

EFEITO DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS SOBRE A BACTERIA *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

Ana Paula Zibetti¹; Angela Valderrama Parizotto², Benício Alves de Abreu Filho³, Carlos Moacir Bonato⁴.

RESUMO: A bacteriose, principal doença com importância econômica para a cultura do maracujazeiro, também conhecida como mancha bacteriana, causada por uma bactéria, *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* Per., constitui fator limitante para a cultura em várias regiões produtoras do Brasil devido à forma severa com que ocorre sob condições de altas temperaturas e umidade. Seu controle é preventivo, com técnicas fitossanitárias que evitem a introdução da bactéria na cultura. Porém quando a doença está instalada, faz-se o uso de antibióticos nos pomares nas áreas afetadas. Sendo assim, este trabalho visou identificar efeito bacteriostático ou bactericida de medicamentos homeopáticos sobre o agente etiológico da mancha bacteriana para auxiliar no seu controle. Foram realizados testes de Microdiluição (MIC), avaliando quantitativamente e de Antibiograma com os medicamentos *Cuprum metallicum*, *Ferrum metallicum*, *Propolis* e *Sulphur* sob diversas dinâmizações. Os resultados demonstram que os medicamentos são promissores para o controle dessa doença.

PALAVRAS-CHAVE: Homeopatia; Maracujá; Bacteriose.

1 INTRODUÇÃO

A bacteriose, principal doença com importância econômica para a cultura do maracujazeiro, frutífera da família Passifloraceae e do gênero *Passiflora* originário da América Tropical. Também conhecida como mancha bacteriana, causada por uma bactéria, *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* Per., foi descrita pela primeira vez no Estado de São Paulo, região de Araraquara (MIRANDA, 2004). Atualmente, Gonçalves & Rosato (2000) por meio de técnicas de hibridação DNA-DNA, mostraram a existência de alto grau de polimorfismo entre isolados de *X. campestris* pv. *passiflorae*, encontrando níveis de similaridade variando de 35% a 85%, propondo sua reclassificação como *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Atualmente a mancha bacteriana é um dos principais problemas fitossanitários da cultura do maracujazeiro e constitui fator limitante para a cultura em várias regiões produtoras do Brasil devido à forma severa com que ocorre sob condições de altas temperaturas e umidade. (MALAVOLTA Jr., 2001)

Quanto às medidas de controle adotadas atualmente são conhecidas como controle cultural, com técnicas fitossanitárias que evitem a introdução desta na produção

¹ Acadêmico do Curso Agronomia. Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR. Programa de Iniciação Científica do PIC-UEM. anazibetti@yahoo.com.br

² Acadêmico do Curso Biologia. Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR. angelaparizotto@hotmail.com

³ Docente da UEM, Maringá – PR. Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá – PR. baafilho@gmail.com

⁴ Docente da UEM, Maringá – PR. Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá – PR. cmbonato@uem.br

de mudas e sementes, bem como a utilização de mudas mais resistentes, execução de poda de limpeza e uso de quebra ventos. Porém quando a doença está instalada, faz-se o uso de antibióticos nos pomares nas áreas afetadas.

Podem ser utilizados como métodos alternativos para o controle de doenças de plantas, produtos elaborados a partir de extratos de plantas e recentemente o uso medicamentos homeopáticos.

A ciência em que se baseia a homeopatia está apoiada principalmente na Lei dos Semelhantes (*Similia similibus curentur* – semelhante cura semelhante), usada empiricamente pelo médico naturalista, Hipócrates (460 a.C) e pelo médico e alquimista, Paracelso (1493 à 1541) e comprovada, experimentalmente, por Samuel Hahnemann, o descobridor da Homeopatia.

Com o presente trabalho, objetiva-se observar o efeito bacteriostático ou bactericida de diversos medicamentos homeopáticos sobre o agente etiológico da mancha bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Homeopatia e Fisiologia Vegetal e de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá.

A cultura de bactéria purificada foi obtida do Instituto Biológico (CEIB) na Coleção de Culturas de Fitobactérias (IBSBF), referências 120; 121.

Inicialmente foram realizados testes com a Metodologia de Microdiluição (MIC) e avaliando quantitativamente com o espectrofotômetro, posteriormente avaliado pela Metodologia de Antibiograma objetivando-se avaliar os efeitos diretos dos medicamentos *Cuprum metallicum*, *Ferrum metallicum*, *Propolis* e *Sulphur* sob diversas dinâmizações para o controle de *X. campestris* pv. *passiflorae*.

Preparo dos medicamentos homeopáticos

Os medicamentos homeopáticos *Ferrum phosphoricum*, *Cuprum metallicum*, *Sulphur* e *Propolis* foram adquiridos na menor dinamização possível em Laboratório de Homeopatia especializado. As dinâmizações de 6CH até 30CH (CH=Centesimal Hahnemanniana) foram feitas no Laboratório de Homeopatia e Fisiologia (UEM) com auxílio de dinamizador braço mecânico (Marca Autic, Mod. Denise 50), segundo o Manual de Normas Técnicas para a Farmácia Homeopática (2003).

Preparo do inóculo

As bactérias foram inoculadas em meio Ágar Nutriente (AN) em placas de petri e incubada em estufa à 28°C durante 24 a 72 h. Após este período inocularam-se 5 colônias em tubo de ensaio com tampa, contendo 3 mL de Caldo Nutriente (CN), em incubadora à 28°C por 24h. A partir da cultura em caldo, foi corrigida a suspensão a fim de se obter uma turvação idêntica ao do tubo 0,5 da Escala Mc Farland (cerca de 10⁸ células/mL em 3 mL de salina 0,85%).

Preparo dos antibióticos

Vancomicina

O antibiótico Vancomicina padrão (teste negativo) foi preparado adicionando-se 0,0050g da droga em 100µL de água destilada estéril. Após homogeneização, as alíquotas de 10µL foram separadas e congeladas para uso posterior. Dez microlitros desta solução foram adicionados a 990µL do CN (diluição 1:100). Cem microlitros da solução obtida foram adicionadas a 900µL do meio CN (diluição 1:10). Desta solução final, 100µL foram colocados em cada well, totalizando 96 amostras para cada placa.

Os produtos comerciais do laboratório PFizer® (Agrimicina, Agrimaicin-500, Micoshield), foram utilizados na concentração de 2,4g/L, diluídos em água destilada e submetidos ao teste de antibiograma.

Bioensaio *in vitro*

VI EPCC

CESUMAR – Centro Universitário de Maringá

Maringá – Paraná - Brasil

Método de microdiluição (MIC)

A suspensão bacteriana foi diluída na proporção de 1:10 (100µL em 900µL de meio): 10^7 células/mL e 5 µL (10^4 células/poço) desta suspensão final colocada em cada uma das 96 depressões (well) da placa.

Aos 100 µL de CN depositado em cada depressão (well), foi adicionado 100 µL dos diferentes medicamentos homeopáticos e suas respectivas dinamizações (6CH a 30CH). Os controles negativo e positivo foram constituídos de 100µL do antibiótico (vancomicina) ou do produto comercial e água destilada estéril, respectivamente. Em seguida foi adicionado 5 µL do inóculo em cada depressão e incubado em câmara úmida, à 28°C, por aproximadamente 24 h.

Após a incubação, os resultados foram avaliados pela turbidez da solução, sendo que quanto menor a turbidez menor o crescimento bacteriano. Foi utilizado uma solução de 2,3,5 trifeniltetrazólio para verificar a atividade desidrogenativa das bactérias e avaliação da absorbância (560nm) com espectrofotômetro.

As porções translúcidas foram avaliadas pelo cultivo em meio sólido (AN), conforme descrito anteriormente, para verificar-se se há crescimento bacteriano.

Antibiograma

Preparo dos discos de papel

Foi utilizado papel-filtro de boa qualidade, tipo “Whatman nº 1”, qualitativo e os discos foram preparados com o auxílio de um furador de papel comum. Os discos eram uniformes e aceitavelmente circulares. Após acondicionados em placas de Petri, foram esterilizados em calor seco, por seis horas, à 100°C.

Procedimento para o teste

As placas de petri, devidamente esterilizadas, foram preenchidas com Ágar Nutriente, formando uma camada uniforme de aproximadamente de 5mm.

Após a solidificação e atingido o equilíbrio térmico com o ambiente, as placas foram devidamente inoculadas, sendo previamente corrigido e com o auxílio de Swabs estéreis, semeado em 3 níveis, incubando posteriormente na geladeira por 1-2 horas.

Em seguida os discos estéreis foram dispostos sobre a superfície do meio em ambiente estéril, acrescidos 10µl da droga-teste (homeopatia) sendo então estes incubados à 28°C por 24hr. A partir disto, foi medido o halo de inibição.

Delineamento estatístico

Os experimentos foram estudados individualmente, ou seja, um medicamento homeopático e suas respectivas dinamizações. O delineamento foi realizado em blocos casualizados com 4 repetições. Os dados, avaliados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando os dados do Teste de Microdiluição (MIC) para verificação do crescimento da bactéria, não houve controle efetivo da bactéria em questão, pelos medicamentos homeopáticos testados. A maioria dos tratamentos foi “negativo” quanto ao controle, sendo que em algumas células (well) da placa não foi observada turvação. Porém, ao realizar-se o teste de crescimento em meio sólido, com uso de trifeniltetrazólio, pode-se observar crescimento das células bacterianas, embora em menor quantidade.

Todos os medicamentos homeopáticos testados apresentaram concentração de células bacterianas superior ao controle com Vancomicina (antibiótico padrão). Porém, observou-se que a maioria das dinamizações utilizadas (exceto *Propolis* 14CH e 16CH e *Sulphur* 16CH), apresentou crescimento bacteriano menor que o controle negativo (apenas com a concentração inicial bacteriana), com destaque para os medicamentos

Sulphur 11CH, 13CH, 14CH e 15CH que apresentaram as menores concentrações. Aparentemente, pelo menos em algumas concentrações, as homeopantias foram efetivas em reduzir as unidades formadoras de colônias (UFC). (Figura 1)

Os medicamentos *Cuprum* e *Ferrum metallicum*, de maneira geral, afetaram o crescimento da bactéria *X. campestris*. As dinamizações de 8 a 15CH de *Cuprum* reduziram significativamente o crescimento bacteriano e, em geral, a absorvência foi inversamente proporcional ao aumento da dinamização. As que mais suprimiram o crescimento bacteriano foram as dinamizações 11, 12, 14 e 15CH. A mesma tendência foi observada quando se aplicou *Ferrum metallicum*. Todas as dinamizações, exceto 6 e 7CH, inibiram o crescimento bacteriano, com maior significância para as dinamizações 11, 12, 13, 14 e 15CH. À medida que se aumentou a dinamização homeopática, houve redução no crescimento bacteriano. Poucos são os trabalhos na literatura que relacionam o controle de doenças fitopatogênicas com o uso de medicamentos homeopáticos (KHANNA & CHANDRA, 1983; VERMA et al, 1989; KUMAR, 1980). Muito menos se tem sobre o controle de bactérias. (Figura 2)

Tabela 2 - Antibiograma com produtos comerciais do laboratório PFizer® comumente utilizados para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae*

DROGAS	DIAM DO HALO (mm)	INTERPRETAÇÃO
Agri-500	10,6	Intermediário
Agrimicina	17,0	Sensível
Micoshield	16,6	Sensível
Água	0,0	Resistente
Álcool 1%	0,0	Resistente

Dentre os três produtos avaliados, a Agrimicina proporcionou melhor resultado (Tabela 2), as bactérias utilizadas mostram-se sensíveis a esta droga, assim como o produto Micoshield, que é mais recomendado para o controle de fungos fitopatogênicos.

Tabela 3- Avaliação da sensibilidade da bactéria a diferentes antibióticos (Antibiograma)

DROGAS	DIAM DO HALO (mm)	INTERPRETAÇÃO
Vancomicina 30µg	30	Sensível
Clindamicina 2µg	24	Sensível
Clorofenicol 30µg	12	Resistente
Tetraciclina 30µg	30	Sensível
Gentamicina 10µg	26	Sensível
Ampicilina 10µg	10	Resistente
Cefalexina 30µg	9	Resistente
Tobramicina 10µg	17	Sensível
Canamicina 30µg	22	Sensível
PolimixinaB 300µg	16	Sensível

Dentre os antibióticos testados, apenas o Clorofenicol 30µg, Ampicilina 10µg e Cefalexina 30µg, não se mostraram eficientes para o controle. Dos produtos utilizados para o controle da *Xanthomonas*, observou-se que Vancomicina 30µg e Tetraciclina 30µg induziram a formação de halos de inibição maiores, Tetraciclina apresentou colônias resistentes em seu halo.

Os medicamentos homeopáticos utilizados não foram efetivos para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae*, em relação à Agrimicina, não havendo a formação de halo de inibição.

4 CONCLUSÃO

Os ensaios “in vitro” demonstraram, de modo geral, que os medicamentos homeopáticos são promissores no controle da bacteriose, entretanto, mais estudos e avaliações são necessárias.

REFERÊNCIAS

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. **Genotypic characterization of *Xanthomonas* stains isolated from passion fruit plants (*Passiflora spp.*) and their relatedness to different *Xanthomonas* species.** *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.811-821, 2000.

KHANNA, K. K.; CHANDRA, S. **Control of fruit rot caused by *Fusarium roseum* with homeopathic solutions.** *Indian Phytopathology*, v.36, p. 356-357. 1983

MIRANDA, J. F. **Reação de Variedades de Maracujazeiro Amarelo a Bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*.** Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, p.48, 2004.

MALAVOLTA-JR, V. A; BERIAM, L. O. S.; NETO, R. **Podridão do fruto, novo sintoma relacionado a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 121-123, jul-dez 2001.

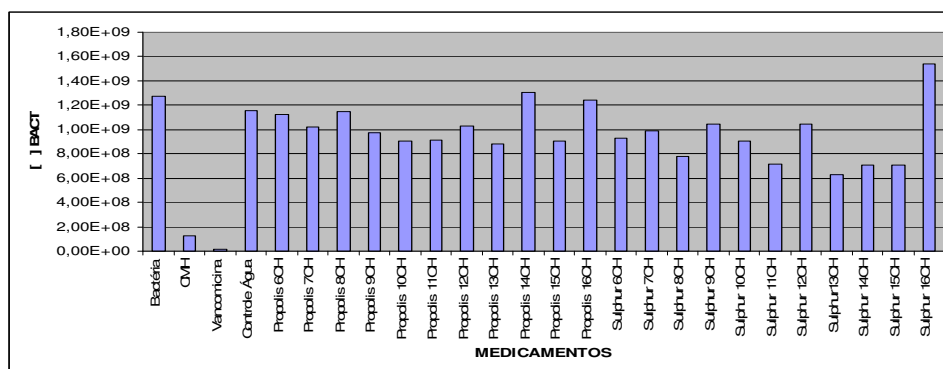


Figura 1 - Concentração bacteriana utilizando os medicamentos *Propolis* e *Sulphur*

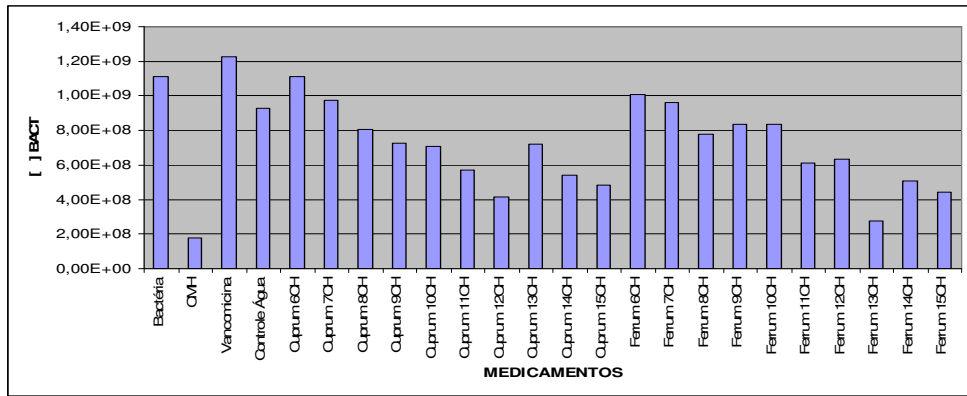


Figura 2 - Concentração bacteriana utilizando os medicamentos *Cuprum metallicum* e *Ferrum metallicum*