

Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd., Asteraceae

Josiane F. Gaspari Dias¹, Suzane Virtuoso¹, Aline Davet¹, Miriam M. Cunico¹, Marilis D. Miguel¹, Obdulio G. Miguel^{1*}, Celso G. Auer³, Albino Grigoletti-Júnior³, Andressa B. Oliveira¹, Marlene L. Ferronato²

¹Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner 3400, 80210-170, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brasil,

²Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, 80035-050, Juvevê, Curitiba, PR, Brasil,

³EMBRAPA Florestas, Estrada da Ribeira, s/n km 111, 83411-000, Colombo, PR, Brasil

RESUMO: Conhecida popularmente como áster-arbustiva, margarida-de-são-miguel e monte-cassino, *Aster lanceolatus* é uma planta ornamental de corte. Sabendo-se que não existem estudos que atestem a atividade biológica desta espécie, procurou-se neste trabalho atividades antibacteriana e antifúngica. Para tanto se utilizaram extratos brutos etanólicos de duas porções distintas, das flores e dos caules com folhas. Para a atividade antibacteriana, oito bactérias patogênicas foram submetidas a ensaio de difusão em gel e concentração inibitória mínima. Demonstrou-se atividade do extrato bruto etanólico de flores contra *Streptococcus pyogenes*, em difusão em gel e atividade de extrato bruto etanólico de caules e folhas contra *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus pyogenes* em concentração inibitória mínima. Para a atividade antifúngica, utilizaram-se três fungos patogênicos em ensaios de crescimento micelial em placas e bioautografia direta. No ensaio de crescimento micelial em placas verificou-se a inibição de *Fusarium oxysporum* e na bioautografia direta, inibição do *Cylindrocladium spathulatum*. Os resultados delinearão uma nova fonte de pesquisa, as plantas ornamentais. Estas podem ser fonte de constituintes químicos capazes de servirem como protótipos para novos agentes terapêuticos e para tratamento sanitário de plantas medicinais.

Unitermos: *Aster lanceolatus*, atividade antibacteriana, atividade antifúngica, difusão em gel, concentração inibitória mínima.

ABSTRACT: “Antibacterial and antifungal activity of ethanolics extracts from *Aster lanceolatus* Willd., Asteraceae”. Popularly known as aster-arbustiva, margarida-de-são-miguel and monte-cassino, *Aster lanceolatus* is an ornamental plant. Having the knowledge that there is no studies on the biological activity of this species, this work aimed to check the antibacterial and antifungal activities. The ethanol extracts of the flowers and of the stems with leaves were used. For the antibacterial activity eight pathogenic bacteria were submitted to the diffusion test in gel and minimal inhibitory concentration. The activity of the ethanolic extract of the flowers has been demonstrated against *Streptococcus pyogenes* in diffusion in gel and the activity of the ethanol extract of the stems and leaves against *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pyogenes* in minimal inhibitory concentration. For the antifungal activity, three pathogenic yeasts have been used in the micelial growth tests in plates and direct bioautography. In the micelial growth tests in plates the inhibition of *Fusarium oxysporum* has been verified and in the direct bioautography, inhibition of the *Cylindrocladium spathulatum*. The results indicated a new research source, the ornamental plants. These can be the source of chemicals capable of serving as prototypes for new therapeutic agents and for sanitary treatment of medicinal plants.

Keywords: *Aster lanceolatus*, antibacterial activity, antifungal activity, gel diffusion, minimal inhibitory concentration.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae apresenta distribuição cosmopolita, melhor representada em clima temperado e subtropical aonde não existam densas florestas. Espécies de vários gêneros são cultivadas para ornamentos e poucas para alimentação e produção de óleos (Cronquist, 1981).

Diversos constituintes químicos podem ser encontrados nas plantas da família Asteraceae: poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides (Cronquist, 1981), óleos essenciais (Agostini et al., 2005), antocianinas (Takeda; Harborne; Self, 1986), flavonóides (Markham, 1982), diterpenos (Batista et al., 2005) entre outros.

Aster lanceolatus, popularmente conhecida

como áster-arbustiva, monte-cassino (Lorenzi; Souza, 1995) e margarida-de-são-miguel (Ferronato, 2000), é uma planta de corte, com crescimento uniforme, hastes longas e resistentes. Empregada para paisagismo e para produção de flores de corte e vaso, seus ramos apresentam floração em formato cônico chamada inflorescência (Ferronato, 2000). As inflorescências são numerosas, ramificadas, com flores em capítulos brancos e centro amarelo (Lorenzi; Souza, 1995). Seus caules são estáveis medindo quando adultos cerca de oito mm de diâmetro e 1,1m de altura. Suas folhas são pequenas e lineares (Lorenzi; Souza, 1995, Ferronato, 2000) e suas raízes do tipo ramificadas e bem desenvolvidas (Ferronato, 2000).

A comprovação da eficácia terapêutica de constituintes químicos obtidos a partir de plantas (Miguel; Miguel, 2004), impulsiona novas pesquisas em busca de espécies que apresentem atividade biológica.

As plantas com eficácia comprovada são possíveis matérias-primas para medicamentos, devendo possuir garantia de qualidade, desde o cultivo. Nesta perspectiva entende-se que planta medicinal deve ser isenta de substâncias que poderiam influenciar na qualidade final do fitoterápico (Brandão, 1996; Rates 2001).

A grande preocupação com o meio ambiente tem levado inúmeros pesquisadores a buscarem alternativas viáveis, efetivas e seguras no controle de pragas e doenças que acometem culturas de plantas de interesse comercial (Kimati et al., 1997).

Considerando-se que *A. lanceolatus* é uma espécie que não possui relatos sobre atividade biológica, procurou-se neste trabalho avaliar preliminarmente o potencial antibacteriano e antifúngico de extratos brutos etanólicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os solventes e reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analítico (Merck®). A diluição das suspensões bacterianas foi realizada com salina estéril e a turbidez padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,5 mL de BaCl₂. 2H₂O 0,048M - 1,75% peso/volume em 99,5 mL de H₂SO₄ 0,36N - 1% volume/volume). Culturas bacterianas puras (ATCC - *American Type Culture Collection*) e disco de antimicrobiano utilizado como controle (cloranfenicol), foram adquiridos comercialmente (Newprov®). Para a atividade antibacteriana utilizaram-se os meios de cultura ágar Muller-Hinton (difusão em gel) e caldo tríptico de soja (concentração inibitória mínima). Para a atividade antifúngica, utilizou-se o meio de cultura ágar batata-dextrose, para o crescimento micelial em placas e bioautografia direta. Os isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Cylindrocladium spathulatum* foram fornecidos pelo Centro de Diagnóstico

Marcos Enrietti, da Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná e pela EMBRAPA Florestas.

Material vegetal

A. lanceolatus foi coletada no mês de junho/2003. As exsicatas foram identificadas pelo botânico Dr. Gerdt Hatchbach do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba/PR e registradas neste museu sob o número 287.063.

Flores, folhas e caules de *A. lanceolatus* após secagem, foram estabilizados à temperatura ambiente. O material botânico foi separado em duas porções distintas, a primeira constituída das flores e a segunda de caules e folhas. A separação em duas porções foi realizada com o intuito de analisar separadamente as flores dos caules e folhas.

Obtenção dos extratos brutos etanólicos

Os extratos brutos das flores e caules com folhas foram preparados com etanol 96°GL em aparelho de soxhlet (Carvalho, 2001) até esgotamento. Os extratos obtidos foram submetidos à concentração em evaporador rotatório com pressão reduzida à temperatura de 50°C e 90 rpm. Em seguida armazenados em frascos âmbar, colocados no freezer por 24 horas e após, filtrados a vácuo em funil de Büchner. Após filtração, os extratos retornaram aos frascos âmbar e foram armazenados na geladeira. Após o preparo dos extratos, fez-se determinação de teor de sólidos depositando 1 mL de extrato bruto etanólico a ser analisado em cadinho pesado (triplicata), levando a estufa 100°C até peso constante e procedendo aos cálculos aonde o resultado é apresentado em quantidade de sólidos em 1 mL e porcentagem em peso do teor de sólidos em relação ao material vegetal. O teor de sólidos das flores obtido foi 78,5 mg/mL (7,22g%) e dos caules e folhas foi 47,5 mg/mL (4,60g%).

Avaliação da atividade antibacteriana

Para realização deste estudo, duas técnicas foram empregadas: difusão em gel, técnica adaptada de Koneman et al. (1993), Romeiro (2001) e Carvalho et al. (2002), e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), técnica adaptada de Moura et al. (1987) e Konemann et al. (1993). Para ambos os testes, cepas de *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27283), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) foram utilizadas.

Teste de difusão em gel

As amostras foram obtidas a partir dos extratos brutos etanólicos das flores e dos caules e folhas de *A. lanceolatus*, diluídas em etanol 96°GL nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5%. Espalhou-se os discos de papel (6 mm) em placas de Petri e impregnou-os com 10 µL de amostras e 10 µL de etanol. As placas contendo os discos foram fechadas e levadas à estufa 40°C por 24 horas.

Para cada extrato testado procedeu-se da seguinte maneira: em cada placa inoculada, foram distribuídos quatro discos de papéis impregnados com as amostras, um disco impregnado apenas com etanol, utilizado como controle negativo de inibição e um disco contendo cloranfenicol (30 µg, lote A6389, validade jan/05), como controle positivo de inibição. Incubaram-se as placas em estufa à 35° C, durante 24 horas. Após este período, as placas foram retiradas da estufa e medidos os halos de inibição, quando presentes, com auxílio de régua. O teste foi realizado em duplicata.

Concentração inibitória mínima (CIM)

Utilizaram-se 2 mL da suspensão de bactérias, em concentração padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland, para colocar em 100 mL (2%) de solução estéril de Tween 80® (a 2% em água destilada).

Para o ensaio utilizaram-se dos extratos brutos etanólicos das flores e dos caules e folhas de *A. lanceolatus*, diluídos em caldo em concentrações decrescentes: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64.

Após as diluições, os tubos receberam 1 mL da suspensão de microrganismos em Tween 80®. O controle negativo foi preparado com caldo e extrato 1:1 e o controle positivo com caldo e suspensão de bactérias 1:1. Os tubos foram incubados a 35° C por 24 horas e decorrido o tempo, procedeu-se às leituras.

Estudo da atividade antifúngica

Para o estudo da atividade antifúngica do extrato bruto etanólico dos caules e folhas de *A. lanceolatus*, utilizou-se técnica de crescimento micelial em placas e bioautografia direta, métodos adaptados de Auer e Bettiol (1986) e Stangarlin et al. (1999) com intuito de encontrar alguma inibição no crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Cylindrocladium spathulatum*.

Crescimento micelial em placas

O extrato etanólico em teste foi adicionado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) nas concentrações de 95, 190 e 285 mg/ 500 mL e autoclavados (120° C e 1 atm por 15 minutos). O meio BDA contendo extrato foi vertido em placas de Petri (15 cm de diâmetro) e após uma hora de resfriamento, inocularam-se esporos de *F. oxysporum* e *C. acutatum* com sete dias de idade em meio

BDA. Após vedação com filme plástico, as amostras foram incubadas a 25 °C no escuro por cinco dias. O teste foi efetuado com seis repetições. Para tratamento controle utilizou-se apenas o meio BDA.

As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), após cinco dias de incubação dos patógenos e o resultado apresentado em médias das medidas.

Bioautografia direta (Bioensaio por cromatografia em camada delgada)

Para este ensaio utilizou-se alíquota de 50 µL (2,375 mg) do extrato bruto etanólico dos caules e folhas de *A. lanceolatus*, empregando-se método adaptado de Stangarlin et al. (1999).

Placas de sílica-gel GF₂₅₄, pré-lavadas com clorofórmio: metanol (1:1, v/v), foram preparadas e após a aplicação da amostra sobre a placa e secagem sob fluxo de ar, realizou-se a separação dos compostos utilizando-se o sistema diclorometano: metanol: água (95: 4,5:0,5 - v/v/v).

Visualizaram-se os compostos sob luz visível e ultravioleta (UV) a 365 nm (longo) e 254 nm (curto) e em seguida, as placas secas contendo as bandas individuais foram aspergidas com suspensão de esporos de *C. spathulatum* (1 x 10⁵ esporos/ 1,6 mL de meio líquido batata dextrose, 40 pulverizações), sendo mantidas sob umidade relativa de 100% a 25° C e luz.

Verificou-se nas placas em estudo (após sete dias), se havia presença de zonas de inibição de crescimento micelial ao redor das bandas individuais.

Para controle utilizou-se placa de sílica-gel GF₂₅₄ nas mesmas condições empregadas no bioensaio, porém sem aplicação de amostra. A bioautografia direta foi realizada em duplicata.

RESULTADOS

Os resultados da atividade antibacteriana (apresentados em média) se encontram na tabela 1 e os resultados do ensaio de crescimento micelial em placas, na tabela 2.

Avaliando-se a atividade antibacteriana de *A. lanceolatus*, verificou-se em ensaio de difusão em gel, 785 µg de extrato bruto etanólico de flores inibiu o desenvolvimento de *S. pyogenes*. Testando-se a concentração inibitória mínima, visualizou-se que o extrato bruto etanólico de caules e folhas inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas e que 1,48 mg/mL do referido extrato inibiu o desenvolvimento de *S. typhimurium* e *S. pyogenes*.

A atividade antifúngica delineou o extrato bruto etanólico de caules e folhas de *A. lanceolatus* como agente capaz de inibir 48,15% do crescimento micelial de *F. oxysporum* ao utilizar 0,57 mg/mL de extrato. Testando-

Tabela 1. Resultados do estudo de atividade antibacteriana de *Aster lanceolatus*.

Extrato bruto etanólico de <i>A. lanceolatus</i>		Difusão em gel - média do diâmetro dos halos de inibição em mm							
	Concentrações	Microrganismos							
		Ec	Kp	Pm	Pa	St	Sa	Se	Sp
Flores	785,0 µg (100,0%)	0	0	0	0	0	0	0	8,5
	392,5 µg (50,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	196,2 µg (25,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	98,1 µg (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle cloranfenicol (30µg)		26,5	24,0	21,0	22,5	30,0	29,0	32,5	27,5
Controle etanol		0	0	0	0	0	0	0	0
Caudex e Folhas	475,0 µg (100,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	237,5 µg (50,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	118,7 µg (25,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	59,4 µg (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle cloranfenicol (30µg)		25,0	21,0	19,5	18,5	29,0	27,5	31,0	25,0
Controle etanol		0	0	0	0	0	0	0	0

Extrato bruto etanólico de <i>A. lanceolatus</i>		Concentração Mínima Inibitória (mg/ mL)							
		Microrganismos							
		Ec	Kp	Pm	Pa	St	Sa	Se	Sp
Flores		9,81 (1:8)	NEG.	39,25 (1:2)	19,62 (1:4)	19,62 (1:4)	9,81 (1:8)	9,81 (1:8)	NEG.
Controle dos microrganismos		+	+	+	+	+	+	+	+
Caudex e folhas		5,94 (1:8)	2,97 (1:16)	47,5 (1:1)	11,88 (1:4)	1,48 (1:32)	5,94 (1:8)	11,88 (1:4)	1,48 (1:32)
Controle dos microrganismos		+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: Ec = *Escherichia coli*; Kp = *Klebsiella pneumoniae*; Pm = *Proteus mirabilis*; Pa = *Pseudomonas aeruginosa*; St = *Salmonella typhimurium*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Se = *Staphylococcus epidermidis*; Sp = *Streptococcus pyogenes*; + = crescimento de microrganismos em meio de cultura isento de material testado, NEG. = resultado negativo, nenhuma concentração inibiu o crescimento de microrganismos.

Tabela 2. Resultados da atividade antifúngica (crescimento micelial) do extrato bruto etanólico de caules e folhas de *A. lanceolatus*.

Amostra	Concentração do extrato bruto etanólico em meio batata dextrose (BDA)	<i>F. oxysporum</i>			<i>C. acutatum</i>		
		Média dos halos de crescimento micelial (mm)		Inibição do crescimento micelial	Média dos halos de crescimento micelial (mm)		Inibição do crescimento micelial
		Extrato bruto etanólico	Controle	(%)	Extrato bruto etanólico	Controle	(%)
Extrato bruto etanólico de caules e folhas	0,19mg/mL	4,0		25,92	3,3		13,15
	0,38mg/mL	3,8	5,4	29,62	3,1	3,8	18,42
	0,57mg/mL	2,8		48,15	3,1		18,42

se o mesmo extrato em ensaio de bioautografia direta, o resultado apresentou-se com ausência de crescimento de *C. spathulatum* com 2,375 mg de extrato.

DISCUSSÃO

Os resultados negativos no ensaio de difusão em gel podem ser decorrentes de características lipofílicas dos extratos testados, pois, meio de cultura que apresenta ágar como agente solidificante é considerado um gel perfeito (Romeiro, 2001), meio apropriado para substâncias com características hidrofílicas.

Resultados da atividade antibacteriana levam a concluir que a maioria dos constituintes químicos presentes nos extratos brutos etanólicos de *A. lanceolatus* apresentam características lipofílicas, com exceção de algum constituinte presente no extrato bruto etanólico das flores que apresenta característica hidrofílica capaz de inibir o crescimento de *S. pyogenes* no ensaio de difusão em gel.

No ensaio de atividade antifúngica, comparando-se o crescimento micelial dos patógenos testados, verifica-se atividade diretamente proporcional à quantidade de extrato presente em meio de cultura.

Estes ensaios preliminares demonstram o potencial biológico de *A. lanceolatus* contra bactérias e fungos, incentivando novas pesquisas com substâncias isoladas com o intuito de estabelecer o constituinte ou constituintes químicos responsáveis por tal atividade. Pesquisas devem ser conduzidas com plantas ornamentais, apresentando uma nova fonte de constituintes químicos que podem servir como protótipos para novos agentes terapêuticos e para o tratamento sanitário de plantas medicinais.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, da Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná e EMBRAPA Florestas, pelos fungos isolados para realização da atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS

- Agostini F, Santos ACA, Rossato M, Pansera MR, Zattera F, Wasum R, Serafini LA 2005. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 15: 215-220.
- Auer CG, Bettiol W 1986. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. *IPEF* 32: 49-51.
- Brandão MGL 1996. A participação do laboratório de Farmacognosia da UFMG no aprimoramento dos produtos fitoterápicos em Minas Gerais. *Rev Bras Farmacogn* 5: 201-210.
- Batista R, Braga FC, Oliveira AB 2005. Quantitative determination by HPLC of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. *Rev Bras Farmacogn* 15: 119-125.
- Carvalho AAT, Sampaio MCC, Sampaio FC, Melo AFM, Sena KXFR, Chiappeta AA, Hígino JS 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. *Acta Farma Bonaerense* 21: 255-258.
- Carvalho, JLS 2001. *Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de Nasturtium officinale R. BR., Brassicaceae*. Curitiba. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- Cronquist A 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- Ferronato ML 2000. *Aprimoramento de atributos comercialmente desejáveis em Aster sp cultivar White Master através do uso de reguladores do crescimento vegetal*. Curitiba. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Kimati H, Gimenez-Fernandes N, Soave J, Kurozawa C, Brignani Neto F, Bettiol W 1997. *Guia de fungicidas agrícolas - Recomendações por cultura*. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia.
- Koneman EW, Allen SD, Dowwel-Junior VR, Sommers HM 1993. *Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido*. 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda.
- Lorenzi H, Souza HM 1995. *Plantas ornamentais no Brasil : arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Nova Odessa: Editora Plantarum.
- Markham KR 1982. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press.
- Miguel MD, Miguel OG 2004. *Desenvolvimento de fitoterápicos*. 2 ed. São Paulo: Robe Editorial.
- Moura RA, Wada CS, Purchio A, Almeida TV 1987. *Técnicas de laboratório*. 3 ed. São Paulo: Livraria Atheneu.
- Rates SMM 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da Farmacognosia. *Rev Bras Farmacogn* 11: 57-70.
- Romeiro RS 2001. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: Editora UFV.
- Stargarlin JR, Schwan-Estrada KRF, Silva Cruz ME, Nozaki MH 1999. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 11:16-21.
- Takeda K, Harborne JB, Self R 1986. Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the Compositae. *Phytochemistry* 25: 1337-1342.