

Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA

Evaluation of *in vitro* antibacterial activity of hydro-ethanol from vegetable extracts against MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus*

RIALA6/1417

Cristiano Sanches GARCIA*, Suely Mitoi Ykko UEDA, Lycia Mara Jenné MIMICA

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Patológicas, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), R. Dr. Cesário Mota Junior, 61, 11º andar, CEP 01221-020, São Paulo, SP, Brasil. Cel. (11) 8922-2241. E-mail: cristianofito@yahoo.com.br

Recebido: 03.04.2011 – Aceito para publicação: 20.11.2011

RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana de extratos de plantas contra as cepas de *Staphylococcus aureus* por meio de testes de Disco-Difusão e de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Foi testada a susceptibilidade de 52 cepas de *S. aureus* aos extratos hidroetanólicos das plantas: (1) *Psidium guajava* var. *pomifera*; (2) *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*; (3) *Pothomorphe umbellata*; (5) *Bidens pilosa*, seguindo-se a metodologia baseada nas normas internacionais do CLSI. Na comparação dos resultados da ação dos extratos nas concentrações preparadas neste modelo experimental, foi observado que: *B. pilosa* apresentou menor ação; *P. guajava* var. *pomifera*, *P. umbellata*, com resultados muito próximos entre si, apresentaram ações medianas; *H. courbaril* var. *stilbocarpa* demonstrou ação muito superior aos outros extratos e ao controle com etanol. A ação *in vitro* dos extratos testados evidenciou a presença de princípios ativos antibacterianos. O estudo tornou evidente que os extratos hidroetanólicos das plantas 1, 2, 3 e 5 possuem ação antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA.

Palavras-chave. extratos vegetais, agentes antimicrobianos, *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the antibacterial activity of vegetable extracts in the control of the *Staphylococcus aureus* strains, using Disk Diffusion and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) tests. The susceptibility of 52 *S. aureus* strains to the hydroethanolic extracts from the following plants: (1) *Psidium guajava* var. *pomifera*, (2) *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*, (3) *Pothomorphe umbellata*, (5) *Bidens pilosa*, was tested by the methodology based on the international standards of CLSI. By comparing the results from the action of extracts concentrations prepared in this experimental study, it was found that the *B. pilosa* showed a minor action; *P. guajava* var. *pomifera*, *P. umbellata*, presented results very close to each other and revealed median actions; *H. courbaril* var. *stilbocarpa* exhibited an action markedly higher than the other extracts and the control with ethanol. The *in vitro* effects of the extracts evidenced the presence of antibacterial active components. This study showed that hydroethanolic extracts from plants 1, 2, 3 and 5 hold *in vitro* antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA.

Keywords. vegetable extracts, antimicrobial agents, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Doenças causadas por estirpes diferentes da espécie de bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* podem ser classificadas como superficiais, invasivas ou tóxicas. As infecções hospitalares causadas por cepas multirresistentes desse agente, membro da microbiota normal dos seres humanos, tem sido objeto de preocupação. Essas bactérias são consideradas o principal agente causador de infecções de feridas cirúrgicas que podem evoluir para bacteremia ou sepse, com mortalidade elevada; por exemplo, 17,6% das infecções nosocomiais na Santa Casa de São Paulo, em 1981, foram causadas por esse agente¹. Algumas amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à maioria das cefalosporinas e penicilinas conhecidas, designadas *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (sigla em inglês, MRSA), só podem ser tratadas com sucesso com o antibiótico vancomicina, e já há relatos do aparecimento de cepas com resistência intermediária a este último (conhecidas como VISA)². Entre 1981 e 1982 foi registrado um aumento de 46 % para 48,6 % de cepas resistentes à oxacilina (ORSA) na Santa Casa de São Paulo¹. O *Staphylococcus aureus* MRSA é um micro-organismo de grande interesse nos estudos de ação antibacteriana visando à descoberta de novos agentes devido às altas taxas de infecção hospitalar. A descoberta de plantas com ação antibacteriana é o primeiro passo para o desenvolvimento de novos princípios ativos (PA) antimicrobianos. Nas tradições populares encontramos diversas plantas utilizadas no tratamento das várias doenças, inclusive infecções. Esta tradição é passada oralmente de geração para geração e sua aplicabilidade clínica muitas vezes carece dos fundamentos científicos para a comprovação de sua eficácia³⁻¹⁵. A descoberta da presença dos PA antimicrobianos em plantas poderia ajudar no tratamento de vários pacientes.

Segundo Gutierrez et al., *Psidium guajava* (goiabeira), da família *Myrtaceae*, foi encontrada na literatura etnofarmacológica de diversos países, especialmente na América Central e África⁴. Extratos de plantas dessa espécie são utilizados em preparações tradicionais, principalmente em distúrbios gastrointestinais (diarréia, dores de estômago, gastroenterite, indigestão e disenteria) e condições dermatológicas (bolhas, infecções e úlceras na pele)⁴. Chah et al. relataram a ação antibacteriana de extratos de folha e de raiz de *P. guajava* contra agentes etiológicos de infecções intestinais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

mutans, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Proteus* spp, *Shigella* spp e *Escherichia coli*³. Além desse estudo, diversos outros relataram a ação antibacteriana contra *S. aureus* utilizando extratos aquosos, extratos etanólicos, extratos hidroetanólicos, extrato metanólico, de folhas, casca do caule e raízes de *P. guajava*⁵. Betoni et al. utilizando extratos etanólicos de folhas de goiabeira sobre cepas de *S. aureus*, conseguiram diminuir sua concentração inibitória mínima utilizando associações desses extratos com antibióticos⁶.

Hymenaea L. (jatobá), da família *Caesalpinaceae*, foi considerado um gênero predominantemente neotropical com 16 espécies distribuídas desde o México até a América do Sul, segundo Dechoum⁷. Seu principal uso na medicina popular é contra afecções pulmonares de modo geral, dores e cólicas estomacais, como vermífugo e antidiarreico, antifúngico, antioxidante, diurético, expectorante, hepatoprotetor, carminativo, adstringente, estimulante e energético⁷⁻¹⁰. Segundo Lima et al. a seiva do jatobá apresenta as mesmas propriedades que o chá elaborado a partir da casca, que além de fortalecedor do sistema imunológico, é estimulante e utilizado pelos indígenas para melhorar o desempenho sexual⁸. Pereira et al. descreveram que o óleo essencial de *H. courbaril* apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Salmonella Thiphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus haemolyticus*⁹. Outros estudos relataram atividade antimicrobiana de *H. courbaril* contra *S. aureus* utilizando extratos de casca ou folhas¹⁰.

Pothomorphe umbellata (pariparoba) pertence à família *Piperaceae* e sua distribuição geográfica vai da América Central até as Antilhas e América do Sul. Seu uso na medicina popular é difundido por todo o Brasil. São empregadas suas folhas, caule e raízes. É considerada diurética, antiepiléptica, utilizada no tratamento de doenças do fígado, contra febre e afecções das vias respiratórias, inchaços e inflamações nas pernas, contra erisipela e filariose^{11,12}. Na Amazônia, todas as partes da planta, principalmente as folhas, são utilizadas sob a forma de chá, suco ou emplastro, como antipaludária, vermífuga e no combate das inflamações internas e externas em machucados ou queimaduras¹¹. Sponchiado-Júnior¹¹, utilizando o teste de difusão em ágar, evidenciou que a fração acetato de etila, proveniente do extrato bruto de *P. umbellata* apresentou efeito antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis*, ação comparável à atividade antimicrobiana do

hidróxido de cálcio. Isobe et al.¹² demonstraram que o alcalóide, N-benzoilmesalina, isolado das partes aéreas da pariparoba, apresentou atividade antibacteriana significativa contra o *Helicobacter pylori*.

O picão-preto (*Bidens pilosa* L.), da família *Asteraceae*, possui ampla dispersão nos trópicos e subtropicais, desde o nível do mar até cerca de 3000 m de altitude. Por onde ocorre é adotada como fitoterápico, sendo referido o uso das folhas ou da planta inteira, com exceção das raízes¹³⁻¹⁵. Seu principal uso é na solução de problemas hepáticos (hepatite e icterícia), além de laringites, dores de cabeça e distúrbios digestivos¹³⁻¹⁵. Segundo revisão de Taylor¹³, no Brasil, *Bidens pilosa* é usada tradicionalmente contra febre, malária, hepatite, diabetes, dor de garganta, tonsilite, obstruções ou outras distúrbios do fígado, infecções urinárias, corrimentos e infecções vaginais. Em infusões ou decocções para uso interno é usada para tonsilite e faringite¹³⁻¹⁵. Externamente é utilizada em feridas, infecções fúngicas, úlceras, picadas de insetos, hemorróidas e erupções da pele. Rabe e van Staden¹⁴ demonstraram sua atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* sp, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Schuch¹⁵, em sua tese de doutorado, descreveu a ação bactericida de extratos hidroetanólicos de *Bidens pilosa* contra cepas de *Staphylococcus coagulase-positiva*.

Referências não foram encontradas nas bases de dados estudadas (LILACS, PUBMED, SCIELO e MEDLINE), nos últimos dez anos, sobre a ação das plantas citadas contra *S. aureus* MRSA, fato preocupante, considerando que estudos científicos poderiam contribuir para o conhecimento dos extratos com ação bactericida.

Este estudo teve como objetivo a avaliação da ação antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à metilicina (MRSA e MSSA) utilizando extratos hidroetanólicos das plantas: *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Psidium guajava* var. *pomifera* (goiabeira) e *Pothomorphe umbellata* (pariparoba). Como métodos, foram realizados os testes de disco-difusão em meio de cultura sólido e teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) em meio de cultura líquido, utilizando como referência as normas internacionais do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁶. Outro objetivo foi verificar se os métodos de extração simples, passíveis de serem utilizados na cultura popular, poderiam produzir extratos com ação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) e no Laboratório de Química do Centro Universitário "Padre Anchieta" (UniAnchieta) entre 2008 e 2009.

Os testes de sensibilidade antibacteriana foram realizados em 52 cepas (28 MRSA e 24 MSSA) de *S. aureus* coletadas da rotina laboratorial do Laboratório do Serviço de Controle de Infecções Hospitalares (SCIH) da Santa Casa de São Paulo e procedentes das Unidades de Pediatria. Essas cepas foram coletadas de 2004 a 2007 e mantidas no freezer a -18 °C.

O material testemunha herborizado foi depositado em acervo comprobatório do Herbário da Universidade Estadual de Campinas, SP (Unicamp) sob a seguinte numeração: *Bidens pilosa* registro nº150348, *Pothomorphe umbellata* registro nº 150349; *Psidium guajava* var. *pomifera* registro nº150350; e *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* registro nº150351.

Preparação dos extratos hidroetanólicos

O material vegetal foi coletado de espécimes de *Hymenaea courbaril* (jatobá: casca de galho), *Bidens pilosa* (picão-preto: planta toda), *Psidium guajava* (goiabeira: casca de galho), *Pothomorphe umbellata* (pariparoba: folhas) na época da florada e, ou frutificação, na região de Jundiá, 23° 11' 9" S, 46° 53' 2" W, estado de São Paulo, Brasil. As herbáceas foram coletadas em sacos plásticos escuros, tomando-se o cuidado de desprezar partes afetadas por doenças, parasitas e materiais estranhos, como partes de outras plantas^{17,18}.

Em até duas horas após as coletas, o material vegetal foi colocado para secar a 40 °C, com circulação de ar, em estufa, por sete dias. Após a secagem foi submetido à moagem e estabilização no Laboratório do Centro Universitário "Padre Anchieta" (UniAnchieta), sendo processado em liquidificador, pesado em balança digital de precisão eletrônica e colocado em frascos de vidro com etanol de cereais à 80% (v/v), numa proporção de 1 grama de planta para 4 mL de etanol (1g:4mL). Após o processamento da matéria vegetal, os frascos com extrato foram deixados em repouso por no mínimo oito dias à temperatura ambiente, dentro de uma caixa de papelão para evitar a degradação de princípios ativos (PA) pela luz^{17,18}.

Após a extração, a amostra foi filtrada em papel-filtro quantitativo de filtragem média, porosidade de 6,5 µm e mantida em frascos âmbar^{17,18}.

Testes preliminares: ação antibacteriana sobre cepa padrão

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP). Utilizou-se a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) da coleção do Laboratório, conservada em freezer à -18 °C. O teste de disco-difusão seguiu o método de Kirby-Bauer, segundo propõe o CLSI¹⁶. Esta etapa foi realizada com a finalidade de padronizar o método e os extratos que apresentaram ação antibacteriana nos testes (disco-difusão e diluição em caldo) e foram utilizados nos experimentos posteriores.

Teste de disco-difusão

Após a padronização dos testes de disco-difusão em cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 com extratos a serem testados, procedeu-se aos testes com as 52 cepas hospitalares MSSA e MRSA. Os extratos hidroetanólicos tiveram sua sensibilidade comparada à sensibilidade dos antibióticos de referência vancomicina, oxacilina e cefalotina, por meio da medição de seus halos de inibição de crescimento.

Um inóculo foi preparado de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de cepas, 0,5 da escala de MacFarland, para serem testados em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI) e semeados em placas de Agar Müeller-Hinton (MH). Discos estéreis de papel filtro impregnados com 10 µL de cada extrato foram colocados na superfície da placa de MH previamente semeada e foram distribuídos de maneira que a distância de centro a centro não excedesse 24 mm para evitar possíveis interações com outros extratos.

O experimento de disco-difusão foi controlado utilizando-se um disco impregnado com etanol 80% e discos contendo os antibióticos de referência: vancomicina (VAN) 1 µg/mL, oxacilina (OXA) 30 µg/mL e cefalotina (CFL) 30 µg/mL. As placas foram invertidas e incubadas em estufa a 37 ± 2 °C, por 24 a 48 h. Após esse período mediram-se os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros. Estes experimentos foram feitos em duplicata para assegurar a veracidade dos dados, como sugere o CLSI¹⁶.

Foi considerado halo de inibição de crescimento bacteriano, o equivalente a área sem crescimento detectável a olho nu, com no mínimo 7 mm. Halos com formação

imperfeita, denominados aqui de halos vestigiais, foram considerados indicativos de possível ação antibacteriana. Todo teste que apresentou crescimento com possível margem de dúvidas foi repetido, como propõe o CLSI¹⁶.

Testes de Concentração Bactericida Mínima (CBM) - testes de diluição em caldo

O teste de concentração bactericida foi realizado somente com extratos que, no teste de disco-difusão, apresentaram halo vestigial ou de 7 mm.

Em 9 tubos de ensaio de 13 x 100 mm esterilizados, foram preparadas diluições seriadas de 1 até 1/256 de extratos em água salina a 8,0%, 1 mL em cada tubo. Suspensões bacterianas de colônias da cepa ATCC 25923 em caldo MH ou BHI (turbidez a 0,5 MacFarland) foram adicionadas aos tubos com diluições e posteriormente estes foram incubados em estufa a 37 °C, até 24 ou 48 h (em duplicatas). O experimento foi controlado por: séries de diluições dos extratos vegetais idênticas à citada e meio de cultura em caldo estéril; série de diluições de álcool de cereais com suspensões bacterianas idênticas à citada acima; controle negativo só com suspensões bacterianas em caldo. Todos os tubos, após 24 h de incubação (e também 48h em alguns casos), tiveram uma alíquota de 10 µL plaqueada em ágar MH para a determinação da CBM, procedimento sugerido por CLSI¹⁶. Hindler e Munro¹⁹ recomendaram o plaqueamento de alíquotas com até 10 µL.

Cada tubo ficou com uma diluição 1:2 de cada concentração de extrato e uma diluição 1:2 do inóculo, o que resultou em uma série final de diluições com 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512.

A CBM é a redução de 99,9% do crescimento bacteriano¹⁶. Nesse estudo, valores menores ou iguais a três colônias representam 99,9% de morte bacteriana, ou seja, as diluições de extrato com essa inibição apresentaram a CBM. Contudo, algumas poucas placas que apresentaram crescimento até cinco UFC, correspondente à inibição estimada de 99,84%, segundo a regra de proporcionalidade aplicada aos valores da Tabela de Pearson et al. adaptada por Hindler e Munro¹⁹, foram consideradas satisfatórias aos objetivos deste estudo. As diluições dos extratos em testes que resultaram em 5 UFC foram denominadas, não como CBM, mas sim, concentração antibacteriana.

Após a inoculação e incubação, o crescimento bacteriano que se apresentou confluyente foi denominado "incontável"; quando as colônias apresentaram-se individualizadas, mas com número muito grande, o crescimento foi denominado "maior que 100 Unidades

Tabela 1. Dados comparativos da Concentração Bactericida/antibacteriana Mínima (CBM); dos diâmetros de halo de inibição de crescimento; da concentração etanólica relativa, por diluição de CBM e do número de colônias desenvolvidas sob a diluição de 1/8 do extrato estoque (imediatamente abaixo da CBM). Testes com a cepa de *S. aureus* ATCC® 25923

Dados	Controle	Extratos			
	álcool	01 <i>Psidium</i> (goiabeira)	02 <i>Hymenaea</i> (jatobá)	03 <i>Pothomorphe</i> (pariparoba)	05 <i>Bidens</i> (picão-preto)
CBM (mg/ mL)	190,0	23,38	3,33	50	51,75
Halo (mm)	-----	11	13	*	*
[] etanol %	20	10	1,25	20	20
Nº de colônias diluição 1/8	incontável	0	0	>100	>100

[] = concentração; * = halo vestigial; ----- = sem halo

Formadoras de Colônia (UFC)”; o crescimento denominado “maior que 60 e menor que 150 UFC” foi aplicado quando foi possível fazer uma estimativa pelo método de contagem por quadrantes da placa. A comparação quanto ao tipo de crescimento, da forma como foi descrita, foi utilizada como critério relativo de avaliação do crescimento bacteriano, caso as CBM do extrato e do controle fossem a mesma.

Testes posteriores - Ação antibacteriana sobre cepas hospitalares de *S. aureus* resistentes e sensíveis

Seguindo o método dos testes de disco-difusão e de concentração bactericida mínima, citados nos testes preliminares descritos anteriormente, foram realizados os testes de sensibilidade antibacteriana em 52 cepas

Tabela 2. Coeficientes das Concentrações Bactericidas/antibacterianas Mínimas (CBM) de extratos hidroetanólicos de: *Psidium guajava* var. *pomifera* (1); *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (2); *Pothomorphe umbellata* (3); *Bidens pilosa* (5); encontradas em testes com 52 cepas hospitalares de *S. aureus* MRSA e MSSA, coletadas na Santa Casa de São Paulo, SP no período de 2004 a 2007

Extrato vegetal	CBM (mg/mL)	% de cepas inibidas
<i>Psidium</i> (1) (goiabeira)	46,75	84,6
	23,38	26,9
<i>Hymenaea</i> (2) (jatobá)	53,25	98,1
	26,62	86,6
	13,31	53,9
	6,65	32,7
	3,33	9,6
<i>Pothomorphe</i> (3) (pariparoba)	50	88,6
	25	36,7
<i>Bidens pilosa</i> (5) (picão-preto)	12,5	3,8
	51,75	92,3
	25,87	11,5

(28 MRSA e 24 MSSA) de *S. aureus* coletadas da rotina laboratorial do Laboratório do Serviço de Controle de Infecções Hospitalares (SCIH) da Santa Casa de São Paulo e procedentes das Unidades de Pediatria. Essas cepas foram coletadas de 2004 a 2007 e mantidas em freezer a -18 °C.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como variáveis qualitativas em termos de frequências absoluta e relativa. Na comparação dos grupos MRSA e MSSA para os dados de cada extrato, o Teste Qui-quadrado ou o Teste Exato de Fisher foi utilizado. A comparação da ação antibacteriana dos extratos em relação ao controle foi feita por meio de intervalos de confiança, utilizando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Resultados dos testes preliminares - suscetibilidade da cepa ATCC® 25923 de *S. aureus* aos extratos vegetais

Diversos extratos foram testados, mas só os que constam na Tabela 1 apresentaram ação antibacteriana observável pelo diâmetro dos halos de inibição e pela CBM. A mesma Tabela apresenta também as concentrações etanólicas relativas a cada diluição da CBM. O termo CBM neste estudo indica a atividade antibacteriana e a bactericida, pois apenas em 12% dos testes houve inibição de 99,84% (antibacteriano no critério adotado).

Resultados dos testes posteriores – teste de concentração bactericida mínima (CBM) para as cepas hospitalares de *S. aureus* MRSA e MSSA

Os valores de CBM para cada extrato vegetal estão indicados na Tabela 2.

A Tabela 3 apresenta uma compilação dos resultados dos testes estatísticos.

A Figura 1 apresenta fotos de algumas amostras nos testes de Disco-difusão e CBM onde as ações antibacterianas das mesmas diluições dos extratos estoque (1/2, 1/4, 1/8 e 1/32) podem ser comparadas. Observou-se que o controle com etanol apresentou inibição até a diluição de 1/4. A inibição dos extratos a uma diluição de 1/8 ou menor foi considerada ação antibacteriana real do extrato e não do etanol.

A ação do controle foi de 0% a partir da diluição de 1/8 e, desse modo, não houve variabilidade de dados que viabilizasse um teste de associação comparando o extrato e o controle. Alternativamente, foram construídos intervalos de confiança de 95%, indicando a ação antibacteriana dos extratos, com o intuito de verificar se apresentavam ação similar à do controle. Esses resultados estão apresentados na Figura 2.

Resultados dos testes posteriores – teste de disco-difusão para as cepas *S. aureus* MRSA e MSSA

Foi detectada uma variação nos halos de inibição compreendida entre zero (cepas resistentes ao extrato) e 26 mm. Não houve diferença significativa entre os resultados de cepas MRSA e MSSA.

Os halos dos extratos 1, *Psidium guajava* var. *pomifera* (goiabeira), e extrato 2, *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá), mediram, em sua maioria, entre 8 e 10 mm, com uma tendência dos halos do extrato 1

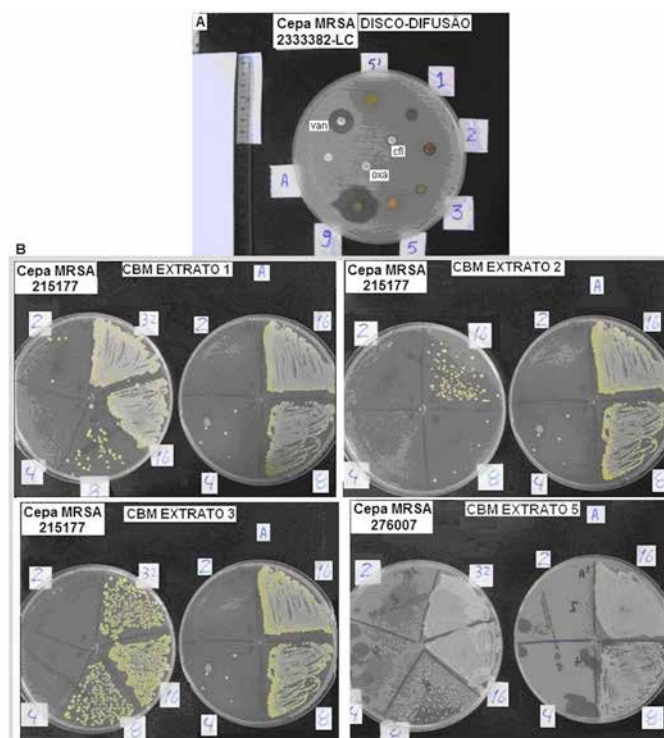


Figura 1. A) Resultados de uma amostra no teste Disco-difusão – Extratos testados: (1) *P. guajava* var. *pomifera*, (2) *H. courbaril* var. *stilbocarpa*; (3) *P. umbellata*; (5 e 5') *B. pilosa*; (9) planta não identificada; (A) etanol 80%; (van) vancomicina, (oxa) oxacilina, (cfl) cefalotina B) Resultados de amostras no teste CBM - A amostra da esquerda são extratos testados (1) *P. guajava* var. *pomifera*, (2) *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, (3) *P. umbellata*, (5) *B. pilosa*; a amostra da direita é o controle etanol (A): diluições de extrato e etanol testadas: (2) representa a diluição 1/2, (4) representa 1/4, (8) representa 1/8, (16) representa 1/16, (32) representa 1/32

Tabela 3. Frequência absoluta de cepas MRSA e MSSA com Concentração Bactericida/antibacteriana Mínima (CBM) de extratos de plantas até a 4ª diluição e acima dela; resultados do Teste X2 (e graus de liberdade) e Teste Exato de Fisher (*) para comparação entre os dados das cepas MRSA e MSSA, com nível de significância $p < 0,05$

Extratos vegetais	Diluição	MRSA	MSSA	Total	P	Graus de liberdade	Conclusão MRSA e MSSA
<i>Psidium</i> (1) (goiabeira)	0-4 ^a	20	18	38	46,3	1	iguais
	8 ^a -64 ^a	9	5	14			
	Total	29	23	52			
<i>Hymenaea</i> (2) (jatobá)	0-4 ^a	4	3	7	99,9*	----	iguais
	8 ^a -64 ^a	25	20	45			
	Total	29	23	52			
<i>Pothomorphe</i> (3) (pariparoba)	0-4 ^a	17	16	33	41,6	1	iguais
	8 ^a -64 ^a	12	7	19			
	Total	29	23	52			
<i>Bidens</i> (5) (picão-preto)	0-4 ^a	27	19	46	38,7*	----	iguais
	8 ^a -64 ^a	2	4	6			
	Total	29	23	52			

----= não se aplica

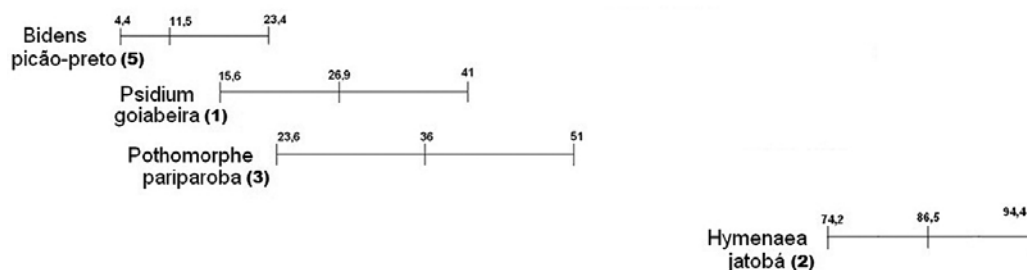


Figura 2. Diagrama dos intervalos de confiança (95%). Frequências relativas (em %) de cepas MRSA e MSSA, inibidas pelas diluições de extratos maiores que 1/4 (1/8 ou maior no teste CBM). Extratos testados: *Psidium guajava* (1); *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa* (2); *Pothomorphe umbellata* (3); e *Bidens pilosa* (5)

(*P. guajava*) serem menores para as cepas MSSA; os halos dos extratos 3, *Pothomorphe umbellata* (pariparoba), e extrato 5, *Bidens pilosa* (picão-preto), mediram, em sua maioria, entre zero e 7 mm (considerando-se os halos vestigiais nesta categoria).

Os halos de inibição do crescimento bacteriano dos controles com antibióticos de referência (OXA, VAN, CFL), em todas as cepas testadas, tiveram seu tamanho entre as medidas esperadas para o padrão internacional do CLSI¹⁶, sem apresentar resistência ao antibiótico vancomicina. Todas as cepas apresentaram halos nulos ou vestigiais segundo indicou o controle com etanol.

DISCUSSÃO

Apesar das CBM de *P. umbellata* (pariparoba) (extrato 3) e *B. pilosa* (picão-preto) (extrato 5) terem apresentado a mesma concentração alcoólica do controle com etanol (A) (Tabela 1), o número de colônias que cresceram nas placas desse controle foi nitidamente maior nas diluições maiores (1/8 ou maior) em relação às referidas CBM dos extratos citados. Isso comprovou a ação antibacteriana não só do etanol, mas também dos extratos vegetais.

O extrato de *B. pilosa* (picão-preto) (extrato 5) foi o que menor ação antibacteriana apresentou. Em concentrações menores ou iguais à diluição de 1/4 desse extrato, o intervalo de confiança das frequências relativas de cepas inibidas apresentou valor muito próximo ao do controle, ou seja, 4,4% e 0% para o controle com etanol (A) (Figura 2).

A ausência de PA antibacteriano em *B. pilosa* (picão-preto), que poderia ser uma hipótese para a porcentagem pequena de cepas com inibição às diluições de extrato menores ou iguais que 1/4, estaria descartada pelos seguintes motivos: a) nesse experimento

foram observados 11,5 % de cepas com concentração bactericida menor do que o controle com etanol; b) foram observados halos vestigiais de inibição de crescimento bacteriano nos testes de disco-difusão; c) houve um crescimento diferencial menor de colônias, comparado com o controle com etanol, mesmo em diluições maiores (1/8 ou maior) do que a concentração bactericida ou antibacteriana menor.

Além desses motivos, estudos descreveram a ação antibacteriana de extratos hidroetanólicos de picão-preto sobre *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus coagulase-positiva*¹⁵.

As CBM descritas para *B. pilosa* (picão-preto) (extrato 5) nesse estudo estão apresentadas na Tabela 2. Schuch¹⁵ relatou em seu estudo com *Staphylococcus coagulase-positiva* uma concentração de inativação (bactericida) de 30 mg/mL para extratos hidroetanólicos.

O motivo do número reduzido de cepas inibidas com concentração menor que a CBM (diluições maiores que 1/4) e da presença de halos de inibição vestigiais, depreende-se da concentração do extrato estoque utilizado nos experimentos ter sido muito pequena. Concentrações maiores poderiam ser obtidas por meio de métodos de extração mais precisos, como o utilizado por Valdes e Rego²⁰, que, fracionando o extrato, obtiveram 3 compostos bacteriostáticos (Ácido Linólico, Ácido α -linolénico e Esqualeno) e 3 compostos antibacterianos (Fenilheptatrina; n-alcanos; Estigmasterol, β -sitosterol, campesterol) obtidos de extrato de *B. pilosa* (picão-preto) com éter de petróleo.

Os extratos de casca de *P. guajava* (goiabeira) (extrato 1) e folhas de *P. umbellata* (pariparoba) (extrato 3) tiveram resultados muito próximos (26,9% e 36%, respectivamente), apresentando intervalos de confiança que se sobrepõem. Isso foi um indicativo de que seriam semelhantes em ação antibacteriana, apesar de não ser possível uma análise estatística.

As CBM descritas para a casca de *P. guajava* (goiabeira) (extrato 1) neste estudo estão descritas na Tabela 2. Gonçalves et al.⁵, para extratos de plantas dessa espécie, encontraram diâmetros de halos de inibição de crescimento bacteriano que variaram entre 8,25 e 9,25 mm, sob a concentração estimada de 96,87 mg/mL. Neste estudo, os halos de inibição de *P. guajava* (extrato 1) foram de 8-10 mm para a maioria das cepas testadas sob as referidas CBM. Porém, foram encontradas na literatura Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de 0,25 mg/mL para extratos hidroetanólicos de casca de *P. guajava* (goiabeira) no trabalho de Sanches et al.²¹ feito com microdiluição. A CIM pode ser feita a partir de microdiluições ou macrodiluições de antibacterianos¹⁶, porém Hindler e Munro¹⁹ afirmaram que a macrodiluição é preferível à microdiluição, pois possibilita um melhor controle das variáveis técnicas e teste de inóculos maiores. Os experimentos aqui apresentados foram modelados para macrodiluições e devido à turbidez dos inóculos (que sofreu interferência dos extratos testados), optou-se por um teste mais seguro, o de CBM, no qual é avaliado o crescimento real de cada tubo, mesmo aqueles com aparente ausência de crescimento, ou seja, sem turbidez.

Betoni et al.⁶ conseguiram diminuir a CIM de 0,52 para 0,13 mg/mL utilizando associações de extrato etanólico de folhas de *P. guajava* (goiabeira) com antibióticos. Burkill²² revelou a presença de 20-30% de taninos na casca da árvore de *P. guajava* (goiabeira), além de outros constituintes como flavonóides, óleos essenciais, álcoois sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides, também referidos por Ilha et al.²³. Destes, poderiam ser antibacterianos alguns taninos, alguns flavonóides (como a quercetina) e certos óleos essenciais^{24,25}.

As CBM descritas para *P. umbellata* (pariparoba) (extrato 3) neste estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Duarte et al.²⁶ descreveram para extratos de *P. marginatum* uma “forte inibição” com CIM de 0,2 mg/mL, a CIM de Piper aduncum contra *S. aureus* foi de 1,8 mg/mL.

Dos compostos químicos presentes em *P. umbellata* (pariparoba), aqueles classificados como óleos essenciais, taninos, xantonas, fenilpropanóides, flavononas, flavonóis e flavonas têm apresentado compostos da mesma classe com atividade antimicrobiana^{24,25}.

Os intervalos de confiança para *H. courbaril* (jatobá) (extrato 2) deixaram evidente a superioridade dessa espécie, em relação às outras, segundo o modelo experimental adotado neste trabalho.

As CBM do extrato hidroetanólico de *H. courbaril* (jatobá) (extrato 2) observadas neste experimento estão na Tabela 2. Souza et al.²⁷, para CIM de 2,5 mg/mL, encontraram 54,0 % de inibição de cepas de *Staphylococcus* sp por extratos de *H. courbaril* (jatobá). Fernandes et al.¹⁰ encontraram 63,3 % de inibição das espécies bactérias Gram-positivas com concentrações estimadas de 1,25 mg/mL, relatados para a mesma espécie. Neste estudo os halos de inibição de crescimento bacteriano do extrato 2 (*H. courbaril*) foram de 8-10 mm.

Os dados encontrados neste experimento estavam de acordo com os estudos referidos na literatura científica (a colocação das fontes daria maior confiabilidade à afirmação).

Segundo Fernandes et al.¹⁰, a *H. courbaril* possui componentes químicos como taninos e flavonóides, que, provavelmente estão associados à atividade antimicrobiana. Muitos trabalhos descreveram os efeitos farmacológicos dos flavonóides, principalmente, a atividade antimicrobiana²⁸.

CONCLUSÃO

Os extratos hidroetanólicos de *Bidens pilosa* (extrato 5) (picão-preto, planta toda), *Psidium guajava* var. *pomifera* (extrato 1) (goiabeira, casca da árvore), *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (extrato 2) (jatobá, casca da árvore) e *Pothomorphe umbellata* (extrato 3) (pariparoba, folhas) possuem atividade antibacteriana ou bactericida contra cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA.

Comparando os extratos, para as concentrações preparadas no modelo experimental deste estudo, foi possível concluir que: *B. pilosa* apresentou menor ação; *P. guajava* var. *pomifera*, *P. umbellata*, obtiveram resultados muito próximos entre si, com ações de caráter mediano; e *H. courbaril* var. *stilbocarpa* mostrou ação muito superior aos outros extratos e ao controle com etanol.

A ação dos extratos dessas plantas nos experimentos descritos aqui seria uma evidência de que preparações simples de extratos hidroetanólicos, feitos a partir de plantas secas, podem apresentar ação antibacteriana detectável *in vitro*, contudo novos estudos devem ser realizados para avaliar a segurança dos extratos dessas espécies de plantas para uso, segundo as tradições populares, e detectar os princípios ativos responsáveis por tais ações nesses extratos. Portanto, as plantas das

espécies *Bidens pilosa*, *Psidium guajava* var. *pomifera*, *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* e *Pothomorphe umbellata* poderiam ser consideradas objeto de estudo, com ênfase sobre suas potencialidades como fornecedores de PA antibacterianos.

Este estudo constituiu um indicativo de que a preservação dos ecossistemas naturais e da biodiversidade brasileira é uma questão não só de qualidade ambiental, mas também de manutenção e busca da saúde, por meio da descoberta de princípios ativos ainda desconhecidos, mas que estariam presentes na natureza.

AGRADECIMENTOS

À Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo, à FCMSCSP (Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo) pela oportunidade e apoio à pesquisa, à Probac do Brasil® pelas doações de material, e à UniAnchieta pelo apoio e permissão de uso do Laboratório de Química

REFERÊNCIAS

- Mimica LMJ, Gonçalves MJPR, Mimica I, Rodrigues A. Sensibilidade comparativa de *Staphylococcus aureus* intra-hospitalares a vários antimicrobianos (1981-1982). São Paulo (SP): AMH FCMSCSP; 1982, p. 44.
- Schlessinger D, Eisenstein BI. Bases Biológicas da Ação Antibacteriana. In: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G (Editores). Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Guanabara Koogan; 2002. p.642.
- Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;104:164-7.
- Gutierrez RM, Mitchel S, Solis RV. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2008;117:1-27.
- Gonçalves FA, Andrade Neto M, Bezerra JNS, Macrae A, Sousa OV, Fonteles-Filho AA, et al. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, Leaf Extracts on Diarrhea-Causing Enteric Bacteria Isolated from Seabob Shrimp. *Rev Inst Med Trop*. 2008;50 (1):11-5.
- Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Stasi LC, Fernandes JR A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):387-90.
- Dechoum MS. Crescimento Inicial, Alocação de Recursos e fotossíntese em Plântulas das Espécies Vicariantes *Hymenaea courbaril* var *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang. (jatobá) e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (jatobá-do-cerrado) (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) [tese de doutorado]. Campinas (SP): Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 2004.
- Lima AF, Azevedo KS, Campos CAS, Taveira US, Rocha AA. Manejo da seiva do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por famílias tradicionais na Reserva Extrativista Chico Mendes, Acre – Brasil. In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil; 2007; Caxambú, MG.
- Pereira CKB, Rodrigues FFG, Mota ML, Sousa EO. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2007; Águas de Lindóia, SP. 10. Fernandes TT, Santos ATE, Pimenta FC. Atividade Antimicrobiana das Plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev Patol Trop*. 2005;34(2):113-22.
- Sponchiado Júnior EC. Atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata* [tese de doutorado]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2006.
- Isobe T, Ohsaki A, Nagata K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brazilian medicinal plant, Pariparoba. *Yakugaku Zasshi*. 2002;122(4):291-4.
- Taylor L. The Healing Power of Rainforest Herbs: *Bidens pilosa*. Atualização em 2005. [acesso 2007 Fev 15]. Disponível em: [www.rain-tree.com].
- Rabe T, van Staden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J Ethnopharmacol*. 1997;56:81-7.
- Schuch LFD. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e com dermatófitos [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement M100-S20, 30(1), Wayne, PA; 2011.
- Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões CMO, colocar o nome dos 6 primeiros autores et al., organizador. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/ UFSC; 2003. p.228 – 45.
- Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. Fitoterapia Racional: Um Guia de Fitoterapia para as Ciências da Saúde. 4ª ed, Ed. Manole; 2002; p. 1-40
- Hindler JF, Munro S. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook [CD-ROM]. 2ª ed. ASM Press; 2004.
- Valdes HAL, Rego HPL. *Bidens pilosa* Linné. *Rev Cubana Plant Med*. 2001;1:28-33.
- Sanches NR, Cortez DAG, Schiavini MS, Nakamura CV, Dias-Filho BP. An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.). *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48(3): 429-36.
- Burkill HM. The useful plants of West Tropical Africa. 2ª ed. Families M-R. Royal Botanic Gardens Kew. 1997;(4):89-93.
- Ilha SM, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Issac VBL, et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(3):387-93.
- Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis, In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, organizador. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/ UFSC; 2003. p.467-96.

24. Simões CMO, Schenkel, EP, Gosmann, G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, organizador. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/UFSC; 2003. p.1102.
25. Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn*. 2004;14(1):6-8.
26. Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2004;90:135-43.
27. Middleton EJR, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673-751. Occupational Safety and Health Administration. Toxic Metals, Occupational Safety and Health Administration. Washington, DC: US Depart of Labor; 2004. [acesso 2010 Mar 18]. Disponível em: [http://www.osha.gov].
28. Institute of Medicine of the National Academies. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington, DC: The National Academy Press; 2001. p. 773.
29. Yusa V, Suelves T, Ruiz-Atienza L, Cervera ML, Benedito V, Pastor A. Monitoring programme on cadmium, lead, and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. *Food Addit Contam: Part B*. 2008;1(1): 22-31.
30. World Health Organization - WHO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Foods. Fifth Session. [acesso 2011 Out 27]. Disponível em: [http://www.cclac.org/documentos/CCCF/2011/3%20Documentos/Documentos%20Ingles/cf05_INF.pdf]
31. United States Environmental Protection Agency - US EPA. What you need to know about mercury in fish and shellfish. EPA-823-F-04-009, 2pp; 2004. [acesso 2010 Mar 18]. Disponível em: [http://www.epa.gov/waterscience/fish/MethylmercuryBrochure.pdf]
32. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. IBGE, Coordenação de Trabalho e rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2011. p.150.