



**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE *ASPARAGUS
PLUMOSUS BAKER* E *ASPARAGUS AFRICANUS***



AUTOR: Abel António João

Maputo, Julho de 2015



**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS RAÍZES DE *ASPARAGUS
PLUMOSUS BAKER* E *ASPARAGUS AFRICANUS***



AUTOR: Abel António João

Supervisor: Prof. Doutor François Munyemana

Co-Supervisora: dra Alice Manjate

Maputo, Julho de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles que fizeram parte da construção, realização e conclusão deste trabalho.

A Deus, por me ter iluminado durante o trabalho.

- À minha filha Leiza pela oportunidade que me concedeu de ser pai.
- Aos meus pais António João e Glória Santiago.
- Aos meus irmãos Irene, Liberato, Delmar, Aurélio,
Antónia, Sabir e Joana pelo incondicional apoio moral e material.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço em primeiro lugar a DEUS pelas diversas graças alcançadas principalmente pelo dom da vida e por me mostrar o caminho da perseverança.
- Ao meu Supervisor Prof. Doutor François Munyemana, pela orientação, confiança, apoio e pela constante colaboração.
- À minha Co-Supervisora dra. Alice Manjate do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, paciência, dedicação e abnegação demonstrada durante a realização deste trabalho.
- A todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM pelo apoio e incentivo.
- Aos técnicos dos Laboratórios de Química da Faculdade de Ciências em especial dr. Maússe, dra. Amélia, Sra. Madalena e Sr. Carmona pelo apoio prestado.
- Aos meus colegas Ussivane Jr, Conjo, Nhacutone, Salvado, Ângelo, Ivo, Honwana, Leonardo, Emerson, Bregueje e Adércio pelo apoio e por terem partilhado muitos momentos desta caminhada.
- Aos meus amigos Ezito, Xavier, Loureiro, Paula, J.Paulo, Delfim, Achiro e Júlio pela força e incentivo.
- À minha namorada Maria de Fátima pelo companheirismo, cumplicidade e vontade de ajudar.
- A todos que directa ou indirectamente contribuíram para a materialização deste sonho.

Do fundo do coração, muito obrigado!

DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA

O presente trabalho de licenciatura foi elaborado pelo autor com base nos recursos a que ao longo do texto se faz referência.

O autor

(Abel António João)

RESUMO

As plantas do género *Asparagus* são usadas em África e em particular em Moçambique na medicina tradicional no tratamento de várias doenças de origem microbiana. As raízes de *A.africanus* são usadas no tratamento de malária, bronquite, cancro da mama, reumatismo, gota crónica, leishmaniose e bilharziose. As raízes de *A.plumosus Baker* são usadas para o tratamento da tuberculose, pneumonia, reumatismo, disenteria e malária. Estas raízes apresentam também uma actividade diurética, laxativa, emoliente e afrodisíaca. O presente trabalho consistiu em realizar um estudo fitoquímico e avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *A.plumosus Baker* e *A.africanus*.

Os extractos das raízes das duas plantas em estudo foram obtidos pelo método de maceração sequencial sob agitação contínua usando diferentes solventes, nomeadamente: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo e n-butanol. Os extractos metanólico e hidrometanólico foram obtidos por maceração directa. A actividade antimicrobiana dos extractos foi avaliada usando o método de difusão em disco e os seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foram testados.

Os testes fitoquímicos realizados nos extractos das plantas em estudo mostraram a presença de saponinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e taninos. A maioria dos extractos mostrou actividade antifúngica contra *C.albicans* e maior actividade antibacteriana foi observada no extracto metanólico de *A.africanus*. *S.aureus* revelou ser a estirpe mais resistente aos extractos das duas plantas em estudo. Nenhuma actividade antimicrobiana foi observada no extracto éter de petróleo. Os extractos das raízes de *A.africanus* revelaram maior actividade antimicrobiana em relação aos de *A.plumosus Baker*.

Os resultados obtidos nos testes fitoquímicos e antimicrobianos permitem comprovar o uso destas plantas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças causadas por microrganismos patogénicos.

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA.....	iii
RESUMO.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJECTIVOS DO TRABALHO	3
2.1. Objectivo geral	3
2.2. Objectivos específicos.....	3
III. METODOLOGIA.....	4
IV. REVISÃO DA LITERATURA	5
4.1. Descrição das plantas em estudo	5
4.1.1. <i>Asparagus plumosus Baker</i>	5
4.1.1.1 Classificação taxonómica	5
4.1.1.2. Descrição botânica.....	5
4.1.1.3. Ocorrência	6
4.1.1.4. Usos medicinais	6
4.1.2. <i>Asparagus africanus</i>	7
4.1.2.1. Classificação taxonómica	7
4.1.2.2. Descrição botânica.....	7
4.1.2.3. Ocorrência	7
4.1.2.4. Usos medicinais.....	8

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

4.2. Compostos isolados das plantas do género <i>Asparagus</i> com actividade antimicrobiana.....	8
4.3. Actividade antimicrobiana	10
4.4. Mecanismo de acção dos antimicrobianos	11
4.5. Resistência aos agentes antimicrobianos.....	12
4.6. Mecanismos bioquímicos da resistência microbiana	13
4.7. Descrição dos microrganismos usados.....	14
4.7.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
4.7.2. <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella tyhphi</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
4.7.3. <i>Candida albicans</i>	17
4.8. Principais metabólitos secundários com actividade antimicrobiana	18
4.8.1.Saponinas.....	18
4.8.2.Taninos	20
4.8.3. Flavonóides.....	21
4.8.4. Alcalóides	23
4.8.5.Terpenóides e óleos essenciais	25
4.8.6.Quinonas.....	26
V. PARTE EXPERIMENTAL	28
5.1.Colheita e identificação botânica das plantas.....	28
5. 2. Solventes e reagentes usados na extracção e testes fitoquímicos.....	28
5.3. Preparação dos extractos brutos	29
5. 3.1. Maceração sequencial por ordem crescente de polaridade.....	29
5.3.2. Maceração directa.....	31
5. 4. Testes fitoquímicos	31
5.4.1. Ensaios de reconhecimento dos flavonóides	31

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

5.4.2. Teste de taninos	31
5.4.3. Testes de Borntrager para reconhecimento de antraquinonas	32
5.4.4. Teste de reconhecimento de triterpenóides e esteróides - Reacção de Liebermann Buchard.....	32
5.4.5. Teste de saponinas	32
5.4.6. Teste dos alcalóides livres	33
5.5. Testes antimicrobianos	33
5.5.1. Reagentes, equipamentos e materiais usados	33
5.5.2. Microrganismos testados	34
5.5.3. Preparação dos meios de cultura	34
5.5.4. Dissolução em água	35
5.5.5. Distribuição do meio	35
5.5.6. Conservação das placas	35
5.5.7. Teste de esterilidade dos extractos	35
5.5.8. Preparação de soluções com diferentes concentrações a partir dos extractos de plantas	35
5.5.9. Preparação de discos contendo extractos.....	36
5.5.10. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	36
VI. RESULTADOS	38
6.1. Extração dos fitoconstituintes.....	38
6.1.1. Maceração sequencial por ordem crescente de polaridade.....	38
6.1.2. Maceração directa.....	38
6.2. Testes fitoquímicos	38
6.3. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	40
6.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

VII. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	44
VIII. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES	48
8.1. CONCLUSÃO	48
8.2. RECOMENDAÇÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
Anexos	A

ÍNDICE DE TABELAS

Tabel 1: Solventes e Reagentes.....	29
Tabela 2: Resultados da maceração sequencial	38
Tabela 3: Resultados da maceração directa	38
Tabela 4: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto metanólico das raízes de <i>A.africanus</i> e <i>A.plumosus Baker</i>	38
Tabela 5: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, n-butanólico e hidrometanólico das raízes de <i>A.africanus</i>	39
Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, n-butanólico e hidrometanólico das raízes de <i>A.plumosus Baker</i>	39
Tabela7: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de <i>A.africanus</i> na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).	40
Tabela 8: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de <i>A.plumosus Baker</i> na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).	41
Tabela 9: Resultado dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de <i>A.africanus</i> para <i>E.coli</i> 1 (halo de inibição em mm).	42
Tabela 10: Resultados dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de <i>A.plumosus baker</i> para <i>E.coli</i> 1 (halo de inibição em mm).	42
Tabela 11: Resultados dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de <i>A.africanus</i> para <i>K.pneumoniae</i> (halo de inibição em mm).....	43
Tabela 12: Resultados dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de <i>A.africanus</i> para <i>C.albicans</i> (halo de inibição em mm).....	43
Tabela 13: Resultados dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de <i>A.plumosus Baker</i> para <i>C.albicans</i> (halo de inibição em mm).	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Compostos isolados de <i>A. cochinchinensis</i> e <i>A.africanus</i>	9
Figura 2: Compostos isolados <i>A.racemosus</i> e <i>A.dumosus</i>	9
Figura 3: Saponina isolada de <i>A.dumosus Baker</i>	10
Figura 4: Saponina isolada de <i>Asparagus racemosus</i>	19
Figura 5: Taninos com actividade antimicrobiana isolados da planta <i>Stryphnodendron obovatum Benth.</i>	21
Figura 6: Estrutura básica dos flavonóides e numeração recomendada pela IUPAC	22
Figura 7: Estruturas de alguns flavonóides com actividade antimicrobiana.....	23
Figura 8: Estrutura de alcalóides isolados da planta <i>Bocconia arbórea</i>	25
Figura 9: Estrutura de sequiterpeno isolado da planta <i>Vernonathura tweedieana</i>	26
Figura 10: Estrutura de quinonas isoladas da planta <i>Rheum emodi</i>	27
Figura11: Esquema geral das etapas seguidas no trabalho	28
Figura 12: Esquema das etapas da maceração sequencial	30
Figura 13: Gráfico ilustrativo da actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de <i>A.africanus</i> na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm)	41
Figura 14: Gráfico ilustrativo da actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de <i>A.plumosus Baker</i> na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

<i>A. africanus</i>	<i>Asparagus africanus</i>
ADN	Ácido desoxiribonucléico
<i>A.dumosus Baker</i>	<i>Asparagus dumosus Baker</i>
AMH	Ágar Mueller Hinton
<i>A. plumosus Baker</i>	<i>Asparagus plumosus Baker</i>
<i>A. racemosus</i>	<i>Asparagus racemosus</i>
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CDC	Centro de controlo e prevenção de doenças infecciosas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cipro	Ciprofloxacina
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.DCM	Extracto diclorometano
E.EP	Extracto Éter de petróleo
E.EtOAc	Extracto Acetato de etilo
E.HMeOH	Extracto Hidrometanólico
E.MeOH	Extracto metanólico
E.n-BuOH	Extracto n-butanólico
HCM	Hospital Central de Maputo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
TC	Tanino condensado
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

UEM Universidade Eduardo Mondlane
VIH Virus da Imunodeficiência Humana

I. INTRODUÇÃO

Durante séculos, as plantas medicinais foram utilizadas em todo o mundo como fonte exclusiva de medicamentos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de nem sempre terem os seus constituintes químicos conhecidos (Maciel *et al.*, 2002)

Apesar dos grandes avanços da medicina científica moderna, a medicina tradicional ainda é a principal forma de tratamento de doenças para a maioria das pessoas nos países em desenvolvimento; mesmo entre aqueles a quem a medicina ocidental está disponível, o número de pessoas que utilizam a medicina alternativa está a aumentar rapidamente em todo o mundo. O aumento do conhecimento sobre os processos metabólicos e dos efeitos das plantas sobre a fisiologia humana ampliou o campo de aplicação de plantas medicinais, mesmo porque muitos dos princípios activos em plantas medicinais ainda não podem ser preparados sinteticamente (Dey, 2012).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), reportam que 80% das pessoas nos países em desenvolvimento ainda dependem de plantas medicinais locais para satisfazerem as suas necessidades primárias de saúde (WHO, 2002). Como a maioria dos países africanos, Moçambique é um repositório importante de diversidade biológica. Esta diversidade é usada por cerca de 90% da população do país, maioritariamente das zonas rurais para satisfazer as suas necessidades habitacionais, energéticas, alimentares e de saúde (Ribeiro *et al.*, 2010). Em Moçambique, cerca de 15% do total dos recursos florestais (estimado em cerca de 5. 500 espécies de plantas) são usados pelas comunidades rurais para fins medicinais e desempenham um papel fundamental nos cuidados de saúde básicos. Para além do valor medicinal, as plantas medicinais constituem uma fonte de rendimento para os colectores e vendedores (Krog *et al.*, 2006)

As plantas contêm misturas de diferentes metabólitos secundários que podem actuar individualmente, de forma aditiva, ou em sinergia para melhorar a saúde. As plantas medicinais, ao contrário de drogas farmacológicas, geralmente têm vários produtos químicos trabalhando juntos cataliticamente e sinergicamente para produzir um efeito combinado que supera o total da actividade dos constituintes individuais. As acções combinadas dessas substâncias tendem a

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de Asparagus plumosus baker e Asparagus africanus

umentar a actividade do principal constituinte medicinal, acelerando a assimilação destas substâncias no organismo (WHO, 2008; Shohawon & Mahomoodally, 2013).

Os metabólitos secundários presentes nas plantas são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas no combate de microrganismos. Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides, alcalóides, lecitinas e compostos fenólicos (flavonóides, taninos e cumarinas) (Gonçalves *et al.*, 2005).

A emergente propagação da resistência aos antimicrobianos é um problema global que afecta tanto os países industrializados como os em vias de desenvolvimento (Adam, 2002).

É neste contexto que nos últimos anos os pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas são frequentemente associados à nova diversidade química. Antibióticos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogénicas (Guimarães *et al.*, 2010).

Estudos realizados na Etiópia e Nigéria em *Asparagus africanus* demonstraram propriedades antifétil, analgésica, anti-inflamatória, antimalária, etc. (Hassan *et al.*, 2008), enquanto *Asparagus plumosus Baker* mostrou ser um bom diurético e laxativo.

Oketch-Rabah *et al.* (1997), isolaram das raízes de *Asparagus africanus* uma sapogenina denominada *Muzanzagenina* que revelou possuir uma actividade antiprotozoária (antileishmaniótica e antimalária) moderada contra *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum*. No extracto metanólico das raízes da mesma planta foram isoladas duas saponinas esteroidais (espirostanósidos e oligofuranósidos).

É neste contexto que no presente trabalho, se fez a avaliação da actividade antimicrobiana dos extractos de raízes de *Asparagus plumosus Baker e Asparagus africanus* (L.) da família Liliaceae, popularmente conhecidas como *Asparagus ornamental* e *Asparagus fern* respectivamente.

II. OBJECTIVOS DO TRABALHO

2.1. Objectivo geral

- Avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *Asparagus plumosus Baker* e *Asparagus africanus*.

2.2. Objectivos específicos

- Realizar testes fitoquímicos para a identificação de metabólitos secundários presentes nos extractos das raízes de *Asparagus plumosus Baker* e *Asparagus africanus*
- Determinar a actividade antibacteriana dos diferentes extractos contra as seguintes estirpes bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*
- Determinar a actividade antifúngica dos extractos das raízes das plantas em estudo contra *Candida albicans*.
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas dos diferentes extractos das raízes das plantas em estudo.
- Estabelecer uma correlação entre a actividade antimicrobiana dos extractos e a sua composição fitoquímica.

III. METODOLOGIA

O presente trabalho obedeceu à seguinte sequência:

1. Pesquisa bibliográfica: consistiu na recolha de informação usando literatura que aborda vários assuntos sobre *Asparagus africanus* e *Asparagus plumosus Baker* com especial realce para botânica, fitoquímica, farmacologia e microbiologia;
2. Colheita e preparação da amostra;
3. Parte experimental: consistiu na extracção de princípios activos, testes fitoquímicos e testes antimicrobianos;
4. Discussão e interpretação dos resultados: a análise dos resultados consistiu na comparação dos resultados obtidos na parte experimental com os da literatura consultada. As conclusões e recomendações foram feitas de acordo com os resultados obtidos. Por fim elaborou-se o relatório final.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Descrição das plantas em estudo

4.1.1. *Asparagus plumosus Baker*

4.1.1.1 Classificação taxonómica



Nome científico: *Asparagus plumosus Baker*

Nome comum: Asparagus ornamental

Sinónimo: *Asparagus setaceus*

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Asparagales

Família: Liliaceae

Género: *Asparagus*

Espécie: *Asparagus plumosus Baker*

4.1.1.2. Descrição botânica

Asparagus plumosus Baker, pertence à família Liliaceae que corresponde a cerca de 4000 espécies agrupadas em mais de 280 géneros e é formada maioritariamente por ervas providas de bolbos, rizomas e tubérculos.

Asparagus plumosus Baker é uma planta rastejante com 5m de altura, tem raízes fibrosas com 4-7cm de comprimento, 0,5cm de largura, tem folhas escamosas e leves, tem flores simples e de cor branca esverdeada, articulada na base e justa por cima, as pétalas têm 3-4 mm de comprimento e as sementes têm cerca de 1 a 3.5 mm de diâmetro (Faife, 2003 & Anónimo, 2014).

4. 1.1.3. Ocorrência

Asparagus plumosus Baker é uma planta nativa da África Austral e Oriental (África do Sul, Quênia, Etiópia, Nigéria, Zâmbia e Moçambique), mas é muito cultivada em outros lugares como planta ornamental. Ocorre no sul dos Estados Unidos da América (EUA) (Califórnia e Flórida), Porto Rico e algumas Ilhas do Pacífico (Havaí e Tonga). Na Austrália é encontrada principalmente no sul e leste do litoral (Demissew, 1997 & Anónimo, 2014).

A propagação das sementes é feita por vento, pássaros, insectos e outros animais.

4.1.1.4. Usos medicinais

É usada na medicina tradicional no tratamento da tuberculose, pneumonia, reumatismo, malária, disenteria e para estancar vômito (Faife, 2003). *Asparagus plumosus Baker* apresenta uma actividade diurética, laxativa, emoliente, afrodisíaca, anti-séptica; as raízes também são usadas para combater a disenteria (Ahmad *et al.*, 1998).

A parte mais utilizada é a raíz, o método de utilização consiste em cortar a raíz em pedaços, ferver em água e tomar. Para adultos, a dose recomendada pelos praticantes de medicina tradicional é de ¼ do copo com capacidade de 250mL, 3 vezes ao dia; crianças 1 colher de chá 3 vezes ao dia.

Utiliza-se na ornamentação, comumente em arranjos florais e para elaboração de produtos cosméticos.

4.1.2. *Asparagus africanus*

4.1.2.1. Classificação taxonómica



Nome científico: *Asparagus africanus*

Nome comum: Asparagus fern

Sinónimo: Protasparagus Africanus

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Asparagales

Família: Liliaceae

Género: *Asparagus*

Espécie: *Asparagus africanus*

4.1.2.2. Descrição botânica

Asparagus africanus é um arbusto espinhoso rastejante, perene, pertencente à família Liliaceae. Atinge o crescimento de 6m em altitude entre 700 e 3800m acima do nível do mar (Demissew, 1997). Possui 1-3m de altura, hastes com ramos estendidos, estreitamente definidos, as flores são esbranquiçadas e geralmente produzidas em pequenos grupos, cada um contendo várias flores, os garfos florais com anteras amarelas cada uma com seus frutos arredondados (5-6 mm de diâmetro) mudam de verde para laranja, e tornam-se um pouco enrugados, à medida que amadurecem. As folhas são carregadas de espinhos com 2-10 mm de comprimento (Navie, 2004 & Anónimo, 2006).

4.1.2.3. Ocorrência

Asparagus africanus ocorre em uma variedade de habitats, mas é principalmente uma erva daninha que varia de floresta sub-tropical a tropical, margens de florestas tropicais, florestas litorâneas, dunas traseiras, florestas abertas. Também invade o ambiente urbano, parques e jardins. É moderadamente tolerante ao estresse hídrico.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Asparagus africanus encontra-se distribuído por toda a África, partes da Europa, da Ásia e Austrália.

Esta planta reproduz-se principalmente por sementes. Os seus frutos são facilmente consumidos e espalhados por pássaros e outros animais. As sementes também podem ser espalhadas em resíduos de jardim (Baerts & Lehmann 2002; Anónimo, 2006).

4.1.2.4. Usos medicinais

É usada na medicina tradicional no tratamento da malária, bronquite, cancro da mama (Dikasso *et al.*, 2012).

Uma variedade de plantas medicinais incluindo *Asparagus africanus* foi amplamente utilizada pelos médicos tradicionais na Etiópia para tratamento de impotência e feridas (Teklehaymanot & Giday, 2007; Teferi & Heinz, 2002). Uma infusão de raízes de *Asparagus africanus* é utilizada para curar doenças venéreas. Além disso, a infusão da raíz misturada com água pode ser usada por mulheres no processo de parto (Tchoumboungang *et al.*, 2005). Na medicina tradicional nigeriana, a planta é usada para o tratamento de dor de cabeça, dor lombar, dor de estomago e como auxiliar no parto (Msonthi & Magombo, 1983), as raízes são fervidas, misturadas com leite e a mistura dada a mulheres imediatamente após o parto para liberar a placenta. A planta também é usada no Senegal e Tanzânia contra hematúria (Desta, 1993), leishmaniose, bilharziose, sífilis e gonorréia (Oketch-Rabah *et al.*, 1997). O extracto de raíz é aplicado externamente para o alívio da dor, reumatismo e gota crónica. Os ramos triturados, misturados com manteiga, são utilizados como uma pomada para o tratamento de hemorróide. As sementes são usadas na prevenção de doenças oculares. A planta é igualmente utilizada como um diurético, para dor de garganta, tosse, esquistossomose e otite.

Em alguns países da África oriental, as folhas são usadas em pomadas por mulheres para estimular o crescimento de cabelo. No Sudão, partes do caule lenhoso são usadas para fabricar lápis. Na Tanzânia a planta é usada na ornamentação (Navie, 2004 & Anónimo, 2006).

4.2. Compostos isolados das plantas do género *Asparagus* com actividade antimicrobiana

Estudos fitoquímicos realizados no género *asparagus* demonstraram a presença de compostos com actividade antimicrobiana, dos quais se destacam lignanas e saponinas. O nyasol (I) foi

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

isolado das raízes de *Asparagus africanus* e também da planta *Asparagus cochinchinensis*, planta usada na medicina tradicional em Hong Kong para o tratamento de tuberculose pulmonar, bronquite e cancro da mama. Destas duas plantas também foram isolados outros compostos com actividade antimicrobiana, é o caso de muzanzagenina (II): 2 β ,12 α -dihidroxi- (25R) -spirosta-4,7dien-3-ona; racemosol (III):9,10-dihidro-1,5-dimetoxi-8-metil-2,7-fenantrenodiol e ecdisona (IV): 20-hidroxiecdisona. O composto II apresenta uma alta actividade antileishmanial (Oketch-Rabah *et al.*, 1997; Sekine *et al.*, 1997).

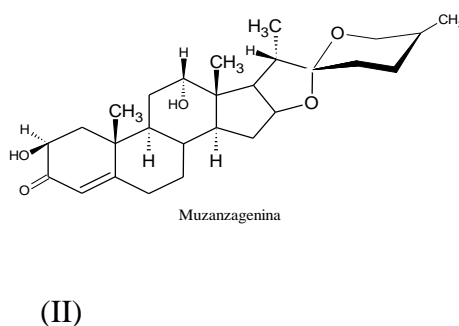
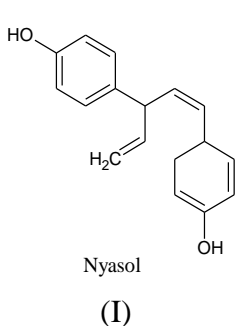


Figura 1: Compostos isolados de *A. cochinchinensis* e *A.africanus*

O composto (III) foi isolado das raízes de *A.racemosus*. Este composto tem uma actividade anti-tóxica. O composto (IV), isolado de *A. dumosus*, mostra uma actividade antifúngica e antibacteriana

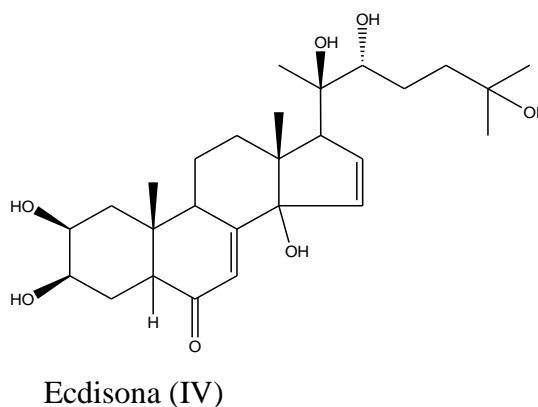
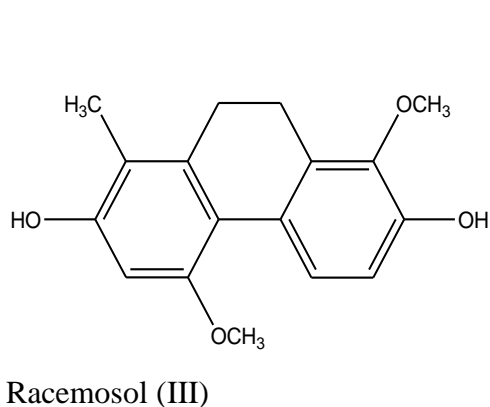


Figura 2: Compostos isolados *A.racemosus* e *A.dumosus*

Da planta *A.dumosus Baker* foi isolada a dumosida (V), uma saponina esteroidal (Ahmad *et al.*, 1998).

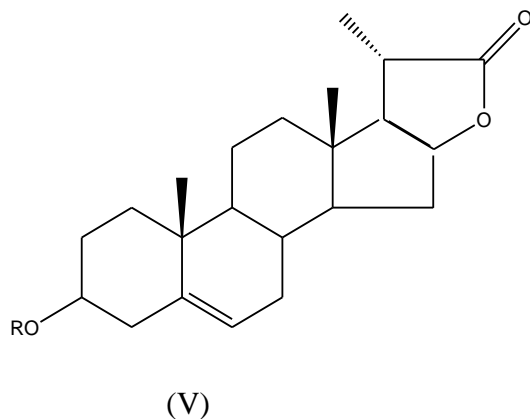


Figura 3: Saponina isolada de *A.dumosus baker*

4.3. Actividade antimicrobiana

Os microrganismos são as formas de vida mais abundantes do planeta e muitos são potencialmente patogénicos para os seres vivos. Tanto vegetais como animais têm evoluído, combatendo o ataque constante de microrganismos, desenvolvendo sistemas de defesa que variam de acordo com o organismo. Nos vegetais superiores, tem sido observada a presença de compostos com amplo espectro de acção, e com potencial aplicação como agentes terapêuticos e como conservantes de alimentos (Montano & Vargas, 2002).

Os antimicrobianos são substâncias que têm a capacidade de inibir o crescimento e/ou destruir microorganismos. Podem ser produzidos por bactérias ou por fungos ou podem ser total ou parcialmente sintéticos (Melo *et al.*, 2012).

Os antimicrobianos são importantes componentes do sistema imunitário de muitas espécies e compreendem três grandes classes a saber:

- Antibacterianos;
- Antiprotozoários;
- Antifúngicos.

4.4. Mecanismo de acção dos antimicrobianos

Os antibióticos podem agir sobre bactérias patogénicas susceptíveis, a partir da interrupção de seu crescimento e reprodução - **Efeito bacteriostático**. Os agentes bacteriostáticos são frequentemente inibidores de síntese protéica e actuam por ligação aos ribossomas.

Quando o crescimento é inibido mas não ocorre morte celular trata-se do **Efeito bactericida**.

O terceiro efeito dos antimicrobianos descrito é o **Efeito bacteriolítico**: há indução da morte celular por lise, levando à diminuição da turbidez da cultura e do número de células viáveis (célula capaz de se multiplicar e dar origem a duas células filhas). Exemplos de agentes bacteriolíticos são os antibióticos que inibem a síntese da parede celular em bactérias, como é o caso da penicilina (Atlas, 1997; Harris & Thorarensen, 2004). Estes efeitos ocorrem através da interferência sobre as vias metabólicas desses agentes infecciosos que podem alterar desde a permeabilidade (membrana externa) até à síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) dessas bactérias (Pages, 2004).

A acção dos antibióticos sobre os microrganismos ocorre através de:

1. Acção antibiótica sobre a parede celular

Os processos de síntese e a lise da parede celular das bactérias em crescimento estão continuamente em equilíbrio. No caso de ocorrência da inibição da síntese de algum constituinte da parede celular, como, por exemplo, o polipeptideoglicano, poderá ocorrer um desequilíbrio e acção de autolisinas destruindo as bactérias (Mcdermott *et al.*, 2003; Harris & Thorarensen, 2004).

Antibióticos como a penicilina, cefalosporina, fosfomicina, vancomicina, ristocetina e bacitracina inibem a síntese da parede celular competindo ou inibindo as enzimas participantes desta síntese (Patel *et al.*, 2004; Bomono e Szabo, 2006).

2. Acção antibiótica sobre a membrana celular

Alguns antibióticos passam livremente para o interior da célula bacteriana, como por exemplo a espiramicina e o cloranfenicol, enquanto outros penetram através de um sistema activo de transporte, como ocorre com a fosfomicina e os aminoglicosídeos (Hashimoto, 1997; Nikaido, 2001) Existem antibacterianos (ex: polimixinas) que se ligam aos constituintes normais da membrana causando uma desorganização funcional, já que modificações na permeabilidade

podem comprometer o metabolismo da célula (Majiduddin *et al.*, 2002; Perez-Trallero & Iglesias, 2003). Tendo em vista que a membrana celular das bactérias é semelhante à membrana das células de mamíferos, os antibióticos que agem sobre a membrana podem ser tóxicos para as células humanas (Nikaido, 2001).

3. Acção antibiótica sobre a Síntese de proteínas

As acções dos antibióticos sobre síntese de proteínas consistem em:

- Inibir a formação das ligações peptídicas durante o alongamento da cadeia polipeptídica.
Ex: Cloranfenicol
- Interagir com a subunidade 50S do ribossomo 70S. Ex: Eritromicina
- Interferir na fixação do tRNA no ribossoma, impedindo assim, a adição de aminoácidos.
Ex: Tetraciclinas.
- Interferência no início da síntese protéica, alterando a conformação da subunidade 30S, no ribossoma 70S procariótico, induzindo a leitura errónea do mRNA. Ex: Estreptomicina e Gentamicina.
- Ligação irreversível ao RNA-polimerase das bactérias bloqueando a iniciação da cadeia de RNA. Ex: Rifocinas (Bomono & Szabo, 2006).

4. Acção antibiótica sobre a replicação do DNA cromossómico

O DNA cromossómico é formado por duas cadeias de nucleotídeos em espiral onde o superespiramento é controlado por acção da DNA-girase (topoisomerase II) e a replicação pela DNA-polimerase (Harris & Thorarensen, 2004). A maioria dos antibióticos que agem sobre a replicação do DNA não apresenta toxicidade selectiva, afectando as células humanas, como é o caso da mitomicina. Outros são empregues na terapêutica como griseofulvina, novobiocina e as quinolonas (Bomono & Szabo, 2006).

4.5. Resistência aos agentes antimicrobianos

A resistência pode ser considerada um fenómeno ecológico (natural) que ocorre como resposta do microrganismo frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. Os microrganismos multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação, podendo trocar material genético

entre linhagens da mesma espécie ou de espécies diferentes. São considerados seres de alta capacidade de adaptação a diversos factores, como a exposição a agentes químicos potentes.

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência microbiana é de grande importância para se entender como estes podem desenvolver a resistência. Apesar destes mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns factores básicos que incluem: inactivação do antibiótico directamente na molécula bioactiva por alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas; modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promove a redução da concentração do antibiótico sem a sua modificação química; transmissão do alvo – alguns microrganismos tornam-se insensíveis a alguns antibióticos porque são capazes de transmitir a inactivação de uma determinada enzima, ou seja, os antibióticos com mecanismos de acção que envolvem inibição enzimática tornam-se inactivos por não terem o alvo para actuar (Guimarães *et al.*, 2010).

4.6. Mecanismos bioquímicos da resistência microbiana

Os microrganismos podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (Jacoby, 2005). Esses mecanismos incluem:

- a) modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibiótico;
- c) substituição do sítio de ligação da droga;
- d) diminuição da permeabilidade ao antibiótico;
- e) aumento da síntese de substracto com o qual a droga compete;
- f) efluxo do antibiótico, por intermédio de transporte activo;
- g) síntese de proteínas protectoras dos ribossomos.

Esses mecanismos podem coexistir em uma mesma estirpe que ainda pode desenvolver resistência cruzada contra distintos antibióticos (Gold & Moellering, 1996). A resistência pode ser consequência da acção de outros factores, como o sítio de infecção onde se encontra a estirpe microbiana e a concentração do antibiótico.

O uso inadequado de antibióticos e a sobrevivência de bactérias em indivíduos imunodeprimidos aumentam a exposição dos microrganismos a esses antibióticos, possibilitando também o

surgimento de estirpes resistentes (Chumpolkulwong, 2004). Assim, dentre inúmeras bactérias, uma pode sofrer mutação gerando estirpes resistentes que podem ser seleccionadas pelos antibióticos.

Estas estirpes multiplicam - se, podendo passar os seus genes de resistência através de diferentes mecanismos genéticos de aquisição (Chumpolkulwong, 2004).

4.7. Descrição dos microrganismos usados

4.7.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, são cocos Gram-positivos, imóveis, não produtores de esporos, catalase positiva, que tendem a formar agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva e que podem eventualmente ser encontrados em diversos espécimes clínicos. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas dos mamíferos e aves. São facultativos quanto à respiração e pouco exigentes nutricionalmente. Crescem no Agar Manitol Salgado, e são activos metabolicamente, fermentando carboidratos e produzindo pigmentos que variam do branco ao amarelo forte (Duarte *et al.*, 2004).

S.aureus é causadora de doenças mediadas por toxinas (síndrome de pele escaldada, intoxicação alimentar, choque tóxico) e infecções supurativas (impetigo, foliculite, furúnculos, carbúnculo, bacteremia, endocardite, pneumonia, empiema, osteomielite, artrite séptica).

4.7.2. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tyhphi*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*

Características gerais

São membros da família *Enterobacteriaceae*, o maior e o mais heterogéneo conjunto de bacilos Gram-negativos, clinicamente importantes. Um total de 40 géneros e 150 espécies e subespécies foram descritos. As enterobacteriaceaes são organismos ubiqutários, encontrados no solo, na água e na vegetação, e são parte da microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo os humanos (Murray *et al.*, 2010).

a) ***Escherichia coli***

É um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases (Bettelheim, 2007)

O género *Escherichia* consiste em cinco espécies, das quais *E. Coli* é a mais comum e clinicamente mais importante.

Doenças causadas por *E. coli*

E.coli é causadora de bacteremia, gastroenterites, infecções do tracto urinário limitadas à bexiga (cistite), podendo-se disseminar para os rins (pielonefrite) ou próstata (prostatite), meningite neonatal e infecções intra-abdominais associadas à perfuração intestinal. *E. Coli* está também associada a diarreia aquosa, vômitos, cólicas, febre baixa (Murray *et al.*, 2010).

b) ***Klebsiella pneumoniae***

A *Klebsiella pneumoniae* é uma das principais representantes do género *Klebsiella*. Dentre as espécies de *Klebsiella* conhecidas, além da *Klebsiella pneumoniae*, pode-se citar as seguintes:

Klebsiella oxytoca; *Klebsiella ozaenae*; *Klebsiella ornithinolytica*; *Klebsiella planticola* e *Klebsiella terrigena*. São anaeróbios facultativos ou aeróbios, fermentam um grande número de carboidratos, possuem estrutura antigénica complexa e produzem uma variedade de toxinas e de outros factores de virulência. Sendo bactérias entéricas, estabelecem-se no trato intestinal normal alguns dias após o nascimento e, a partir daí, constituem uma parte importante da flora microbiana aeróbia (anaeróbia facultativa normal). A *Klebsiella pneumoniae* também é encontrada no trato respiratório, em aproximadamente 5% dos indivíduos normais (Farmer & Kelly, 1991; Murray *et al.*, 2010).

Doenças causadas por *Klebsiella pneumoniae*

É responsável por uma parte das pneumonias bacterianas, infecções oportunistas e nosocomiais, sendo uma das causadoras da pneumonia lombar; pode provocar extensa consolidação necrotizante hemorrágica dos pulmões e formação de cavidades; causa pneumonia em pacientes

debilitados ou imunodeprimidos, sendo os alcoólatras particularmente susceptíveis à infecção. É invasora secundária em pulmões de pacientes com bronquiectasia crónica, infectados por vírus *influenzae* ou pelo bacilo da tuberculose. Pode ser o microorganismo dominante em fibrose cística.

Algumas vezes, dá origem à infecção do trato urinário e bacteremia, com lesões focais em pacientes debilitados. Pode causar infecção das vias biliares, do ouvido médio, dos seios mastoideos e paranasais, peritonite, conjuntivite em lactentes jovens, meningite e quadro séptico (Hervas *et al.*, 1993 & Koutouby & Habibulla, 1995)

c) *Salmonella typhi*

Salmonella typhi é uma bactéria em forma de bastonete, anaeróbica facultativa e activa que é susceptível a vários antibióticos. A identificação laboratorial pode ser alcançada por crescimento em ágar MacConkey. Actualmente, 107 estirpes deste organismo foram isoladas, muitas contendo características metabólicas variáveis. As toxinas são produzidas principalmente no tracto gastrointestinal dos seres humanos e animais e não formam esporos.

Salmonella typhi é uma bactéria que se transmite por meio de alimentos ou água contaminados com matéria fecal ou urina de pessoas portadoras (transmissão fecal-oral). É resistente a baixas temperaturas o que permite a sua transmissão através de alimentos conservados a baixas temperaturas (David, 2003).

Doenças causadas por *Salmonella typhi*

A infecção por *S. typhi* leva ao desenvolvimento de febre tifóide ou entérica. Esta doença é caracterizada pelo aparecimento repentino de uma febre contínua e sistémica, dor de cabeça, náuseas e perda de apetite. A febre tifóide ou febre entérica é uma doença infecciosa grave e aguda que constitui um problema grave de saúde pública em quase todo o mundo, porém a sua incidência é maior em países com baixos níveis de higiene e saneamento do meio ambiental. Outros sintomas incluem constipação ou diarreia, aumento do baço, possível desenvolvimento de meningite e / ou mal-estar geral (Kidgell *et al.*, 2002 & Murray *et al.*, 2010).

d) *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium é uma bactéria em forma de haste. Quando cultivadas em agar habitual, o organismo forma colónias esféricas lisas cerca de duas a quatro milímetros de diâmetro. Quando cultivadas em agar entérico Hektoen, as colónias são azul-esverdeadas com centros pretos, indicando que a espécie não fermenta lactose (comum a muitas espécies de *Salmonella*). *S. typhimurium* pode ser encontrado em certos alimentos, no lúmen intestinal e também dentro da matéria fecal de um hospedeiro infectado. A intoxicação alimentar ocorre muitas vezes quando uma pessoa consome carne crua ou entra em contato com a matéria fecal de um indivíduo infectado. (Murray *et al.*, 2010).

Doenças causadas por *Salmonella typhimurium*

Os sintomas mais comuns incluem: diarreia, vômitos e febre que duram entre dois a cinco dias. *S. typhimurium* infecta o hospedeiro por penetração da mucosa intestinal e migra para o baço e fígado, onde causa doença sistémica (Rosenberger *et al.*, 2000).

e) *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria aeróbica, não-fermentadora, que se apresenta sob a forma de bastonetes isolados ou aos pares, movidos por flagelos polares (Kiska & Gilligan, 1999; Trabulsi *et al.*, 1999). Esta espécie comumente habita o solo, água e vegetais, e faz parte da microbiota normal do ser humano, podendo ser encontrada na pele, garganta e nas fezes de indivíduos saudáveis. Pode ser considerada oportunista, uma vez que causa doença em indivíduos imunocomprometidos (Silva, 1999; Murray *et al.*, 2010).

Doenças causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Infecções otológicas: Otite – uma infecção do canal auditivo externo, esta infecção causa uma dor intensa e lesão nervosa e é mais comum em indivíduos diabéticos.

Infecções oftalmológicas: A *P.aeruginosa* pode produzir úlceras no olho após penetrá-lo através de uma lesão oftálmica de uma lente de contato. Outras patologias associadas a *P.aeruginosa* são a artrite infecciosa, pneumonia grave, uretrite, cistite e pielonefrite (infecção urinária complicada) (USP, 2001).

4.7.3. *Candida albicans*

Características gerais

São leveduras de forma oval, têm entre 2 a 6 µm de diâmetro. Apresentam brotos, e hifas e pseudo-hifas. As espécies de *Candida* existem como comensais, aeróbios e são considerados microorganismos oportunistas presentes na microbiota normal da cavidade oral e dos tratos gastrointestinal e urogenital de seres humanos. Geralmente não ocasionam processos infecciosos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um período de tempo prolongado (Suzuki, 2009 & Matos *et al.*, 2009).

Doenças causadas por *C. albicans*

O principal sítio de colonização é o tracto gastrointestinal, desde a boca até recto. Esses microrganismos também podem ser encontrados como comensais na vagina e na uretra, na pele e nas unhas das mãos e dos pés.

As infecções por *Candida* incluem: infecção orofaríngea, esofagite, infecção vulvovaginal, infecções da pele e das unhas, candidíase muco-cutânea crónica, pneumonia, endocardite, pericardite, infecção do sistema nervoso central, infecção ocular, infecção dos ossos e articulações, infecção abdominal e infecções hematogénicas (Murray *et al.*, 2010).

4.8. Principais metabólitos secundários com actividade antimicrobiana

As plantas são conhecidas como produtoras de constituintes químicos que são de natureza tóxica para bactérias e fungos que são formados durante os processos de metabolismo da planta. Vários estudos demonstraram que uma ampla gama de plantas possui actividade antimicrobiana *in vitro*. O estímulo para a síntese de metabólitos com actividade antimicrobiana nas plantas pode produzir-se na presença de fracções de polissacáridos presentes na parede celular de patógenos. Vários tipos de metabólitos secundários de plantas foram relacionados com a actividade antimicrobiana: compostos fenólicos (quinonas, flavonóides e taninos), terpenóides e óleos essenciais, alcalóides e saponinas (López, 2010).

4.8.1.Saponinas

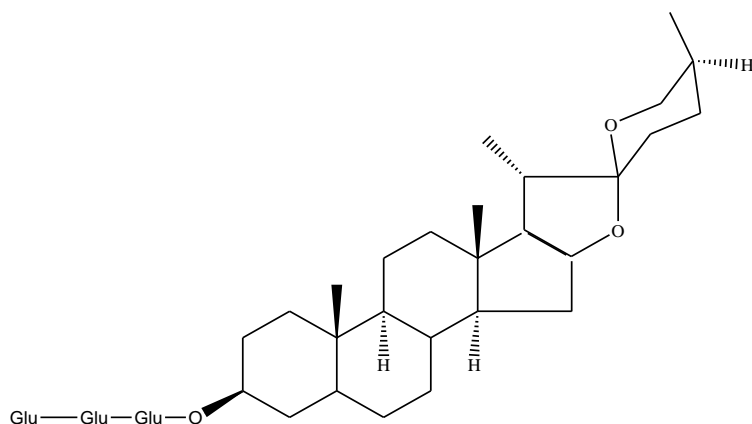
Quimicamente as saponinas são heterósidos de genina esteróides ou triterpénicas que têm como característica comum a propriedade de reduzirem a tensão superficial da água, o que explica a sua acção detergente, emulsionante, de formação de espuma persistente e a sua elevada toxicidade para os peixes (Cunha *et al.*, 2009). Este facto resulta da combinação dos agrupamentos polares com elementos estruturais não-polares das saponinas (Santos, 2009).

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Na sua estrutura, a saponina possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares). O comportamento anfifílico das saponinas é a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas e determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a sua acção sobre membranas celulares, formando poros, produzindo vazamento das células e alterando a sua permeabilidade; um amplo efeito citotóxico ou antimicrobiano é geralmente consequência desta interacção (Simões *et al.*, 2007).

Saponinas são frequentemente subdivididas em duas classes principais, triterpénicas e esteroidais, ambas derivadas do precursor óxido de esqualeno, com 30 átomos de carbono (C30). A diferença entre estas duas classes são que as saponinas esteroidais têm 3 grupos metilo a menos (C27), enquanto as saponinas triterpénicas se mantêm com 30 átomos de carbono. Subdivisões das principais classes são baseadas em modificações adicionais, como rearranjos, ciclizações, oxidações (formação de grupos hidroxilo, carbonilo e carboxilo), glicosilações, insaturações e degradações, além da presença de grupos como DDMP (2,3-diidro-2,5- dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona) e angeloíla como substitutos de hidroxilos (Ribeiro, 2012).

A partir das fracções de acetato de etilo, clorofórmio e metanol dos extractos de raízes da planta *Asparagus racemosus*, foi isolada uma saponina esteroidal denominada Shatavarin IV que revelou uma actividade anticancerígena e citóxica (Mitra *et al.*, 2012)



(VI) Shatavarin

Figura 4:Saponina isolada de *Asparagus racemosus*.

4.8.2. Taninos

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas. Apresentam alto peso molecular (500-3000 Daltons) e contem grupos hidroxilos fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas.

Classicamente, segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilos do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavanol: flavan-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas). Eles estão presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos. Os TC podem conter duas a cinquenta unidades flavanóides; possuem estruturação complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura (Monteiro *et al.*, 2005).

Diversos estudos sobre actividade dos taninos evidenciaram importante acção antibacteriana, acção sobre protozoários, na reparação de tecidos, regulação enzimática e proteica, entre outros. Estes efeitos dependem da dose e do tipo de tanino ingerido.

Actividades bactericidas e fungicidas ocorrem por três características gerais comuns aos dois grupos de taninos: complexação com iões metálicos; actividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacáridos (Mello & Santos, 2001).

A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogénio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, emprestando uma duradoura estabilidade a estas substâncias (Monteiro *et al.*, 2005).

Extractos ricos em taninos e até mesmo taninos purificados, já foram descritos na literatura como potentes inibidores de peçonhas de serpentes (Farrapo *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013). Essa acção de inibição pode ser devido à capacidade que os taninos têm de se ligarem a metais e de

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

precipitar proteínas. Assim, podem actuar como quelante dos iões de cálcio, ou até mesmo formar complexos com essas proteínas das peçonhas (Mendes *et al.*, 2013).

Sanches *et al.* (2005), avaliaram a actividade antioxidante e fungicida dos extractos do caule e da casca de *Stryphnodendron obovatum* Benth contra as seguintes leveduras: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Ainda nesta planta foram identificados dois taninos que demonstraram alguma actividade antimicrobiana (Sanches *et al.*, 2005).

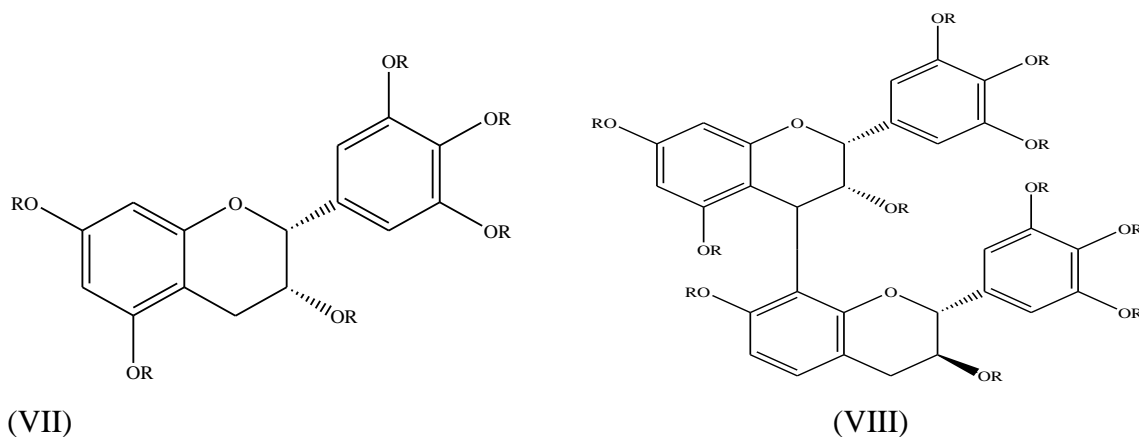


Figura 5: Taninos com actividade antimicrobiana isolados da planta *Stryphnodendron obovatum* Benth.

4.8.3. Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos gordos dentre outros. Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (Dornas *et al.*, 2007).

Quimicamente são caracterizados por serem compostos de baixo peso molecular com uma estrutura comum (ver a Figura 6), contendo quinze átomos de carbonos (C₆-C₃ C₆), isto é, apresentam dois núcleos benzénicos ligados a um núcleo heterocíclico. Normalmente designa-se o primeiro núcleo benzénico pela letra **A**, o segundo pela letra **B**, e o terceiro núcleo heterocíclico pela letra **C**.

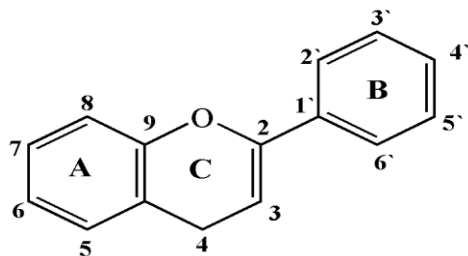


Figura 6: Estrutura básica dos flavonóides e numeração recomendada pela IUPAC. (Fonte: Heim *et al.*, 2002)

Cada vez mais, os flavonóides têm sido referidos como possuindo muitas propriedades úteis, incluindo a actividade anti-inflamatória, estrogénica, antimicrobiana, anti alérgica, antioxidante, vascular e citotóxico (Barros, 2012).

A actividade antifúngica dos flavonóides tem sido atribuída à capacidade generalizada destes de inibir a germinação de esporos patogénicos de plantas, facto que concorre para uso contra fungos patogénicos do homem. Um exemplo destes compostos é a Galangina (IX): 3,5,7-trihidroxi-2-fenilcrom-4-ona; é um flavonol vulgarmente encontrado em amostras de própolis, tem sido demonstrado que possui uma actividade inibidora contra *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*.

Os flavonóides são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a uma infecção microbiana; por esta razão estes compostos foram usados em ensaios *in vitro* como substâncias antimicrobianas, tendo mostrado eficácia contra uma ampla gama de microrganismos. As catequinas (X) têm sido extensivamente pesquisadas devido à sua actividade antibacteriana *in vitro* contra *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* e outras bactérias. Vários outros flavonóides como a apigenina, galangina, flavona e flavonóides glicosídeos, isoflavonas e calconas, têm sido demonstrados como tendo uma potente actividade antibacteriana (Arif *et al.*, 2011 & Flambó, 2013).

Assim, o mecanismo de acção antimicrobiana pode estar relacionado com sua capacidade de inactivar enzimas microbianas, proteínas da parede celular e rompimento das membranas microbianas.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Actualmente vários pesquisadores têm mostrado interesse na actividade inibidora de alguns flavonóides contra o vírus da imunodeficiência humana (VIH). Estudos *in vitro* demonstraram que baicalina (XI) inibe infecção e replicação por VIH e impedem a sua replicação. Também tem sido relatado que os flavonóides como crisina, acacetina e apigenina são usados na prevenção contra o VIH-1 através de activação dum mecanismo que provavelmente envolve a inibição da transcrição do RNA viral (Cushnie & Lamb, 2005).

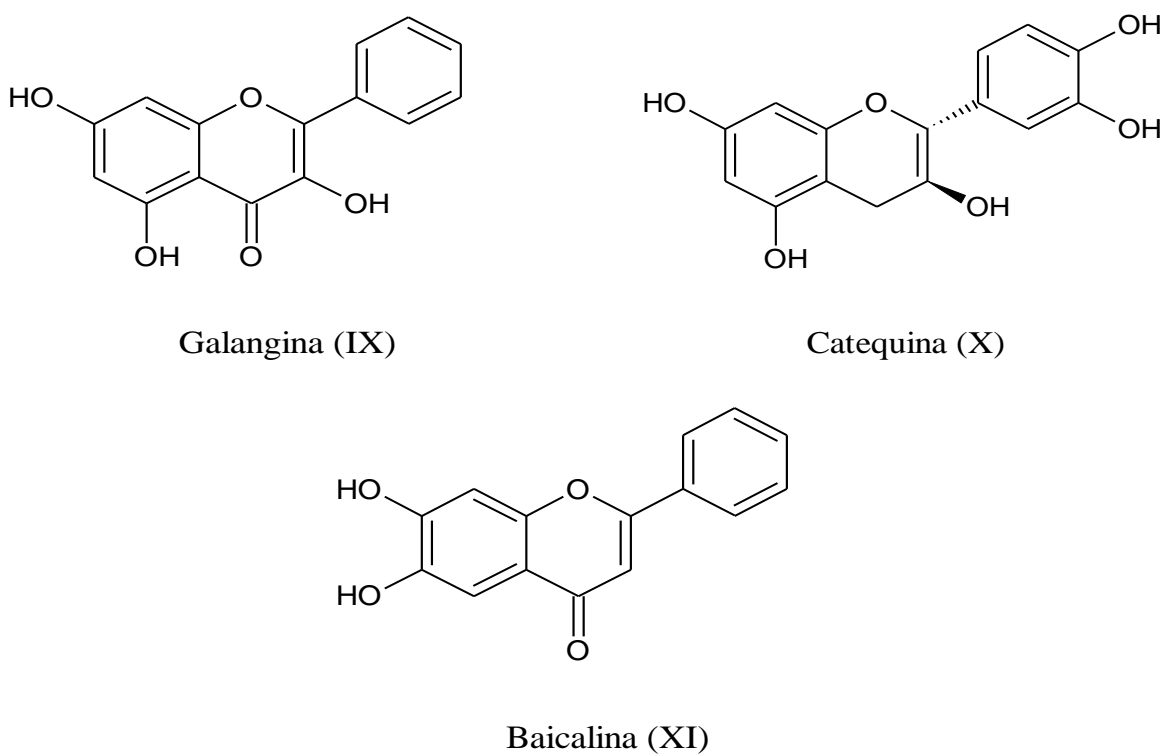


Figura 7: Estruturas de alguns flavonóides com actividade antimicrobiana

4.8.4. Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogénio no seu anel. Na sua grande maioria os alcalóides possuem caracter alcalino, já que a presença do átomo de nitrogénio apresenta um par de electrões não compartilhados. Contudo, existem alcalóides de caracter ácido, como por exemplo a colchicina. Os alcalóides são

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa forma, não aparecem em células jovens. São encontrados principalmente em plantas, mas também numa menor extensão em microrganismos e animais. Os átomos de nitrogénio de muitos alcalóides estão presentes nos anéis heterocíclicos e em poucos casos, o nitrogénio pode estar presente na forma de uma amina primária ou em forma de aminogruppo quaternário.

Diferentes sistemas de classificação podem ser adoptados para os alcalóides. Essencialmente são baseadas em:

1. Acção farmacológica (a actividade biológica);
2. Estrutura química (tipo de azoto, heterocíclico ou não heterocíclico e do tipo de anel);
3. Origem bioquímica (via biossintética da produção na planta);
4. Origem taxonómica (famílias de plantas ricas em alcaloides) (El-Sakka, 2010).

Os alcalóides apresentam inúmeras actividades farmacológicas, estas podem variar de tónicas, anti-cancerígenas, analgésicas, narcóticas, estimulantes, anti-asmáticas, expectorantes, anti hipertensivas, relaxantes musculares, citotóxicas, antimicrobianas entre outras (Souza, 2008).

Ensaio realizado na planta *Sida acuta*, revelaram altas propriedades farmacológicas dos extractos desta planta. A actividade antimicrobiana foi em particular revelada pela presença de quinolina (usada no tratamento da malária, sendo eficaz e utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório, urinário e diabetes em vários países do Centro Oeste do continente Africano) e criptolepina, constituído por dois alcalóides que foram isolados no extracto metanólico de *Sida acuta* e *Cryptolepis sanguinolenta* tendo sido demonstrada a sua actividade antimicrobiana inibindo *in vitro* o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Shigella dysenteriae* (Karou *et al.*, 2005; Kumar & Etukala, 2008)

Navarro & Delgado (1999), isolaram dois alcalóides, dihidrocheleritrina (XII) e dihidrosanguinarina (XIII) a partir das partes aéreas da planta *Bocconia arborea*. Os dois compostos demonstraram uma importante actividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas e contra a levedura *Candida albicans* (López, 2010; Navarro & Delgado, 1999).

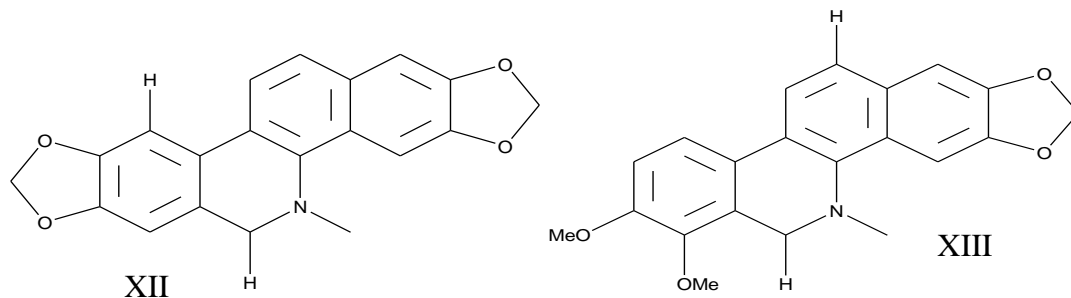


Figura 8: Estrutura de alcalóides isolados da planta *Bocconia arbórea*

4.8.5. Terpenóides e óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos naturais lipofílicos, voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário (Machado & Fernandes Jr, 2011)

Os óleos essenciais estão altamente enriquecidos por compostos com estrutura base do isopreno. Estes compostos são chamados monoterpenos, a estrutura química geral é $C_{10}H_{18}$ e eles também podem existir como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (C_{20} , C_{30} , C_{40} respectivamente), assim como hemiterpenos (C_5) e sesquiterpenos (C_{15}). Quando os compostos contêm elementos adicionais, geralmente o oxigénio, são chamados de terpenoides (Simões *et al.*, 2007 & Cowan, 1999).

Os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como a acção larvicida, atividade antioxidante, acção analgésica e anti-inflamatória, fungicida e actividade antitumoral (López, 2010).

O mecanismo de acção antimicrobiana dos terpenos não foi ainda completamente elucidado, porém supõe-se que envolve uma disrupção da membrana por meio dos compostos lipofílicos. De acordo com Mendoza *et al.* (2001), o aumento da hidrofílicidade do caureno diterpenoide, diminui drasticamente a atividade antimicrobiana.

O sesquiterpeno cinamoyloxy-1-hydroxieudesm-4-em 3-ona (XIV), proveniente das raízes da planta *Vernonathura tweedieana*, isolado e identificado por Portillo *et al.* (2005), demonstrou

uma actividade antifúngica contra uma espécie de dermatomicose *Trichophyton mentagrophytes* com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 4 µg/mL (López, 2010).

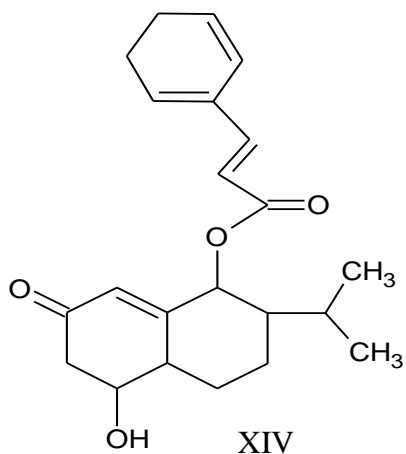


Figura 9: Estrutura de sesquiterpeno isolado da planta *Vernonathura tweedieana*

4.8.6. Quinonas

São dicetonas cíclicas insaturadas com grupos carbonílicos envolvidos no sistema das ligações duplas conjugadas. São ubíquas na natureza e são caracteristicamente de alta reactividade. As quinonas podem ser consideradas como produtos de oxidação de fenóis; da mesma forma, a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis. A sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado, com pelo menos duas ligações duplas C-C (Cowan, 1999; Simões *et al.*, 2007). Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas – um anel benzénico; naftoquinonas - um anel naftalénico; antraquinonas - um anel antracénico linear ou angular.

As quinonas formam complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos em proteínas, muitas vezes levando à inactivação da proteína e perda de função. Por esse motivo, o potencial de efeitos antimicrobianos de quinonas é grande (Silva *et al.*, 2003).

Brandelli *at al.* (2004), evidenciaram que a complexação de metais é um dos mecanismos envolvidos na actividade antimicrobiana de naftoquinonas. As naftoquinonas são responsáveis

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

pelas actividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral de extractos de *Kigelia pinnata*, uma planta pertencente à família Bignoniaceae. (Lopes, 2010)

Decosterd *at al.* (1994), demonstraram actividade inibitória da replicação do vírus VIH pela naftoquinona trimérica, isolada de *Conospermum incurvum* planta da família Proteaceae. Em outro estudo, Agarwal *at al.* (2010), comprovaram a actividade antifúngica das quinonas reina (XV), fisciona (XVI), aloe-emodina (XVII) e crisofanol (XVIII) isoladas de *Rheum emodi*, planta da família Polygonaceae.

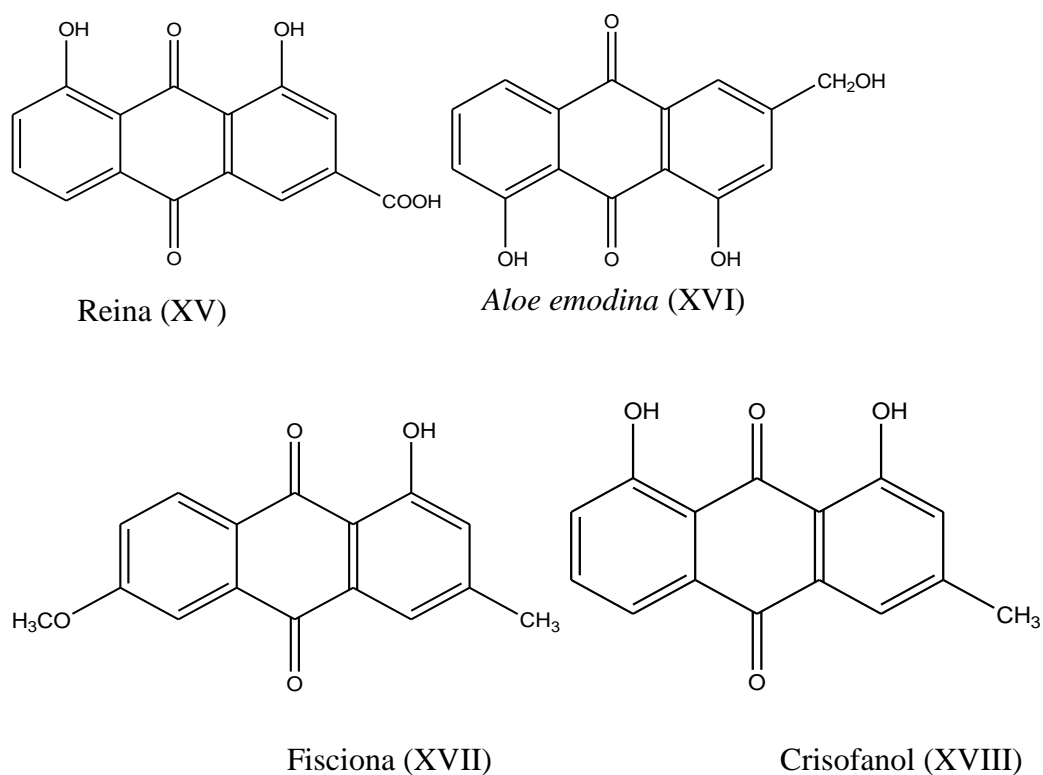


Figura10: Estrutura de quinonas isoladas da planta *Rheum emodi*

V. PARTE EXPERIMENTAL

Esta parte corresponde à execução prática do trabalho, onde são apresentados os procedimentos usados, desde a colheita da amostra até à realização dos ensaios laboratoriais de acordo com os objectivos definidos e com as condições técnicas e materiais disponíveis.

Na figura abaixo está esquematizada a sequência das actividades seguidas durante a realização do presente trabalho.

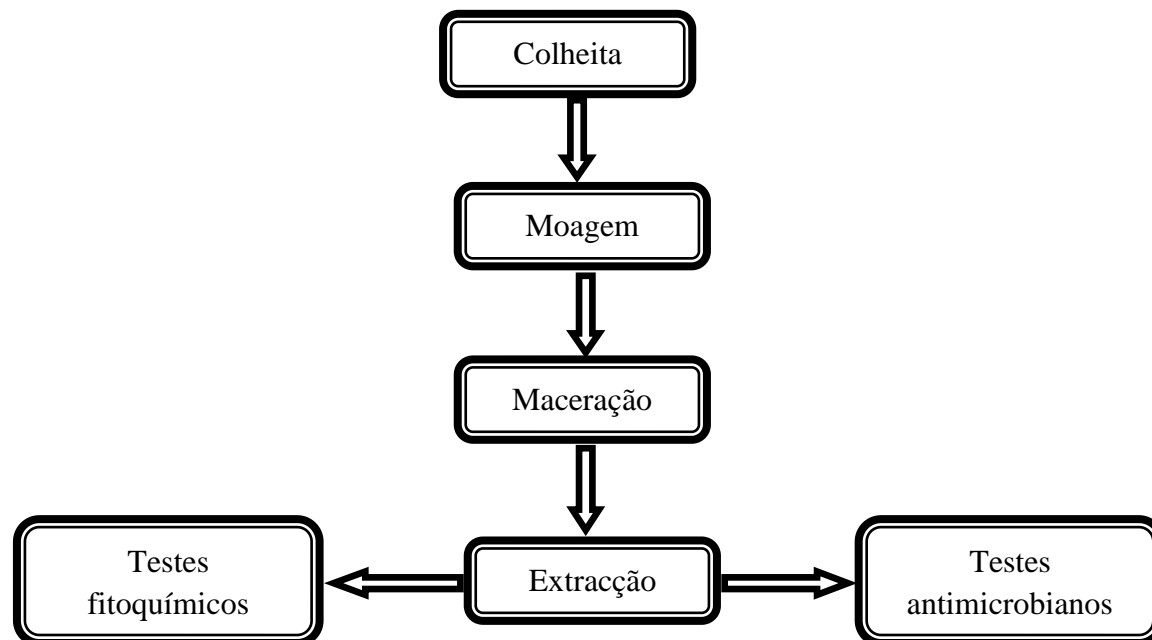


Figura11:Esquema geral das etapas seguidas no trabalho

5.1.Colheita e identificação botânica das plantas

O material vegetal usado (raízes de *Asparagus africanus* e *Asparagus plumosus Baker*) no presente trabalho foi colhido no dia **14 de Agosto de 2012**, no bairro de Chiboene, localidade de Mahulane, distrito da Moamba na província de Maputo. As plantas colhidas foram posteriormente identificadas no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UEM.

5. 2. Solventes e reagentes usados na extração e testes fitoquímicos

Para a realização das extrações e dos testes fitoquímicos foram usados os reagentes e solventes que são descritos na tabela abaixo.

Tabel 1: Solventes e Reagentes

Água destilada	NaOH a 5%
Éter de petróleo	HCl a 2%
Diclorometano	Cloreto férrico a 2%
Acetato de etilo	H ₂ SO ₄ concentrado
Metanol	Reagente de Mayer (K ₂ [HgI ₄])
n-Butanol	Reagente de Dragendorff (K ₂ [BiI ₄])
Acetato de magnésio	Reagente de Wagner ([I ₂ /KI])
Acetato de chumbo	Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) anidro
NH ₄ OH a 10%	

5.3. Preparação dos extractos brutos

Os extractos usados para os testes fitoquímicos e para avaliação da actividade antimicrobiana foram preparados por maceração sob agitação constante a temperatura ambiente.

5. 3.1. Maceração sequencial por ordem crescente de polaridade

Para a realização da extracção por ordem crescente de polaridade, pesou-se 100 g do pó das raízes das duas plantas em estudo (*A.africanus* e *A.plumosus Baker*), em seguida foram submetidas a maceração dinâmica com 500 mL de éter de petróleo durante 72 h. Separou-se o resíduo da solução por filtração e concentrou-se o filtrado no vaporizador rotativo. Secou-se o resíduo durante 24 h e adicionou-se 500 mL de diclorometano para a maceração durante 72 h à temperatura ambiente, sob agitação constante. Separou-se o resíduo da solução por filtração e concentrou-se o filtrado no vaporizador rotativo. O mesmo procedimento foi feito com os solventes subsequentes, acetato de etilo e metanol respectivamente. O extracto metanólico obtido foi dissolvido em 150 mL de água destilada e depois procedeu-se com a extracção sucessiva (2 e 3 vezes respectivamente), primeiro com acetato de etilo (EtOAc) com volumes iguais de 50mL cada e depois com o n-Butanol usando volumes iguais de 40mL cada obtendo-se duas fases: fase orgânica e fase aquosa. A orgânica (n-butanólica) foi concentrada no vaporizador rotativo, obtendo-se assim um extracto pastoso de cor castanha. Todos os extractos obtidos foram usados para testes fitoquímicos e avaliação da actividade antimicrobiana.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

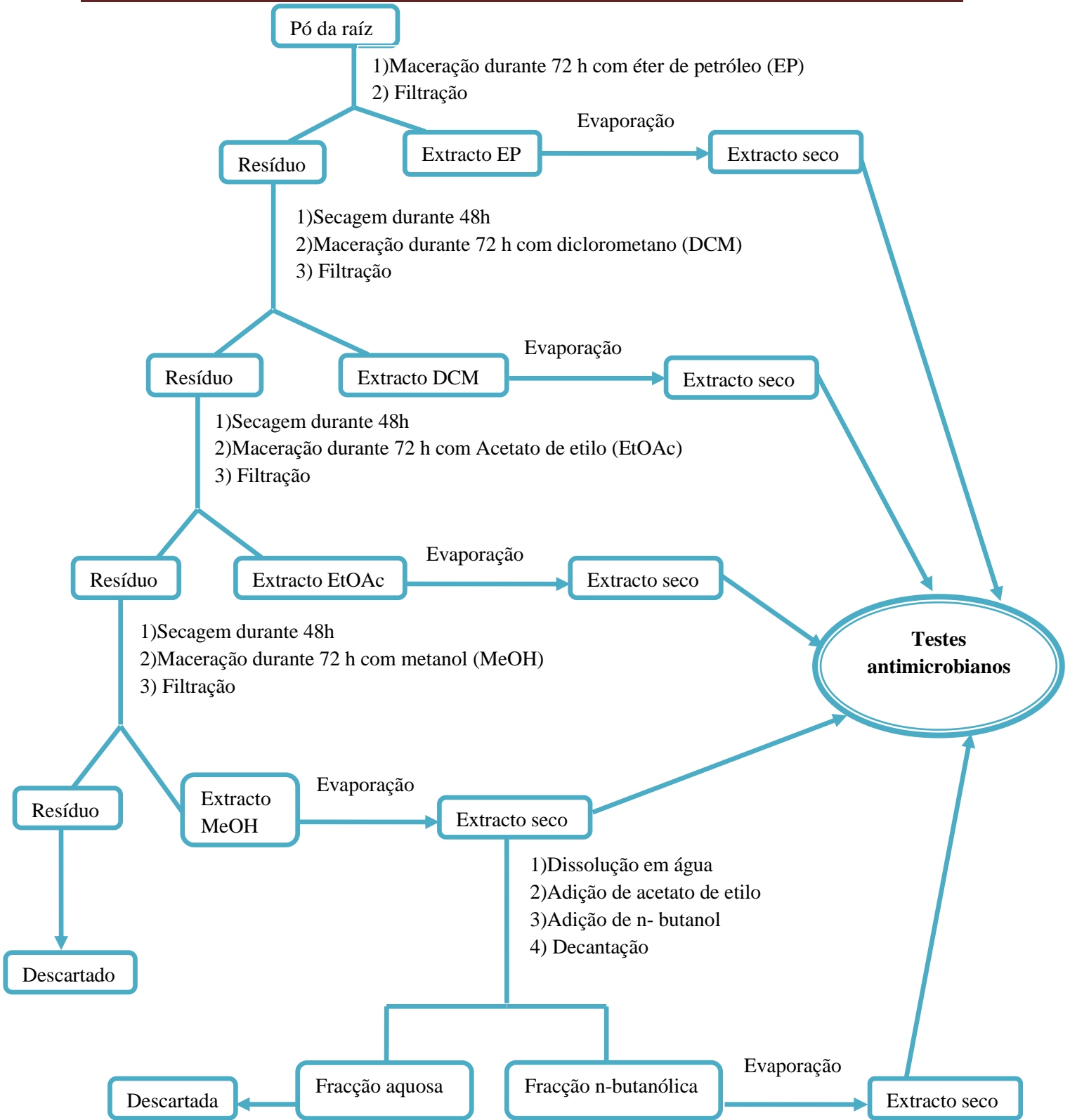


Figura 12:Esquema das etapas da maceração sequencial

5.3.2. Maceração directa

Na maceração directa, pesou-se 100 g do pó das raízes das duas plantas em estudo e foram submetidos a maceração dinâmica com 500 mL de metanol durante 72 h. Separou-se o resíduo da solução por filtração e concentrou-se o filtrado no vaporizador rotativo. Igual procedimento foi realizado para uma segunda maceração, desta feita usando como solvente uma mistura entre metanol e água nas proporções de 9:1.

5. 4. Testes fitoquímicos

Para a identificação dos metabólitos secundários presentes nas raízes das duas plantas, foram realizados testes qualitativos colorimétricos e de precipitação. As classes dos metabólitos secundários testados foram: saponinas, flavonóides, taninos, antraquinonas, esteroides/triterpenóides e alcalóides.

5.4.1. Ensaio de reconhecimento dos flavonóides

a) Reacção com ácido sulfúrico

Tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

b) Reacção de Shinoda

Tomou-se uma alíquota de cada extracto bruto que foi acidificada com HCl a 10% até ao pH 4 e submetida a hidrólise durante 30 minutos. Após arrefecimento adicionou-se 10 mL de água destilada e fez-se a extracção com éter de petróleo. Da solução de éter de petróleo, retirou-se 1mL que foi colocado num tubo de ensaio e adicionou-se três pedaços de fita de magnésio metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado.

Para os 2 testes acima descritos, a formação duma solução que varia de parda a vermelha é indicativa da presença de flavonóides em cada um dos extractos.

5.4.2. Teste de taninos

a) Reacção com cloreto férrico

Em um tubo de ensaio, diluiu-se 1 mL do extracto com 2 mL de água destilada. Agitou-se fortemente e adicionou-se 3 gotas de cloreto férrico a 1%. O mesmo procedimento foi repetido usando o acetato de chumbo.

Para este teste a formação de uma coloração azul sugere a presença de taninos hidrossolúveis enquanto a verde a presença de taninos condensados.

5.4.3. Teste de Borntrager para reconhecimento de antraquinonas

a) Reacção com NaOH a 5%

Deitou-se em um tubo de ensaio 2 mL do extracto ligeiramente concentrado, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e agitou-se. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Recolheu-se a fase clorofórmica e dividiu-a em dois tubos de ensaio. No primeiro tubo, adicionou-se 1 mL de solução de NaOH a 5%.

A coloração roxa em fase aquosa indica a presença de antraquinonas (Reacção de Borntraeger).

No segundo tubo, adicionou-se 1 mL de solução de acetato de magnésio a 5 %.

A coloração roxa sugere a provável presença de antraquinonas livres.

b) Reacção com NH₄OH a 10 %

Colocou-se 1 mL de extracto ligeiramente concentrado num tubo de ensaio e adicionou-se 3 mL de NH₄OH a 10 %. A coloração rosa, vermelha ou violeta sugere a provável presença das antraquinonas.

5.4.4. Teste de reconhecimento de triterpenóides e esteróides - Reacção de Liebermann Buchard

Para o ensaio de esteróides e triterpenóides, introduziu-se num tubo de ensaio 2 mL do extracto e misturou-se 2 mL de clorofórmio. Em seguida filtrou-se a solução clorofórmica em um funil com algodão coberto com 0,5 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro. De seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se pelas paredes do tubo três gotas de H₂SO₄ concentrado e agitou-se suavemente. A coloração azul evanescente seguida de verde, indicou a presença de esteróides ou triterpenóides.

5.4.5. Teste de saponinas

Teste de espuma

Para testar as saponinas tomou-se uma alíquota de cada extracto, colocou-se num tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de água destilada e agitou-se energicamente por 3 minutos.

Para este teste a formação de espuma persistente indica a provável presença de saponinas.

5.4.6. Teste dos alcalóides livres

a) Reacção com reagente de Dragendorff e de Mayer

Dissolveu-se cada um dos extractos em 1,5 mL de HCl a 2%. Agitou-se com uma vareta de vidro até a dissolução total e dividiu-se a solução obtida em volumes iguais, em 3 tubos de ensaio:

Tubo 1 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer;

Tubo 2 – Adicionou-se 3 gotas do reagente de Dragendorff;

Tubo 3 – Testemunha.

Precipitados brancos com o reagente de Mayer e amarelos com o de Dragendorff são indicativos da provável presença dos alcalóides.

5.5. Testes antimicrobianos

Esta habilidade foi avaliada pelo método de difusão em agar descrito em 1966, por Bauer e Kirby. O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de susceptibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do agar Mueller-Hinton, a partir de um disco impregnado com o mesmo.

5.5.1. Reagentes, equipamentos e materiais usados

Reagentes

- Água destilada
- Solução de etanol a 50%
- Solução salina ou soro fisiológico a 0,9% de NaCl
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Sabouraud Dextrose

Material e Equipamento

- Balança analítica
- Bico de Bunsen
- Densitómetro

- Autoclave
- Estufa de secagem
- Congelador – 20°
- Copos de Becker
- Erlenmeyers
- Proveta graduada
- Placas de Petri
- Pipeta
- Tubos de ensaios
- Espátulas
- Zaragatoas estéreis
- Ansas bacteriológicas

5.5.2. Microrganismos testados:

- *Staphylococcus aureus* (Coco Gram-positivo)
- *Escherichia Coli* (Bacilo Gram-negativo)
- *Samonella Typhimurium* (Bacilo Gram-negativo)
- *Salmonella Typhi* (Bacilo Gram-negativo)
- *Klebsiella pneumoniae* (Bacilo Gram-negativo)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Bacilo Gram-negativo)
- *Candida albicans* (levedura)

Refira-se que as bactérias testadas foram isoladas de pacientes com infecções urinárias (superior e inferior), atendidas no Laboratório de análises clínicas do HCM (Hospital Central de Maputo).

5.5.3. Preparação dos meios de cultura

Para preparação de meios de cultura seguiram-se essencialmente as seguintes operações tomando sempre em consideração as indicações prescritas pelo fabricante, onde no meio de cultura:

- Agar Mueller Hinton (AMH) pesou-se 37g e dissolveu-se em 1000 mL de água destilada;
- Agar Sabouraud Dextrose (ASD) pesou-se 25g e dissolveu-se em 250 mL de água destilada. A pesagem dos meios foi feita através balança analítica.

5.5.4. Dissolução em água

A dissolução foi feita num balão volumétrico de vidro, onde foi introduzida gradualmente água destilada até metade do volume. Em seguida, agitou-se e aqueceu-se o balão em banho-maria durante 60 minutos; depois de dissolver o meio no balão em banho-maria, deixou-se arrefecer e em seguida adicionou-se o resto da água perfazendo o volume total e autoclavou-se por 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Deixou-se arrefecer até aproximadamente 50 °C.

5.5.5. Distribuição do meio

Após autoclavar-se o meio foi distribuído em placas de Petri com 90 mm de diâmetro. Este processo foi feito dentro de uma cabine de biossegurança tipo II, para assegurar a esterilidade do mesmo (evitar a contaminação do meio de cultura). As placas foram depois mantidas semiabertas até à solidificação do meio de modo a evitar a formação de bolhas de água.

Para verificar a esterilidade do meio, duas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Como não houve crescimento de bactérias ou fungos após 24 a 48 horas de incubação o meio foi considerado estéril e apto para ser usado.

5.5.6. Conservação das placas

As placas foram conservadas na geleira (2 a 8°C), com as tampas viradas para baixo etiquetadas com o nome do meio e data da preparação.

5.5.7. Teste de esterilidade dos extractos

Este teste consistiu em depositar uma gota do extracto no meio de cultura agar sangue e incubado por 24 a 48 horas numa estufa a 37°C. Findo o período de incubação, as placas foram analisadas e ausência de colónias fúngicas e bacterianas indicava esterilidade do extracto.

5.5.8. Preparação de soluções com diferentes concentrações a partir dos extractos de plantas

Preparou-se uma solução de 200 mg/mL, pesando num frasco estéril, 0,8g de extracto bruto e dissolveu-se em 4mL de etanol a 50%. Esta foi a solução com concentração máxima, ou a concentração “stock”, ou ainda solução 1, pois a partir dela foram preparadas as seguintes concentrações: 150 mg/mL; 100 mg/mL; 50 mg/mL e 25mg/mL em 4 frascos previamente esterilizados e rotulados com os números 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

5.5.9. Preparação de discos contendo extractos

Para preparação dos discos foi usado papel de filtro de boa qualidade, tipo "Whatman No.1". Com auxílio de um furador de papel comum, foram preparados os discos. Os discos resultantes foram uniformes quanto a tamanho, e aceitavelmente circulares. Posteriormente, os discos foram etiquetados usando um lápis de grafite. Os discos preparados foram depois acondicionados em placas de Petri para permitir a esterilização por calor seco, numa estufa de Pasteur por 2 horas a uma temperatura de 170°C.

No presente trabalho, os discos de papel de filtro com um diâmetro de aproximadamente 6mm foram impregnados com soluções de diferentes concentrações de extracto previamente preparadas, tendo-se usado o volume de 20µl para cada disco. Todo o procedimento foi realizado na cabine de biossegurança do tipo II para garantir a esterilidade dos discos.

Após a impregnação, nas soluções preparadas, os discos foram conservados numa geleira a 4°C.

Os discos preparados foram usados para a determinação da sensibilidade.

5.5.10. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado com o objectivo de avaliar a capacidade dos extractos em inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Esta habilidade foi avaliada pelo método de difusão em discos em meio Agar Mueller-Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose para fungo.

A triagem da actividade antibacteriana foi realizada a partir de culturas puras de microrganismos a testar com crescimento máximo de 24 horas. Foram seleccionadas duas a três colónias isoladas, com auxílio de uma ansa bacteriológica. Em seguida, foram adicionados num tubo de ensaio que continha solução salina (soro fisiológico a 0,9% de NaCl). A mistura foi agitada com auxílio de um misturador. Esta suspensão bacteriana foi depois comparada à turvação padrão na escala de 0,5 de *MacFarland*, que equivale a um valor de absorvância entre 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 580 nm. Esta turvação é equivalente a $1,2 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (UFC). Com auxílio de uma zaragatoa estéril (cotonete), foi retirada a suspensão de bactérias e distribuída uniformemente por estrias, na superfície da placa de ágar *Mueller-Hinton*, tendo sido semeado em triplicado, isto é, três placas no meio de cultura (agar *Muller – Hinton*) para uma espécie bacteriana.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Posteriormente, foram colocados os discos na superfície do meio onde a bactéria-teste foi incorporada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, com as tampas viradas para cima.

Geralmente os halos de inibição surgem após 24 horas sob a forma de uma área circular, transparente, sem crescimento bacteriano, geometricamente circunscrita ao disco de papel; foram medidos os diâmetros desses halos com o auxílio duma régua.

Os extractos com concentração máxima que exibiram actividade antibacteriana e antifúngica com maior halo de inibição, foram diluídos. Após a incubação a 37 °C durante 24 h, as concentrações mais baixas dos extractos que foram capazes de inibir o crescimento visível dos microrganismos, foi considerada como sendo Concentração Inibitória Mínima (CIM).

VI. RESULTADOS

6.1.Extracção dos fitoconstituintes

6.1.1. Maceração sequencial por ordem crescente de polaridade

A tabela abaixo indica as massas dos extractos de éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo e n-butanol, obtidos por maceração sequencial (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados da maceração sequencial

Maceração de 100g de material vegetal		
	<i>A.africanus</i>	<i>A.plumosus Baker</i>
Solvente	Massa (g)	Massa (g)
Éter de petróleo	0,98	0,87
Diclorometano	1,20	1,02
Acetato de etilo	1,05	1,42
n-Butanol	0,92	0,84

6.1.2. Maceração directa

Os resultados da maceração directa no metanol e no metanol a 90% estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados da maceração directa

Maceração de 100g de material vegetal		
	<i>A.africanus</i>	<i>A.plumosus baker</i>
Solvente	Massa (g)	Massa (g)
Metanol	1,80	1,76
Metanol 90%	2,03	2,00

6.2. Testes fitoquímicos

Os testes fitoquímicos realizados nos extractos das raízes de *A.africanus* e *A.plumosus Baker*, revelaram a presença de vários metabólitos secundários que incluem saponinas, flavonóides, taninos, esteróides e triterpenos. (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto metanólico das raízes de *A.africanus* e *A.plumosus Baker*.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Metabólitos secundários	Métodos usados	Extracto metanólico	
		<i>A.africanus</i>	<i>A.plumosus Baker</i>
Saponinas	Teste de espuma	+	+
	Reacção com ácido sulfúrico	+	+
Flavonóides	Reacção de Shinoda	+	+
Esteróides e triterpenóides	Reacção de Liebermann- Buchard		+
		+	
Taninos	Reacção com cloreto férrico		
		+	+
Alcalóides	Reacção com reagente de Dragendorff	-	-
	Reacção com reagente de Mayer	-	-
Quinonas	Reacção com NaOH a 5%	-	-
	Reacção com NH ₄ OH a 10%	-	-

(+): Presente; (-): Ausente

Tabela 5: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, n-butanólico e hidrometanólico das raízes de *A.africanus*

Metabólitos secundários	E.EP	E.DCM	E.EtOAc	E.n-BuOH	E.HMeOH
Flavonóides	+	+	+	+	+
Taninos	-	-	-	+	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	+	+	+
Esteróides/Triterpenóides	-	-	-	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-

(+): Presente; (-): Ausente; E.EP: extracto éter de petróleo; E.DCM: extracto diclorometano; E.EtOAc: extracto acetato de etilo; En-BuOH: extracto n-butanólico; E.MeOH: extracto metanólico; E.HMeOH: extracto hidrometanólico.

Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, n-butanólico e hidrometanólico das raízes de *A.plumosus baker*

Metabólitos secundários	E.EP	E.DCM	E.EtOAc	E.n-BuOH	E.HMeOH
Flavonóides	-	-	+	+	+
Taninos	-	-	+	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	+	+	+
Esteróides/Triterpenóides	-	-	-	-	+
Alcaloides	-	-	-	-	-

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

(+): Presente; (-): Ausente

EEP: extracto éter de petróleo; E.DCM: extracto diclorometano; E.EtOAc: extracto acetato de etilo; E.n-BuOH: extracto n-butanólico; E.MeOH: extracto metanólico; E.HMeOH: extracto hidrometanólico.

6.3. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

A análise antimicrobiana permitiu identificar a acção inibitória dos extractos das raízes de *A.africanus* e *A.plumosus Baker*, e o antibiótico Ciprofloxacina foi usado para o controlo positivo. Os resultados dos testes antimicrobianos estão apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela7: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *A.africanus* na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).

AMOSTRA	Cipro	E.EP	E.DCM	E.EtOAc	E.n-BuOH	E.MeOH	E.HMeOH
<i>E. coli 1</i>	19	0,0	14	0,0	7,0	11	10
<i>E. coli 2</i>	20	0,0	8,0	7,0	3,0	9,0	8,0
<i>P. aeruginosa</i>	22	0,0	0,0	0,0	4,0	2,0	5,0
<i>K. pneumoniae</i>	20	0,0	15	18	5,0	16	7,0
<i>S. thyphi</i>	20	0,0	6,0	8,0	0,0	0,0	7,0
<i>S. thyphimurium</i>	24	0,0	8,0	2,0	2,0	8,0	9,0
<i>S. aureus</i>	20	0,0	0,0	3,5	0,0	3,0	2,0
<i>C. albicans</i>	0,0	0,0	10	12	14	13	9,0

Cipro-Ciprofloxacina

E.Coli 1- Isolada de amostras clínicas de pacientes com infecção urinária

E.coli 2- Isolada de amostras clínicas de paciente com infecção na corrente sanguínea

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

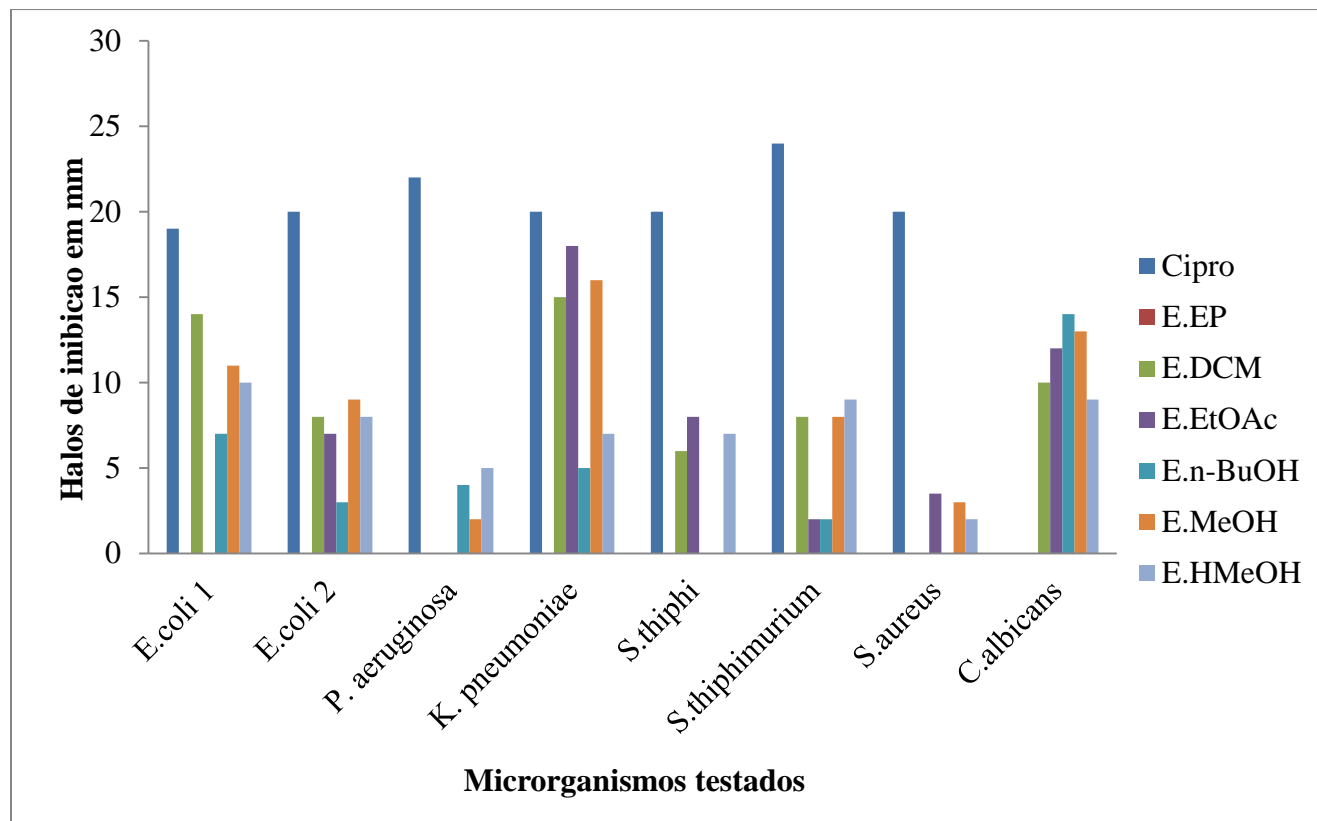


Figura 13: Gráfico ilustrativo da actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *A.africanus* na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).

Tabela 8: Actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *A.plumosus Baker* na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).

AMOSTRA	E.EP	E.DCM	E.EtOAc	E.n-BuOH	E.MeOH	E.HMeOH
<i>E.coli 1</i>	0,0	8,0	7,0	3,0	11	9,0
<i>E.coli 2</i>	0,0	2,0	5,0	0,0	7,0	6,0
<i>P.aeruginosa</i>	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0
<i>K. pneumoniae</i>	0,0	5,0	8,0	5,0	9,0	8,0
<i>S. thyphi</i>	0,0	2,0	0,0	3,0	0,0	4,0
<i>Sl. thyphimurium</i>	0,0	6,0	5,0	2,0	6,0	7,0
<i>S. aureus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. albicans</i>	0,0	11	9,0	7,0	12	10

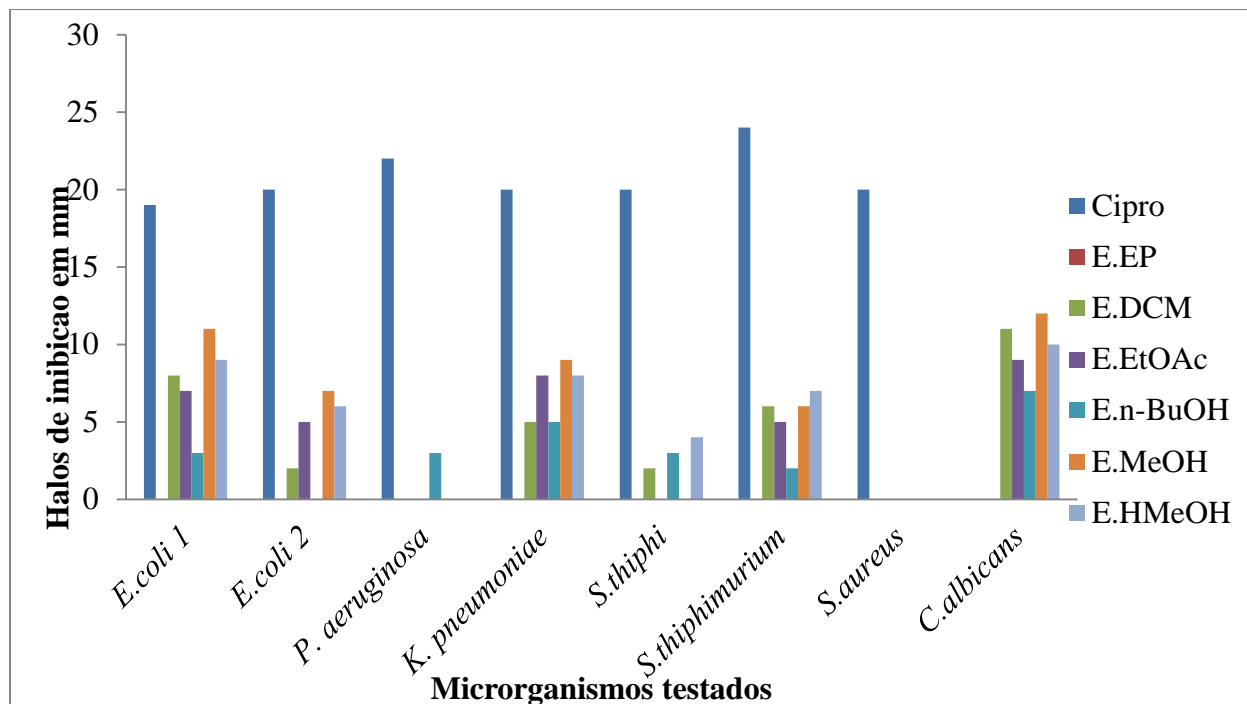


Figura 14: Gráfico ilustrativo da actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *A.plumosus Baker* na concentração de 200mg/mL (Halos de inibição em mm).

6.4.Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As tabelas 9, 10,11,12 e 13 abaixo mostram os resultados das concentrações inibitórias mínimas obtidas em vários extractos das plantas em estudo.

Tabela 9: Resultados dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de *A.africanus* para *E.coli 1* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL
EDCM	14	8,0	0,0
EMeOH	11	6,0	0,0
EHMeOH	10	4,0	0,0

Tabela 10: Resultado dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de *A.plumosus Baker* para *E.coli1* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL
EMeOH	11	2,0	0,0

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Tabela 11: Resultado dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de *A. africanus* para *K.pneumoniae* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL
E.DCM	15	6,5	0,0
E.EtOAc	18	7,5	0,0
E.MeOH	16	9,0	0,0

Tabela 12: Resultado dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de *A.africanus* para *C.albicans* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL
E.DCM	10	7,0	4,0	0,0
E.MeOH	13	9,0	4,0	0,0
E.EtOAc	12	6,5	1,5	0,0
E.n-BuOH	14	5,0	0,0	-

Tabela 13: Resultados dos testes antibacterianos na determinação de CIM dos extractos de *A.plumosus Baker* para *C.albicans* (halo de inibição em mm).

Extractos	200mg/mL	150mg/mL	100mg/mL	50mg/mL
E.DCM	11	7,0	2,5	0,0
E.MeOH	12	6,0	3,0	0,0
E.HMeOH	10	3,0	2,0	0,0

VII. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados da extracção dos metabólitos secundários revelaram maior rendimento na extracção por maceração directa em comparação com a maceração sequencial. A maceração sequencial permite a selectividade na extracção dos metabólitos secundários que consiste numa semi-purificação das substâncias através das suas polaridades.

Os resultados dos testes fitoquímicos realizados nos extractos das raízes de *A.africanus* e *A. plumosus Baker* revelaram a presença de saponinas, flavonóides, taninos, esteróides e triterpenóides. Estes resultados estão em consonância com os de Yared *et al.* (2012), que fizeram um estudo sobre a actividade antimalárica do extracto metanólico das raízes de *A.africanus*, com o objectivo de validar o uso tradicional de *A. africanus* para o tratamento de malária no sistema de saúde tradicional da Etiópia. Neste estudo os resultados da triagem fitoquímica revelaram a presença de saponinas esteroidais, polifenóis, taninos e fitoesteróis.

As saponinas afiguram-se como os metabólitos secundários predominantes nas duas plantas em estudo, tendo sido identificados em todos os extractos analisados. Diversos estudos realizados neste género, em particular em *A. africanus*, revelaram forte presença de saponinas nos extractos das raízes da planta (Hassan *et al.*, 2008). Ao contrário das saponinas, os testes de detecção dos alcalóides e antraquinonas deram resultados negativos em todos os extractos.

Em geral, a actividade antimicrobiana observada nos testes de sensibilidade realizados com os extractos brutos das plantas, pode ser explicada pela presença de determinados componentes químicos identificados através dos testes fitoquímicos, tais como: saponinas, terpenóides, alcalóides, lecitinas e compostos fenólicos. Estas substâncias, são resultantes do metabolismo secundário das plantas, e têm a função de defesa contra predadores ou atracção de agentes polinizadores, mas também apresentam outras actividades biológicas (Costa *et al.*, 2005).

Os testes de sensibilidade aos antibacterianos e antifúngicos permitiram determinar a actividade antimicrobiana dos extractos das raízes de *A.africanus* e *A.plumosus Baker*, tendo sido usado como controlo positivo a ciprofloxacina, um antibiótico do grupo das fluoroquinolonas com efeito bactericida. Este antibiótico actua inibindo a replicação do DNA bacteriano unindo-se a uma enzima chamada DNA girase.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Dos testes antimicrobianos realizados envolvendo diferentes estirpes de bactérias, verificou-se a formação de diferentes halos de inibição que variavam entre 1,5-18 mm para *A.africanus* e 2,0-12 mm para *A.plumosus Baker*.

Esta actividade antimicrobiana pode ser atribuída principalmente à presença de saponinas e flavonóides visto que estes metabólitos secundários foram encontrados em diferentes extractos com actividade antimicrobiana. As análises fitoquímicas de *A.africanus* e *A.dumosus Baker* realizadas por Yared *et al.* (2012) & Ahmad *et al.* (1998) revelaram forte presença de saponinas. Segundo Price *et al.* (1987) as saponinas têm uma variada gama de propriedades, que incluem doçura, amargura, formação de espuma, propriedades emulsificantes, propriedades farmacológicas e medicinais, fortes propriedades hemolíticas, bem como actividade antimicrobiana, insecticida e moluscicida. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram seleccionados os extractos que apresentaram na concentração de 200 mg/mL um halo de inibição igual ou superior a 10 mm.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 100 mg/mL no caso dos testes antifúngicos contra *Candida albicans* na maioria dos extractos testados enquanto que nos testes antimicrobianos foi de 150 mg/mL no caso dos testes contra *K. Pneumoniae* e *E. Coli*. O extracto EP das duas plantas em estudo não conseguiu inibir o crescimento de nenhum dos microorganismos usados no ensaio de teste de sensibilidade antimicrobiana.

Comparando o perfil de sensibilidade dos extractos das duas plantas na concentração de 200mg/mL, observa-se que a maioria dos extractos das raízes de *A. africanus* mostrou maior actividade antimicrobiana do que os de *A.plumosus Baker*.

Todos os extractos de *A.plumosus Baker* mostraram-se inactivos contra *S.aureus*. Os extractos E.AcOEt, E.MeOH e E.HMeOH de *A. africanus* inibiram o crescimento desta bactéria apenas na concentração máxima (200mg/mL), com halos de inibição de 3,5mm, 3,0mm e 2,0mm respectivamente. Estes resultados são similares aos reportados por outros autores (Deans & Ritchie, 1987; Zaika, 1988; Dorman & Deans, 2000) em relação a uma tendência de maior resistência de microrganismos Gram-positivos a extractos vegetais.

S. aureus é um agente patogénico humano adaptável causando uma variedade de infecções variando da pele e dos tecidos moles para sepsis fatal. Actualmente é um dos principais causadores de infecções hospitalares (Lowy, 1998).

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Esta bactéria tem uma capacidade demonstrada única para responder rapidamente a cada novo antibiótico com o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Os primeiros casos de resistência foram observados com penicilina e depois meticilina. Recentemente foram reportados casos de resistência a linezolida e daptomicina. Os mecanismos de resistência desta bactéria incluem inactivação enzimática do antibiótico, alteração do local alvo de ligação com diminuição da afinidade para o antibiótico, aprisionamento do antibiótico e bombas de efluxo. Matrizes genéticas complexas adquiridas por transferência horizontal de genes entre os *Staphylococcus* e através de mutações espontâneas também são reportados (Pantosti *et al.*, 2007).

Os extractos E.DCM, E.EtOAc e E.MeOH de *A. africanus* revelaram maior actividade antibacteriana em relação a *K.pneumoniae*, sendo a maior actividade verificada no extracto EtOAc na concentração de 200mg/mL com o valor de 18mm. Na concentração de 150mg/mL o extracto MeOH mostrou maior actividade com halo de inibição de 9,0 mm. Os extractos de *A.plumosus Baker* também mostraram actividade relativamente moderada contra esta estirpe bacteriana, facto que evidencia o uso de plantas deste género no combate da pneumonia (Ahmad *et al.*,1998).

Segundo CDC (Centro de controlo e prevenção de doenças infecciosas) (2012), *Klebsiella* é uma bactéria Gram negativa que faz parte da flora normal do intestino e que pode causar diversos tipos de infecções associadas aos cuidados de saúde (infecções intra hospitalares) incluindo infecções da corrente sanguínea, infecções das feridas cirúrgicas, meningites. Muito recentemente estas bactérias desenvolveram resistência aos antibióticos carbapenémicos.

Em relação a outras bactérias gram negativas (*P.aeruginosa*), observou-se um comportamento diferente do observado na *Klebsiella*, pois foi verificada fraca actividade antimicrobiana na maioria dos extractos das duas plantas. Estes resultados estão de acordo com os referidos por Soares (2005), que indicavam que a *P.aeruginosa* apresentava resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos, como a maioria dos β -lactâmicos, as tetraciclina, ao cloranfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicósidos. Dentre os mecanismos responsáveis destacam-se: a baixa permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo, produção de

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção de β -lactamases (Soares, 2005 & Casal *et al.*, 2012).

Nas raízes de *A. africanus*, o E.DCM mostrou maior actividade inibitória contra *E. Coli*, seguido por E.MeOH e E.HMeOH nas duas concentrações usadas. Contudo nas raízes de *A.plumosus Baker* apenas o E.MeOH revelou actividade inibitória nas concentrações analisadas.

Os extractos de *A.africanus* revelaram capacidade em inibir o crescimento das bactérias *S.thyphi* e *S.thyphimurium*, destacando-se o extracto hidrometanólico como o mais activo. Contudo os extractos de *A.plumosus Baker* revelaram menor capacidade inibitória contra estas duas bactérias.

Um estudo similar realizado por Uddin *et al.* (2010) & Mandal *et al.* (2000) sobre as raízes de *Asparagus racemosus* revelou a susceptibilidade antimicrobiana do extracto metanólico contra estirpes bacterianas incluindo *K.pneumoniae*, *E.coli*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *S. flexneri*. Pelo estudo, concluiu que *A. racemosus* pode ser usado na fitoterapia para tratar infecções respiratórias.

As variações nas concentrações inibitórias mínimas de extractos de plantas podem ser atribuídas a vários factores. Dentre eles podemos citar a técnica usada na obtenção dos extractos, da origem do microrganismo utilizado no teste, a origem da planta, a época da colheita do material vegetal, a natureza do material vegetal (seco ou fresco) e a quantidade de extracto testado (Fennel *et al.*, 2004).

Em relação a *C.albicans*, os extractos E.DCM, E.MeOH, E.EtOAc e E.n-BuOH de *A.africanus* apresentaram halos de inibição maior ou igual a 10mm a 200mg/mL. No caso *A. plumosus baker* foram os extractos E.DCM, E.MeOH e E.HMeOH que apresentaram halos de inibição maiores ou iguais a 10mm.

Os resultados dos testes antimicrobianos confirmam o efeito antibacteriano e antifúngico relatado na literatura para as plantas do género *Asparagus*.

VIII. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

8.1. CONCLUSÃO

- Os testes fitoquímicos realizados nos extractos das raízes das plantas *A. africanus* e *A. plumosus Baker* permitiram identificar os seguintes metabólitos secundários nas duas plantas: saponinas, flavonóides, taninos, esteróides e terpenóides.
- O extracto que inibiu o crescimento de maior número de microrganismos foi o metanólico (E.MeOH).
- O E.EP não revelou nenhuma actividade antimicrobiana em todas as concentrações usadas das duas plantas.
- A bactéria *K.peumoniae* revelou ser a mais sensível aos extractos e foi nela que se verificou o maior halo de inibição.
- Apenas 3 extractos (E.EtOAc, E.MeOH e E.HMeOH) de *A.africanus* na concentração de 200mg/mL revelaram actividade antimicrobiana contra *S.aureus*, sendo este o microrganismo menos sensível aos extractos das duas plantas em estudo.
- A maioria dos extractos inibiu o crescimento de *C.albicans* em concentrações mais baixas (100mg/mL).
- No geral a actividade antimicrobiana das raízes de *A. africanus* foi maior em relação à de *A.plumosus Baker*.
- Os resultados obtidos nos testes fitoquímicos e antimicrobianos permitem comprovar o uso destas plantas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças causadas por microrganismos patogénicos.

8.2. RECOMENDAÇÕES

- É importante a continuidade de estudos com estas plantas partindo-se de outros métodos extractivos e/ou o emprego de outros solventes para obtenção de extractos que possam ter outros componentes químicos ou em concentrações distintas das utilizadas neste estudo.
- Recomenda-se que se faça o isolamento e identificação de princípios activos presentes nos extractos que revelaram acção inibitória contra os microrganismos.
- Que haja o aprofundamento na colaboração entre os investigadores na área das plantas medicinais e praticantes da medicina tradicional para o aprofundamento do conhecimento sobre plantas medicinais e enriquecimento de estudos nesta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, D. (2002). Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumonia*. *J Antimicrob Chemother.* **50**(1): 1-5.
- Agarwal, V.; Lal. P & Pruthi, V. (2010). Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *J. Microbiol Immunol Infect.* **43**(5): 447–451.
- Ahmad, V. U., Khaliq-uz-Zaman, S. M & Shameel, S. (1998). Steroidal saponins from *Asparagus dumosus*. *Phytochemistry.* **50**(3): 481-484.
- Anónimo. (2006). Climbing *Asparagus fern*. Natural Resources and Water Facts. Disponível em:
- Anónimo. (2014). The State of Queensland, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Disponível em:

http://www.fynu.ucl.ac.be/users/j.lehmann/plante/Asparagus_africanus.html. Acessado a 21.09.14
- Arif, T., Mandal, T & Dabur, R. (2011). Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. *Research Signpost.* **37**(2): 283 – 311.
- Atlas. (1997). *Principles of Microbiology*, 2a edição, Willian C. Brown Pub, 1298 pp. Louisville. EUA
- Baerts, M. & Lehmann, J. (2002). *Asparagus africanus*. Quelques plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle vétérinaire et humaine en Afrique subsaharienne. Laboratoire de Botanique Médicale de Louvain-la-Neuve, Belgique. Disponível em:

<http://www.fynu.ucl.ac.be/users/j.lehmann/plant/asparagus-africanus.html>. Acesso em 21 de Dezembro de 2014
- Barros, M.C. (2012). Preparação de novos derivados flavonóides com potencial actividade biológica. Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial. Universidade de Coimbra, Coimbra. 78 pp.
- Bettelheim, K.A. (2007). The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*. *Critical Reviews in Microbiology.* **33**:67 – 87.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- Bomono, A & Szabo, D. (2006) Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species, *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* **43**: 4
- Brandelli, A., Bizani, D., Martinelli, M., Gerbasse, A. (2004) Antimicrobial activity of 1,4 Naphthoquinones by metal complexation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **40**(2): 247-252.
- Casal, M., Causse, M & Rodríguez-López, F. (2012). Resistência antimicrobiana em analisados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Esp Quimiot.* **25**(1): 37-41
- CDC. (2012). *Klebsilla pneumonia* in Healthcare Settings. Disponível em: www.cdc.gov/HAI/.../klebsiella/klebsiella.html. Acessado a 05.05.15
- Chumpolkulwong, N. (2004) Effects of *E. coli* ribosomal protein S12 mutations on cell-free protein synthesis. *Eur J Biochem.* **271**: 1127– 34.
- Costa, J. G. M., Rodrigues, F.F., Angélico, E.C & Silva, M.R. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* **15**(4): 304-309.
- Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbial. Rev.* **12**(4): 564-582.
- Cunha, A., Roque, R., Valentao, P & Andrade, P. (2009). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Cushnie, T.P.T and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **26**(5) : 343-356
- David, P. (2003). *Salmonella enterica typhi*. Disponível em www.salmonellatyphi.org/salmonellatyphimorphology. Acessado no dia 20 de Janeiro de 2015
- Deans, S.G & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology.***5**: 165-80.
- Decosterd L. A., Dai, J. R & Gustafson, K. R. (1994). Novel naphthoquinones from *Conospermum incurvum*. *Journal of Natural Product.* Nov. **57**(11):1511-6.
- Demissew, S. (1997). Asparagaceae: In Flora of Ethiopia and Eritrea (Eds. Edwards S, Demissew, S & Hedberg, I.). The National Herbarium, Addis Abeba University and the Swedish Science Press. **6**: 67-69.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- Desta, B. (1993). Ethiopian traditional herbal drugs, part II. Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **39**(2): 129-139.
- Dey, Y. N., Ota, S. & Jamal, M. (2012). A phytopharmacological review on an important medicinal plant - *Amorphophallus paeoniifolius*. *Ayu.* Jan-Mar, **33**(1): 27–32.
- Dikasso, D., Makonnen, E & Debella, A. (2012). In vivo anti-malarial activity of hydroalcoholic extracts from *Asparagus africanus* Lam. in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Ethiop.J.Health Dev.* **3**: 88 – 94.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* **88**: 308–316
- Dornas, W. C., Oliveira, T. T. & Dores, R.G.R. (2007). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm.Básica Apl.* **28**(3) : 241-219
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M & Pereira, B. (2004). Actividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev. Bras. Farmacogn.* **14**(1): 6-8.
- El-Sakka, M .A. (2010). *Phytochemistry Alkaloids*. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy. Al Azhar University, Cairo, Egito. Third Edition, 122 pp.
- Faife, D. (2003). *Actividade antiprotozoária de Asparagus plumosus baker*. Trabalho de Licenciatura em Química, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
- Farmer, IIIJ & Kelly, M.T. (1991). *Enterobacteriaceae*. In: Balows A, Hausler WJJ, Hermann KL, *et al*, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 5^a ed. Washington. ASM. 560pp
- Farrapo, N. M., Silva, G. A., Costa, K. N. & Silva, M. (2011). Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth. Extracts. *Journal of Venom Research.* **2**: 52–60.
- Fennel, C .W; Lindsey, K. L & Gaw, L. J. (2004). Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* **94**: 205–217.
- Flambó, D.F. (2013). *Actividades Biológicas dos Flavonoides: Actividade Antimicrobiana* Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. Porto. 43 pp

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- Franceschini, F.S. (2004). Plantas terapêuticas. São Paulo. Andrei editora. 334pp.
- Gold, H.S & Moellering, R.C. (1996).Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med.* **335**: 1445-53
- Gonçalves, A.L., Filho, A.A & Menezes, H. (2005). Estudo comparativo da actividade antimicrobiana de extractos de algumas árvores nativas. Arquivo do Instituto Biológico.**72**(3): 353–358.
- Guimarães, D.O., Momesso, L.S. & Pupo, M.T. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Departamento de Ciências Farmacêuticas.Universidade de São Paulo. *Quim. Nova.* **33**(3): 667– 679.
- Harris, C. R. and Thorarensen, A. (2004). Advances in the discovery of novel antibacterial agents during the year. *Curr Med Chem*; **11**: 2213– 43.
- Hashimoto, H. (1997) Acquisition of antibiotic resistance in bacteria by alteration of molecular target, or by the decreased permeability. *Nippon Rinsho*, **55**: 1167–72.
- Hassan, H.S., Ahmadu, A. A. & Hassan A.S (2008). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Asparagus africanus* root extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* **5**(1): 27 – 31.
- Heim, E., Tagliaferro, R. and Bobilya, J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572–584.
- Hervas, J.A., Alomar, A., Salva, F. & Benedí, V. J. (1993). Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca, Spain.*Clinical Infectious Diseases.* **16**(5): 719–24.
- Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*; **41**: 120-26.
- Karou, D., Savadogo, A. & Traore, A.S. (2005). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology.* **4** (12): 1452–1457.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J and Bodo, L. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol.***2**(1) : 39–45.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- Mendes, M.M., Vieira, S.A.P.B; Gomes, M.S.R & Rodrigues, V.M. (2013). Triacetyl p-coumarate: An inhibitor of snake venom metalloproteinases. *Phytochemistry*. **86**: 72–82.
- Mendoza, L., Wilkens, M & Urzua, A. (2001) Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **58**: 85–88.
- Mitra. S.K., Prakash, N.S. & Sundaram, R. (2012). Shatavarins (containing Shatavarin IV) with anticancer activity from the roots of *Asparagus racemosus*. *Indian J.Pharmacol.* **44**(6): 732– 736.
- Montano, K. P. and Vargas, F. A. (2002). A defense mechanism with ample future. *Interciencia*. **27**(1): 21-27.
- Monteiro, J., De Albuquerque, U. & Araújo, E. (2005). Taninos: Uma abordagem da Química à Ecologia. *Quim. Nova*. **28**(5): 892– 896.
- Moura, V.M., Sousa, L .F & Oliveira, R.B. (2013). Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* .**7** (31): 2330–2337.
- Msonthi, J. D. and Magombo, D. (1983). Medicinal Herbs in Malaria and their Uses. Hamdard. *Journal List*. **20** (2): 94–100.
- Murray P.R., Rosenthal K. S. E. & Pfaller, M. A. (2010). *Microbiologia Médica*, 6ª edição, Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro. Brasil
- Navarro, V & Delgado, G. (1999). Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *Journal of Ethnopharmacology*. **66**: 223– 226.
- Navie, S.C. (2004). *Declared Plants of Australia*. CD-ROM. The University of Queensland, St. Lucia, Queensland. 10pp.
- Nikaido, H. (2001) Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers, active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**: 215– 23.
- Oketch-Rabah, H.A., Dossaji, S.J. & Christensen, S.B. (1997). Antiprotozoal Compounds from *Asparagus africanus*. *J. Natural product*. **60**(10): 1017– 1022.
- Pages, J.M. (2004). Bacterial porin and antibiotic susceptibility. *Med Sci (Paris)*. **20**: 346–51.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- Pantosti, A., Sanchini, A. & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* **2**(3): 323-34.
- Patel, O. G., Mberu, E. K & Nzila A.M (2004). Sulfa drugsstrike morethan once. *Trends Parasitol.* **20**: 1-3.
- Perez-Trallero, E & Iglesias, L. (2003). Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **21**: 520– 29.
- Portillo, A., Vila, R., Freixa, B & Adzet,T. (2001). Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* **76**:93-98.
- Price, K. R., Johnson, I. T. & Fenwick, G.R. (1998). The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **26**: 27–135.
- Ribeiro, A., Romeiras, M. M and Taveres, J. (2010). “Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge”, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* **6**: 33.
- Rosenberger, C., Scott, M., Gold, M., Hancock, R., & Finlay, B. (2000). *Salmonella typhimurium* Infection and Lipopolysaccharide Stimulation Induce Similar Changes in Macrophage Gene Expression. *The Journal of Immunology.* **164**(11): 5894– 5904.
- Sanches, A. C., Lopes, G. C. & Nakamura, C.V. (2005). Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.***41** (1): 101–107
- Santos, J.D.G. (2009). *Avaliação da actividade antimicrobiana de extratos e caracterização parcial de saponinas obtidas do resíduo de Agave sisalana*. Mestrado em Recursos Genéticos. UEFS. Bahia. 125pp.
- Sekine, T; Fukasawa, N. & Murakoshi, I. (1997). A 9,10-dihydrophenanthrene from asparagus racemosus. *Phytochemistry.* **44**(4): 763–764.
- Shohawon, S and Mahomoodally, M.F. (2013). “Complementary and alternative medicine use among Mauritian women,” *Complementary Therapies in Clinical Practice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicin.* **19**(1): 36– 43.
- Silva, C.H.M (1999). *Bacteriologia: um texto ilustrado*. Teresópolis: Eventos. 531pp.

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- Silva, M.N; Ferreira, V.F & Souza, M.B. V. (2003). Um panorama actual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. Departamento de. *Quim. Nova.* **26**(3): 407– 416.
- Simões, C.M., Amoros, M. & Girre, L. (2007). Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy research.* **13**(4): 323– 328.
- Soares, M.T (2005). *Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ. (UFF). Niterói. 178pp.
- Souza, W.M (2008). *Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de himatanthus lancifolius.* Universidade federal do Paraná. Paraná. 114pp.
- Srinivasan, A., Dick, J.D & Perl, T.M. (2002). Vancomycin Resistance in *Staphylococci.* *Clinical Microbiology Reviews.* **48**(3): 430– 38.
- Suzuki, L. C. (2009). *Desenvolvimento de biofilme formado por Candida albicans in vitro para estudo da terapia fotodinâmica.* Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo. 49pp
- Tchoumboungang, F., Amvam, P. H & Mekonnen, Y. (2005). In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei.* *Planta Med.* **71**(1): 20–3.
- Teferi, G. & Heinz, J. (2002). Treatment of malaria in Ethiopian folk medicine. *The Royal society of Medicine Journals.* **32**(4): 206 – 209.
- Teklehaymanot, T and Giday, M. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Zeige peninsula, Northwestern Ethiopia. *J Ethnobiol Ethnomedicine.* **3**: 1-3
- Trabulsi, L.R., Alterthum, F and Gompertz, AF. (1999). *Microbiologia.* 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 753pp
- Uddin, M., Ghufran, M.A., Idrees, M., Irshad, M and Naeem, R. (2010). *Journal of Public Health and Biological Sciences.* **1**(2): 32– 35.
- USP (2001) – Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário - uma revisão técnica. *Ribeirão Preto online.* **34**: 70–78.

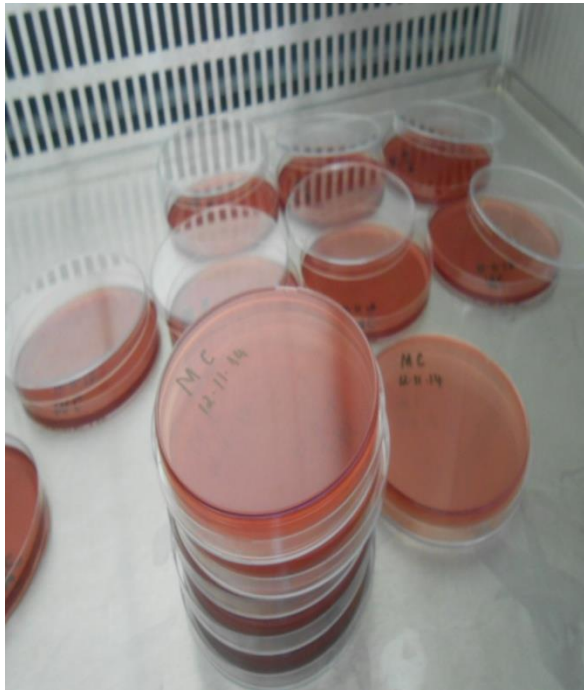
Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

- WHO. (2002). *WHO Policy Perspectives on Medicines*. Traditional Medicine –Growing Needs and Potencial. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2008). “*Traditional Medicine*”. Factsheet N°134
- Yared, D., Mekonnen, Y., Debella, A. (2012). In vivo antimalarial activities of fractionated extracts of asparagus africanus in mice infected with Plasmodium Berghei. *Pharmacologyonline.silae.it*. **3**: 88 –94.
- Zaika, L.L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal Food Nutrition*. **9**: 97– 118.

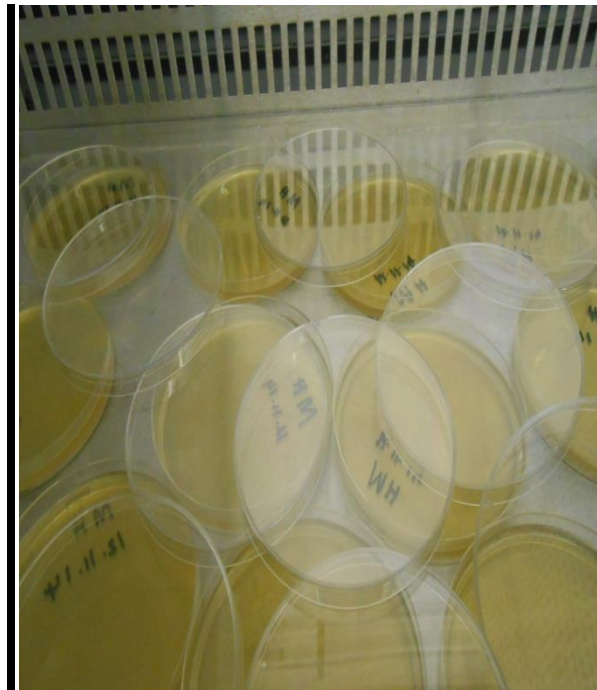
Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Anexos

Anexo1: Preparação dos meios de cultura usados



Mconkey



Ágar Mueller Hinton

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Anexo2: Colónia de alguns microrganismos usados



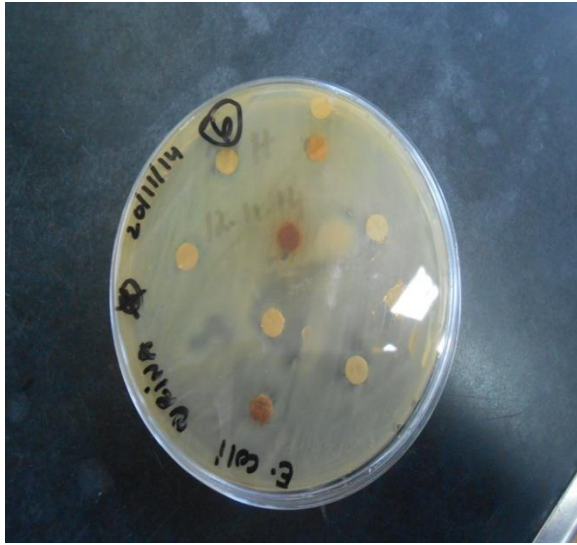
K. Pneumoniae



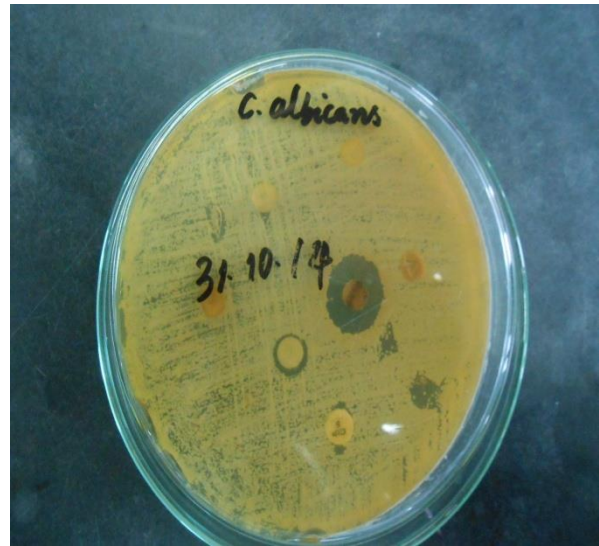
E. coli

Avaliação da actividade antimicrobiana das raízes de *Asparagus plumosus baker* e *Asparagus africanus*

Anexo3: Fotografia de antibiograma de *E.coli*, *C.albicans* e *K. pneumoniae*.



E.coli



C.albicans



K. pneumoniae