

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JEFERSON JÚNIOR DA SILVA

TRIAGEM ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS CONTRA
ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Staphylococcus aureus* OXACILINA
RESISTENTES (ORSA).

ALFENAS / MG

2013

JEFERSON JÚNIOR DA SILVA

TRIAGEM ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS CONTRA
ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Staphylococcus aureus* OXACILINA
RESISTENTES (ORSA).

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.
Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco.
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

ALFENAS / MG

2013

Silva, Jeferson Júnior da.

Triagem antimicrobiana de extratos vegetais frente a isolados ambientais de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistentes (ORSA). / Jeferson Júnior da Silva. - 2013.

54 f. -

Orientador: Jorge Kléber Chavasco.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Extratos Vegetais. 2. Produtos com Ação Antimicrobiana. 3. MRSA. 4. Testes de Toxicidade. 5. Testes de Sensibilidade Microbiana. I. Chavasco, Jorge Kléber. II. Título.

CDD: 579.353



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3298-1000 . Fax: (35) 3298-1063



JEFERSON JÚNIOR DA SILVA

TRIAGEM ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS CONTRA
ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Staphylococcus aureus* OXACILINA
RESISTENTES (ORSA).

A Banca examinadora abaixo -
assinada aprova a Dissertação
apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em: 8 de março de 2013.

Prof^o. Jorge Kleber Chavasco- Orientador

Instituição: UNIFAL-MG - Assinatura: 

Prof^o. Maulori Curie Cabral

Instituição: UFRJ - Assinatura: 

Prof^o. João Evangelista Fiorini

Instituição: UNIFENAS - Assinatura: 

Dedico este trabalho à minha família, aos meus orientadores e amigos de laboratório e a todos os que me fortaleceram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as bênçãos oferecidas à minha pessoa. Agradeço a meus pais e minha família pelo exemplo de caráter e fortaleza que são. Agradeço a meus Orientadores Dr. Jorge Kleber Chavasco e Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo por serem os exemplos principais de minha formação profissional. Agradeço a cada amigo de laboratório com os quais aprendi o valor do companheirismo na execução de qualquer que seja a atividade. Enfim, agradeço a todos os responsáveis direta ou indiretamente pela minha prosperidade.

Esta Dissertação tem o apoio de FAPEMIG (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* – APQ-3897-4.03/07).

É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito; e vivem nessa penumbra cinzenta sem conhecer nem vitória nem derrota.

Franklin D. Roosevelt

RESUMO

Atualmente, *S. aureus* metilicilina resistente (MRSA) é o mais importante patógeno nosocomial, devido à sua multirresistência aos antimicrobianos disponíveis, o que direciona esforços na busca de novas alternativas terapêuticas. Neste estudo foi avaliada a ação antimicrobiana de extratos vegetais contra isolados MRSA do ambiente aéreo, identificados previamente. Os extratos de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugenia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora* foram obtidos por maceração em álcool etílico a 70%, submetidos à rota evaporador e liofilizados. Estes foram testados quanto à ação antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar. Posteriormente, realizou-se a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo. Testes de toxicidade em cultura celular e análise fitoquímica dos extratos complementaram a análise, onde a maioria dos extratos apresentou baixa toxicidade, presença de alcalóides, flavonóides, taninos e saponinas. Os extratos da folha, casca do fruto e caule de *Plinia cauliflora*, caule e folha de *Eugenia pyriformis*, caule, polpa, casca do fruto e folha de *Annona crassiflora* e flor, caule e folha de *Bidens pilosa* foram efetivos contra as amostras multirresistentes analisadas, sendo que o extrato de *Bidens pilosa* folha apresentou a melhor atividade antibacteriana *in vitro* por ambos os métodos avaliados.

Palavras chave: Extratos Vegetais. Produtos com Ação Antimicrobiana. MRSA. Testes de Toxicidade. Testes de Sensibilidade Microbiana.

ABSTRACT

Currently *S. aureus* methicillin resistant (MRSA) is the most important nosocomial pathogen due to multidrug resistance to available antimicrobials, which directs efforts in the search for new therapies. In this study we evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of plant extracts against ambient aerial isolates of MRSA previously identified. The hydroethanolic extracts of *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugenia pyriformis*, *Heliconia rostrata* and *Plinia cauliflora* were obtained by steeping in ethyl alcohol, 70%, evaporated and lyophilized. The antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution broth. Toxicity testing in cell culture and phytochemical analysis complemented the analysis where most of the extracts showed low toxicity, presence of alkaloids, flavonoids, tannins and saponins. The extracts of leaf, stem and fruit rind of *Plinia cauliflora*, stem and leaf of *Eugenia pyriformis*, stem, pulp, fruit rind and leaf of *Annona crassiflora* and flower, stem and leaf of *Bidens pilosa* were effective against multidrug-resistant samples analyzed being that the leaf extract of *Bidens pilosa* showed the best *in vitro* anti-MRSA activity by both methods evaluated.

Keys words: Plant Extracts. Products with Antimicrobial Action. MRSA. Toxicity Tests. Microbial Sensitivity Tests.

Figura 01	<i>Annona crassiflora</i> Mart. (Marolo)	15
Figura 02	<i>Bidens pilosa</i> L. (picão preto)	16
Figura 03	<i>Eugênia pyriformis</i> Cambess (uvaia)	17
Figura 04	<i>Heliconia rostrata</i> (papagaio)	17
Figura 05	<i>Plinia cauliflora</i> (jaboticabeira)	18
Figura 06	Crescimento de <i>S. aureus</i> em Manitol Salt Agar	20
Figura 07	Crescimento de <i>S. aureus</i> em ágar Vogel Jonhson	21
Figura 08	Antibiograma de cepas de <i>S. aureus</i>	28
Figura 09	Determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais segundo metodologia de Silva et al 2010	28
Figura 10	Determinação da CIM de extratos de Flor de <i>B. pilosa</i>	33
Figura 11	Determinação da atividade citotóxica de extratos	34
Figura 12	Células normais da linhagem C6/36	34
Figura 13	Células alteradas da linhagem C6/36 pelos extratos vegetais de semente de <i>E. pyriformes</i> na concentração de 5mg/mL	34

LISTA DE FIGURAS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Novos agentes antimicrobianos	13
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAL E MÉTODO	20
3.1	Obtenção das cepas ORSA	20
3.2	Confirmação dos espécimes de ORSA	21
3.3	Antibiograma dos isolados ORSA	22
3.4	Obtenção dos extratos vegetais	22
3.5	Cadastramento da Planta	23
3.6	Preparo dos extratos das plantas.	23
3.7	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos	23
3.8	Avaliação da atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular	24

3.9	Avaliação do perfil fitoquímico dos extratos	25
3.10	Análise estatística dos resultados	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Confirmação das espécimes de ORSA.	26
4.2	Resistência	27
4.3	Determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais	28
4.4	Determinação da Concentração inibitória Mínima de extratos vegetais	32
4.5	Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular	33
4.6	Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais	35
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICES	44

1 INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus aureus* são encontrados colonizando a microbiota natural, principalmente da pele, podendo tornar-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. Os traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea constituem-se na principal causa de mudança de comportamento desse microrganismo para agente etiológico mais comum de infecções cutâneas. É responsável por uma grande variedade de infecções, como infecções na pele e no subcutâneo, infecções pós-cirurgias, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia. Além disso, é uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais, bem como de infecções comunitárias que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (GELATTI et al; 2009)

A partir da década de 40 houve um grande aumento na incidência de infecções associadas ao ambiente hospitalar, causada por linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes, algumas apresentando resistência a mais de 20 compostos antimicrobianos, incluindo anti-sépticos e desinfetantes (LYON; SKURRAY, 1987; PEARCE et al; 1999)

Os *Staphylococcus aureus* possuem três mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, clinicamente significativos. O primeiro é a inativação da penicilina através da hidrólise do anel β -lactâmico pela penicilinase ou β -lactamase. O segundo mecanismo é igualmente efetivo contra penicilinas β -lactamase sensíveis e resistentes tais como a oxacilina e a meticilina, pois envolve a baixa afinidade à substância PBPs (Penicilin binding protein), uma vez que o antibiótico dificilmente se ligará a essa proteína. O último mecanismo é a tolerância desse microrganismo aos efeitos antibacterianos dos antibióticos β -lactâmicos por hiperprodução de β -lactamase (SABATH, 1982; NETO et al., 2000).

Em poucos anos foram relatadas as primeiras linhagens penicilina resistente de *S. aureus* e em 1946 foi estimado que 60% das linhagens isoladas em hospitais do Reino Unido eram resistentes a esse antimicrobiano (LYON; SKURRAY, 1987). A sucessiva introdução da estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e dos macrolídeos, também conseguiu combater com sucesso os microrganismos resistentes (PLORDE; SHERIS, 1974), porém as linhagens, além de serem resistentes às penicilinas, pela

produção da β -lactamase (penicilinase), adquiriram resistência a esses novos antibióticos.

O emprego da meticilina e outras penicilinas sintéticas como a oxacilina, iniciado em 1959, representou etapa significativa na terapia antiestafilocócica em âmbito mundial. Contudo, a identificação de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA – Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) foi registrada em 1962, espalhando-se rapidamente pelo mundo nos anos subsequentes. A partir da década de 1980, as ocorrências de infecções por MRSA aumentaram consideravelmente em vários países, sendo alguns destes detectados na Austrália (surgimento em 1985 e disseminação entre 1994-1997), na Bélgica e em Manitoba (surgimento em 1993). Em 1994, Espanha, França e Itália eram considerados os países com maiores índices de infecção por MRSA. Ainda hoje, se observa número crescente de estudos relacionados à epidemiologia deste microrganismo em centros que comportam pacientes imunocomprometidos, que sofreram intervenção cirúrgica, que foram transplantados ou que são portadores de queimaduras graves ressaltando a necessidade de desenvolvimento de fármacos que sejam eficazes no tratamento dessas infecções (MASUNARI; TAVARES, 2006)

A crescente incidência de resistência à oxacilina pelos *Staphylococcus aureus* tornou-se um sério problema clínico e terapêutico. MRSA hospitalar (HA-MRSA) são geralmente resistentes a muitos agentes antimicrobianos, como as quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, e macrolídeos, dificultando o tratamento e prolongando a permanência do paciente no hospital (AIRES et al., 2004). A resistência à meticilina é determinada em estafilococos pelo SCCmec (cassete cromossômico estafilocócico MEC) que transporta o gene *mecA*, que codifica o PBP 2A ou 2', que por sua vez confere resistência cruzada a todos os antibióticos β -lactâmicos (DEURENBERG et al., 2007).

Além da vasta resistência aos mais diversos antibióticos, o *S. aureus* pode ainda apresentar resistência a íons metálicos, como arsenato, cádmio e mercúrio, e abiocinas, tais como acriflavina, cloreto de benzalcônio, ceftriaxona e clorexidina. A seleção e manutenção destas marcas de resistência se explicam pela presença desses agentes como poluentes urbanos ou industriais, ou ainda através do uso hospitalar como antisséptico (MAIA et al., 2008).

O aumento da prevalência de infecções hospitalares causadas por MRSA durante as duas últimas décadas em todo o mundo tem sido associado com a ocorrência disseminada de linhagens específicas de MRSA internacionais (AIRES et al., 2004). Com base nas técnicas de genotipagem de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), SCCmec datilografia e digitação de sequência multilocus, vários clones HA-MRSA pandêmicos foram identificados, incluindo o clone ibérico (USA500; ST247-SCCmecIA), o clone epidêmico brasileiro- BEC (ST239-SCCmecIIIA), o clone New York / Japão (USA100; ST5-SCCmecII), o clone pediátrico (USA800; ST5-SCCmecIV ou SCCmecVI), e o clone EMRSA-16 (USA200; ST36-SCCmecII) (AIRES et al., 2004; DEURENBERG et al., 2007; McDOUGAL et al., 2003). Estudos realizados no Brasil mostraram o predomínio do BEC, um clone multirresistente descrito primeiramente no Brasil em 1992, que foi responsável de 70-80% do total de isolados MRSA em hospitais brasileiros (TEIXEIRA et al., 1995; DOS SANTOS SOARES et al., 2000)

O MRSA, que foi considerado anteriormente um patógeno exclusivamente hospitalar (HA-MRSA), foi isolado de indivíduos na comunidade sem fatores de risco identificados e nenhuma relação epidemiológica para o MRSA comunidade-associado (CA-MRSA) em 1990 (REMONATTO et al., 2007). Além disso, durante os anos mais recentes, o MRSA comunitário (MRSA-CO) também aumentou; e medidas de controle dos antimicrobianos para reduzir a incidência de 59% de MRSA-CO nas infecções de pele e partes moles foram relatadas pelos serviços de emergência em 11 cidades dos EUA (MORAN et al., 2006) fazendo do MRSA o agente isolado com maior frequência neste tipo de patologia. Esses dados, junto com o risco de desenvolvimento de *S. aureus* resistente a glicopeptídeos, tornam essencial a necessidade de instituição de medidas eficazes em nível mundial para a prevenção da transmissão de MRSA, tanto nos hospitais como na comunidade.

A gestão das infecções hospitalares e da comunidade tornou-se cada vez mais difícil porque ambos HA-MRSA e CA-MRSA foram isolados tanto no hospital quanto na comunidade. A maioria dos profissionais de saúde colonizados são portadores transitórios, mas podem se tornar portadores persistentes, especialmente quando têm lesões de pele. Assim, a identificação e o tratamento de colonizados pode reduzir a incidência de MRSA, quando não identificados pacientes colonizados,

estes podem atuar como um reservatório em situação endêmica (BEN-DAVID et al., 2008).

Embora a dimensão exata da doença relacionada ao MRSA permaneça desconhecida, existe consenso entre a maioria dos infectologistas que as infecções por MRSA são um problema importante clínico e de saúde pública (CIMOLAI, 2007; STRUELENS et al., 2009).

Na América Latina, apesar da variabilidade entre os países significar que os dados sobre a incidência de MRSA em determinados hospitais podem não ser representativos da situação nacional, em geral é aceito que a prevalência de infecções por MRSA na região seja provavelmente alta (GUZMÁN- BLANCO et al., 2009). No entanto, apesar dos dados epidemiológicos e microbiológicos publicados, não se chegou à conclusão de qual é a melhor abordagem para a prevenção e o controle da endemia de MRSA (RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010).

Muitas linhagens de MRSA apresentaram-se sensíveis apenas ao tratamento com vancomicina, mostrando-se resistentes aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas e outros quimioterápicos. Recentemente, entretanto, foi isolado tanto em laboratório como em clínica linhagens mutantes com sensibilidade reduzida à vancomicina. Obteve-se, inclusive, a transferência em laboratório de plasmídeo R, com determinante de resistência à vancomicina, para *S. aureus*, no qual felizmente o plasmídeo não se estabilizou. Esses dados antecipam os gravíssimos problemas que poderão trazer essas linhagens multirresistentes, caso não surjam novos antimicrobianos ou terapias alternativas para combatê-los (COHEN, 1976).

1.1 Novos agentes antimicrobianos

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Além disso, a utilização dos dados de estudos desta natureza como primeiro passo na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes provenientes de plantas é de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no

desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (MENG et al., 2000; HO et al., 2001; MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES ; FARIA, 2007)

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário são reconhecidas empiricamente há séculos e foram comprovadas cientificamente apenas. A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenoides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muuroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica. Apesar dos mecanismos de ação estarem pobremente caracterizados, esta parece estar associada ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995)

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO et al., 2003).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macro diluição e micro diluição. Para determinar a CMI(Concentração Mínima Inibitória) ou a CMB (Concentração Mínima Bactericida) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998. As variações referentes à determinação da CMI de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para

expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico. No Brasil, Santos et al.(1996) isolaram e determinaram a estrutura de uma nova acetogeninase, uma substância protótipo, a partir do extrato etanólico de sementes de *Annona crassiflora* Mart.(marolo) (Figura 01), que foi denominada crassiflorina ou araticulin. A mesma acetogeninase foi também isolada nos EUA, a partir da espécie *Annona bullata*, e na França, a partir da espécie *Annona cherimolia*, que nestes países recebeu o nome de bulatacina e cherimolina-2, respectivamente (CORTES et al., 1993). Muitos têm sido os trabalhos que procuram elucidar as ações biológicas das acetogeninases: Rupprechet et al. (1990) e Zafra-Polo et al. (1998) atribuem-lhes atividades citotóxica, antimetabólica, antimicrobiana e antimalárica; Morre et al (1995) e Oberlies et al (1997) relataram a atividade antitumoral em testes *in vitro* e *in vivo* em diferentes linhagens de células neoplásicas, sendo que algumas acetogeninases foram efetivas na inativação de linhagens de células multirresistentes a algumas drogas sem causar toxicidade em outras células humanas. Mais recentemente, Yuan et al (2003) pesquisaram os efeitos biológicos da annonacin, uma acetogeninase isolada a partir de sementes da espécie *Annona reticulata*. Neste estudo, eles verificaram que esta acetogeninase foi capaz de induzir a transcrição de p21 e bloquear o ciclo celular de células neoplásicas na fase G1. Além disso, a annonacin foi significativamente mais citotóxica às células neoplásicas que se encontravam na fase S.

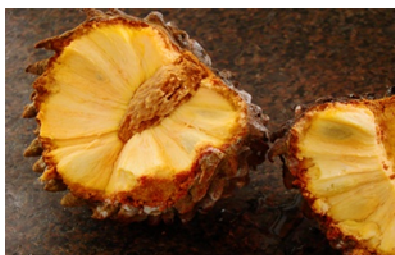


Figura 01 *Annona crassiflora* Mart. (Marolo)
Fonte: <http://lulussweetsecrets.blogspot.com.br/2011/04/marolo-candies-and-ice-cream.html>
acesso em 5/7/2012

Bidens pilosa, popularmente chamada de picão preto (Figura 02), é amplamente utilizada na medicina tradicional como anti-gripal, controle da diabetes e tratamento da gastroenterite (CHANG et al., 2001). A planta é anual, ereta, com ramificações herbáceas que crescem até 1,5 m de altura, minuciosamente peludas nas hastes. As folhas são opostas, com dentes simples e ovais, compostas de quatro a sete folhas lanceoladas (MORTON, 1962; GEISSBERGER; SEQUIN, 1991). É amplamente distribuída nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (DEBA et al., 2008). No Brasil, *Bidens pilosa* é encontrada em praticamente todo o território, com maior concentração nas áreas agrícolas da região Centro-Sul, onde se constitui numa das mais importantes plantas infestantes (KISSMANN; GROTH, 1992). Extensas pesquisas nas últimas décadas têm mostrado que *Bidens pilosa* possui atividades antiviral (CHIANG et al., 2003.), antifúngica (MOTSEI et al., 2003.; DEBA et al., 2008) e antibacteriana (GEISSBERGER; SEQUIAN, 1991; KHAN et al., 2001; ROJAS et al., 2006). *Bidens pilosa* L. é utilizada na forma de chá (infusão), sendo utilizadas todas as partes da planta, com muitas indicações, mas as mais comuns são antisséptico bucal e anti-ictérica (ROJAS et al., 2006).



Figura 02 *Bidens pilosa* L. (picão preto)
Fonte: <http://afloresta.com.br/picao>
Acesso em 15/07/2012

Estudo recente realizado sobre a composição química do óleo essencial das flores e frutos de *Eugenia pyriformis* (uvaia) detectou a presença constante dos monoterpenos terpinen-4-ol e alfa-terpineol embora em pequenas quantidades (1,3 e 5,4 %, respectivamente) no óleo essencial da fruta (Figura 03). Outros dois componentes importantes para o referido óleo foram limoneno (12,4 %) e óxido de cariofileno (16,2 %) por não serem comumente encontrados em espécies de Myrtaceae (STIEVEN et al., 2009)



Figura 03 *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaia)
 Fonte: <http://familiabelle.blogspot.com.br/p/agrofloresta-e-frutas-nativas.html> acesso em 5/7/2012

O gênero *Heliconia* é muito pouco estudado e ainda não é certo o número de espécies existentes, porém estima-se que haja entre 150 a 250 espécies (Marques et al. 2004) .A utilização de percolados etanólicos de rizomas secos de *Heliconia rostrata* (Figura 04), para verificar potencial inibitório frente ao veneno de *Bothrops asper* mostrou que a espécie vegetal tem atividade anticoagulante significativa (ESTRADA et al; 2009)



Figura 04 *Heliconia rostrata* (papagaio)
 Fonte: <http://www.hear.org/starr/images/image/?q=071024-0406&o=plants> em 5/7/2012

A espécie *Plinia cauliflora* Berg., (Figura 05), conhecida popularmente como jabuticaba paulista, jabuticaba assú (ASCHERI *et al.*, 2006) ou jabuticaba ponhem (BRUNINI et al., 2004), é uma planta nativa do Brasil, da Mata Atlântica, que vegeta diversos solos, podendo ser encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul (AGRA et al., 2007). Os estudos fitoquímicos da jabuticaba encontrados na literatura são poucos, estando reportada a presença de ácido ascórbico, taninos e glicosídeos cianidínicos e peonidínicos (REYNERTSON; 2006). Macedo-Costa (2008) observou resultados positivos do extrato do caule de *Plinia cauliflora* Berg. sobre cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus*

oralis, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus casei*. Diante destes resultados tão promissores faz-se necessário desenvolver mais pesquisas com este enfoque para a validação da atividade biológica dos extratos acima citados e para o desenvolvimento posterior de protótipos farmacêuticos eficazes e fármacos financeiramente viáveis e eficazes.



Figura 05 *Plinia cauliflora* (jaboticabeira)
Fonte: <http://www.plant-care.com/1594-jaboticaba.html>
acesso em 5/7/2012

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo:

- Avaliar a ação antibacteriana de extratos hidroetanólicos de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugenia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora* contra isolados de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistentes, de origens ambientais (Clínica Odontológica) previamente caracterizados e genotipados;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos analisados frente a isolados de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistentes;
- Determinar a toxicidade dos extratos frente à cultura celular destes extratos;
- Determinar a presença de compostos químicos com caráter antimicrobiano pré definido pela literatura.

3 MATERIAL E METODOS

A obtenção dos isolados ORSA foi realizada no ano de 2008 pelo Laboratório de Pesquisas em Genética e Biologia Molecular (UNIFENAS). A pesquisa foi realizada nos anos de 2011 e 2012 no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas(UNIFAL-MG) , e as etapas são divididas a seguir

3.1 Obtenção das cepas ORSA

Foram utilizadas 60 amostras ORSA isoladas, caracterizadas e mantidas no Laboratório de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular da Universidade José do Rosário Velano em Alfenas-MG provenientes de ambiente aéreo de clínica odontológica. Estes espécimes provenientes do ambiente aéreo foram coletados por meio de placas de Petri (90 mm ± 15 mm), contendo 20 mL de ágar Manitol salgado (Merck) (Figura 06), expostas por 2 horas em dois turnos de trabalho, a partir de 2 horas após o início de cada turno, estrategicamente dispostas nas Clínicas Odontológicas. Logo após as coletas, essas placas foram conduzidas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular, onde foram incubadas a 35°C por 48 horas. Colônias indicativas de fermentação do manitol por *Staphylococcus* (i.e., presença de halo amarelo em torno das colônias) foram cultivadas em ágar BHI (Merck) a 35°C por 24 horas. A identidade da espécie *S. aureus* foi obtida empregando-se os métodos de microbiologia clássica, sendo estes a coloração de Gram e testes de catalase, coagulase (Coagu-Plasma, Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda.) e Dnase (Difco).



Figura 06 Crescimento de *Staphylococcus aureus* em Manitol Salt Ágar; a presença de halo dourado indica crescimento de *Staphylococcus* patogênico. Fonte: Do autor

Foi realizado teste confirmatório adicional para avaliação da resistência à oxacilina, sugestivo da presença do gene *mecA*, através da triagem em meio de cultura MHA suplementado com 684 mM NaCl (4% m/v) e oxacillin ($6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) conforme metodologia descrita previamente (NCCLS document M7-A6). Um inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de cada uma das colônias bacterianas conforme a escala 0,5 de McFarland de *S. aureus* recém-cultivadas em ágar BHI a 35°C por 18-24 horas. Com o auxílio de um alça (volume de $1 \mu\text{L}$) cada inóculo bacteriano foi semeado sobre ambos os meios de cultura ágar Mueller-Hinton adicionado de oxacilina-NaCl e ágar Mueller Hinton sem oxacilin-NaCl (controle experimental), numa área de 10-15 mm de diâmetro. Essas placas foram incubadas invertidas a 35°C por 24 horas e, posteriormente, e xaminadas quanto à presença de pequenas colônias (>1 colônia) ou um tênue crescimento bacteriano, indicativos de resistência a oxacilina. A linhagem padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923 sensível a oxacilina foi também usada a fim de assegurar a reprodutibilidade e precisão do teste de susceptibilidade de diluição em ágar.

3.2 Confirmação dos espécimes de ORSA

Os sessenta isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes foram inoculados em meio específico ágar Vogel Johnson (com telurito de potássio) (Figura 07) permanecendo em estufa por 48 horas onde foram observados aspectos morfológicos característicos (colônias negras). Para nova confirmação do isolamento, as amostras foram submetidas a testes bioquímicos e de coloração sendo estes método de Gram, catalase, Dnase e coagulase.



Figura 07 Crescimento de *Staphylococcus aureus* em ágar Vogel Johnson; o crescimento de colônias negras indica consumo metabólico de telurito de potássio indicativo de *Staphylococcus* patogênico
Fonte : Do autor

3.3 Antibiograma dos isolados ORSA

Para avaliação e confirmação do perfil de resistência dos sessenta isolados de ORSA, foi realizado o antibiograma utilizando os seguintes discos da marca "Sensidisc" com antibióticos utilizados na prática clínica: Amoxicilina com ácido clavulânico (30), Azitromicina (15), Ciprofloxacino (05), Clindamicina (02), Doxicilina (30), Norfloxacin (10), Oxacilina (10), Vancomicina (30) e Linezolida (30). Uma suspensão de cada isolado foi preparada em solução salina (NaCl 0,9 ou 150 mM) com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland e inoculadas em ágar Mueller-Hinton com auxílio de swab. Posteriormente foram inseridos os discos de antibióticos na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas por 18 horas em estufa a 37°C e realizou-se leitura manual dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano em volta dos discos, conforme método de Bauer e Kirby, (1966)

3.4 Obtenção dos extratos vegetais

Foi realizada a coleta de amostras do fruto, caule e folha de *Annona crassiflora* (marolo) no município de Alterosa-MG, no distrito de Divino Espírito Santo situado a latitude sul -21° 8' 50.18"S e longitude oeste -46° 5' 13.06"W no mês de março de 2011. A coleta das amostras de caule, folhas e frutos de exemplares adultos de *Eugenia pyriformis* (uvaia) foi realizada na zona rural do município de Alfenas – MG (21° 25' 44" S e 45° 56' 49" W) em janeiro de 2011. Amostras de folha, caule e fruto de exemplares adultos de *Plinia cauliflora* (jaboticaba) foram coletadas na cidade de Alfenas-MG (21°25'44"S, 45°56'49" W) em janeiro de 2011. A coleta das folhas, flores, pseudocaule e rizoma de *Heliconia rostrata* (papagaio de jardim) foram realizados na Chácara Cabo Verde, município de Areado-MG, latitude de 21° 24'39,44" S e longitude de 46° 08' 53,81"W. em janeiro de 2011. A coleta de exemplares de *Bidens pilosa* (picão preto) foi realizada no Bairro Jatobá na cidade de Pouso Alegre-MG (22°27'75"S, 18°45'90" W) em janeiro de 2011.

3.5 Cadastramento da planta

Após a coleta de cada planta, estas foram identificadas, cadastradas e arquivadas pelo Prof. Dr. Marcelo Pólo no Herbário UALF da Universidade Federal de Alfenas, recebendo os números do tomo da exsicata 1636 (*Heliconia rostrata*), 1401 (*Annona crassiflora*), 1637 (*Plinia cauliflora*), 1745 (*Bidens pilosa*) e 1459 (*Eugenia pyriformis*).

3.6 Preparo dos extratos das plantas

As partes das plantas (folhas, flor, raízes e caules) foram limpas e cortadas manualmente. Prepararam-se extratos hidroetanólicos na proporção de 20% peso/volume utilizando-se álcool etílico a 70%. Os extratos preparados foram macerados por sete dias e mantidos ao abrigo da luz, com agitação diária. Após maceração, passaram por filtração em filtro de “nylon” e após, em filtro de papel. Posteriormente, os extratos foram submetidos à concentração em rota-evaporador à pressão negativa de 500 mmHg e 60 °C. Após a concentração, os mesmos foram distribuídos em frascos com 5 mL, congelados e liofilizados. No momento do uso foram pesados e preparadas soluções aquosas na concentração de 100mg/mL.

3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

Os testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). A ação antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar segundo metodologia de Silva et al, 2010. Preparou-se uma suspensão bacteriana em soro fisiológico (solução de NaCl a 0,9%) com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland e inoculada na superfície do meio de cultura ágar Mueller Hinton com auxílio de swab. Quarenta microlitros dos extratos foram colocados nos poços de 4 mm de diâmetro feitos na placa de meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Após a

incubação, realizou-se a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, utilizando como controle positivo, solução de clorexidina a 0,12% e como controle negativo, água destilada.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os extratos foram submetidos ao teste de determinação do concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de micro diluição em caldo conforme metodologia proposta no documento M7A3 (CLSI, 2008). Para tanto os extratos foram diluídos no caldo Mueller Hinton em microplaca, a partir da concentração de 50 mg/mL até 0,39 mg/mL. Após 24 horas de incubação a 37°C foi realizada a leitura visual, observando a inibição ou crescimento bacteriano pela turvação do meio de cultura. Foi inserida aos testes para efeito comparativo a cepa padrão *S. aureus* (ATCC 6538).

3.8 Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular

A citotoxicidade foi avaliada através do método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em um composto colorido denominado formazan. Neste teste foram semeadas 1×10^4 células (derivadas de larvas de mosquito *Aedes albopictus*) por poço, em placas de 96 poços contendo meio de cultura L-15, acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após 24 h de incubação a temperatura ambiente, o meio de cultivo foi removido e adicionado à cultura 0,1 mL de meio L-15 contendo 1% de soro fetal bovino com diluições decrescentes dos extratos (5mg/mL a 0,039 mg/mL). As microplacas foram incubadas à temperatura ambiente por 48h. Após esse período acrescentou-se 10 μ L de MTT a uma concentração de 5mg/mL e incubou-se por 4 h a temperatura ambiente para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente houve remoção cuidadosa do meio de cultura e solubilização dos cristais de formazan pela adição de 100 μ L de dimetil sulfoxido (DMSO). A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 600 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada utilizando a formula $[(A-B) / A \times 100]$, onde A e B são valores das densidades ópticas das células controle e tratadas, respectivamente. A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi estimada a partir de curvas de

concentração-efeito após análise de regressão linear. (ARAUJO, et. al., 2008). Os testes foram realizados em duplicata juntamente com o controle da viabilidade celular.

3.9 Avaliação do perfil fitoquímico dos extratos

Na triagem fitoquímica foram pesquisados a presença de alcalóides pelas reações com reativo de Mayer, reativo de Dragendoff, reativo de Bouchardat e reativo de Bertrand. Para antraquinonas foi empregada a reação de Bornträger direta. Com flavonóides foi empregada a Reação de Shinoda e a reação com cloreto férrico. Para determinar taninos utilizaram-se as reações com cloreto férrico e acetato de cobre e precipitação de proteínas e alcalóides. Saponinas foram determinadas pela agitação do extrato aquoso com formação de espuma Rersistente (COSTA,1982).

3.10 Análise estatística dos resultados

Os testes de difusão em ágar foram feitos em triplicata e os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANAVA) e teste de Scott-Knott em software Sisvar Versão 5.3 DEX-UFLA à 5% de significância (As médias foram consideradas estatisticamente diferentes com valores de $p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Confirmação dos espécimes de ORSA

As amostras de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes foram submetidas à inoculação em meio específico de ágar Vogel Johnson para novo isolamento, e as amostras foram submetidas a testes para identificação de *Staphylococcus aureus*. Todos os isolados selecionados apresentaram-se positivos para todos os testes (Método de Gram, catalase, manitol, DNase e coagulase) confirmando sua identificação anterior. As amostras de ORSA analisadas neste experimento são provenientes do ambiente aéreo de clínica odontológica, onde a veiculação de patógenos é intensa devido à instrumentação utilizada, desde instrumentos de alta rotação até ar condicionado. Estes fatores tornam o ambiente clínico odontológico tão propenso a contaminações cruzadas quanto o ambiente hospitalar. A dispersão de gotículas contendo microrganismos torna a disseminação destes patógenos maior neste ambiente, reforçado pela alta rotatividade de pacientes e profissionais que podem atuar como veiculadores de patógenos clínicos para a população, como também responsáveis por trazer microrganismos para o ambiente clínico. (POWELL et al. , 2008; WALLIN et al. ,2008). Nos Estados Unidos, ORSA é responsável por aproximadamente 25% das infecções nosocomiais, e relatórios de infecções por ORSA adquiridos na comunidade estão aumentando (WALLIN et al., 2008) Em algumas instituições médicas, como hospitais da cidade de Nova York, MRSA é responsável por aproximadamente 29% das infecções nosocomiais e 50% das mortes associadas (RUBIN et al.,1999). Similarmente, a alta prevalência de MRSA em Shiraz e outras partes do Irã foram relatados (FOLAHZADEH et al. , 2009; JAPONI et al., 2004). Estes dados demonstram o quão importante são os isolados utilizados nesta pesquisa e o quão necessário são resultados satisfatórios com protótipos farmacêuticos contra estes isolados.

4.2 Resistência

Com os isolados devidamente caracterizados foi realizado o teste de antibiograma (Apêndice F). Destes, todos os sessenta (100%) isolados mostraram índices de resistência e/ou intermediários a um ou mais antibióticos, e nenhum isolado mostrou susceptibilidade microbiana a todos os antibióticos (Figura 08). A resistência a múltiplas drogas por estirpes de ORSA e sua intrínseca resistência a β -lactâmicos torna difícil e caro para o tratamento, o que justifica atribuíveis taxas de mortalidade por bacteremia causada por *S. aureus* no mundo desenvolvido ter subido até 30% (DAS et al. , 2007; KAECH et al. ,2006; POWELL et al. , 2008) Neste estudo, a análise por antibiograma revelou a resistência intrínseca de isolados ORSA contra oxacilina (β lactâmico), mas também revelou uma alta porcentagem de resistência contra azitromicina (macrolídeo) (53,3 %), e maior porcentagem de resultados intermediários à ciprofloxacina (quinolona)(56,8%) e a clindamicina (lincosamida)(58,4%). Uma maior porcentagem das amostras analisadas apresentou-se sensíveis contra amoxicilina com ácido clavulânico (β lactâmico associado a inibidor de β lactamase)(60%), doxiciclina (tetraciclina)(83,4%), norfloxacin (fluoroquinolonas)(76,6%), vancomicina (glicopeptídeo)(60%) e linezolida (oxazolidinonas)(91,7%), porém não foi observada em nenhum dos antibióticos empregados com exceção da oxacilina uma unanimidade de resultado. A ausência deste padrão reforça as afirmativas de infectologistas que alertam sobre o risco de erro da terapia antimicrobiana quando aplicada contra isolados multirresistentes, fato que pode ocorrer no tratamento de infecções de caráter odontológico, já que na maioria dos casos as clínicas odontológicas adotam protocolos de tratamento fixos que podem ser ineficazes contra cepas resistentes (GELATTI et al. ,2009).



Figura 08 Antibiograma de cepas de *Staphylococcus aureus* Oxacilina resistentes. Fonte: Do autor.

4.3 Determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais

Após a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, em volta dos poços (Figura 09), estes foram devidamente avaliados pela presença ou ausência de halo de inibição frente aos sessenta isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes. Todos os extratos de *Heliconia rostrata*, de semente de *Annona crassiflora*, caule e raiz de *Bidens pilosa* não apresentaram atividade antibacteriana contra as amostras de ORSA analisadas. Os extratos da folha, casca do fruto e caule de *Plinia cauliflora*, do caule e folha de *Eugenia pyriformis*, caule, polpa, casca do fruto e folha de *Annona crassiflora* e flor, flor e folha de *Bidens pilosa* foram efetivos contra as amostras multirresistentes analisadas, ou seja, apresentaram halos de inibição do crescimento bacteriano (Apêndice A).



Figura 09 Determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais segundo metodologia de Silva *et al* 2010 . Fonte : Do autor

Espécies de *Staphylococcus* têm sido reconhecidas como tendo resistência antimicrobiana crescente e preocupante. Para pacientes, a resistência aos

antibióticos aumenta a morbidade e a mortalidade, enquanto que para as instituições de saúde significa aumento de custos. No que diz respeito à importância clínica crescente dada a infecções nosocomiais e comunidades associadas e o desenvolvimento progressivo de resistência a antimicrobianos, um grande número de pesquisas científicas enfatizando as propriedades antibacterianas de produtos de plantas tem sido realizadas (COUTINHO et al, 2008) . Mattana et al. observou *S. aureus* resistente a Oxacilina altamente susceptíveis à extratos de acetato de etila e etanólico de *Acacia aroma* , pelo método de difusão em ágar(MATTANA et al , 2010). Ele também observou que extratos etanólicos apresentavam maior grau de atividade antimicrobiana, comparado a extratos tendo como solvente apenas a água. Os extratos utilizados nesta pesquisa foram submetidos à maceração por álcool etílico a 70% e foi observado um ótimo desempenho antimicrobiano nos testes por difusão em ágar, confirmando a afirmativa descrita por Mattana et al. (2010) provavelmente devido ao álcool extrair maior números de substâncias polares e apolares. Mandal et al., (2011) também observou atividade anti MRSA em extratos etanólicos de plantas indianas (*Cuminum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum cyminum*) que apresentaram halos de inibição que abrangeram de 22-27 mm, 19-23 mm e 9-15 mm, respectivamente. Salvagnini et al. (2008), observou, através das técnicas de “template” e difusão em disco atividade de *Myrtus communis* para as linhagens de *Staphylococcus aureus* obtendo-se resultados de halos de inibição de 15 e 12 mm, respectivamente, segundo a técnica. Coutinho et al., (2008) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Hyptis martiusii* Benth contra cepas *S. aureus* e *S. aureus* resistentes a meticila *in vitro*. Os diâmetros das zonas de inibição variaram de 13 - 20 mm. Com base nestas afirmações a maioria dos extratos analisados nesta pesquisa foi efetivo contra às cepas MRSA, pois a faixa média de inibição variou entre 8,68 e 16,7 e assim como os trabalhos descritos anteriormente, propõe novos protótipos antimicrobianos eficazes e naturais. Embora a solubilidade dos bioativos constituintes para cada extrato testado apresente-se como um fator preponderante nos testes de triagem antibacteriana pelo método de difusão em ágar, os valores de halos de inibição apresentados são concordantes com os da literatura.

Dos extratos avaliados pela técnica de difusão em ágar, o extrato de *Bidens pilosa* folha apresentou a maior média de halos de inibição de crescimento (16,7mm, com $p < 0,05$) contra os isolados de ORSA utilizadas no experimento (n=60), seguido

por *Bidens pilosa* flor (14,1mm), *P. cauliflora* folha (13,4 mm) e *E. pyriformis* folha (13,3 mm), que, estatisticamente, apresentaram entre si a mesma média de halos ($p>0,05$). Apenas *Bidens pilosa* folha apresentou-se estatisticamente, superior em efetividade inibitória contra os isolados ambientais, que o controle positivo, a clorexidina 0,12%, que apresentou média de halos de 15,35 mm.

Na comparação da atividade dos extratos contra *S. aureus* (ATCC 6538) e os isolados, pela técnica de difusão em ágar, a média geral dos halos produzidos pelos extratos avaliados frente a cepa padrão (11mm), foi superior que contra ORSA (7mm), portanto a cepa padrão (ATCC) mostrou-se mais sensível aos extratos que os isolados ($p<0,05$). O extrato mais ativo, tanto para *S. aureus* (ATCC), como para os isolados, foi o de *Bidens pilosa* folha, entretanto, a média dos halos de inibição formados por este extrato frente à ATCC (26,3 mm) foi estatisticamente superior ($p<0,05$) à média produzida frente aos isolados (16,7 mm).

O diâmetro médio dos halos produzidos pelos extratos de *Bidens pilosa* folha (26,3mm), *Bidens pilosa* flor (22 mm) e *Annona crassiflora* casca do fruto (18 mm) frente à cepa padrão (ATCC), foram estatisticamente superiores ($p<0,05$) a média produzida pelo controle positivo (16,3 mm), à clorexidina 0,12%.

Dos extratos que apresentaram alguma atividade inibitória contra os isolados ORSA, os de *Annona crassiflora* caule, *Annona crassiflora* polpa, *Plinia cauliflora* Caule e *Annona crassiflora* folha com médias de halos de 8,68; 8,87; 10,37 e 10,38 mm respectivamente foram estatisticamente, de forma igual, os menos ativos, dados contrastantes para com os *S. aureus* ATCC, onde os extratos de *Eugenia pyriformis* caule, *Annona crassiflora* caule, *Eugenia pyriformis* folha e *Annona crassiflora* folha foram igualmente os menos ativos, com média de halos de 11,3; 12; 12 e 12 respectivamente.

Os estudos atuais de atividade biológica envolvendo *Annona crassiflora* utilizam apenas a folha para avaliação. Lage, (2011) observou atividade antimicrobiana em extrato de folha de *Annona crassiflora*, além da atividade em suas frações. Ele observou que o extrato etanólico, hidroalcoólico e o precipitado da fração hidroalcoólica apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), e a levedura (*Candida albicans*). Dentre as substâncias isoladas a norestefalagina e a epicatequina foram as únicas que apresentaram

atividade antimicrobiana e contra apenas a bactéria *Staphylococcus aureus*. Estudo realizado para determinar a atividade antimicrobiana de extratos de casca, folha e fruto de *Annona muricata* revelou a ausência de inibição frente às cepas padrão analisadas incluindo *Staphylococcus aureus* (SILVA *et al.*, 2011). Este resultado vem acrescentar à bibliografia informações relevantes sobre *Annona crassiflora* além de demonstrar que não só a folha desta planta apresenta princípios ativos com atividade biológica significativa, mas também o fruto e o caule as apresentam.

A difusão dos bioativos constituintes para cada extrato testado pode apresentar-se como interferente nos testes de triagem antibacteriana pelo método de difusão em ágar. Tal fato pode explicar a ausência de atividade inibitória preliminar pelo método de difusão em ágar dos extratos da raiz e caule de *B. pilosa*, contrastante com achados preliminares de literatura, que relatam possível atividade antibacteriana dos extratos das raízes de *B. pilosa*, inclusive maiores em relação aos extratos exclusivamente de folhas, pelo fato de a raiz ser um órgão de síntese de muitos compostos encontrados na parte aérea das plantas, e estes podem estar em maior quantidade nas raízes e pelo fato do extrato de caule de *B. Pilosa* ter apresentado efeito inibitório na determinação da CIM. Em *B. pilosa*, é na cutícula e nas células epidérmicas das folhas que estão localizados os princípios ativos mais consumidos na área medicinal (KVICINSKI *et al.*, 2008) e na fitoterapia (VASQUES *et al.*, 1986).

Poucos estudos foram feitos quanto à atividade antimicrobiana de *E. pyriformes*. Em estudo recente, Stieven *et al.*, (2009) demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de *E. pyriformes* contra diferentes microorganismos pelo método de difusão em disco. Nesse estudo, foi observado que os extratos hidroetanólicos da casca e semente inibiram o crescimento de *S. aureus* (ATCC 6538) de 16 a 25 horas de incubação. Adicionalmente, foi demonstrada a presença de alcalóides, compostos fenólicos e flavonóides em *E. pyriformes*. Tais substâncias, são implicadas na atividade antimicrobiana.

Para os extratos de *H. rostrata* não foi observado nenhuma atividade antimicrobiana pelo método de difusão. Pode-se atribuir esta ausência à já citada solubilidade dos bioativos constituintes do extrato testado, mas também pode ser atribuída pela morfo-fisiologia da bactéria além da especificidade de bioativos com ação anti-ORSA que pode estar desigualmente distribuídos entre as partes da

planta. Os estudos com *H. rostrata* são originais, portanto ainda não existem parâmetros bibliográficos para comparação. Esta pesquisa demonstra a ausência de atividade antimicrobiana desta planta, não impedindo a realização de testes para avaliação de outras atividades bioativas.

Macedo Costa (2008) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato de folha de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) contra cocos positivos orais. Foi obtido halos de inibição variando de 10 a 18 mm de diâmetro e apresentou desempenho médio significativamente inferior em relação a clorexidina, na comparação do extrato bruto vs substância pura e nas concentrações 1:2 e 1:4. O autor concluiu que o extrato de folha de *Plinia cauliflora* produziu uma significativa atividade bacteriostática *in vitro* sobre as bactérias do biofilme dental, o que sugere a utilização dessa substância como meio alternativo e economicamente viável para o controle de afecções em Odontologia.

4.4 Determinação da Concentração inibitória Mínima de extratos vegetais

Para a determinação da concentração inibitória mínima a técnica empregada neste estudo foi a microdiluição (Figura 10). Eloff (1998) citado por Ostrosky et al. (2008) concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente. Como neste estudo a amostragem é relativamente grande esta técnica foi adequada. Observou-se que em sua maioria os extratos analisados apresentaram alta concentração inibitória, com alguns deles com valores próximos a maior concentração de extrato (50mg/ml). As exceções foram os extratos de fruto de *Plinia cauliflora* (6,25 mg/ml) e flor e folha de *Bidens pilosa* (12,5 mg/ml e 6,25mg/ml respectivamente), que apresentaram concentrações inibitórias mínimas baixas (Apêndice B). Silveira et al (2007) determinou a concentração inibitória mínima de extratos de gervão (*Stachytarpheta cayennensis*) contra MRSA que apresentou CIM variando de 0,4 a 1,6 mg/mL. Os resultados indicam que a planta tem moderada atividade antibacteriana. Mattana et al., (2010), também avaliou a atividade de extratos orgânicos de *Acacia aroma* contra MRSA. A CIM abrangeu de 2.5 a 10

mg/ml, considerado um resultado promissor. No estudo de Mandal et al (2011), foi avaliado a atividade anti-MRSA de extratos vegetais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* e *Cuminum ecyminum*. As CIM abrangeram de 64-256, 64-512 e 128-512 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Os valores da CIM para *Hyptis martiusii* contra MRSA e MSSA (*S. aureus* sensíveis a meticilina) desenvolvidos por Coutinho et al., (2008) variaram de 128 a $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. O autor conclui que os extratos são indicados como um agente anti-*Staphylococcus*, pois, quando comparado com outros antibióticos como meticilina e gentamicina, o extrato foi mais efetivo, demonstrando ser um promissor agente antibacteriano. Desta forma, pode-se afirmar que três extratos analisados neste trabalho (casca do fruto de *Plinia cauliflora* e flor e folha de *Bidens pilosa*) apresentam os valores de CIM mais satisfatórios, podendo afirmar que apresentam boa atividade antibacteriana contra ORSA.

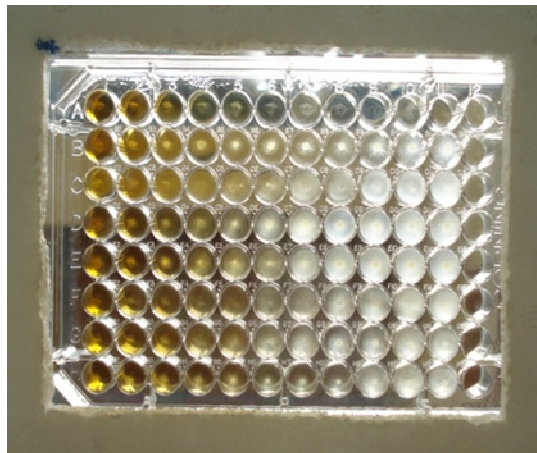


Figura 10 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de extratos de Flor de *Bidens pilosa*. Fonte: Do autor

4.5 Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular

Quanto à avaliação da atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular foram verificados que, conforme **Apêndice C** os extratos de caule e flor de *H. rostrata*, folha e caule de *P.cauliflora*, semente de *A. crassiflora*, folha e raiz de *B. pilosa* e caule de *Eugenia pyriformis* não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas sobre a cultura célula. A CC_{50} (Concentração citotóxica para 50% das células) variou nos extratos de 1,30 mg/mL a 9,56 mg/mL. A CC_{90} (Concentração citotóxica para 90% das células) variou nos extratos de 2,55 mg/mL a

19,00 mg/mL. Com estes resultados observou-se que a toxicidade é baixa na maioria dos extratos (Figura 11).

Como os extratos de *H. rostrata* e o extrato de raiz de *B. pilosa* não apresentaram efeito antimicrobiano este resultado está restrito ao perfil toxicológico das partes das plantas analisadas. Para *A. crassiflora* foi observado que o extrato de semente, que apresentou CIM de 50 mg/ml não apresentou toxicidade significativa. Isto revela que este extrato apresenta grande potencial para o uso como protótipo farmacêutico. Este perfil foi observado também para os extratos de folha e caule de *P.cauliflora*, caule de *Bidens pilosa* e caule de *Eugenia pyriformis* (Figura 12 e 13).

Referente ao extrato de folha de *Bidens pilosa* observou-se que a ausência de toxicidade a torna um protótipo em potencial, devido ao fato de apresentar um valor de CIM satisfatório (12,5mg/ml). Os demais extratos apresentaram valores de ação tóxica celular baixos. Isto os caracteriza como bioativos promissores no tratamento contra ORSA com destaque para o extrato de casca do fruto de *P. cauliflora* e para o extrato de flor de *Bidens pilosa*.

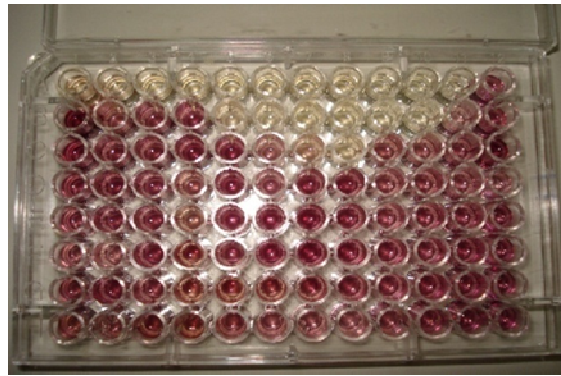


Figura 11 Determinação da atividade citotóxica de extratos vegetais frete cultura celular. Fonte : Do autor

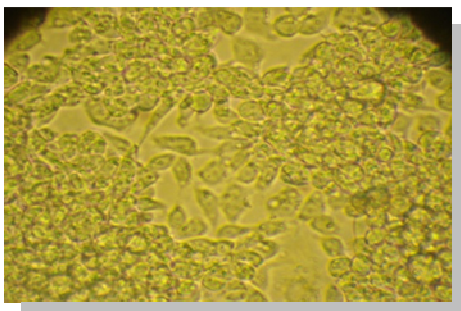


Figura 12 Células normais da linhagem C6/36 pé tratamento. Fonte: Do autor.

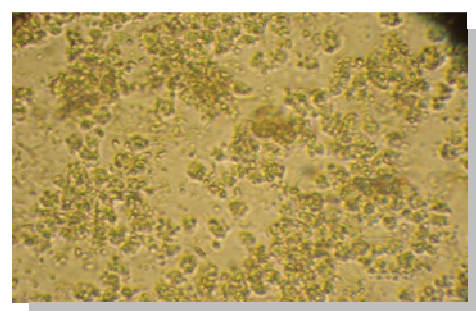


Figura 13 Células alteradas da linhagem C6/36 pelos extratos vegetais de semente de *E. pyriformes* na concentração de 5mg/mL. Fonte: Do autor

4.6 Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais

O perfil fitoquímico (Apêndice E) dos extratos de *Annona crassiflora* apontou a presença de alcalóides nos extratos de casca do fruto, polpa e folha. Em 1982, Leboeuf e colaboradores publicaram uma revisão sobre a fitoquímica da família Annonaceae, onde é relatada a predominância de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família. Foi observado que os extratos de caule e casca do fruto apresentaram taninos, saponinas foram observadas apenas no extrato de polpa e flavonóides apenas no extrato de folha. Além de alcaloides, constituintes como polifenóis, óleos essenciais, terpenos e substâncias aromáticas também são encontradas em representantes da família. (LEBOEUF et al., 1982). Quanto aos compostos fenólicos, na família Annonaceae os de maior ocorrência são os flavonoides (SIMÕES ; SCHENKEL, 2004).

A análise farmacognóstica revelou que a maioria dos extratos de *B. pilosa* apresentou-se positivos para alcalóides, flavonóides, taninos e saponinas. Este resultado confirma estudos anteriores que afirmam que os principais compostos já isolados da planta são substâncias poliacetilênicas e flavonóides (BRANDÃO et al, 1997). Borges et al. (2009) determinou também a presença de substâncias fenólicas tais como taninos e flavonóides e também apresentou resultado positivo para saponinas e alcalóides ,também observado nesta pesquisa.

Para os extratos de *Eugenia pyriformis* foi observado que o extrato de folha apresentou-se positivo para todas as substâncias com exceção de antraquinonas. Estudos mostram que o gênero *Eugenia* tem a presença de fenóis, taninos hidrolisáveis e condensados (YANG, LEE E YEN, 2000), flavonas (PAINULY; TANDON, 1983), flavonóis, na forma de agliconas e heterosídeos, catequinas (HUSSEIN et al., 2003) e triterpenos livres e também na forma de saponinas (GU et al., 2001). Para os demais extratos desta planta houve uma predominância da presença de taninos e saponinas confirmando os dados da literatura. Não foi observada na literatura pesquisada a presença de alcalóides, mas neste trabalho o extrato da folha apresentou resultado positivo.

A análise revelou a presença de flavonóides taninos e saponinas nos extratos de *Heliconia rostrata*. Como os estudos com esta planta são escassos estes resultados são considerados originais.

Os extratos de *Plinia cauliflora* revelaram uma variação da presença de constituintes químicos de acordo com a parte da planta. As folhas obtiveram resultado positivo para flavonóides, taninos e saponinas. O caule apresentou apenas taninos e saponinas. Já a casca do fruto apresentou-se positivo para alcalóides e saponinas. Souza-Moreira et al (2008) analisou o perfil fitoquímico de folhas de *Plinia cauliflora* e os extratos polares apresentaram flavonoides, taninos, alto teor de fenóis totais e de flavonoides totais, resultado semelhante ao deste trabalho.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- Todos os extratos de *Heliconia rostrata*, semente de *Annona crassiflora*, caule e raiz de *Bidens pilosa* não apresentaram atividade antibacteriana contra as amostras testadas no teste de difusão em ágar, porém foi observada a atividade do extrato de semente de *Annona crassiflora* e caule de *Bidens pilosa* na determinação da CIM em microplaca.
- Os extratos da folha, casca do fruto e caule de *Plinia cauliflora*, do caule e folha *Eugenia pyriformis*, caule, polpa, casca do fruto e folha de *Annona crassiflora* e flor, caule e folha de *Bidens pilosa* foram efetivos contra as amostras.
- Quanto à toxicidade a maioria dos extratos demonstrou baixa toxicidade.
- Os melhores extratos, por apresentarem baixas CIM e baixo ou nenhum efeito tóxico foram os extratos de casca do fruto de *Plinia cauliflora* e flor e folha de *Bidens pilosa*.
- Foram observados, pela análise fitoquímica nos extratos, ausência total de antraquinonas e presença variável de alcalóides, flavonóides, taninos e saponinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M.S. ; DE LENCASTRE, H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol*, V. 40: p. 101-111, 2004.
- AGRA, M.F. ; FRANÇA, P.F. ; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v.17: p.114-140, 2007.
- ARAÚJO, S. A. C. et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. *Ciência Animal*, Ceará p. 25-31, 2008.
- ASCHERI, D.P.M. ; ASCHERI, J.L.M. ; CARVALHO, C.W.P. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. *Cien Tecnol Aliment.*, v. 26: p.1-9, 2006.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, v. 45: p. 493-6, 1966.
- BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Natural products with antileptotic activity. *Rev Bras Farmacogn*, v. 17: p. 141-148 2007.
- BEN-DAVID, D.; MERMEL, L.A. ; PARENTAL, S. Methicillin-resistant *S. aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. *Am J Infect Control.*, v.36(2): p. 93-7, 2008.
- BORGES, C. C. *Análise farmacognóstica de Bidens pilosa (L.) (Asteraceae)*. 2009. Trabalho de conclusão de curso(Graduação em Farmácia)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2009.
- BRANDÃO, M.G.L et al. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, v.57, 131–138, 1997.
- BRUNINI, M.A. et al. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Plinia jabuticaba* Berg) cv "sabará". *Cien Tecnol Alimen*, v. 24: p. 378-83, 2004.
- CHANG, J.S. et al. Antileukemic Activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *Am. J. Chin. Med.*, v. 29: p. 303-312, 2001.
- CHIANG, L.C. et al. In vitro antiherpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26: p 1600-1604, 2003.
- CIMOLAI, N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* public concern, and legislative mandates. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, v 28(7): p. 896 , 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

- COHEN, S. N. Transportable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* (London), v. 263, p. 731-738, 1976.
- CORTES, D. et al. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*; v. 32, p. 1475- 1482, 1993.
- COSTA, A. F. Isolamento e identificação dos constituintes vegetais. In: Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian v. 3. cap. 20, p. 926-962, 1982.
- COUTINHO, H. D. M. et al. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*; v. 18 (Supl.): p.670-675, Dez. 2008.
- DAS, I.; O'CONNELL, N.; LAMBERT, P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in a university hospital in UK_ *J Hosp Infect.*, v. 65: p. 117–123 , 2007.
- DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control.* , v. 19: p. 346-352.
- DEURENBERG, R.H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, v. 13: p. 222-235 , 2007.
- DOS SANTOS SOARES, M.J. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J Hosp Infect* , v. 44: p. 301-308, 2000.
- ESTRADA, G. S. et al. Evaluación fitoquímica preliminar de *Heliconia psittacorum* y *Heliconia rostrata* y de la potencial actividad inhibitoria de algunos de los efectos del veneno de *Bothrops asper* (mapaná x). *Vitae*, Medellín, v. 16, n. 2, p. 252-257, 2009.
- FENNEL, C.W. et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* , v.94: p. 205-217, 2004.
- FOLAHZADEH, B. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from a teaching hospital in Tehran. *Jpn J Infect Dis.*, v. 62: p.309-301, 2009.
- GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Tropica.*, v. 48(4): p. 251 – 261, 1991; Feb.
- GELATTI, L.C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina: disseminacao emergente na comunidade. *An Bras Dermatol*; v. 84(5): p. 501-6, 2009.
- GU, J.Q. et al . Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry*, v.58, p. 121–127, 2001.

GUZMÁN- BLANCO, M. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int J Antimicrob Agents.* , v. 34(4): p. 304-8, 2009.

HO , K.Y. et al. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *J Pharm Pharmacol.*, v. 53: p. 187-191, 2001.

HUSSEIN, S.A.M. et al. Polyoxigenated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry*, v. 64, p. 883- 889, , 2003.

JAPONI, A. et al. Distribution patterns of methicillin resistance genes (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Iran. Biomed. J.*, v. 8: p. 173-178, 2004.

KAECH, C. et al. Course and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a retrospective analysis of 308 episodes in a Swiss tertiary centre. *Clin Microbiol Infect.*, v. 12: p. 345–352, 2006.

KHAN, M.R.; KIHARA, M. ; OMOLOSO, A.D. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. *Fitoterapia.*, v. 72: p. 662-665, 2001.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Paulo: BASF, Tomo II. 978 p, 1999..

KVIECINSKI, M. R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *J. Ethnopharmacol.*, v. 117, n. 1, p. 69-75 , 2008.

LAGE, G. A. *Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas Annona crassiflora mart.* 2011. 108 f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. 2011

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21 (12): p. 2783-2813, 1982.

LEITÃO, S.G. et al . Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. *Rev Bras Farmacogn.*, v. 16: p. 6-11, 2006.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*, v. 16: p. 197-201, 2006.

LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiol Rev.*, p. 88-134, 1987.

MAIA, R R, et al. Efeito antimicrobiano do extrato de *Momordica charantia* Linn isolado e em associação com antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* multirresistentes *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, UFCG – Patos – PB.

MACEDO-COSTA MR. *Atividade antimicrobiana e antiaderente de Mimosa tenuiflora (Willd) Poir e Plinia cauliflora Berg sobre bactérias do biofilme dental.* 2008. 95p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.

MANDAL, S. et al. In Vitro Antibacterial Activity of three Indian Spices Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Oman Medical Journal* , v. 26, No. 5:319-323, 2011.

MARQUES J. M. et al. Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de populações de *Heliconia bihai* e *Heliconia rostrata*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

MASUNAR, I A. ;TAVARES, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multiresistente (MRSA);Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, n. 2, abr./jun, 2006.

MATTANA, C.M. et al. Antibacterial activity of extracts of *Acacia aroma* against Methicillin-resistant and Methicillin-sensitive *Staphylococcus* Brazilian Journal of Microbiology , v. 41: p. 581-587,2010.

McDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* , v. 41: p. 5113-5120, 2003.

MENG ,J.C. ; ZHU, Q. X.; THAN, R.X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroiseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. *Planta Med.* , v. 66: p. 541-544, 2000.

MICHELIN, D.C. et al . Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev Bras Farmacogn.* , v. 15: p. 316-320 , 2005.

MORAN, G.J. et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med.* , v. 355(7): p. 666-74, 2006.

MORRE, D.J.et al. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HELA and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sci*, v.56, p. 343-348. 1995.

MORTON, J.F. Spanish needles (*Bidens pilosa* L.) as a wild food resource. *Econ. Bot.* pp. 173-173, 1962;.

MOTSEI, M.L. et al. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J. Ethnopharmacol.* , v. 86: p. 235-241, 2003.

NETO, V. A. et al . *Antibióticos na prática médica*. 5ª Ed., São Paulo: Rocca , 2000.

OBERLIES, N.H.; CHANG, C.J.; MACLAUGHLIN, J.L. Structure activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J Med Chem*,; v.40, p.2102-2106, 1997.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18(2): p. 301-307, Abr./Jun, 2008.

PEARCE, H.; MENAGER, S.; MAILLARD, J. Y. Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infec*, v. 43(2), p. 101-107 , 1999.

PINTO, T.J.A. ; KANEKO, T.M. ; OHARA, M.T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos* 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.

PLORDE, J. J. ; SHERRIS, J. C. Staphylococcal resistance to antibiotics: origin, measurement, and epidemiology. *Ann N Y Acad Sci*, v. 236, p. 413-434, 1974.

POWELL, J.P.; WENZEL, R.P.. Antibiotic options for treating community acquired MRSA. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, v. 6: p. 299–307, 2008.

REMONATTO, G. et al. CA-MRSA: um patógeno emergente. *NewsLab*, v. 80:p. 92-6, 2007.

REYNERTSON, K.A. et al .Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Plinia cauliflora*). *J Nat Prod.*, v. 69: p. 1228-30, 2006.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. et al.. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis.*, v. 14: e560-6, 2010.

RUBIN, R.J. et al. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City Hospitals. *Emerg Infect Dis.*, v. 5: p.9-17, 1999.

ROJAS, J.J. et al .Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of nonnosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine* ,2006.

RUPPRECHET, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Acetongenins from Annonaceae. *J Nat Prod*, v.53, p.237, 1990.

SABATH, L. D. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Inter Med*, v. 97, p. 339-334, 1982.

SALVAGNINI, L .E; OLIVEIRA J R S .Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18(2):p. 241-244, Abr./Jun., 2008 .

SANTOS, P.L. et al . Araticunlin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* Mart. *Elsev Sci*, v.42, p. 705-707, 1996.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A, FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Farmacogn*, v. 17: p. 455-465, 2007.

SCOTT, A. J ; KNOTT M .Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, v. 30:p. 507-512 , 1974; .

SILVA, R. B. et al. Antimicobacterial Activity Evaluation and MIC Determination of *Bixa Orellana* L Liophilized Hydroalcoholic Extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20(2): p. 171-174,Abr.-mai, 2010.

- SILVA, F. R. ; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *annona muricata* L. (annonaceae) . Revista de Biologia e Farmácia, v. 06– Número 02 , 2011.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2004.
- SILVEIRA et al .Antibacterial activity of gervão extract against *Staphylococcus aureus* oxacillin-sensible and oxacillin-resistant strains isolated from biological samples. RBAC, vol. 39(4): p. 299-301, 2007.
- SIKKEMA , J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiology Reviews* ,v. 59: p. 201-222, 1995.
- SOUZA-MOREIRA, T.M. et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20(1): p. 48-53, Jan./Mar. , 2010.
- STIEVEN, A. C., MOREIRA, J. J. S.C; F. SILVA, F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. *Ecl. Quím.*, São Paulo, v. 34(3):p. 7 – 13, 2009.
- STRUELENS, M.J. Guidelines and indicators for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in hospitals: toward international agreement? *Curr Opin Infect Dis.*, V. 22(4):p. 337-8, 2009.
- TEIXEIRA, L.A. et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol*; v. 33: p. 2400-2404, 1995.
- VASQUES, C. A. V. et al. Revisão farmacognóstica do picão (*Bidens pilosa* L.). *Arq. Bras. Med.* , v. 60, n. 2, p. 107-108, 1986;.
- WALLIN, T.R.; HERN, H.G.; FRAZEE, B.W. . Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Med Clin North Am.* v. 26: p. 431–455, 2008.
- YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters*, v. 157, p. 65-75, 2000.
- YUAN, S.S.F. et al. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. *Life Sci* , v.72, p.2853–2861, 2003.
- ZAFRA-POLO, C.M. et al. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, v.48, p. 1087-1117, 1998.

APÊNDICES

Lista de Quadros

Apêndice A – Médias de halos de inibição de extratos hidroalcolicos de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugênia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora* frente a sessenta isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) e intervalos de inibição em mm

Planta	<i>Annona crassiflora</i>					<i>Bidens pilosa</i>				<i>Eugênia pyriformis</i>	
Extrato	Casca do fruto	Caule	Semente	Polpa	Folha	Raiz	Caule	Flor	Folha	Folha	Caule
Média de inibição	12,16	8,68	0	8,86	10,38	0	0	14,10	16,70	13,33	12,03
Intervalo do halo de inibição	6 – 15	5 - 15	0	6 - 15	6 - 14	0	0	8 - 20	8 -23	10 - 16	9 - 16
Planta	<i>Heliconia rostrata</i>				<i>Plinia cauliflora</i>			Clorexidina 0,12%	Água destilada		
Extrato	Caule	Flor	Folha	Rizoma	Casca do fruto	Folha	Caule				
Média de inibição	0	0	0	0	12,31	13,40	10,36	15,35	0		
Intervalo do halo de inibição	0	0	0	0	9 – 16	6 – 17	5 – 15	10 - 26	0		

Apêndice B – Valores de Concentração Inibitória Mínima de extratos hidroalcolicos de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugênia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora* frente a sessenta isolados *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) obtido pelo método de Micro Placas em mg/mL.

Planta	<i>Annona crassiflora</i>					<i>Bidens pilosa</i>				<i>Eugênia pyriformis</i>	
Extrato	Casca do fruto	Caule	Semente	Polpa	Folha	Raiz	Caule	Flor	Folha	Folha	Caule
CIM	50	25	50	25	25	N	50	12,5	6.25	50	50
Planta	<i>Heliconia rostrata</i>					<i>Plinia cauliflora</i>					
Extrato	Caule	Flor	Folha	Rizoma	Casca do fruto		Folha		Caule		
CIM	N	N	N	N	6,25		50		50		

.N= ausência de inibição na concentração máxima utilizada no teste

Apêndice C -Determinação da citotoxicidade dos extratos sobre cultura de células da linhagem C6/36 (em mg/mL).

Planta	<i>Annona crassiflora</i>					<i>Bidens pilosa</i>				<i>Eugênia pyriformis</i>	
Extrato	Casca do fruto	Caule	Semente	Polpa	Folha	Raiz	Caule	Flor	Folha	Folha	Caule
CC₅₀ (Concentração citotóxica para 50% das células)	2,06	5,86	NT	2,68	3,86	NT	3,91	2,82	NT	9,56	NT
CC₉₀ Concentração citotóxica para 90% das células)	9,38	10,77	NT	5,98	8,03	NT	7,27	5,41	NT	19,0	NT
Planta	<i>Heliconia rostrata</i>				<i>Plinia cauliflora</i>						
Extrato	Caule	Flor	Folha	Rizoma	Casca do fruto		Folha		Caule		
CC₅₀ (Concentração citotóxica para 50% das células)	NT	NT	1,40	2,15	1,30		NT		NT		
CC₉₀ Concentração citotóxica para 90% das células)	NT	NT	2,60	6,90	2,55		NT		NT		

Legenda : (NT= Não tóxico nas concentrações utilizadas no experimento). Fonte: O autor

Apêndice D -Análise comparativa entre resultados de Concentração Inibitória Mínima de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, frente aos extratos hidroalcoólicos de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugênia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora*

Planta	Extrato	CIM (mg/ml)**		CC ₅₀ / CC ₉₀ (mg/ml)***	IS	
		<i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilina resistentes	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		<i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilina resistentes	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Annona crassiflora</i>	Casca do fruto	50	6,25	2,06/9,38	0,0412	0,3296
	Caule	25	1,56	5,86/10,77	0,2344	3,75641
	Semente	50	N	NT/ NT	NA	NA
	Polpa	25	12,5	2,68/5,98	0,1072	0,2144
	Folha	25	25	3,86/8,03	0,1544	0,1544
<i>Bidens pilosa</i>	Raiz	N	N	NT/ NT	NA	NA
	Caule	50	25	3,91/7,27	0,0782	0,1564
	Flor	12,5	1,56	2,82/5,41	0,2256	1,807692
	Folha	6,25	25	NT/ NT	NA	NA
<i>Eugênia pyriformis</i>	Folha	50	25	9,56/19,0	0,1912	0,3824
	Caule	50	25	NT/ NT	NA	NA
<i>Heliconia rostrata</i>	Caule	N	N	NT/ NT	NA	NA
	Flor	N	N	NT/ NT	NA	NA
	Folha	N	N	1,40/2,60	0,014	0,014

	Rizoma	N	N	2,15/6,90	0,0215	0,0215
<i>Plinia cauliflora</i>	Casca do fruto	6,25	25	1,30/2,55	0,208	0,052
	Folha	50	50	NT/ NT	NA	NA
	Caule	50	6,25	NT/ NT	NA	NA

Legenda : N= ausência de inibição na concentração máxima utilizada no teste; NT= Não tóxico nas concentrações utilizadas no experimento.NA = Não se aplica a esta análise

Apêndice E- Determinação de compostos químicos dos extratos vegetais de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugênia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora* por análise fitoquímica

Planta	Extrato	Alcalóides	Antraquinonas	Flavonóides	Taninos	Saponinas
<i>Annona crassiflora</i>	Casca do fruto	+	-	-	+	-
	Caule	-	-	-	+	-
	Semente	-	-	-	-	-
	Polpa	+	-	-	-	+
	Folha	+	-	+	-	-
<i>Bidens pilosa</i>	Raiz	-	-	-	+	+
	Caule	+	-	-	+	+
	Flor	+	-	+	+	+
	Folha	+	-	+	+	+
<i>Eugênia pyriformis</i>	Folha	+	-	+	+	+
	Caule	-	-	-	+	+
<i>Heliconia rostrata</i>	Caule	-	-	-	+	+
	Flor	-	-	-	-	+
	Folha	-	-	+	+	-
	Rizoma	-	-	+	-	-
<i>Plinia cauliflora</i>	Casca do fruto	+	-	-	-	+
	Folha	-	-	+	+	+
	Caule	-	-	-	+	+

Legenda : + positivo nas reações frente ao extrato analisado; - negativo nas reações frente ao extrato

Apêndice F -Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sessenta isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) obtido pelo método de Disco de Difusão

Código	Amostra	Amoxicilina/AC. Clavulânico	Azitromicina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Doxiciclina	Norfloxacina	Oxacilina	Vancomicina	Linezolida
		AMC	AZI	CIP	CLI	DOX	NOR	OXA	VAN	LNZ
I.A4.1b	G1 74	S	R	I	R	S	S	R	S	S
II.A7.4b	II.A7.4b	S	R	I	R	S	S	R	S	S
II.A7.5a	G2 81	S	S	S	R	S	S	R	S	S
II.A8.1d	G2 79	S	S	I	R	I	S	R	S	S
III.A4.4a	G3 26	S	R	I	I	S	S	R	S	S
IV.A2.14a	G4 25	S	R	S	R	S	S	R	S	S
IV.A13.9b	G4 6	S	R	S	I	S	S	R	S	S
IV.B4.2b	G4 5	S	I	S	I	I	S	R	S	S
V.A3.1a	G5 31	S	R	S	R	S	S	R	R	S
V.A13.2e	G5 38	S	I	I	I	R	S	R	S	S
V.A13.7f	G5 51	S	I	S	I	R	S	R	S	S
VI.A1.8a	G6 15	S	R	S	I	S	S	R	S	S
VI.A2.14a	G6 30	S	R	I	I	S	S	R	S	S
VI.A11.1a	G6 20	S	S	S	R	S	S	R	S	S
VII.A13.5c	G7 60	S	R	S	I	S	S	R	S	S
VII.B1.20a	G7 31	S	R	I	I	S	S	R	S	S

Apêndice F -Continu. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sessenta isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) obtido pelo método de Disco de Difusão

Código	Amostra	Amoxicilina/AC. Clavulânico	Azitromicina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Doxicilina	Norfloxacina	Oxacilina	Vancomicina	Linezolida
VII.B3.1b	G7 55	R	R	I	I	S	S	R	S	S
VIII.A7.2a	G8 29	R	R	I	R	R	I	R	R	S
VIII.A9.6a	G8 2	R	R	I	R	S	S	R	R	S
VIII.A1.3.6g	G8 22	S	R	I	I	S	S	R	S	S
IX.A1.3a	G9 165	S	R	I	R	R	R	R	S	S
IX.A1.10a	G9 107	R	R	I	I	S	S	R	S	S
IX.A4.6b	G9 108	S	R	I	R	I	S	R	R	S
X.A1.9a	G10 19	R	R	I	I	S	S	R	S	S
X.A10.1c	G10 3	R	R	I	I	S	I	R	S	S
X.A13.10f	G10 5	R	I	I	I	R	R	R	S	S
XI.A2.4b	G11 96	S	I	S	I	S	S	R	S	S
XI.A4.6a	G11 129	S	R	I	R	S	S	R	R	R
XI.A7.1a	G11 13	S	I	I	S	I	I	R	R	S
XII.A9.7b	G12 14	R	R	I	I	S	S	R	S	S
XII.A1.3.2b	G12 13	S	S	R	I	S	I	R	R	S
XIII.A1.1a	G13 - 112	R	R	I	R	S	S	R	R	S
XIII.A1.2.1c	G13 - 47	S	R	S	R	S	S	R	S	S

Apêndice F - Continuo. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sessenta isolados de *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) obtido pelo método de Disco de Difusão

Código	Amostra	Amoxicilina/AC. Clavulânico	Azitromicina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Doxiciclina	Norfloxacina	Oxacilina	Vancomicina	Linezolida
XIV.A1.18d	G14 - 199	R	R	R	R	S	I	R	S	R
XIV.A2.12a	G14 - 71	S	R	I	R	S	S	R	S	S
XIV.A1.3.10e	G14 - 126	R	R	I	I	S	S	R	R	S
XV.A2.11a	G15 - 159	S	S	S	I	S	S	R	S	S
XV.A5.4a	G15 - 52	S	R	I	I	S	S	R	S	S
XV.A9.8b	G15 - 40	R	I	I	I	S	R	R	R	S
XVI.A1.2a	G16 - 269	R	R	S	R	S	S	R	R	S
XVI.A1.4b	G16 - 258	S	S	I	S	S	S	R	S	S
XVI.A2.10d	G16 - 167	R	S	S	I	I	S	R	R	S
XVII.A.1.14a	G17 86	S	S	R	S	S	R	R	S	S
XVII.A.9.4a	G17 115	R	R	S	I	S	S	R	S	S
XVII.A.13.2c	G17 62	R	I	S	I	S	S	R	R	S
XVIII.A.1.10d	G18 110	S	I	I	R	S	S	R	R	S
XVIII.A.2.14b	G18 100	S	S	I	I	S	I	R	R	R
XVIII.A.4.5a	G18 104	S	I	I	I	S	S	R	R	S
XIX.A2.1b	G19 43	S	R	S	R	S	S	R	S	S
XIX.A1.3.2a	G19 21	R	I	I	I	S	S	R	R	R
XIXB2c	G19 10	S	I	I	S	S	I	R	S	S

Apêndice F -Final . Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sessenta isolados *Staphylococcus aureus* Oxacilina Resistentes (ORSA) obtido pelo método de Disco de Difusão

Código	Amostra	Amoxicilina/AC. Clavulânico	Azitromicina	Ciprofloxacina	Clindamicina	Doxicilina	Norfloxacina	Oxacilina	Vancomicina	Linezolida
XX.A1 2.1a	G20 44	S	I	S	R	S	S	R	R	S
XX.A1 3.1a	G20 12	R	S	S	I	S	S	R	R	S
XX.A1 3.1c	G20 14	R	R	I	R	S	S	R	R	S
XXI.B5 .2a	G21 1	R	S	I	I	S	I	R	R	S
XXII.A 2.10a	G22 55	R	S	S	I	S	S	R	S	S
XXII.A 2.13b	G22 48	S	R	I	I	S	I	R	R	R
XXII.A 3.1a	G22 63	R	I	R	I	S	R	R	S	S
XXII.A 4.6a	G22 29	R	I	S	I	S	S	R	R	S
XXII.A 3.1b	G22 64	R	I	S	I	S	S	R	R	S

Legenda: AMO/ACL: Amoxicilina com Acido clavulânico(30) ; AZI: Azitromicina(15) ;CIPRO: Ciprofloxacina(05); CLIN: Clindamicina(02) ; DOXI: Doxicilina (30) ; NOR : Norfloxacina(10) ; OXA: Oxacilina (10); VAN :Vancomicina (30) ;LIN : Linezolida (30); R : Resistente ; I :Intermediário ; S : Sensível

Apêndice G – Médias de halos de inibição de extratos hidroalcológicos de *Annona crassiflora*, *Bidens pilosa*, *Eugênia pyriformis*, *Heliconia rostrata* e *Plinia cauliflora* frente a *S. aureus* (ATCC 6538) e intervalos de inibição em mm

Planta	<i>Annona crassiflora</i>					<i>Bidens pilosa</i>				<i>Eugênia pyriformis</i>	
Extrato	Casca do fruto	Caule	Semente	Polpa	Folha	Raiz	Caule	Flor	Folha	Folha	Caule
Média de inibição	18,0	12,0	0	16,0	12,0	0	0	22,0	26,3	12,0	11,3
Intervalo do halo de inibição	16 -20	10 - 14	0	14 -18	10 -14	0	0	21 -23	25 -28	11 -13	10 -12
Planta	<i>Heliconia rostrata</i>				<i>Plinia cauliflora</i>			Clorexidina 0,12%	Água destilada		
Extrato	Caule	Flor	Folha	Rizoma	Casca do fruto	Folha	Caule				
Média de inibição	0	0	0	0	15,3	16,7	13,0	16,3	0		
Intervalo do halo de inibição	0	0	0	0	15-16	15- 18	12 -15	15 -18	0		