbicida. No ensaio fitoquímico, dos testes realizados, a planta não apresentou saponinas. Conclui-se com esse trabalho que a *Malva sylvestris* não teve atividade contra os microrganismos testados, mesmo apresentando em sua composição alguns compostos químicos.

Palavras-chaves: plantas medicinais, concentração, microbicida, compostos naturais.

ABSTRACT: “Phytochemical profile and antimicrobial activity of leaves *Malva sylvestris* (*Malvaceae*)” The pharmacological studies of medicinal plants are extremely important for proving the efficacy of the use by the population and also to discover new herbal. *Malva sylvestris* is a plant belonging to the family *Malvaceae*, has lobed leaves, orbicular, with wavy edges. It is known for its emollient properties, soothing, expectorant and anti-inflammatory. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of leaves *Malva sylvestris*, extracting its active ingredients, determining the minimum inhibitory concentration and minimum microbicide concentration of crude extract front to different microorganisms. *Malva sylvestris* showed inhibitory activity only against *Staphylococcus aureus*, however did not show microbicidal action. In the phytochemical essay the plant did not show saponins. This study concludes that *Malva sylvestris* had no activity against the microorganism tested, even with some compounds in their chemical composition.

Key words: medicinal plants, concentration, microbicidal, natural compounds.

1.0 - INTRODUÇÃO

Os estudos farmacológicos das plantas

medicinais são de extrema importância para comprovação da eficácia do uso pela população e também para descobrir novos fitoterápicos

(Santos et al., 2011). A flora brasileira oferece uma extensa biodiversidade de espécies que ainda não tiveram sua ação antimicrobiana comprovada cientificamente, portanto são poucos os relatos das atividades biológicas das espécies vegetais (Lôbo et al., 2010; Ostrosky et al., 2008).

A medicina popular, principalmente à base de plantas, tem se tornado comum, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde é limitada (Agra; Freitas; Barbosa – Filho, 2007).

No Brasil, onde a população tem pouco acesso a medicamentos, a comprovação científica da ação das plantas medicinais e uso delas como terapia é uma alternativa ao tratamento com antibióticos. Isto pode contornar o problema da resistência aos antimicrobianos e da toxicidade causadas pelos antifúngicos, além de outras vantagens como baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos, evitando ou diminuindo os riscos de intoxicações por uso inadequado (Alvarenga et al., 2007).

Malva sylvestris, é uma planta pertencente à família *Malvaceae*, possui folhas lobadas, orbiculares, com bordos ondulados (Morgan, 1997). É conhecida por suas propriedades emoliente, calmante, expectorante e antiinflamatória, além de ser anti-séptica e promover a melhora na cura de feridas, também sendo empregada na formulação de enxaguatórios e cremes dentais (Tadeg et al., 2005; Souza et al., 2004; Torres et al., 2000).

Estudos realizados com o extrato das flores e folhas da *Malva sylvestris* comprovaram que esta planta serve como um valioso remédio para a tosse e doença inflamatória das membranas mucosas e a atividade biológica desta planta pode ser atribuído aos antioxidantes, tais como polifenóis, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, taninos e óleos essenciais e outros fitoquímicos identificados como os principais constituintes flavonóides da *Malva sylvestris* (Marouane et al., 2011; Cogo et al., 2010; Farina et al., 2005).

Um levantamento bibliográfico feito por Souza et al. (2004) cita o uso popular da *M. sylvestris* para cistite, como diurética, além de auxiliar no tratamento de feridas infeccionadas. A ação farmacológica desta planta encontrada pelo autor é antibacteriana e antiinflamatória e ainda de acordo com esse estudo não foi encontrada na literatura nenhuma referência com relação a citotoxicidade da *M. sylvestris*.

Para o conhecimento da atividade

farmacológica das plantas é importante determinar os compostos químicos encontrados nos vegetais, para fornecer uma relação com os princípios ativos (Lôbo et al., 2010). Estas substâncias químicas são resultantes do metabolismo secundário das plantas, que no vegetal têm a função de defesa ou atração, mas também apresentam atividades biológicas interessantes (Simões et al., 2000).

As plantas representam uma importante fonte de medicamento devido a grande diversidade de moléculas com potencial medicinal, contribuindo para a busca de novos produtos mais eficazes e menos tóxicos contra microrganismos patogênicos e multirresistentes (Barbosa-Filho et al., 2007). Assim o objetivo desse estudo foi avaliar a composição fitoquímica das folhas da *Malva sylvestris*, extraíndo seus princípios ativos, avaliando a atividade antimicrobiana através da determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima do extrato bruto.

2.0 - MATERIALE MÉTODOS

2.1 - Coleta e preparo do extrato - Após levantamento bibliográfico da planta *Malva sylvestris*, foi realizada a coleta das folhas da planta no mês de junho de 2010, na cidade de Toledo – PR. A secagem das folhas coletadas foi feita em temperatura ambiente. O material seco foi triturado, sendo submetido a um processo extração de princípios ativos pela adição de metanol (solução hidroalcolica). Essa solução foi estocada em temperatura ambiente, protegida da luz, durante 7 dias. A solução foi filtrada a vácuo obtendo o extrato bruto, que foi mantido em temperatura de 2-8 °C, protegido da luz.

2.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana - Para determinação da Concentração Inibitória Mínima, microplaca com 96 poços foram preparadas contendo 100µL de Caldo Muller Hinton, 100µL do extrato bruto e 5µL da suspensão de bactérias em cada poço. No primeiro poço foi testando a concentração de 4000µg/mL do extrato bruto e nos poços seguintes 2000µg/ml, 1000µg/mL e assim sucessivamente.

A partir de uma cultura reativada dos microrganismos *Salmonella thypi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, para cada microrganismo foi feita uma suspensão padrão 10⁸ UFC/mL em

salina estéril, através de comparação com 0,5 da escala McFarland, sendo ainda realizada uma diluição 1/10 em tubo, obtendo uma suspensão de 10^7 UFC/mL.

A microplaca foi incubada em estufa à 37 °C, por 24 horas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a maior diluição em que houve inibição do crescimento microbiano e foi determinada observando a ausência de turvação.

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi preparado placas de Petry com 20 mL de Ágar Muller Hinton. A partir do último poço em que não houve crescimento e dos dois subsequentes sem crescimento de organismos, a amostra foi semeada nas placas com Ágar Muller Hinton. As placas foram incubadas em estufa à 37°C, por 24 horas. Após o tempo de incubação, a CBM foi definida pela leitura das placas que apresentaram cultivo negativo.

2.3 - Teste de alcalóides - Para o teste de alcalóides, 20 mL do extrato bruto foi submetido à evaporação em banho-maria e nos 10 mL que restou no béquer adicionou-se 6 gotas de hidróxido de sódio 1% e 6 mL de água destilada. Colocou-se 6 mL de clorofórmio, mediante agitação, filtrou-se e em seguida colocou-se em tubos de ensaio com 4 mL de HCl 1%. Pipetou-se o sobrenadante desta solução e colocou-se 1 mL por tubo de ensaio, onde foi adicionado os reativos de precipitação: Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer. A formação de precipitado acusa a presença de alcalóides.

2.4 - Teste de esteróides - No teste de esteróides, 20 mL do extrato bruto foi evaporado em banho-maria até a secura. O resíduo foi dissolvido em 7 mL de clorofórmio, filtrando-o em seguida. Para a reação Liebermann-Burchard (detecção de esteróides insaturados) em cinco tubos de ensaio foram colocados 2,0 mL, 1,5 mL, 1,0 mL, 0,5mL e 0,25 mL da solução anteriormente obtida, completando-se cada um dos tubos com clorofórmio até adquirirem 2,0 mL. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A coloração azul seguida de verde indica a presença de esteróides.

2.5 - Teste de flavonóides - No teste de flavonóides, 15 mL do extrato bruto foi agitado

com 5 ml de água destilada e com 5 mL de éter de petróleo. Após remoção da fase etérica, a fase aquosa foi extraída com porções de 15 mL de clorofórmio (até a clorofila ser completamente removida), sendo então, evaporado em banho-maria até a secura. Dissolveu-se o resíduo obtido em 3 mL de metanol, realizando em seguida a Reação de Shinoda: adicionou-se em 2 mL do extrato obtido no máximo 3 fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Observou-se a mudança de cor de róseo a vermelho.

2.6 - Teste de saponinas - No teste de saponinas, diluiu-se 5 mL do extrato bruto em 100 mL de água destilada. Colocou-se esta solução em seqüência de tubos de ensaio numa série sucessiva de 1,2,3 até 10 mL e ajustou-se o volume até 10 mL com água destilada. Os tubos foram agitados numa frequência de duas agitações por segundo durante 15 segundos. Após aguardar 15 minutos, a altura da espuma formada nos tubos de ensaio foi medida. A quantidade de espuma menor que 1 cm indica que o índice de espuma é menor que 100. O índice de espuma foi calculado através da fórmula:

$$\text{Índice de Espuma} = 1000/a.$$

Onde a = volume em ml do extrato diluído utilizado para preparar a diluição do tubo onde foi observado 1 cm de espuma.

2.7 - Teste de taninos - Para ao teste de taninos evaporou-se em banho-maria até secura 5 mL do extrato bruto. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de água, filtrando-o em seguida. Colocou-se 1 mL do filtrado em tubos de ensaio separados e realizou-se as reações de identificação:

a) Reação com sais de ferro – Adicionou-se 5 mL de água e algumas gotas de solução de cloreto férrico a 2 %. b) Reação com acetato de chumbo – Adicionou-se gotas de solução aquosa de acetato de chumbo a 10% no extrato. Observou-se a formação de precipitado ou turvação. c) Reação com alcalóides – Adicionou-se uma gota de solução de ácido clorídrico a 10 % e algumas gotas de solução aquosa a 0,1 % de sulfato de atropina. Observou-se a formação de precipitado branco. d) Reação com gelatina – Acrescentou-se uma gota de solução de ácido clorídrico a 10 % e em seguida, a solução aquosa de gelatina a 2,5 % gota

a gota. Observou-se a turvação da solução ou formação de precipitado. e) Reação com acetato de cobre – Acrescentou-se ao extrato algumas gotas de solução aquosa de acetato de cobre 3 %. Observou-se a formação de precipitado ou turvação.

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a *Malva sylvestris* apenas inibiu o crescimento do *S. aureus*, nas concentrações de 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 4000 µg/mL, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressos em µg/mL, do extrato metanólico das folhas da *Malva sylvestris*.

Concentração do extrato (µg/mL)	<i>Salmonella typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
4000	+	-	+
2000	+	-	+
1000	+	-	+
500	+	-	+
250	+	+	+
125	+	+	+

(+): crescimento do microorganismo; (-): inibição do crescimento do microorganismo

Com isso pode-se perceber que a CIM deste extrato para *S. aureus* foi de 500 µg/mL. A partir das concentrações de extrato que apresentaram inibição de crescimento para *S. aureus* (500 µg/mL, 1000 µg/mL e 2000 µg/mL), foi semeado em placas contendo Ágar Muller Hinton para determinar a Concentração

Bactericida Mínima (CBM). Entretanto, quando realizado a leitura do teste de CBM, observou-se que o extrato avaliado não apresentou efeito bactericida para este microorganismo, pois as placas incubadas apresentaram cultura positiva (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração Bactericida Mínima (CBM), expressos em µg/mL, do extrato metanólico das folhas de *Malva sylvestris*.

Concentração do extrato	500µg/mL	1000 µg/mL	2000 µg/mL
Microrganismo			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+

(+): cultura positiva

Para *Salmonella Typhi* e *E. coli* o extrato testado não apresentou atividade inibitória nem bactericida. Um estudo realizado por Razavi et al., (2011), o extrato metanólico das folhas da *M. sylvestris* mostrou alto efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, com valor de CIM de 320, 320 e 640 µg/mL, respectivamente. Esse resultado pode ser devido ao método de extração e solventes utilizados por esses autores que pode ter extraído mais composto químico comparado com a metodologia de extração utilizada neste trabalho, justificando a CIM de 320 µg/mL para inibição de *S. aureus* daquele trabalho, além de inibir o

crescimento de outros microorganismos como *E. coli*, *Candida albicans*, *Enterococcus fecalis*, *Streptococcus agalactiae*.

No ensaio fitoquímico foi realizado somente análise qualitativa dos componentes químicos: alcalóides, esteróides, saponinas, flavonóides e taninos. Dos testes realizados, a *Malva sylvestris* não apresentou saponinas. Esses dados podem ser observados na Tabela 3.

Para o teste de alcalóides foi utilizado reativos de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer, onde houve a formação de precipitado característico na presença de alcalóides. O teste de esteróides foi confirmado pela Reação de

Liebermann-Burchard onde a coloração azul é indicativa de presença de esteróides. Já o teste de flavonóides, na Reação de Shinoda, a mudança para cor rósea da amostra confirmou a presença deste composto. O teste de taninos nas Reações

de Sais de Ferro, Acetato de Chumbo, Gelatina e Acetato de Cobre observou-se a formação de precipitado e turvação caracterizando a presença de taninos e na Reação com Alcalóides observou-se formação de precipitado branco.

Tabela 3 - Resultados da análise qualitativa do ensaio fitoquímico da *Malva sylvestris*

Metabólitos	Reação	Presença (+) / Ausência (-)
Alcalóides	Bertrand	+
	Bouchardat	+
	Dragendorff	+
	Mayer	+
Esteróides		+
Flavonóides	Reação de Shinoda	+
Saponinas		-
	Sais de Ferro	+
Taninos	Acetato de Chumbo	+
	Alcalóides	+
	Gelatina	+
	Acetato de Cobre	+

(+): presença do componente químico; (-): ausência do componente químico

As análises fitoquímicas fornecem informações relevantes da presença de metabólitos secundários na planta, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (Silva; Miranda; Conceição, 2010)

Segundo Loguercio et al. (2005), há três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos. A primeira supõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com substratos dessas enzimas. A segunda é de que os taninos modificam o metabolismo do microrganismo por ação nas membranas celulares. E a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a possibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Para Coelho et al. (2003) a atividade antimicrobiana dos flavonóides possivelmente é devida à habilidade deste composto de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares e também com a parede das células bacterianas. Ao grupo de flavonóides estão associadas inúmeras atividades biológicas como funções: antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante, antiespasmódica, anticancerígena e diurética (Verdi; Brighente; Pizzolatti, 2005; Fernandes; Santos; Pimenta, 2005).

Silva, Miranda, Conceição (2010) afirmam que o estudo fitoquímico é um desafio para a

comunidade científica, já que o uso de plantas medicinais é crescente e preocupante devido ao grande número de espécies que falta ser estudada e validada na flora brasileira. A concentração dos metabólitos secundários, embora seja controlada geneticamente, pode variar nos tecidos vegetais, dependendo da idade e do tamanho da planta, da parte coletada, da época e ainda do local de coleta (Blank et al., 2007).

4.0 – CONCLUSÃO

Malva sylvestris conhecida popularmente como malva apresentou atividade inibitória somente para *S. aureus* nas concentrações de CIM 500 ug/mL, 1000 ug/mL, 2000 ug/mL, e 4000 ug/mL. Na determinação do perfil fitoquímico verificou-se a presença de taninos, flavonóides, alcalóides e esteróides, sendo que os taninos e flavonóides são os compostos mais citados na literatura como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana.

A quantificação destes compostos poderá ser realizada em trabalhos futuros, porque a concentração pode variar com a época e ainda com local da coleta. É importante realizar estudos com plantas medicinais para comprovar cientificamente o uso popular e ainda conhecer os possíveis efeitos colaterais que elas podem causar.

REFERÊNCIAS

- Agra M.F. Freitas P.F. Barbosa-Filho J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, n.1, p.114-140,2007.
- Alvarenga A.L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. *Ver. Bras. Pl. Med.*, v.9, n.4, p.86-91,2007.
- Barbosa-Filho J.M et al. Natural products with antileprotic activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, n.1, p.141-148,2007.
- Blank, A.F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, n.4, p.557-564,2007.
- Buffon M.C.M. et al. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Corcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. *Revista Visão Acadêmica*, v.2, n.1, p.31-38,2001.
- Catão R.M.R. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. *RBAC*, v.37, n.4, p. 247-249,2005.
- Coelho A.M.S.P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). *Revista Lecta*, Bragança Paulista, v.21, n.1/2, p.47-54,2003.
- Cogo L.L. et al. Anti- Helicobacter pylori Activity of plant Extracts Traditionally used for the tre treatment of gastrointestinal disorders. *Brasilian Journal of Microbiology*, v.41, p.304-309,2010.
- Farina A. et al. HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *Pharmaceut Sci*, v.14, p.203-21, 1995.
- Lôbo K.M.S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.12, n.2, p.227-233,2010.
- Fernandes T.T. Santos A.T.F. Pimenta F.C. Atividade Antimicrobiana das Plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Revista de Patologia Tropical*. v.34, n.2, p.113-122, 2005.
- Loguercio A.P. Atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376,2005.
- Martinazzo A.P. Martins, T. Plantas medicinais utilizadas pela população de Cascavel – PR. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, v.8, n.1, p.3-6,2004.
- Morgan, R. *Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais*. São Paulo,1997.
- Mourane, W. et al. E. The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. *Lipids in health and disease*, v.10, n. 65,2011.
- Ostrosky E.A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p. 301-307,2008.
- Razavi S.M. Bioactivity of *Malva Sylvestris* L., a Medicinal Plant from Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v.14, n. 6, p. 574-579. 2011.
- Santos V.L. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.13, n.1, p. 68-72,2011.
- Sartoratto A. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p.275-280. 2004.
- Simões C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre,2000.
- Souza G.C. Farmácias caseiras comunitárias no município de Maquiné (RS): uma avaliação etnofarmacológica. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.6, n.2, p. 83-91,2004.
- Souza G.C. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacolog*, v.90, p.135-143,2004.
- Tadeg H. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacol*, v.100, n.1-2, p.168-75,2005.
- Torres C.R.G. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. *Rev Fac Odontol*, v.3, n.2,2000.
- Verdi L.Z. Brghente I.M.C. Pizzolatti M.G. Gênero *Baccharis* (Arteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quím. Nova*, v.28, n.1, São Paulo,2005.