

AValiação da Ação Antibacteriana do Extrato Metanólico das Folhas de *Dysphania ambrosioides* in Vitro

EDVANNIA DOS SANTOS SILVA; LARA RODRIGUES MESSIAS; SILVIO FERNANDO GUIDETTI MARQUES

RESUMO

A existência de microrganismos resistentes, aliado a indisponibilidade de novos fármacos antibacterianos, aumenta a necessidade de pesquisa por novos princípios ativos. A *Dysphania ambrosioides* conhecida popularmente como Matruz ou Erva - Santa – Maria, da família *Amaranthaceae*, originária da América Central e do Sul, possui ampla distribuição no território brasileiro. Têm-se atribuído a essa planta, inúmeras atividades terapêuticas, entre elas a atividade anti-inflamatória e antibacteriana, devido a produção de metabolitos secundários, principalmente os terpenos, flavonóides e alcalóides. O presente trabalho objetivou testar o potencial antibacteriano direto do extrato foliar de *D. ambrosioides* frente a cepa bacteriana padronizada, *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023), através do método de disco-difusão. A amostra de extrato foliar total, foi obtida através da extração simples com metanol, sendo o rendimento total do extrato de 56,81% (em base de massa). As concentrações utilizadas no experimento foram 0,000665, 0,001330, 0,002661 e 0,003326 g/mL, com o qual não foram observados resultados da ação antibacteriana contra *S. aureus* em nenhuma das concentrações testadas. A análise estatística dos dados empregando variância one-way (ANOVA) e teste de Tukey para comparações múltiplas, também não apresentaram alterações significativa entre as distribuições. Os resultados negativos de atividade antibacteriana do extrato foliar podem ser explicados devido a ocorrência de condições edafoclimáticas que impactam diretamente na produção de metabólitos secundários pela espécie vegetal, com o qual, sua presença em baixas concentrações, não demonstram adequadamente os efeitos estudados. Estudos posteriores utilizando outras partes vegetais podem melhor esclarecer os efeitos antibacterianos de *D. ambrosioides*.

Palavras-chave: *Dysphania ambrosioides*; atividade antibacteriana; resistência bacteriana; *Staphylococcus aureus*; extrato metanólico.

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas a milhares de anos para o tratamento de transtornos de saúde e prevenção de doenças, estas propriedades terapêuticas são geralmente atribuídas a compostos ativos produzidos durante o metabolismo secundário vegetal (Silva; Fernandes, 2010). Segundo Kossel (1891) e Ojala (2001), os estudos acerca dos metabólitos secundários de plantas se desenvolveram aceleradamente nos últimos anos, com o qual estes compostos são conhecidos por desempenharem um importante papel na interação das plantas frente a diferentes condições edafoclimáticas, estresse oxidativo, ataque de pragas e radiação ultravioleta.

Estes metabólitos secundários também representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas, conhecidas também como fitotoxinas ou aleloquímicos (Ferreira; Aquila, 2000). A *Dysphania ambrosioides*, conhecida popularmente como mastruz ou Erva-Santa-Maria, é uma planta da família *Amaranthaceae*, natural da América Central e do

Sul, conhecida por suas diversas propriedades medicinais, e que possui ampla distribuição em território brasileiro. Devido à fácil acessibilidade por parte da população, a *D. ambrosioides* é muito utilizada comumente para tratar complicações respiratórias, doenças parasitárias, fungos e além de possuir capacidade de acelerar o reparo tecidual ósseo, também possui atividade antibacteriana. Todas essas propriedades são provenientes de composto produzidas através do metabolismo secundário vegetal. (Jácome *et al.*; 2020).

A análise fitoquímica das espécies do gênero *Dysphania* revelou uma ampla variedade de compostos orgânicos, incluindo terpenos, esteroides, saponinas triterpênicas, flavonoides e alcaloides (Kokanova-Nedialkova; Nedialkov; Nikolov, 2009). Algumas dessas espécies possuem aplicações tradicionais conhecidas, mas outras têm sido objeto de estudos mais aprofundados em relação a suas atividades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória (Yadav *et al.*, 2007) e antihelmíntica (Duke, 1985; Weiss, 2001; Yadav *et al.*, 2007).

Um estudo conduzido na Universidade de Dschang, na África Central, avaliou o óleo essencial das partes aéreas de *D. ambrosioides*, obtido por hidrodestilação, e sua composição química foi analisada por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa com Espectro de Massa (GC/MS). Foram identificados 14 componentes, que representam 98,8% do total de óleo, sendo os principais o α -terpineno (51,3%), p-cimeno (23,4%) e p-menta-1,8-dieno (15,3%) (Chekem *et.al.*, 2010).

Esses resultados fornecem informações valiosas para a compreensão e utilização das espécies do gênero *Dysphania* em diversas áreas, destacando sua riqueza em compostos orgânicos e potencial para atividades biológicas importantes, entre elas, a atividade antibacteriana (Yadav *et al.*, 2007; Chekem *et.al.*, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana é uma crescente ameaça a saúde pública, o grau de desenvolvimento de resistência bacteriana tanto em Gram-positivos e Gram-negativos é um constante desafio terapêutico observado em todo o mundo, devido principalmente, ao uso incorreto dos antimicrobianos, aliado ao fato de que a produção de novos antibióticos não acompanha o ritmo acelerado do surgimento de novas resistências.

Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos, o aumento da resistência bacteriana tem levado a um aumento na necessidade da produção de novos fármacos e novas classes de antibióticos, pois as estruturas básicas dos mesmos foram introduzidas em meados de 1930 e final de 1960, sendo as novas gerações, resultantes de modificações de estruturas químicas destes antimicrobianos (Ling, 2015).

Diante desse pressuposto, fontes naturais bioativas vêm ganhando a atenção da indústria farmacêutica para produção de novos derivados com propriedades antibacterianas, integrando a química orgânica sintética a química medicinal, para tratar tanto as infecções adquiridas na comunidade quanto em unidades hospitalares (Ling, 2015). Sendo assim, este estudo tem o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do extrato foliar da espécie vegetal *Dysphania ambrosioides*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Preparo do Material Vegetal

As folhas de *Dysphania ambrosioides* foram coletadas no Município de Sabino, São Paulo, Brasil, em abril de 2023. Para o experimento, foi preparado o extrato metanólico das folhas, com o qual usou-se a balança analítica para pesagem inicial e Estufa (modelo Q3173-22 QUIMIS) à 60°C por 72 horas até alcançarem peso constante.

As partes secas foram trituradas até obter-se o pó e submergidas em reagente Metanol com uma proporção de 1:10 durante 48 horas (Doughari & Manzara, 2008). O extrato obtido foi filtrado com papel de filtro Whatman nº 1 e concentrado em Banho Maria (modelo CE –

160/22 CienlaB) a temperatura de 60 °C até volume reduzido durante 6 horas.

- Utilizou-se a seguinte fórmula para obtenção do rendimento total do extrato:

$$\text{Re} = \frac{\text{P.E.S}}{\text{P.T.V}} \times 100.$$

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); P.E.S = Peso do extrato seco (g); P.T.V = Peso do triturado vegetal (g).

Microrganismos Utilizados e Padronização Da Densidade Do Inóculo

Para o experimento foram utilizadas as cepas padrões ATCC – American Type Culture Collection, *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023). Para obtenção do inóculo bacteriano, foram seguidas as padronizações preconizadas pela CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, com o qual foi preparada uma suspensão de células em solução salina 0,85 %, equivalente a um padrão de 0,5 da escala de MacFarland (108 UFC/mL).

Os testes foram realizados de acordo com o método de disco-difusão em Agar Mueller-Hinton incubadas em estufa bacteriológica a 35°C ± 2°C por 20 horas.

Para garantir a ausência de contaminantes ou a ineficiência do meio para o crescimento bacteriano, foi realizada a validação e esterilidade dos meios de cultura utilizados. Não sendo observada a presença de contaminação do meio de crescimento e do extrato vegetal, não havendo crescimento microbiológico misto em meio de cultura. No que diz respeito ao controle da bactéria, foi observado crescimento das cepas e coloração de GRAM, evidenciando um resultado positivo que comprova a viabilidade dos testes realizados.

Determinação da Atividade Antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana do extrato foliar de *D. ambrosioides* as alíquotas dos extratos foram usadas na sua forma pura (solução mãe) e diluições em água destilada esterilizada para obtenção de algumas concentrações para serem utilizadas para os testes para modo de comparação.

Os discos de papel filtro foram impregnados com as concentrações diluídas a partir da solução mãe, com as concentrações de 0,000665, g/mL, 0,001330 g/mL, 0,002661 g/mL, 0,003326 g/mL do extrato foliar e logo em seguida depositados nas placas de cultura.

Como se trata de um experimento *in vitro* controlado, este estudo contou com controle negativo e positivo, sendo o controle negativo, o solvente Metanol utilizado na extração e como controle positivo o antibiótico Amoxicilina+Clavulanato, com o qual apresentara inibição do crescimento direto da cepa bacteriana e formação de halo de inibição. Os testes foram realizados em triplicata.

Formas de Análise dos Resultados

Todos os dados obtidos foram submetidos a cálculos estatísticos empregando a análise de variância one-way (ANOVA), seguido do teste de Tukey e/ou Dunnett para comparações múltiplas, com a utilização do software GraphPadPrism® 5 (versão 5.02).

Os resultados da comparação entre os controles e a exposição às diferentes concentrações do extrato foliar total de *Dysphania ambrosioides* foram considerados significativos com intervalo de confiança de 95% (p<0,05).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

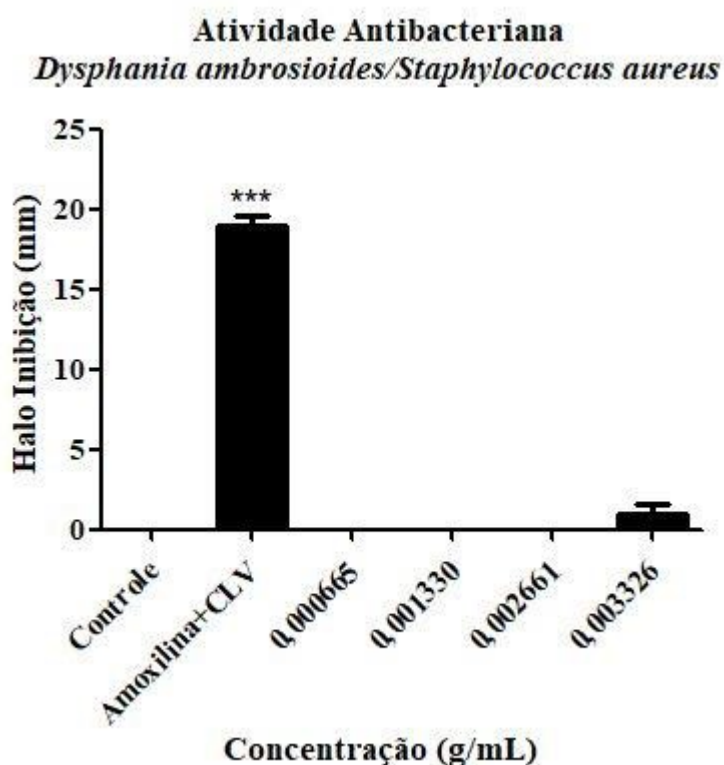
- Avaliação da Atividade Antibacteriana

O método de disco-difusão foi empregado para avaliar a atividade antibacteriana do extrato metanólico foliar total de *Dysphania ambrosioides* através da formação de halo de inibição.

O Controle Positivo utilizado foi o antibiótico Amoxicilina associado com Clavulanato (Ác. Clavulâmico), e de acordo com o esperado, apresentou formação de halo de inibição do crescimento bacteriano.

O rendimento total do extrato foliar foi de 56,81%, onde quatro concentrações do composto estudado foram selecionadas e testadas, sendo, 0,000665, g/mL, 0,001330 g/mL, 0,002661 g/mL, 0,003326 g/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata para obtenção dos resultados, os quais demonstraram que nenhuma das concentrações testadas do extrato foliar de *D. ambrosioides* apresentaram formação de halo de inibição e ação direta frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (Figura 1).

Figura 1 – Atividade antibacteriana direta de *D. ambrosioides* frente a cepa ATCC 0023 *Staphylococcus aureus*. Controle (Controle Negativo); Amoxilina+CLV (Controle Positivo).



*** Valor estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Os resultados mostram que o extrato foliar de *D. ambrosioides* contra cepa *S. aureus* (ATCC 0023) não apresentou nenhuma atividade antibacteriana quando comparada com Amoxicilina+Clavulanato (antibiótico beta-lactâmico com ótimo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas) com halo de inibição médio de 19mm.

Resultado semelhante também foi observado em um estudo, com o qual realizou avaliação microbiológicas do óleo essencial das folhas de *D. ambrosioides* contra cepas bacterianas convencionais, Gram-positiva de *S. aureus* ATCC 6538P, como também outras bactérias e fungos foram incluídas nesta pesquisa, com o qual frente a cepa de *S. aureus*, nenhuma atividade antibacteriana foi observada (Baumgart, 2014).

Em outro estudo, foi testado a atividade antibacteriana contra *S. aureus*, também utilizando extrato metanólico das folhas, através da determinação da Concentração Inibitória

Mínima (CIM) com o qual, não houve ação antibacteriana, com resultados de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, compreendendo um valor clinicamente irrelevante. Porém neste mesmo estudo obtiveram resultados de modulação/sinergismo quando o extrato foi associado aos aminoglicosídeos contra cepa de *Staphylococcus aureus* (Pereira *et al.*, 2015).

Resultado positivos quanto a atividade antibacteriana de *D. ambrosioides* foi observada em óleos essenciais de partes como caule, folhas e flores, contra bactérias gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e cepa de bacteriana patogênica gram-negativa (*Escherichia coli*), com o qual, frente a *S.aureus*, todas amostras de óleo essencial foram responsivas, com zona de inibição entre 15 a 20 mm, com exceção ao óleo essencial das folhas que apresentaram ação moderadamente sensível, com formação de zona de inibição de 10mm (Kandsi *et al.*, 2022).

Os resultados negativos de atividade antibacteriana do extrato foliar podem ser explicados devido a ocorrência de condições edafoclimáticas que impactam diretamente na produção de metabólitos secundários pela espécie vegetal, com o qual, sua presença em baixas concentrações, não demonstram adequadamente os efeitos estudados (Shomali *et al.*, 2022).

Além disso, as bactérias Gram-positivas possuem uma parede bacteriana de peptidoglicana que permite a passagem de moléculas hidrofóbicas para o ambiente interno. Já as bactérias Gram-negativas são compostas principalmente por lipopolissacarídeos, o que permite a passagem de pequenas moléculas hidrofílicas devido à abundância de proteínas porinas. Essas informações são relevantes para entender a estrutura e funcionamento desses microrganismos e como os extratos podem atuar mediante as suas características químicas (Man *et al.*, 2019).

As soluções hidrofílicas – característica do extrato metanólico foliar utilizado neste estudo, parecem possuir menor potencial antibacteriano frente a bactérias Gram-positivas, quando comparada com óleos essenciais, devido as características deste último estarem associadas diretamente aos mecanismos de ação antibacteriana, como a hidrofobicidade, que resulta em aumento da permeabilidade celular e subsequente vazamento de conteúdo celular, podendo também ser reconhecida como inibição do crescimento celular ou morte celular (Angane *et al.*, 2022).

4 CONCLUSÃO

Foi demonstrado que o extrato foliar de *Dysphania ambrosioides* não apresentou atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* nas concentrações testadas, pois as condições edafoclimáticas podem impactar na produção e maior concentração de compostos com atividade antibacteriana. Além disso, as características da parede das bactérias Gram-positivas composta por peptidoglicana, permitem a passagem de moléculas hidrofóbicas para o ambiente interno, sendo o extrato metanólico foliar utilizado nesse estudo, de característica hidrofílica, com o qual, possui maior dificuldade em atravessar a parede bacteriana e consequentemente apresenta menor potencial antibacteriano.

É necessário a realização de mais estudos sobre a espécie vegetal em questão para ampliação do conhecimento sobre os mecanismos de ação antibacteriano, bem como o isolamento de constituintes ativos para contribuir com novas formas de tratamento farmacológico.

REFERÊNCIAS

ANGANE M., SWIFT S., HUANG K., BUTTS C.A., QUEK S.Y. Óleos essenciais e seus principais componentes: Uma revisão atualizada sobre as atividades antimicrobianas, mecanismo de ação e seu potencial aplicação na indústria de alimentos. **Alimentos**. 2022; 11:464. DOI: 10.3390/foods11030464.

BAUMGART, A.M.K. Avaliação do Potencial Antimicrobiano das Espécies Vegetais, Cipura, Paludosa e *Chenopodium ambrosioides*, 2014. Disponível online: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Ana%20Milda%20Karsten%20Baumgart.pdf>.

CHEKEM, M. S. G.; LUNGA, P. K.; TAMOKOU, J. D.; KUIATE, J. R.; TANE, P.; VILAREM, G.; CERNY, M. Antifungal Properties of *Chenopodium ambrosioides* Essential Oil Against Candida Species. **Pharmaceuticals**. v. 3, n. 9. p. 2900-2909, 2010.

DOUGHARI, J.; MANZARA, S. In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p.067-072, 2008. DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC, 1985.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente na ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

JÁCOME, E. V.M., BESSA, M. S. DE, MELO, M. C. N. DE, PESSOA, D. M. DAV., SANTOS, M. M. DOS, MOURA, J. M. B. DE O., & ALMEIDA, G. C. M. de. (2020).

Atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e *Crescentia cujete* (coité) em *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, 12(10), e4787. <https://doi.org/10.25248/reas.e4787.2020>.

KANDSI F, ELBOUZIDI A, LAFDIL FZ, MESKALI N, AZGHAR A, ADDI M, HANO C, MALEB A, GSEYRA N. Atividade antibacteriana e antioxidante de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin e Clemants Óleos Essenciais: Abordagens Experimentais e Computacionais. **Antibióticos (Basileia)**. 2022 Abr 5;11(4):482. DOI: 10.3390/antibioticos11040482. PMID: 35453233; PMCID: PMC9031865.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z.; NEDIALKOV, P.T.; NIKOLOV, S. D. The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. **Phcog Rev**, v. 3, n.6, p. 280-306, 2009.

LING, L.L; SCHNEIDER, T; PEOLPES, A.J et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature** 2015; 517 (7535):455-459. doi: 10.1038/nature14098.

MADIGAN et al., Microbiologia de Brock. São Paulo: Prentice-Hall, 10ª ed., 2004. Capítulo 4. OJALA, T.; et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299-305, 2000.

OJALA, T. *Biological Screening of Plant Coumarins*. 2001. 62f. Academic Dissertation, University of Helsinki. PEREIRA, Nara Luana Ferreira et al. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 101- 112, set. 2015. DOI: 10.5935/2446-4775.20150009.

SILVA, N.C.C; FERNANDES, J.A. Biological properties of medicinal plants: a review of the antimicrobial activity. **Journal of Medicinal Plant**, v.6, n.6, p. 441-448, 2012.

SHOMALI A, DAS S, ARIF N, SARRAF M, ZAHRA N, YADAV V, ALINIAEIFARD S, CHAUHAN DK, HASANUZZAMAN M. Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. *Plants (Basel)*. 2022 Nov 18;11(22):3158.

doi: 10.3390/plants11223158. PMID: 36432887; PMCID: PMC9699315. WEISS, R. F. **Weiss's herbal medicine**. Classic ed. Stuttgart: Thieme, 2001.

YADAV, N., VASUDEVA, N., SINGH, S., SHARMA, S. K. Medicinal properties of genus *Chenopodium* Linn. **Natural Product Radiance**, v. 6, n. 2, p. 131-134, 2007.