

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JOSÉ WALBER GONÇALVES CASTRO

**PERFIL QUÍMICO, ESTUDO ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Asparagus setaceus* (Kunth)**

Juazeiro do Norte – CE
2018

JOSÉ WALBER GONÇALVES CASTRO

**PERFIL QUÍMICO, ESTUDO ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Asparagus setaceus* (Kunth)**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues.

JOSÉ WALBER GONÇALVES CASTRO

**PERFIL QUÍMICO, ESTUDO ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Asparagus setaceus* (Kunth)**

Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues.

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): _____

Prof^ª. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Orientadora

Prof(a): _____

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Examinador 1

Prof(a): _____

Prof^ª. Esp. Rakel Olinda Macedo da Silva

Examinador 2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre iluminar meus passos e dar-me coragem para vencer os momentos difíceis transformando tudo em aprendizado.

Aos meus pais, José Vilson e Antonilda de Castro por nunca medirem esforços para minha formação. A minha madrinha Naura Nogueira e a Dona Zenalda Alves Nogueira por toda confiança, incentivo e zelo depositada nesta jornada.

Aos meus Avós Maternos *In memoriam* e aos Avós paternos pelos conselhos que me foram bastante úteis nesta construção profissional.

A Dona Socorro por fazer o papel de mãe e de vó quando eu estava longe de casa, obrigado por toda contribuição amorosa que me foi valiosa nesses anos de estadia no Cariri.

A minha orientadora Prof^a Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues pela confiança, paciência, conselhos por todos os ensinamentos e pelo exemplo como professora e pesquisadora.

Ao curso da Biomedicina na pessoa da professora coordenadora Ana Ruth por cada dia me fazer sentir útil em poder ajudar alguém.

Ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais-LPPN da Universidade Regional do Cariri-URCA por contribuir neste estudo.

A todas que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Biofísica da Unileão, em especial Erika Braga, Sara Araújo, Cícera Oliveira, Ana Paula Monteiro, Caroline Rodrigues, Bruna Natacha e Luzia Costa, sinto-me extremamente feliz em estar ao lado de vocês e poder partilhar da minha experiência laboratorial com pesquisadoras (amigas) tão companheiras e engajadas. Agradeço, sobretudo pela paciência em escutar-me.

Aos meus irmãos Lucas, Gustavo, Tiago e Paulo por acreditarem que eu conseguiria vencer a jornada.

Aos meus amigos da faculdade Hobert, Laville, Vitória Rhuana, Roberta, Larissa, Ana Maria, Myrelle Moama, Vitor Barreto e Professor Roberto, saibam que vocês terão um futuro brilhante se continuarem no caminho que estão seguindo.

Por fim, gostaria de expressar imenso agradecimento a todos que direto ou indiretamente contribuíram na minha formação pessoal e profissional ensinando-me diariamente a viver o melhor mostrando o que devo sempre compartilhar.

Grato a todos que ajudaram me a chegar até aqui!

PERFIL QUÍMICO, ESTUDO ANTIBACTERIANO E TOXICOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Asparagus setaceus* (Kunth)

José Walber Gonçalves Castro¹; Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues²

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo obter o perfil químico e verificar as atividades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Asparagus setaceus* (Kunth). O extrato foi obtido com o uso de etanol a frio e as classes de metabólitos secundários foram identificadas com reagentes específicos. Os ensaios antibacterianos foram realizados usando o método de microdiluição frente às bactérias padrão, sendo três Gram +: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Bacillus cereus* e três Gram -: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Houve modulação da resistência aos antibióticos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos. A solução teste teve sua concentração variando de 512 a 0,5 µg/ mL, na microdiluição e modulação. A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo *Artemia salina* (Leach) nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/ mL. Os resultados tabulados foram analisados pelo ANOVA bidirecional, através da análise da variância e teste de Tukey. O extrato etanólico de *Asparagus setaceus* (EEAS) indicou a presença de: fenóis, taninos condensados, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, catequinas, leucoantocianidinas, flavonas e saponinas. O EEAS apresentou CL₅₀ de 90,22 µg/ mL. No ensaio de microdiluição o extrato etanólico mostrou inibição de cepas padrão de bactérias Gram + e Gram -, porém nas cepas multirresistentes apresentou concentração acima de 1024 µg/ mL. Para a modulação da ação antibiótica frente as cepas bacterianas o EEAS apresentou tanto ação sinérgica quanto antagônica, sendo a ação sinérgica mais expressiva sobre benzilpenicilina, amicacina e gentamicina frente *Escherichia coli* 27. Todos os antibióticos aminoglicosídeos apresentam atividade sinérgica sobre todas as bactérias testadas. Diante disso, conclui-se que as folhas *Asparagus setaceus* (Kunth) dispõe de propriedades químicas e biológicas que podem contribuir na elaboração de recursos terapêuticos contra processo inflamatório e infeccioso bacteriano.

Palavras chave: *Asparagus setaceus*. Ensaio antibacteriano. Metabólitos secundários. Modulação. Toxicidade.

1-Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, walbercastro1@hotmail.com, Juazeiro do Norte- CE

2- Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, fabiola@leaosampaio.edu.br, Juazeiro do Norte- CE

CHEMICAL PROFILE, ANTIBACTERIAL AND TOXICOLOGICAL STUDY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF THE LEAVES OF *Asparagus setaceus* (Kunth)

ABSTRACT

This work aims to obtain the chemical profile and to verify the biological activities of the ethanolic extract of the leaves of *Asparagus setaceus* (Kunth). The extract was obtained with the use of cold ethanol and the classes of secondary metabolites were identified with specific reagents. The antibacterial assays were performed using the microdilution method against standard bacteria, three Gram +: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Bacillus cereus* and three Gram -: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. There was modulation of resistance to aminoglycoside and beta-lactam antibiotics. The test solution had its concentration ranging from 512 to 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in the microdilution and modulation. The toxicity was tested against the microcrustaceos *Artemia salina* (Leach) at the concentrations of 10, 25, 50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The tabulated results were analyzed by bidirectional ANOVA, through analysis of variance and Tukey's test. The ethanolic extract of *Asparagus setaceus* (EEAS) indicated the presence of: phenols, condensed tannins, anthocyanins, anthocyanins, flavones, flavonols, xanthonenes, chalcones, aurones, flavononols, catechins, leucoanthocyanidins, flavones and saponins. The EEAS presented CL_{50} of 90.22 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In the microdilution assay the ethanolic extract showed inhibition of standard strains of Gram + and Gram - bacteria, but in the multiresistant strains presented concentration above 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$. For the modulation of the antibiotic action against the bacterial strains the EEAS presented both synergistic and antagonistic action, the most significant synergistic action being on benzylpenicillin, amikacin and gentamicin against *Escherichia coli* 27. All aminoglycoside antibiotics have synergistic activity on all the bacteria tested. Thus, it is concluded that the leaves *Asparagus setaceus* (Kunth) has chemical and biological properties that may contribute to the elaboration of therapeutic resources against inflammatory and infectious bacterial processes.

Key words: *Asparagus setaceus*. Antibacterial assay. Secondary metabolites. Modulation. Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as populações fazem uso das plantas no interesse de tratar ou curar enfermidades. Portanto, a utilização desses vegetais na atenção básica de saúde além de antiga está relacionada com a própria evolução do homem, que encontrava na natureza o único recurso de sobrevivência. Os mitos, superstições ou próprias comprovações científicas fortalecem o uso de plantas medicinais como fonte terapêutica (IBIAPINA et al., 2014).

A fitoterapia trata-se do estudo de plantas medicinais com propriedades curativas ou remediativas que fazem parte da prática da medicina popular. Esta prática está associada ao conjunto de saberes difundido por diversos usuários e praticantes. O uso dessas plantas medicinais pela população é bastante comum passando a compor inúmeras vezes o único artifício da atenção básica de saúde (ALVES; POVH, 2013; BRUNING; MOSEHUI; VIANA, 2012; CRUZ, 2017).

A escolha por fitoterápicos em detrimento de medicamentos sintéticos deve-se principalmente a composição desses produtos vegetais. Os inúmeros metabólitos secundários têm a função de inibir ou retardar os processos bioquímicos dos microrganismos contribuindo diretamente no organismo humano. As propriedades antimicrobianas que compõem extratos e óleos essenciais de plantas se tornaram principais pautas de estudo, pois possuem compostos que podem ser a base de antibióticos mais específicos e menos nocivos (CARVALHO et al., 2017).

Essas características são observadas em plantas da família Asparagaceae como é o caso do *Asparagus setaceus*, popularmente conhecido como melindro. As espécies desta família possui composição química caracterizada por compostos fenólicos, terpenos e ácido ascórbico justificando assim o poder antioxidante. A ação antimicrobiana dar-se pela presença de compostos lipofílicos de alta solubilidade, pois estes possuem ações degenerativas sobre as membranas dos microrganismos (HESHAM et al., 2012).

É crescente o número de microrganismos resistente aos antibióticos convencionais. Quando ocorre esse tipo de evento necessita-se da junção de dois ou mais antibióticos para obtermos o que chamamos de efeito sinérgico. Frequentemente, esse efeito sinérgico ocorre através da modulação fitoterápica, tornando o composto natural um método de baixo custo e com evoluída comprovação científica. (COSTA et al., 2017).

A utilização da fonte natural no processo de limitação da resistência a antimicrobianos é uma característica bastante evidente, uma vez que moléculas bioativas fitoterápicas podem atuar de forma sinérgica com fármacos potencializando assim o efeito medicamentoso desses.

Além disso, os compostos vegetais apresentam baixo custo frente aos medicamentos industrializados e é crescente comprovação científica da ação terapêutica. Assim sendo, deve-se considerar tal recurso de origem popular natural na prática cotidiana, como forte atributo para mediar o processo saúde-doença. Portanto, esse estudo teve como objetivo obter o perfil químico, estudo antibacteriano e toxicológico do extrato etanólico das folhas de *Asparagus setaceus* (Kunth).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO

Esta pesquisa trata-se de um estudo experimental, que inclui uma pré-tese para testar uma hipótese. Os resultados encontrados contribuirão no aprimoramento de novas técnicas científicas que também terão finalidade de descobrir algo inexplorado, variáveis contidas neste estudo serão manipuladas a fim de permitir o efeito e a causas de um determinado evento (DODT et al., 2015). Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e Bromatologia do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO, *Campus* Saúde e no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais-LPPN da Universidade Regional do Cariri-URCA, *Campus* Pimenta.

2.2 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *A. setaceus* (Kunth) foram coletadas em cultivo próprio no mês de julho no bairro São Miguel, Rua Job Lobo-Santa Luzia, N° 86, Crato - CE, 63122-055, com coordenadas de latitude: 7° 13' 44,049" S, longitude: 39° 23' 38,438" W e altitude: 400. Uma exsicata foi encaminhada para o Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC).

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As folhas (122, 8 g) de *A. setaceus* (Kunth) foram secas a temperatura ambiente e submetidas a extração durante 72 horas. O etanol foi escolhido como solvente extrator, de acordo com Simões et al. (2010). Após esse período a mistura foi submetido à filtração para

retirada das impurezas, a destilação do solvente ocorreu em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura controlada entre 30-40 °C, tendo rendimento de 1,66% (v/v).

2.3.1 Prospecção química

A prospecção química foi realizada de acordo com a metodologia de Matos (2009) e Simões et al. (2010) com o intuito de identificar as classes de metabolitos presentes. Esse teste baseia-se na observação visual, intensificação da cor ou formação de precipitado após adição de reagentes específicos nas soluções das amostras.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA

A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo *Artemia salina* (Leach). O teste foi realizado em triplicata, com as concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL, acompanhado de controle positivo preparado com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), e controle negativo com água marinha. Após 24 h foi feita a leitura de larvas sobreviventes. O cálculo da CL₅₀ foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando CL₅₀ < 1000 µg/mL (MEYER et al., 1982; HIROTA et al., 2012)

2.5 AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição com base no CLSI (2012). Foram utilizadas bactérias padrão, sendo três Gram (+): *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Streptococcus mutans* ATCC 00446 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e três Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Todas as linhagens foram concedidas pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais-LPPN da Universidade Regional do Cariri-URCA.

Inicialmente foi preparada uma solução mãe contendo 10 mg do extrato etanólico dissolvidos em 1 mL de DMSO e 9 mL de água destilada, obtendo esta solução a concentração de 1024 µg/ mL.

As linhagens bacterianas foram ativadas em meio *Brain Heart Infusion Broth* (BHI 3,8 %) e mantidas na estufa por 24 h. Após o primeiro cultivo o inóculo foi padronizado a partir da concentração de aproximadamente de 1 x 10⁸ UFC/mL (turbidez de 0,5 da escala de

McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída em caldo BHI a 10 % e volumes de 100 μL foram adicionados e homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido do produto vegetal com concentração inicial de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram realizadas diluições seriadas e as concentrações variando de 512 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico utilizando 25 μL de resazurina sódica (0,01%) após o período de incubação. O último poço da placa de microdiluição continha apenas os inóculos bacterianos, portanto tratava-se do controle positivo. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano.

2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA

O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do composto natural através de microdiluição em triplicata. Para avaliar a atividade moduladora foi utilizada a CIM, do extrato etanólico frente aos antibióticos da classe aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), beta-lactâmicos (benzilpenicilina e Cefalotina).

A quantidade do extrato etanólico foi calculada pela concentração sub inibitória (MIC/8). Os inóculos bacterianos em BHI a 10 % associados ao extrato foram distribuídos na microplaca seguido da microdiluição de 100 μL das soluções de antibióticos (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Houve a realização de seguidas diluições obtendo as concentrações do antibiótico que variaram de 512 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O teste foi monitorado com um controle de inibição contendo apenas os antibióticos e os microrganismos. As placas microdiluídas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a leitura foi procedida com auxílio resazurina sódica como descrito anteriormente (COUTINHO et al., 2008).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados da avaliação da atividade toxicológica foram tabulados através do modelo de regressão linear e teste de Tukey por comparação múltipla. Os testes microbiológicos foram analisados pelo ANOVA bidirecional seguida pelo teste de Bonferroni utilizando software GraphPad Prism 6.0. Os resultados em $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PROSPECÇÃO QUÍMICA

A utilização dos fitoterápicos como riqueza natural vem contribuindo constantemente para o aprimoramento de novas técnicas terapêuticas devido aos seus metabólitos secundários. Esses são conhecidos por contribuírem diretamente ou indiretamente no organismo humano, podendo inibir ou antagonizar importantes alvos moleculares e celulares nos microrganismos (ARAÚJO et al., 2012; LACERDA et al., 2016).

A prospecção química do extrato etanólico de *A. setaceus* (EEAS) indicou a presença de fenóis (taninos condensados) e flavonóides (antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis; xantonas, chalconas, auronas e flavononóis). Os flavonóides que apresentaram menor intensidade da cor e formação do precipitado foram: catequinas; leucoantocianidinas e flavonas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da Prospecção fitoquímica do Extrato Etanólico das folhas de *Asparagus setaceus* (EEAS).

Classe de metabólitos secundários																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
EEAS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: própria do autor. 1: Fenóis; 2: Taninos hidrolisáveis; 3: Taninos condensados; 4: Antocianinas; 5: Antocianidinas; 6: Flavonas; 7: Flavonóis; 8: Xantonas; 9: Chalconas; 10: Auronas; 11: Flavononóis; 13: Catequinas; 14: Leucoantocianidinas; 15: Flavonas; 16: Saponinas. (+) presente; (-) ausente.

O extrato etanólico de *A. setaceus* apresentou uma diversidade de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, por exemplo, são responsáveis por protegerem os vegetais do ataque de bactérias por se ligarem a determinadas proteínas antimicrobianas levando a redução de solubilidades das mesmas. Os estudos de Nindo et al. (2003) relataram que os *Aspargos* são espécies ricas em compostos químicos principalmente em compostos fenólicos e flavonóides (como rutina) tornado os alimentos um dos mais consumidos por atuarem na regulação de distúrbios gástricos .

Outros fenóis como taninos condensados são responsáveis por caracterizar os alimentos com sabor amargo e odor forte, essas características sensoriais também foram

observados na espécie do presente estudo. A pesquisa de Lima et al. (2018) ressalva a importância dos taninos presente nas folhas de plantas ornamentais quando exclama que esses possuem papel importante na proteção contra os microrganismos (incluindo fungos), além de interferirem no processo simbiótico e possuírem grande relevância em atividades farmacológicas.

Os flavonóides são compostos vegetais que possuem elevado poder antioxidante capaz de interagir com os radicais livres reduzindo o envelhecimento das células, possui ainda função analgésica, vasodilatadora e anti-inflamatória. Estudos realizados por Cabral; Pita; Salgueiro. (2014) caracteriza a família Asparagaceae com alto teor de flavonoides e antocianinas o que confere a esta família a atividade cardiotônica, portanto este estudo corrobora com achados destes metabólicos na espécie.

As espécies deste gênero são largamente utilizadas por conterem também saponinas. Hesham et al. (2012) Zhong et al. (2015) atribuem o gênero a presença saponinas triterpênicas que são compostos lipofílicos com função de solubilidade elevada, tendo ação sobre membranas celulares, desorganizando-as. Além de poderem agregar às proteínas, carboidratos, complexos vitamínicos e aminoácidos atribuindo às espécies ações: anti-inflamatória, diurética, vasodilatadora, analgésica e de controle da permeabilidade celular.

Testes experimentais descritos por Assis; Souza; Rocha (2014) mostram que o aumento da clorofila presentes no chá verde de *Camellia sinensis* é diretamente proporcional a quantidade de polifenóis, que entre eles estão as catequinas responsáveis pela melhora do estado imunológico. Em contrapartida esse estudo apontou que as catequinas e as leucoantocianidinas (auxilia no tônus e resistência capilares) estão em menor quantidade na espécie mesmo a planta e seu extrato etanólico apresentando intensa coloração verde.

3.2 ATIVIDADE TOXICOLÓGICA

Além das plantas serem popularmente conhecidas como terapêuticas, frequentemente podem possuir características tóxicas que somente são descobertas no momento da busca por propriedades farmacológicas. Segundo Campos et al. (2016) a toxicidade de um a espécie vegetal pode estar relacionada a determinados metabólicos secundários assim como motivos associados ao individuo humano, ao modo de cultivo, uso da planta e fatores ambientais.

O extrato da espécie de *A. setaceus* apresentou uma CL_{50} de 90,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nos estudos paliativos de Fajardo; Barreraa; Osorio (2011) com *Sansevieria trifasciata* (Prain) planta também pertencente a família Asparagaceae, o extrato etanólico total apresentou

concentração letal média de 146,41 $\mu\text{g} / \text{mL}$ frente *Artemia salina*, o mesmo não demonstrou atividade citotóxica contra células Vero ou células de mieloma de camundongo antitumorais.

Segundo Santos; Fukushima; Fávero (2015) um percentual de 60% das intoxicações no Brasil ocorrem por plantas e cerca de 50% destas ocorrem por espécies de características ornamentais. No levantamento do estudo sobre as principais plantas e respectivas famílias com toxicidade reconhecida encontraram a família Asparagaceae tendo como representante *Dracaena* sp e *Sansevieria trifasciata*. Alguns sinais de intoxicação relatados apareceram após a ingestão direta ou exsudatos, corroborando assim com o presente estudo por se tratar de uma planta ornamental com exsudato viscoso pertencente à mesma família.

3.3 ENSAIOS ANTIBACTERIANOS

Atualmente, a população tem questionado o uso indiscriminado de medicamentos sintéticos, procurando alternativas nos fitoterápicos, devido: a melhor qualidade de vida adquirida por meio do uso desses métodos naturais e saudáveis, baixo custo frente aos medicamentos industrializados e a crescente comprovação antimicrobiana da ação terapêutica. (BRUNING; MOSEHUI; VIANA, 2012; PERNA; FERREIRA, 2014).

Os resultados contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas mostrou que o extrato tem efeito inibitório. Para as bactérias Gram negativas linhagem padrão obteve se um CIM 512 $\mu\text{g} / \text{mL}$, enquanto as bactérias Gram positivas linhagem padrão apresentou uma CIM que variaram entre 512 e 256 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a depender da espécie bacteriana avaliada. Em contrapartida as bactérias multirresistentes apresentaram uma CIM ≥ 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração inibitoria mínima do EEAS frente as cepas bacterianas Gram negativas e Gram positivas.

EEAS	
BACTÉRIAS	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	512
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	512
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018	256
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 00446	256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	512
<i>Escherichia coli</i> 27 multirresistente	≥ 1024
<i>Staphylococcus aureus</i> 358 multirresistente	≥ 1024

Fonte: própria do autor

O produto vegetal mostrou maior efetividade frente às bactérias Gram positivas, o que vai de acordo com a literatura como Lima et al. (2016) e Tian et al. (2009) que confirma haver maior susceptibilidade dessas bactérias aos extratos naturais. Já as bactérias Gram negativas possuem na morfologia a parede celular recoberta pela camada de lipopolissacarídeos o que limita assim a entrada de alguns compostos, portanto a ação do produto é reduzida.

Quanto às bactérias multirresistentes como o caso *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358 mostrou-se uma concentração inibitória maior que 1024 µg/ mL (Tabela 2). De acordo com Moura et al. (2017) e Houghton et al. (2007) nesta concentração o extrato não mostra nível clínico confiável, ou seja, não interfere relevantemente na atividade biológica, sendo necessário grandes quantidade do extrato para este atingir níveis plasmáticos.

João (2015) corrobora com resultado dessa pesquisa ao avaliar a atividade antimicrobiana de duas espécies do gênero *Asparagus* não encontrando atividade clínica confiável contra a *Staphylococcus aureus*, sendo que o produto avaliado apresentava efeito quando utilizado uma concentração acima de 200 µg/ mL (maior concentração). Além disso, justificou esse resultado devido à linhagem bacteriana se tratar de um dos principais microrganismos causadores de infecção hospitalar e produzir inúmeros fatores de resistência (bomba de efluxo, inativação enzimática e alteração do sítio de ligação).

O estudo de Batista et al. (2018) evidenciou a incidência de *Bacillus cereus* que pode estar associada a intoxicação alimentar pela produção de enterotoxina e hemolisinas, sendo alternativa de controle a utilização de produtos naturais que inibam o crescimento exponencial da bactéria. A presente pesquisa está de acordo com essa afirmação já que o extrato bruto foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo em concentração de 256 µg/ mL.

Essa mesma concentração também foi observada quando o EEAS foi utilizado frente *Streptococcus mutans* (Tabela 2). Nos ensaios de Ferreira (2017), onde foram utilizadas três espécies do gênero de *Dracaena* pertencente à família Asparagaceae, foi possível verificar que algumas plantas que compõem a família possuem resina com capacidade de interagir com membranas dos microrganismos obtendo a ação antimicrobiana e citotóxica, em especial das bactérias Gram positivas.

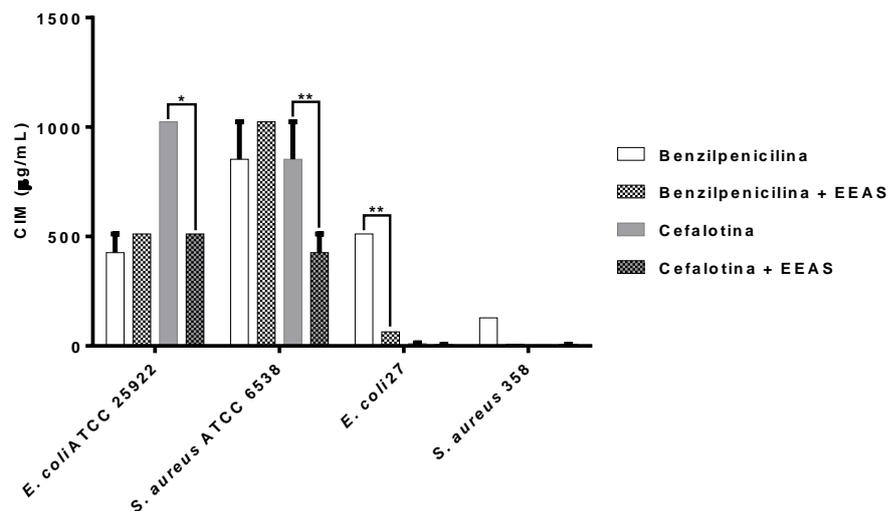
É possível observar que há trabalhos relacionados sobre a atividade antibacteriana de espécies da família Asparagaceae que são em partes divergentes com esse estudo. Os testes de Bozorgi et al. (2017) utilizando a *Drimys maritima* Stearn (Asparagaceae) exibiram atividade antibacteriana elevada contra cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistente, *Bacillus megaterium* e *Neisseria gonorrhoeae*. Como visto no presente estudo a concentração inibitória mínima menos significativa foi frente as bactérias multirresistentes.

3.4 ATIVIDADE MODULADORA

A busca por produtos naturais com propriedades moduladoras tem se intensificado, devido os compostos naturais poderem interagir com os fármacos alterando a permeabilidade das membranas e potencializando o influxo da droga. Ao utilizar esses produtos com efeitos sinérgicos consideráveis aumenta-se o campo de atuação do medicamento enquanto diminuí a resistência microbiana.

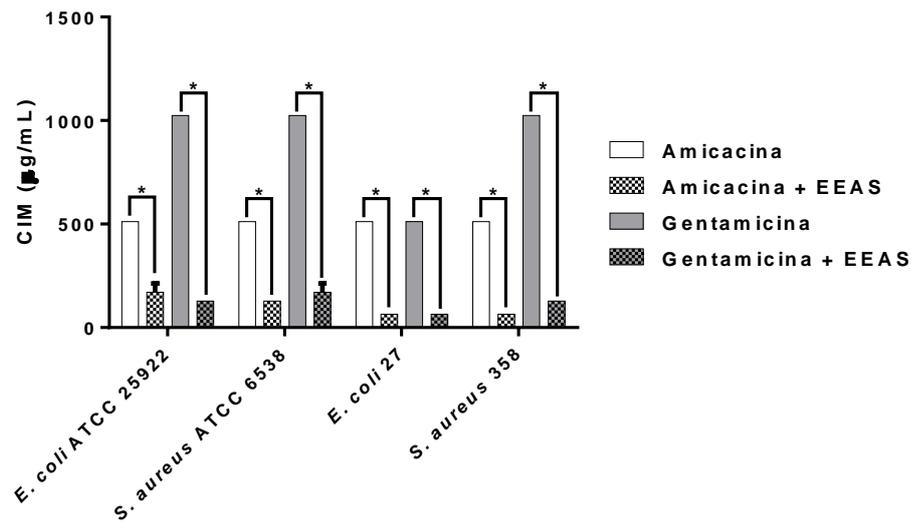
Para a modulação da ação antibiótica frente as cepas bacterianas o EEAS apresentou tanto ação sinérgica quanto antagonônica conforme observadas nas Figuras 1 e 2. O extrato exerceu ação sinérgica mais expressiva sobre benzilpenicilina, amicacina e gentamicina frente *Escherichia coli* 27 com a diminuição da CIM de 512 µg/ mL para 64 µg/ mL.

Figura 1. Resultado do potencial modulador do EEAS na atividade antibiótica de beta lactâmicos frente às cepas de *E.coli* ATCC 25922; *S.aureus* ATCC 6538; *E. coli* 27 (multirresistente) e *S. aureus* 358 (multirresistente).



Fonte: própria do autor. ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 6.0. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,0005$

Figura 2. Resultado do potencial modulador do EEAS na atividade antibiótica de aminoglicosídeos frente as cepas de *E.coli* ATCC 25922; *S.aureus* ATCC 6538; *E. coli* 27 (multirresistente) e *S. aureus* 358 (multirresistente).



Fonte: própria do autor. ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 6.0. * p < 0,0001; **p < 0,0005

Para *Escherichia coli* padrão o sinergismo foi observado sobre a cefalotina diminuindo a CIM de 1024 µg/ mL para 512 µg/ mL, gentamicina com a diminuição da CIM de 1024 µg/ mL para 512 µg/ mL e amicacina com a redução de 512 µg/ mL para 128 µg/ mL, quanto a benzilpenicilina o extrato não alterou a CIM permanecendo com 512 µg/ mL.

Frente a *Staphylococcus aureus* padrão o EEAS reduziu a CIM: da amicacina de 512 µg/ mL para 128 µg/ mL, cefalotina de 1024 µg/ mL para 512 µg/ mL e da gentamicina de 1024 µg/ mL para 128 µg/ mL sendo a redução mais significativa estatisticamente. Quanto a benzilpenicilina a CIM se manteve em 1024 µg/ mL.

Ainda relacionado à mesma bactéria, porém a cepa multirresistente houve potencialização antibiótica sobre amicacina reduzindo a CIM de 512 µg/ mL para 64 µg/ mL, bem como sobre a gentamicina com redução de 1024 µg/ mL para 128 µg/ mL. Foi observado efeito antagônico pouco expressivo frente à cefalotina aumentando a CIM de 4 µg/ mL para 8 µg/ mL.

Como observado na Figura 2 todos os antibióticos da classe de aminoglicosídeos obtiveram a atividade sinérgica sobre todas as bactérias testadas sendo estas Gram positivas ou negativas pertencentes a linhagem padrão ou multirresistente. Essa característica não pode ser observada nos antibióticos beta lactâmicos já que estes não conseguiram inibir sinérgicamente todas as bactérias, apenas a cefalotina as duas bactérias pertencentes a linhagem padrão e a benzilpenicilina inibiu *Escherichia coli* Multirresistente 27 e *Staphylococcus Aureus* Multirresistente 358.

Os beta- lactâmicos são uma classe de antibióticos comumente utilizado devido sua tolerância pelo organismo, mas o uso inadequado desta classe gera mecanismos de resistência, um dos mais utilizados pelas bactérias é a produção de enzimas de inativação denominadas de beta-lactamases. Segundo Ribeiro (2018) uma alternativa de ultrapassar essa barreira de resistência é a combinação dessas drogas aos produtos naturais.

Caracterizando os aminoglicosídeos, Brasil (2010) exclama que são antibióticos com forte poder de penetração e podem possuir ação mais imediata por interferirem na síntese proteica, em especial a amicacina e gentamicina apresentando maior atividade contra cepas multirresistentes da família Enterobactereaceae.

Os aminoglicosídeos são antibióticos que apresentam toxicidade celular bastante importante podendo esses provocar nefrotoxicidade e até bloqueio muscular. Segundo Nonato (2018) esses efeitos tóxicos podem ser resolvidos com a combinação de classes antibióticas com produtos naturais, isso levará a diminuição da dose terapêutica eficaz a partir da redução expressiva da concentração inibitória mínima.

Os ensaios antimicrobianos realizados por Figueredo et al. (2013) mostraram boa atividade sinérgica ao associar o extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* frentes as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistentes, onde o extrato foi responsável por reduzir MIC's de todos antibióticos aminoglicosídeos testados, portanto corroborando com o presente estudo.

Segundo estudos de Pindel (2017) a família Asparagaceae possui capacidade de alteração morfológica de alguns microrganismos sejam eles padrão ou multirresistente, essa modificação genética está relacionada a inúmeros fatores como clima, sazonalidade ou até mesmo o microrganismo testado, essas condições podem ser responsáveis por reduzir ou antagonizar o potencial de algumas espécies, o que reforça o resultado antagônico observado pela benzilpenicilina na Figura 1.

O antagonismo da cefalotina frente *Staphylococcus aureus* 358 observado na Figura 1, deve-se principalmente a resistência múltipla da cepa, responsável por limitar opções terapêuticas e prolongar o tratamento de algumas infecções. Conforme Lima et al. (2015) a maioria das cepas de *S. aureus* possuem a capacidade de adquirirem plasmídeos que codificam penicilinas e inativam o antibiótico por hidrólise do anel betalactâmico mesmo estando em associação a um agente modulador.

O sinergismo ocorre quando um antibiótico tem seu efeito aumentado em conjunto com outra substância, essa situação pode ser justificada pelo aumento da permeabilidade bacteriana o que facilita a entrada do antibiótico. Os aminoglicosídeos apresentaram efeito

sinérgico quando testados frente às cepas de *Escherichia coli* (Figura 2), corroborando com esses dados Souza et al. (2016) verificou que o extrato hexânico de *Melissa officinallis* apresentou efeito sinérgico quando testado frente amicacina e gentamicina.

As análises de Tintino et al. (2013) sobre a atividade moduladora do extrato etanólico de *Costus cf. arabicus* expressaram que frente *S. aureus* 358 foi verificada a redução da concentração inibitória mínima de duas a seis vezes em relação ao controle com o antibiótico aminoglicosídeo sozinho, portanto houve um sinergismo como observado na figura 2.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Asparagus setaceus* (Kunth) apresentou uma variedade de compostos químicos secundários que podem ser responsáveis por suas propriedades farmacológicas *in vitro*. Além disso o extrato mostrou-se como promissora alternativa a ser tomada na terapia antibacteriana combinada a antibióticos, já que o mesmo apresentou apenas um efeito antagônico, indicando que a planta possui um potencial para ser utilizada como alternativa no tratamento contra bactérias resistentes.

O produto vegetal apresentou CL_{50} 90,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que pode ser justificada pela variedade de metabólicos assim como pela forma de cultivo e condições experimentais para utilização das folhas da planta, sendo necessário estudos mais aprofundados para verificação da citotoxicidade da espécie. Portanto os dados ressaltam a necessidade de estudos que quantifiquem os compostos da espécie para melhor relatar e interpretar suas atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

ALVES, G. S. P.; POVH, J. A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.

ARAÚJO, K. R. M. et al. Plantas medicinais no tratamento de doenças respiratórias na infância: uma visão do saber popular. **Revista rene**, v. 13, n. 3, p. 659-666, 2012.

ARIMURA, G. et al. Herbivore Induced Defense Response in a Model Legume. Twospotted Spider Mites Induce Emission of (E) β Omicene and Transcript Accumulation of (E) β Omicene Synthase in *Lotus japonicas*. **Plant physiology**, v. 135, n.1, p. 1976-1983, 2004.

ASSIS, A. C. G. G; SOUZA, M. A; ROCHA, S. S. A. **O uso do chá verde na hipertrofia muscular**. 2014. Monografia (Curso de Farmácia)- Fundação Universitária Vida Cristã-FUNVIC, Pindamonhangaba, 2014.

BATISTA, R. D. et al. Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos gerados através da intoxicação alimentar. **Revista Desafios**, v. 5, n. 2, p. 30-40, 2018.

BOZORGI, M. et al. Traditional medical uses of *Drimys* species in terms of phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 37, n. 1, p. 124-139, 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Renome** 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G. ; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

CAMPOS, F. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 373-382, 2016.

CABRAL, C; PITA, J. R, SALGUEIRO, L. **Plantas medicinais: entre o passado e o presente**, 2ª. ed. Coimbra, 2014.

CARVALHO, J. A. M. et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*). In: Semana de Engenharia química da UFES, 5., 2017, Espírito Santo. **Anais da V Semana de Engenharia química UFES**. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo, 2017. p. 1-5.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**-.Ninth Edition. CLSI document Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COSTA, A. P. M. et al. Resistência antimicrobiana e a implementação da RDC 20/2011. **Única cadernos acadêmicos**, v. 3, n. 3, p. 1-6, 2017. Disponível em: <http://co.unicaen.com.br:89/periodicos/index.php/UNICA/article/view/58.pdf>>. Acesso em : 18 de abril. 2018.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1250-1318, 2008.

CRUZ, D. B. **Atividade antioxidante e citotoxicidade de plantas do campo rupestre brasileiro: *Gomphrena arborescens* L.F., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.** 2017. Dissertação(Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

DODT, R. C. M. et al. Estudo experimental de uma intervenção educativa para promover a

autoeficácia materna na amamentação. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 23, n. 4, p.725-732, 2015.

FAJARDO, L. M; BARRERAA, M. G; OSORIO, J. C. C. Contribución al estudio fitoquímico de la especie “*Sansevieria trifasciata* Prain” y su comportamiento frente a ensayos biológicos. *Research journal University of Quindio*, v. 1, n. 22, p. 121-128, 2011.

FERREIRA, S. L. **Fitoquímica e avaliação farmacológica de *Dracaena sp.*** 2017. Dissertação (Ciências Farmacêuticas)- Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2017.

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearenses* A.C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. , 2013.

HESHAM, R. E. et al. Anti-schistosomiasis triterpene glycoside from the Egyptian medicinal plant *Asparagus stipularis*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 314-318, 2012.

HIROTA, B. C. K. et al. Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente á *Artemia salina*. **Visão acadêmica**, v. 13, n. 2, p. 42-48, 2012.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

IBIAPINA, W. V. et al. Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. **Ciência & saúde**, v. 12, n. 1, p. 58-68, 2014.

JOÃO, A. A. **Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus Baker* e *Asparagus africanus***. 2015. Monografia (Departamento de Química) - Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, 2015.

LACERDA, G. M. et al. Atividade moduladora sobre antibióticos pelo extrato aquoso das folhas de *Bauhinia unguolata* L. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 21, n. 3, p. 309-317, 2016.

LIMA, J. L. S. et al. Identificação e susceptibilidade de microrganismo proveniente de uma unidade hospitalar pública. In: Mostra científica da farmácia da Unicatólica, 10., 2016, Quixadá. **Anais da X Mostra Científica da Farmácia- UNICATÓLICA**. Quixadá: Centro Universitário católica, 2016. p. 1-6.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares - Revisão de literatura. **Revista UNINGÁ Review**, v.21, n.1, p. 32-39, 2015.

LIMA, R. A . et al. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper tuberculatum* jacq. (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Revista Eletrônica da FAINOR**, v.11, n. 2, p. 316-334, 2018.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**, 3ª. ed. Fortaleza: UFC, 2009.

MEYER, B. N. et al. . Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medicinal**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MOURA, W. C. S. et al. Perfil antibacteriano de novos derivados N-acilidrazônicos substituídos. **Revista Biofarm**, v 13, n. 4, p. 59-66, 2017.

NINDO, C. I. et al. Evaluation of drying technologies for retention of physical quality and antioxidants in asparagus (*Asparagus officinalis*, L.). **Lebensm wiss. U.technology**, v. 36, n. 1, p. 507-516, 2003.

NONATO, C. F. A. **Caracterização Química e avaliações biológicas da polpa dos frutos de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) do Cariri Cearense**. 2018. Dissertação (Etnobiologia e conservação da natureza)- Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE; Universidade Estadual da Paraíba-UEPB; Universidade Regional do Cariri-URCA, Recife, 2018.

PERNA, T. A; FERREIRA, A. P. N. L. Revisão Bibliométrica Sobre o Cultivo de Plantas Medicinais em Quintais Urbanos em diferentes Regiões do Brasil (2009-2012). **UNOPAR científica. Ciências biológicas da saúde**, v. 16, n. 1, p. 61-67, 2014.

PINDEL, A. Regeneration capacity OF *Asparagus setaceus* (Kunth) Jessop ‘pyramidalis’ *in vitro* cultures. **Acta scientiarum polonorum horticulture**, v. 16, n. 1, p. 85–93, 2017.

RIBEIRO, D. A. **Variabilidade da composição química e atividades biológicas de *Secundatia floribunda* A.DC. em função da sazonalidade e em diferentes fases fenológicas**. 2018. Dissertação (Etnobiologia e conservação da natureza)- Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE; Universidade Estadual da Paraíba-UEPB; Universidade Regional do Cariri-URCA, Recife, 2018.

SANTOS, F. P; FUKUSHIMA, A. R. FAVERO, O. A. Verificação da ocorrência de plantas com potencial de toxicidade nos jardins do Campus Mooca da Universidade São Judas Tadeu (São Paulo/SP). **Saúde e Saneamento ambiental**, v. 11, n. 8, p. 81-94, 2015.

SOUZA, A. T. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*. **Revista ciência de la salud**, v. 14, n. 2, p. 201-210, 2016.

TIAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. **Food Chemistry Journal Elsevier**, v. 113, n. 1, p.173- 179, 2009.

TINTINO, S. R. et al. Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 157-162, 2013.

ZHONG, Z. et al. Antihepatic Fibrosis Effect of Active Components Isolated from Green Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Involves the Inactivation of Hepatic Stellate Cells. **J. Agricultura and food chemistry**, v. 63, n. 1, p. 6027–6034, 2015.

