

SINERGISMO ENTRE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *TARGETES MINUTA* E DROGAS ANTIMICROBIANAS FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS* SPP E *ESCHERICHIA COLI*.

CAROLINA LAMBRECHT GONÇALVES¹; DIANE BENDER ALMEIDA SCHIAVON¹; TASSIA GOMES GUIMARÃES¹; FERNANDA VOIGT MOTA¹; ÂNGELA FACCIN¹; LUIZ FILIPE DAMÉ SCHUCH¹

¹Laboratório de Doenças Infecciosas – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas - carolina_lamg@yahoo.com.br; dianebalmeida@gmail.com; tagogui@gmail.com; nandavoight@yahoo.com.br; angefaccin@gmail.com; bitoxu@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

Das cerca de 200.000 espécies vegetais presentes no Brasil, estima-se que 50% destas possuem alguma atividade biológica, no entanto, menos de 1% foram estudadas quanto as suas propriedades terapêuticas (FOGLIO, 2006; MARTINS, 2000).

Segunda a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial fazem ou já fizeram uso dos recursos vegetais como método de prevenção ou cura para os mais diversos males. Este dado pode estar relacionado com a facilidade de obtenção das espécies vegetais, aliada a situação econômica e social nos países em desenvolvimento (COSTA et al., 1998, OMS, 2008).

No Brasil, os tratamentos a base de plantas medicinais são realizados como integrativa terapêutica de forma isolada ou em associação com outros medicamentos, o que pode proporcionar riscos a saúde de seus usuários (ALEXANDRE et al., 2008). Por serem consideradas inócuas, plantas medicinais e fitoterápicos são comercializados livremente, facilitando a automedicação e reduzindo a procura pela orientação dos profissionais de saúde (OLIVEIRA & GONÇALVES, 2006).

O uso inadequado dos produtos de origem vegetal, como a sua interação com demais medicamentos, ou ainda, a utilização de plantas identificadas incorretamente, podem gerar danos ao organismo, muitas vezes irreversíveis (SCHENKEL, 2004). O uso de extratos vegetais dentro das doenças infecciosas, bem como, os aspectos relacionados com sua atividade antimicrobiana utilizadas em tratamentos e prevenções de enfermidades, e a possibilidade de sua interação com drogas antimicrobianas sintéticas, tornaram-se temas de estudos relevantes no que se refere a resistência bacteriana (BETONI et al, 2006).

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta*, conhecida popularmente como chinchilho, e sua interação com antibióticos frente a bactérias patogênicas.

2. METODOLOGIA

Preparo do Extrato Vegetal: O extrato hidroalcoólico (EHA) de *T. minuta* foi produzido na proporção de 1:10 (g/mL) da planta seca e álcool de cereais a 70° GL, conforme a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010), sendo o solvente extraído por meio de um evaporador rotativo a 55°C sob 600 mm/Hg de pressão negativa.

Linhagens Bacterianas: As bactérias testadas foram: *Staphylococcus* spp

coagulase positiva (n = 9) e *Escherichia coli* (n = 9), além de cepas padrões identificadas como *S. aureus* (ATCC 12600) e *E. coli* (ATCC 8739).

Atividade Antimicrobiana: A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de Macrodiluição em Agar Müller Hinton (AMH) para a obtenção dos valores referentes a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EHA de *T. minuta* (NCCLS, 2003; BETONI et al., 2006). Os inóculos foram preparados através de uma suspensão bacteriana, em solução salina, em uma concentração equivalente a 10^6 ufc/mL. O extrato vegetal foi diluído em base logarítmica dois em água destilada estéril (ADE). Após a diluição do EHA, da adição do inóculo e do AMH, os microrganismos foram mantidos a 37 °C durante 24 h. O experimento foi realizado em duplicata.

Efeito Sinérgico: Para a verificação de possíveis interações entre os EHA e antibióticos, utilizou-se uma concentração igual a $\frac{1}{4}$ do valor referente a CIM 90% do EHA obtida na Macrodiluição para cada grupo bacteriano. Foram realizados antibiogramas controle (sem EHA) e tratamento (com EHA) através da metodologia dos discos, preconizadas por KIRBY & BAUER (CLSI, 2005) e adaptada por BETONI et al. (2006). O efeito sinérgico foi verificado com os seguintes antibióticos: Amoxicilina, Ampicilina, Gentamicina, Penicilina, Tetraciclina e Vancomicina. Após, as placas foram incubadas (37 °C/24 h) e os halos de inibição obtidos (milímetros) foram comparados entre os ensaios controles e tratamentos, sendo classificados como: sinérgicos, indiferentes ou antagônicos. Os experimentos foram realizados em duplicatas e para a análise estatística utilizou-se a média dos valores observados.

Análise Estatística: Os resultados obtidos no método adaptado de KIRBY & BAUER para cada grupo bacteriano, foram submetidos ao teste pareado de T para a verificação de possíveis interações entre a associação do EHA com os antibióticos. Quando a diferença entre as médias do controle e do tratamento, para cada antibiótico era significativa ($p \leq 0,05$), concluía-se a ocorrência de interação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O EHA de *T. minuta* apresentou atividade antibacteriana sobre os isolados de *Staphylococcus* spp onde os valores da CIM variaram de 35 a 50%, enquanto que as amostras de *E. coli* não apresentaram sensibilidade ao extrato vegetal.

A atividade antimicrobiana de *T. minuta* foi verificada anteriormente por SCHUCH et al (2008), onde os autores verificaram ação antifúngica do extrato em concentrações de 10,5 e 13,2 mL/100mL frente aos dermatófitos testados. GONÇALVES et al (2013), ao avaliarem a ação do extrato hidroalcoólico do chinchilho frente a bactérias isoladas de leite bovino, obtiveram inibição de microrganismos do gênero *Staphylococcus* em concentrações entre 19 a 100% do EHA, enquanto que a *E. coli* utilizada neste estudo, demonstrou -se resistente ao extrato de *T. minuta*, corroborando com os resultados do presente estudo .

A Tabela 1 apresenta os valores das médias de cada tratamento comparando-os com os valores obtidos no antibiograma controle, juntamente com os valores de p, onde é possível observar a interferência do EHA sobre o efeito antibacteriano dos antibióticos testados.

O gênero *Staphylococcus* demonstrou-se suscetível à interferência do EHA de *Tagetes minuta* quando associado aos antibióticos estudados. Foi possível evidenciar um efeito sinérgico entre todas as interações realizadas, com destaque para a droga ampicilina, seguida pela tetraciclina, gentamicina, penicilina, vancomicina e amoxicilina, sendo que esta última não apresentou diferença

estatística significativa na interação, ainda que observado um aumento na sensibilidade dos microrganismos submetidos ao EHA em relação ao controle. Não foi evidenciado nenhum caso de antagonismo.

O mesmo não ocorreu em relação a *E.coli*, a qual não apresentou efeitos sinérgicos durante a associação do EHA frente aos antibióticos, apresentando efeitos antagônicos em todas as interações.

Tabela 1: Valores das médias encontradas para os controles (C) e para os tratamentos (T) com o EHA de *T. minuta* frente a seis antibióticos sobre *Staphylococcus spp* e *E.coli*.

Bactérias	Amox		Ampi		Genta		Peni		Tetra		Vanco	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
<i>Staphylococcus spp.</i>	41,3	43,8	38,7	46	25,7	30,8	39	43,2	32,5	39,1	22	25,5
Valores de P	0,0564		0,0056		0,0258		0,0191		0,0018		0,0061	
<i>E. coli</i>	28,4	26,1	26,5	20,3	29	19,5	2,5	2,4	29,3	21	9,3	10
Valores de P	0,1381		0,0053		0,0002		0,7734		0,0001		0,65	

Amox: Amoxicilina, Ampi: Ampicilina, Genta: Gentamicina, Peni: Penicilina, TET: tetraciclina, Vanco: Vancomicina. Valores em negrito demonstram diferença significativa $p \leq 0,05$.

Como observado por ZAGO et al (2009), o *Staphylococcus spp* demonstrou-se mais suscetível às interações quando comparado com a *E. coli*. Para OLIVEIRA et al. (2006), estes resultados podem estar relacionados com a maior sensibilidade apresentadas pelas bactérias Gram positivas durante os estudos de interações entre drogas antibacterianas e extratos vegetais, o que pode ser explicado pela sensibilidade deste grupo bacteriano aos agentes antimicrobianos, diferentemente das Gram negativas, as quais apresentam maior resistência aos antibióticos, devido a sua estrutura de maior complexidade (LAMBERT, 2002).

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo, concluem que o gênero *Staphylococcus* demonstrou-se sensível ao EHA de *T. minuta*, com valores de CIM que variaram de 35 a 50%, apresentando maior sensibilidade e suscetibilidade às interações realizadas, em comparação a *E. coli*. Assim sendo, estes dados, sugerem a possibilidade do uso do EHA de *T. minuta* de forma isolada ou em associação com antibióticos com a finalidade de aumentar o potencial antimicrobiano e minimizar seus efeitos secundários no tratamento de bactérias patogênicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CATELLANI, D.C.; DIAS, J.E.. **Plantas Mediciniais**. UFV, Viçosa, 2000, 220p..
- SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G., PETROVICK, P.R. Produtos de origem natural e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES C.M.O., SCHENCKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 th Ed. Ed.

- Universidade/UFRGS and Ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004,p. 371-400.
- ZAGO, J.A.A.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; JUNIOR, A.F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.4, p. 828-833, 2009.
- COSTA, A.F.E. et al. Plantas medicinais utilizadas por pacientes atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. **Pesquisa de Medicina de Fortaleza**, v. 1, n. 2, p. 20-25, 1998.
- LAMBERT, P.A.. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal Applied Microbiology Symposium Supplement**. v.92, n.18, p. 46-54, 2002.
- BRASIL, **Farmacopeia dos estados Unidos do Brasil**/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 5ª ed. São Paulo: Siqueira; p. 546, 2010.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).. **Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne (PA): Approved Standard M7-A6, 2003.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 5. informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne (PA), 2005.
- FOGLIO, M. A.; et. al.; Plantas Medicinais como fontes de Recursos Terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Revista Multiciência**, n.7, v.3, p. 57-64, 2006.
- GONÇALVES, C.L.; SCHIAVON, D.B.A.; MOTA, F.V.; FACCIN, A.; SCHUBERT, R.N.; SCHIEDECK, G., SCHUCH, L.F.D. Antibacterial activity of essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. and *Tagetes minuta* against bacteria that cause mastitis. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**.v.18, n.3, p.487-494, 2013.
- SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; GARCIA, E.N.; PRESTES, L.S.; SCHRAMM, R.C.; COIMBRA, H.; MEIRELES, M.C.A.. Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, n3, P. 267-271, 2008.
- ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.117-26, 2008.
- BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES, J. A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.v.9, n.12,p. 387-390, 2006.
- OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L.A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 36-41, 2006.
- OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA, FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p.77-82, 2006.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Traditional medicine**: definitions. Acessado em: 9 de set. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>.