

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ANNA KARYNE PEREIRA DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO
DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. (MASTRUZ)**

JUAZEIRO DO NORTE – CE

2019

ANNA KARYNE PEREIRA DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO
DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. (MASTRUZ)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário Leão
Sampaio, como requisito para obtenção do
grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Esp. Lívia Maria Garcia
Leandro

Coorientador: Orlando de Menezes Dantas
Junior

JUAZEIRO DO NORTE – CE

2019

ANNA KARYNE PEREIRA DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO
DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. (MASTRUZ)**

Projeto de Pesquisa 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 Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

Coorientador: Orlando de Menezes Dantas Junior.

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): _____

Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

Orientadora

Prof(a): _____

Orlando de Menezes Dantas Junior

Coorientador

Prof(a): _____

Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Examinador 1

Prof(a): _____

Msc. Rakel Olinda Macedo da Silva

Examinador 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA DE *Chenopodium ambrosioides* L. (MASTRUZ).

Anna Karyne Pereira dos Santos¹, Livia Maria Garcia Leandro², Orlando de Menezes Dantas
Junior³

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e modulatória do extrato etanólico da folha de *Chenopodium ambrosioides* L. frente às cepas bacterianas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e multirresistentes *Staphylococcus aureus* 358 e *Escherichia coli* 27. Trata-se de um estudo experimental de caráter quantitativo tendo como material para análise folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. onde a partir do extrato etanólico do material foi analisada a concentração inibitória mínima (CIM) por meio de teste de microdiluição, e análise da modulação de aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina). Na avaliação da CIM foram obtidos resultados ≥ 1024 com as cepas bacterianas. O extrato etanólico apresentou resultados clinicamente relevantes podendo evidenciar que houve sinergismo quando utilizou-se o extrato frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 358 em associação com a gentamicina e com amicacina. Portanto, estudos futuros precisam ser realizados com intuito de elucidar os constituintes majoritários da planta para melhor entender a atividade da mesma.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*, microdiluição, modulação, plantas medicinais, resistência.

ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Chenopodium ambrosioides* L. (MASTRUZ).

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antibacterial and modular activity of the ethanolic extract of *Chenopodium* L. *ambrosioides* leaf against the standard bacterial strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 and *Escherichia coli* ATCC 25922 and multiresistant *Staphylococcus aureus* 358 and *Escherichia coli* 27. an experimental study of quantitative character having as material for analysis of leaves of *Chenopodium* L. *ambrosioides* where from the ethanolic extract of the material was analyzed by MIC (minimum moderate inhibition) by means of microdilution test and analysis of aminoglycoside modulation (amikacin and gentamicin). In the MIC evaluation, results ≥ 1024 were obtained with the bacterial strains. The ethanolic extract showed clinically relevant results capable of demonstrating that there was synergism when used or extracted with the *Staphylococcus aureus* 358 strain in combination with gentamicin and amikacin. Therefore, future studies need to be conducted in order to elucidate the major constituents of the plant to better understand its activity.

Keywords: *Chenopodium ambrosioides*, microdilution, modulation, medicinal plants, resistance.

1 INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos como bactérias, fungos, e vírus provocam infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se evidencia é o das bactérias que fazem parte da flora humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis devido sua baixa virulência, mas que podem causar infecção em indivíduos imunocomprometidos – denominadas assim de bactérias oportunistas (ANVISA, 2004)

Diante disso uma das bactérias oportunistas é *Escherichia coli* que pertence à família Enterobacteriaceae, sendo distribuída na natureza em grande escala, que tem como seu principal habitat o trato intestinal humano e animal. *E. coli* comensal, que está presente na microbiota intestinal, não é patogênica e apresenta uma importante função fisiológica para o funcionamento do organismo (MONTEIRO et al., 2016)

Staphylococcus aureus também é classificado como um patógeno humano oportunista e constantemente está relacionado a infecções adquiridas em ambientes hospitalares. As infecções mais habituais envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos. Algumas infecções por *S. aureus* são agudas e podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, também podem ocorrer (ANVISA, 2007)

Estas bactérias estão se tornando resistentes a diversos antibióticos, por esse motivo a resistência bacteriana é vista como um transtorno de saúde pública mundial, realidade para a qual têm sido propostas inúmeras iniciativas de controle. Assim, a contínua emergência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde consiste em um importante desafio mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos (OLIVEIRA & SILVA, 2008)

Em suma o emprego de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de patologias, é um dos mais antigos modelos de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) apresentou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como único meio de acesso aos cuidados básicos de saúde (JUNIOR, 2005)

O uso das plantas e ervas na medicina de forma empírica para os mais diversos fins é um costume comum visto em diversas regiões do país. Muitas de suas espécies vegetais são amplamente utilizadas na cicatrização de feridas, por serem a elas atribuídas propriedades terapêuticas, como é o caso *Chenopodium ambrosioides* L (SÉRVIO et al., 2011)

Chenopodium ambrosioides vem sendo utilizada na culinária tradicional no México e na Europa. Suas folhas são usadas, frequentemente, como condimento e na preparação de bebidas e bolos. Também tem seu uso na medicina tradicional e, nos inúmeros países onde se encontra, ela recebe diferentes nomes populares: mastruz, mastruço (Norte, Nordeste); mentruz, erva de Santa-Maria (Sudeste) (SÁ, 2015)

A espécie possui um hábito herbáceo, com até um metro de altura. Com disseminação ampla pelo mundo, é empregada em vários países como febrífugo, auxiliar da digestão, anti-reumático e antipirético, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais no mundo inteiro (TAVARES & COSTA, 2006)

O uso indiscriminado de fármacos por instituições de saúde e pela população acentuou a resistência bacteriana que é tida como um grande problema de saúde mundial. Nesta perspectiva, torna-se necessária a avaliação da atividade antibacteriana e modulatória do extrato etanólico da folha de *Chenopodium ambrosioides* L., que vem sendo muito utilizado na medicina popular como uma alternativa terapêutica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTOS DA PESQUISA E LOCAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental quantitativo, realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio - Unileão, localizado na cidade de Juazeiro do Norte – CE.

2.2 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. foram coletadas no mês de agosto de 2019, no município de Milagres-Ceará, Brasil.

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Para preparação do extrato, foram coletadas as folhas que permaneceram submersas no solvente etanólico por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo e banho-maria (model Q-214M2 – Quimis, Brazil), obtendo-se a massa de extrato bruto. (BRASILEIRO et al., 2006)

2.4 CEPAS MICROBIANAS

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas as linhagens padrão *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e multirresistente das bactérias e *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas a 35°C por 24 horas em *Brain Heart Infusion broth*– BHI (DifcoLaboratoriesLtda).

Tabela 1. Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos

Bactéria	Origem	Resistência a antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA 358)	Feridacirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Ca, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Escherichia coli</i> (EC 27)	Feridacirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob

Ast-Azitromicina; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefalexina; Cfc-cefaclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacino; Clo –Clorafenicol; Im-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametoxazol, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosine; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E MODULAÇÃO

Para os testes foram utilizadas soluções preparadas a partir do extrato, sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), em seguida foi diluído com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003) utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentara uma concentração de 10^5 UFC/mL em placas de microdiluição com 96 poços, com diluições em série $\frac{1}{2}$. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução do extrato. As concentrações finais do extrato foram variadas entre 512 – 8 µg/mL.

As CIM foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento. Para evidenciá-las, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança da coloração azul para rosa é devido à redução da resazurina, que indica o crescimento bacteriano (JAVADPOUR et al., 1998), auxiliando a visualização da CIM. Esta é definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Para modulação o extrato foi misturado em caldo BHI 10% contendo os microrganismos em concentrações subinibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução de extrato foi reduzida 8 (oito) vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídos na proporção de 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100µL do meio de cultura conteve suspensões bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados durante a modulação (COUTINHO et al., 2008). As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso da resazurina como citado anteriormente no teste de determinação da CIM. Os ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como a média geométrica.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi aplicada à análise de variância de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni* utilizando o *Software GraphPadPrism 5.0*, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da atividade antibacteriana realizada pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides L.* frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi obtido resultado $\geq 1024\mu\text{g/mL}$.

O extrato não apresentou o efeito antibacteriano esperado, que pode ter se dado em função de diversos fatores, entre eles as características ambientais e genéticas do espécime. (MILLEZI et al., 2014)

Staphylococcus aureus os resultados obtidos na CIM pode ter se dado devido a sua capacidade de após a invasão celular opsonizar o complemento, neutralizar a fagocitose e inibir respostas humoral e celular. (SANTOS et al, 2007).

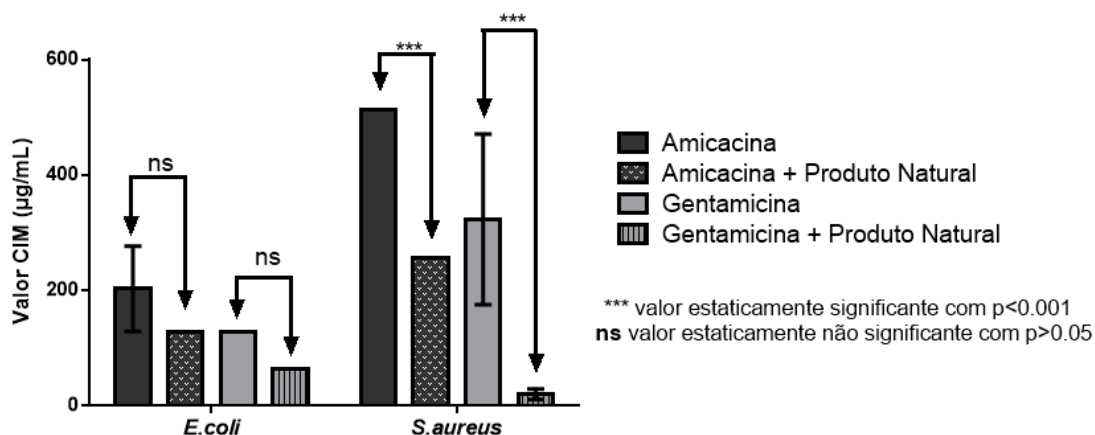
O extrato pode não ter tido o efeito esperado devido á presença de bombas de efluxo tanto em células Gram-positivas quanto em Gram-negativas. Essas bombas de efluxo estão presentes na membrana plasmática de *E. coli* e pode ser um dos seus fatores de virulência. (COUTINHO et al. 2008)

Em teste semelhante feito por COSTA & RIBEIRO (2013) para detecção da CIM de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) obtiveram que as concentrações necessárias para obtenção da atividade antibacteriana variaram entre 50 a 25 mg/mL.

De acordo com PEREIRA et al. (2015) em estudo semelhante realizado com extrato do *Chenopodium ambrosioides L.* evidenciou também a mesma concentração inibitória mínima obtida neste trabalho tanto para bactérias *Escherichia coli*, quanto para *Staphylococcus aureus*, obteve-se resultados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$.

A ausência da atividade antibacteriana do extrato testado pode esta relacionada com a forma de obtenção dele. Apesar do seu uso na medicina popular, as folhas de *Chenopodium ambrosioides* passaram por um processo de extração por etanol, e não por água como geralmente acontece na medicina popular. Além disso, a eficácia dos extratos pode ser afetada, pelo local de crescimento da planta, hora em que a planta foi coletada, luminosidade, altitude, temperatura ambiente. Neste caso, pode-se obter resultados diferentes, caso a planta seja coletada em situações e lugares diferentes. (SILVA et al, 2018)

Figura1. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença de EECA (Extrato etanólico de *Chenopodium ambrosioides* L.) e bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



O extrato mostrou resultados relevantes na modulação com aminoglicosídeos. Pode-se evidenciar que houve sinergismo entre o extrato etanólico da folha frente a cepa de *Staphylococcus aureus* 358 em associação com a gentamicina e amicacina.

Os mecanismos pelos quais podem inibir o crescimento bacteriano com uso de insumos naturais são inúmeros, e isso pode se da em parte à natureza hidrofóbica de alguns componentes. Esses componentes podem atuar mutuamente com a dupla camada lipídica da membrana celular e acometer a cadeia respiratória e a produção de energia, ou ainda modificar a célula tornando-a mais permeável aos antibióticos. (TINTINO et al, 2015)

De acordo com estudo realizado por BRITO, CARVALHO, & ALBUQUERQUE (2007) utilizando método semelhante de modulação, constatou-se que houve crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, nas adjacências dos discos impregnados com

mastruz, o que mostrou que o extrato não apresentou efeito sobre estas bactérias. No entanto difere da presente pesquisa.

Em resultados obtidos por PEREIRA et al. (2015) a atuação do extrato com a amicacina teve sinergismo com a linhagem *E. coli*. Quando se combinou o extrato com a gentamicina, observou-se sinergismo frente à linhagem *S. aureus* e antagonismo frente a linhagem de *E. coli*, onde no presente estudo o sinergismo frente a *S. aureus* também foi observado.

Em pesquisa realizada por SOUZA et al. (2015) com *Chenopodium ambrosioides L.* para a análise da sensibilidade dos microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, foi comprovada a atividade antimicrobiana do extrato desta planta somente para *E. coli*. Enquanto no presente estudo o resultado demonstrou ação antibacteriana modulatória do mastruz contra a *E. coli* e *S. aureus*.

Através de outra metodologia WEI et al. (2013) realizou testes in vitro que evidenciaram a ação bactericida do *C. ambrosioides L.* contra o *Helicobacter pylori* que é uma bactéria com resistência a vários antibióticos. Este resultado pode ter sido obtido devido, a presença do ascaridol componente do mastruz, que pode ter efeito sobre as mitocôndrias e inibir a cadeia de transporte de elétrons. (MONZOTE et al., 2009)

4 CONCLUSÃO

A presente pesquisa mostrou que o extrato etanólico da folha de *Chenopodium ambrosioides L.* não apresentou atividade relevante na CIM frente às cepas das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Porém, a modulação feita com extrato da mesma, acompanhado de aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), apresentou resultados de relevância clínica, apontando que o extrato quando junto à amicacina e gentamicina apresentava resultados relevantes ligados a *S. aureus* destacando-os por apresentar resultados estatisticamente significantes.

Novas e aprofundadas pesquisas devem ser desenvolvidas em busca da ampliação e comprovação do conhecimento da espécie estudada. Os resultados obtidos são promissores e poderão estimular no desenvolvimento de outras novas pesquisas.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Editora Ministerio da Saúde. 2004.

ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Resistência microbiana - mecanismos e impacto clínico. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm>. Acesso em: 24 agosto 2019.

BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screen in some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev.Bras.Ciê.Farm.** v. 42, n. 1, 2006

BRITO, M. V. H.; CARVALHO, D. S. ; ALBUQUERQUE, A. M. M. Efeito do extrato de mastruz em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* . **Revista Paraense de Medicina**. 2007.

COSTA, N. C.; RIBEIRO, E. E. C. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos hidroalcoólico de *cymbopogon citratus*, *chenopodium ambrosioides*, *allium sativum*, *allium cepa* e casca de *saccharum officinarum* e *punica granatum* sobre bacterias e fungos de interesse clínico. In: **Anais do Conic-Semesp**. Campinas, 2013.

COUTINHO, H. D. M. et al. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary Alternative Medicine**, V.9, n.13. 2009

JAVADPOUR, M. M. et al. Antimicrobial peptide swithl womam malian cell toxicity. **J.of medicinal chemistry**, v. 39, n. 1, 1998.

JUNIOR, P. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Revista Quim. Nova**, v.28, n.3, 2005

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16 , n.1 ,2014.

MONTEIRO L. C. R. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 7, n.2, 2016.

NARA, L. F. et al. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos**, V.9 , n.2 , 2015.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, V. 10, n. 1, 2008.

PEREIRA, N. L. F. et al. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos**, V. 9, n.2, 2015.

SÁ, S. R. SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.:estado da arte. **Revista de Ciências Farmaceuticas basica e aplicada** . v. 36, n. 2, 2015.

SANTOS, A.. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**, V. 43, n. 6, 2007.

SÉRVIO, E. M. et al. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides*(mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe**. v. 10, n. 3, 2011.

SILVA, D. R. Atividade antimicrobiana do extrato de *Chenopodium ambrosioides* e *Ruta graveolens* sobre *Streptococcus mutans*. **Archives of health investigation**, v.7, n.4, 2018.

SOUZA, A. P. O. et al. Atividade antimicrobiana dos sumos de alecrim, aroeira, guiné e mastruz sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Scientia plena**, v. 11, n.7, 2015.

TAVARES, E. S.; COSTA, M. V. L. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (*Chenopodiaceae*) erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, 2006

TINTINO, S. R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta biológica colombiana**, v.20 , n.1 ,2015.