

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CEREUS JAMACARU SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Lima, B F (1); Germoglio, V G;(2); Brandão, D O (3)

1. Beatrys Fernandes Lima; 2. Vanessa Garcia Germoglio; 3. Deysiane de Oliveira Brandão

Faculdade Mauricio de Nassau
beatrys_fernandes@hotmail.com

Resumo: O *Staphylococcus aureus* tem uma grande resistência a antibióticos devido seu gene sofrer mutações, sendo assim uma bactéria de pressão seletiva. As cactáceas apresentam grande potencial como fonte de substâncias de uso medicinal, podendo assim contribuir para manutenção da saúde. O objetivo do estudo foi verificar a atividade antimicrobiana do extrato de *Cereus Jamacaru* isolado e associado aos mais conhecidos antimicrobianos sobre o *Staphylococcus aureus* resistente. Para isso, foi utilizado o extrato do *Cereus jamacaru* sobre cepas do *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, AMB01, AMB02, AMB03, AMB04, AMB05, AMB06). Foram feitos testes isolados e associados aos seguintes antibióticos: Eritromicina, Amoxicilina + Ácido clavulânico, Azitromicina, Norfloxacino, Cefalotina. Das amostras analisadas, foram encontrados resultados positivos para algumas cepas do *S. aureus*. Quando associado o extrato a um antimicrobiano, foi bastante notório o aumento da concentração inibitória fracionada (CIF), não foi observado efeito antagônico (CIF < 4) em nenhum dos experimentos. O melhores resultados foram obtidos com a associação da Eritromicina ao extrato, pois das 7 cepas utilizadas, 1 sendo sensível e as outras 6 resistentes, 4 apresentaram efeito sinérgico ao composto utilizado. Conclui-se então, que tais resultados indicam que *C. jamacaru* pode vir a ser uma fonte de produtos naturais com potencial para modificar a atividade de antibióticos, principalmente em junção com a Eritromicina, podendo atuar como adjuvantes na terapia antimicrobiana.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; *Cereus jamacaru*; resistência antimicrobiana.

Introdução

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (Ceballos et al., 1993; Lima, 1996; Cunha, 1995; Cowan, 1999; Farias; Lima, 2000; Belém, 2002; Michelin et al., 2005).

As plantas medicinais e os fitoterápicos apresentam papel importante na terapêutica, pois 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem natural e constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. (OMS, 1991; Rates, 2001, citado por CONTON e ONOFRE, 2009).

As cactáceas possuem um grande potencial como fonte de substâncias de uso medicinal, entre eles a atividade antimicrobiana comprovada como a do *Cereus jamacaru*. (Messias, 2010) O *Cereus jamacaru* popularmente conhecido como mandacaru é um cacto colunar

característico da região semiárida do Brasil, que ocorre nas caatingas nordestinas de grande importância para a sustentabilidade e conservação da biodiversidade do bioma caatinga. Seus frutos servem de alimentos para pássaros e animais silvestres da caatinga. Em períodos de seca, esta cactácea é largamente utilizada pelos agricultores para alimentação dos animais. (Braga, s.d.).

O uso medicinal popular é pouco difundido. Diz-se que as raízes e o caule são diuréticos e melhoram males do coração. Toda a planta é usada no combate ao escorbuto e nas afecções do aparelho respiratório - bronquites, tosse, catarro (Scheinvar, 1985). Muitos cactos possuem propriedades medicinais bem estabelecidas, como é o caso da espécie *Opuntia fícus-indica*, que apresenta atividade antioxidante (Lee et al., 2002), anti-inflamatória (Park et al., 2000) e anti-ulcerogênica (Galati et al., 2001).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras), (SANTOS, A.L et al. , 2007).

A eficiência da disseminação de *S. aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade desse microrganismo. A capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, pressão osmótica ou deficiência de nutrientes, possibilita não só a colonização do homem como do ambiente ao seu redor, criando reservatório. (LEITE, 2008). A resistência do *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou até de outras). Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos e transpostos. (BERNARD, L. et al 2004).

Apesar da modernidade e tecnologia para fabricação de medicamentos, o uso indeterminado de antibióticos sem orientação e prescrição médica ainda é um fato de grande interesse da saúde pública, pois a capacidade metabólica que estas bactérias têm de se adaptar ao meio tornando-se resistentes ao mecanismo de ação dos antibióticos contribui para o surgimento de superbactérias multirresistentes dentro e fora do âmbito hospitalar. (Silver & Bostian, 1993).

A propriedade antimicrobiana é motivo de inúmeros estudos devido ao aumento da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas convencionais, além do que também são necessários estudos visando entendimento desta propriedade, mesmo para as plantas que já tiveram seu potencial antimicrobiano comprovado (Schelz&Hohmann, 2006).

Tendo em vista o avanço da disseminação de multirresistência aos antimicrobianos ainda conceituados na clínica médica, este estudo tem como objetivo verificar as propriedades bacteriostáticas do extrato do óleo de *C. jamacaru* frente ao *S. aureus* e observar se o mesmo tem potencial modulador capaz de intensificar o efeito do antibiótico.

Metodologia

Material vegetal e preparação dos extratos do *C. Jamacaru* foram coletadas na região semiárida do estado da Paraíba. O material vegetal secou em estufa de circulação de ar a 40 ± 1 °C e, posteriormente, pulverizado em moinho de facas, com granulometria de 10 mesh. Os pós das plantas (100g) foram submetidos à extração com etanol 96% por percolação durante cinco dias, seguida de concentração em evaporador rotativo a 40°C, obtendo-se os extratos etanólicos brutos.

Teste de susceptibilidade microbiana e determinação da concentração inibitória fracionada.

O extrato vegetal foi testado em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (AMB01, AMB02, AMB03, AMB04, AMB05, AMB06) resistentes à Eritromicina, Amoxicilina + Ácido clavulânico, Azitromicina, Norfloxacino, Cefalotina e em cepa não resistente (ATCC 25923).

Os microrganismos foram cultivados em ágar Mueller Hinton a $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ durante 24 horas e mantidas em tubos de ensaio contendo ágar BHI. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição, de acordo com os procedimentos recomendados pelo Clinicaland Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Os inóculos foram padronizados em tubos contendo 5µL de solução salina a 0,9% esterilizada. A suspensão microbiana foi ajustada, utilizando um espectrofotômetro, Shimadzu, com comprimento de onda de 625 nm, o que equivalente a 105 UFC/µL, 100µLo extrato foi diluído em série com caldo Mueller Hinton esterilizado em uma placa de 96 poços para cada cepa estudada, 10µL do inóculo de cada microrganismo foram adicionados em todos os poços em suas respectivas placas.

As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o crescimento bacteriano foi indicado pela adição de $20\text{ }\mu\text{L}$ da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% com a posterior incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bactérias viáveis reduzem o corante mudando sua coloração azul para rosa e a CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina. O etanol 96% foi usado como controle negativo. No ensaio de modulação da resistência, a CIM do antibiótico foi definida na presença de uma concentração sub-inibitória dos extratos (CIM/8). O cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi realizado para obter um coeficiente que indicasse se a associação dos extratos com o antibiótico produziu efeito sinérgico ($\text{FIC} \leq 0,5$), indiferente ($4,0 > \text{CIF} > 0,5$) ou antagonista ($\text{FIC} > 4,0$) de acordo com a fórmula descrita por Mackay et al. (2000).

Resultados e Discussão

Macrolídeos

A classe dos macrolídeos pode ter efeito bactericida ou bacteriostático, dependendo da concentração plasmática e tecidual do inóculo, pela inibição da síntese proteica bacteriana. Quando ligada à subunidade ribossomal 50S, impede a translocação de peptídeos (FUCHS, F. D, 2010).

Os resultados descritos da associação de eritromicina com *C. jamacaru* na Tabela 1 apresentou um resultado significativo de sinergismo na cepa determinada como não resistente (ATCC25923) como também uma elevação considerável no CIF de cepas determinadas resistente (AMB 01, AMB 02, AMB03), indicando que o uso desta substância mostrou uma modulação aceitável para potencializar o antimicrobiano.

Tabela 1: Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato do *Cereus Jamacaru*, isolado e em associação com eritromicina, sobre cepas de *S. aureus*.

Microrganismo	CIM (mag/mL)			CIF	Interpretação
	ERI	EB	combinada		
S. aureus					
ATCC 259223	0,007	1,04	0,0033	0,47	SINERGICO
	0				
AMB 01	32, 21	1,04	12,04	0,37	SINERGICO

AMB 02	0,8	1,04	0,31	0,38	SINERGICO
AMB 03	12,34	1,04	3,25	0,26	SINERGICO
AMB 04	14,06	1,04	31,25	2,22	INDIFERENTE
AMB 05	15,09	1,04	31,25	2,07	INDIFERENTE
AMB 06	2,1	1,04	1,95	0,92	INDIFERENTE

ERI: Eritromicina; EB: Extrato bruto; CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

Na tabela 2, o teste de associação do extrato ao antimicrobiano, foi observado uma leve sensibilidade na cepa AMB 02 e na ATCC259223.

Tabela 2: Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato do *Cereus Jamacaru*, isolado e em associação com a Azitromicina, sobre cepas de *S. aureus*.

Microorganismo	CIM (mg/mL)			CIF	Interpretação
	AZT	EB	combinada		
S. aureus					
ATCC 259223	0,006	1,04	0,0003	0,05	SINERGICO
	0				
AMB 01	51,21	1,04	125,00	2,44	INDIFERENTE
AMB 02	0,6	1,04	0,00	0,05	SINERGICO
AMB 03	21,32	1,04	25,00	1,17	INDIFERENTE
AMB 04	26,04	1,04	31,24	1,20	INDIFERENTE
AMB 05	21,21	1,04	31,24	1,50	INDIFERENTE
AMB 06	2,1	1,04	3,90	1,80	INDIFERENTE

AZT: Azitromicina; EB: Extrato bruto; CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

De acordo com Fabri & Costa (2012), o crescimento bacteriano pode ter sido inibido pelo extrato vegetal devido às ações do conjunto de metabólitos secundários presentes na planta, os compostos fenólicos, como taninos, podem ser tóxicos para microrganismos devido

à inativação de enzimas e proteínas transportadoras da parede celular.

Levando em consideração que a diferença entre esses antibióticos está apenas na estrutura, cuja da eritromicina possui 14 membros com átomos de nitrogênio, enquanto a Azitromicina possui 15 membros na sua composição. (ANVISA Brasil, 2007).

Possivelmente o extrato contribuiu para impedir a translocação de peptídeos da porção 50S possibilitando um efeito modulador considerável principalmente da eritromicina.

β-lactâmicos

Guimarães (2010) diz que o principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β-lactâmicos é através da produção de enzimas que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) capazes de promover a abertura do anel β-lactâmico, interrompendo a síntese e conseqüentemente a formação adequada da parede celular.

No demonstrativo da tabela 3, os testes feitos nessas amostras através do extrato de *C. jamacaru* não demonstraram resultados importantes, contudo apresentou sinergismo na cepa que já é sensível ao antimicrobiano.

Tabela 03: Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato do *Cereus Jamacaru*, isolado e em associação com a Amoxicilina + Ácido clavulânico, sobre cepas de *S. aureus*.

Microrganismo Interpretação	CIM (mg/mL)			CIF	
	AMC	EB	combinada		
S. aureus					
ATCC 259223	0,005	1,04	0,0007	0,14	SINERGICO
	0				
AMB 01	63,33	1,04	125,00	1,97	INDIFERENTE
AMB 02	0,6	1,04	0,80	1,33	INDIFERENTE
AMB 03	42,32	1,04	104,17	2,46	INDIFERENTE
AMB 04	26,04	1,04	31,24	1,20	INDIFERENTE
AMB 05	20,83	1,04	31,25	1,50	INDIFERENTE

AMB 06 3,9 1,04 2,76 0,71 INDIFERENTE

AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; EB: Extrato bruto; CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

Na tabela 4, no teste feito com o bactericida Cefalotina que atua interrompendo a síntese adequada da parede celular bacteriana, houve uma variação não significativa de sinergismo nas cepas AMB 04 e AMB 05.

Observou-se que provavelmente a associação do extrato com a Cefalotina tenha contribuído para que as β -lactamases não rompam o anel β -lactâmico, deixando o mesmo sem espectro de ação.

Tabela 04: Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato do *Cereus Jamacaru*, isolado e em associação com a Cefalotina, sobre cepas de *S. aureus*.

Microrganismo	CIM (mg/mL)			CIF	Interpretação
	CFL	EB	combinada		
S. aureus					
ATCC 259223	0,005	1,04	0,0660	1,32	INDIFERENTE
	0				
AMB 01	45,32	1,04	125,00	2,75	INDIFERENTE
AMB 02	0,63	1,04	0,48	0,76	INDIFERENTE
AMB 03	42,21	1,04	125,00	2,96	INDIFERENTE
AMB 04	27,09	1,04	0,81	0,03	SINERGICO
AMB 05	22,09	1,04	0,24	0,01	SINERGICO
AMB 06	2,1	1,04	2,60	1,23	INDIFERENTE

CFL: Cefalotina; EB: Extrato bruto; CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

Quinolonas

O Norfloxacin, da classe dos quinolônicos, atua inibindo a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese

descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias. Também inibem, *in vitro*, a topoisomerase IV, porém não é conhecido se este fato contribui para a ação antibacteriana. (ANVISA Brasil, 2007).

Seu potencial antimicrobiano associado ao extrato do *Cereus*, modulou as cepas consideradas resistentes AMB03 e AMB04 como também a ATCC25923 considerada sensível ao antibiótico, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 05: Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato do *Cereus Jamacaru*, isolado e em associação com o Norfloxacino, sobre cepas de *S. aureus*.

Microrganismo	CIM (mg/mL)			CIF	Interpretação
	NOR	EB	combinada		
S. aureus					
ATCC 259223	0,010	1,04	0,0040	0,40	SINERGICO
	0				
AMB 01	78,34	1,04	41,67	0,53	INDIFERENTE
AMB 02	0,4	1,04	0,60	1,5	INDIFERENTE
AMB 03	34,21	1,04	1,30	0,03	SINERGICO
AMB 04	28,22	1,04	10,42	0,36	SINERGICO
AMB 05	30,32	1,04	31,24	1,03	INDIFERENTE
AMB 06	5,1	1,04	3,25	0,63	INDIFERENTE

NOR: Norfloxacino; EB: Extrato bruto; CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

Seu potencial antimicrobiano associado ao extrato do *Cereus* modulou as cepas consideradas resistentes AMB03 e AMB04 como também a ATCC25923 considerada sensível ao antibiótico.

Ao observar o experimento nota-se a provável atuação do extrato somado ao antibiótico inibindo a atividade da DNA girase impedindo a síntese bacteriana.

Conclusões

O extrato bruto de mandacaru foi testado em diversas cepas consideradas resistentes a antibióticos, e obtivemos os resultados preliminares positivos apesar de não significativos, no entanto é importante ressaltar que este estudo foi limitado.

Referências

Azevedo EF, Barbosa LA, Cassiani SHB; Administração de antibióticos por via subcutânea: uma revisão integrativa da literatura, *Acta Paul Enferm.* 2012;25(5):817-22.

Braga R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 4ed. Escola Superior de Agricultura de Mossoró: Editora Universitária da UFRN.

CANTON, Marilde; ONOFRE, Sideney Becker, Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC, Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica, *Revista Brasileira de Farmacognosia; Brazilian Journal of Pharmacognosy*; 20(3): 348-354, Jun./Jul. 2010.

Cowan MM 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM 1997. Natural products drug discovery and development. *J Nat Prod* 60:52-60.

Del Fiol FS, Mattos Filho TR, Groppo FC. Resistência bacteriana. *Rev Bras Med.* 2000; 57(10): 85-7.

Galati EM, Mendello MR, Giuffrida D, Miceli N 2001. Anticancer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultra structural study. *J Ethnopharmacol* 76: 1-9.

LEITE, Gustavo Bultuline, Análise dos portadores de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília, BRASÍLIA/DF: OUTUBRO/2008.

MESSIAS, Júlio Brando, *Cereus jamacaru* DC: Efeito Toxicológico sobre o desenvolvimento embrionário de *Rattus norvegicus*; Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2010.

OLIVEIRA, Caio Ferreira et al. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo, *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, Salvador, v. 13, n. 2, p. 242-247, mai./ago. 2014.

PERES, David et al., Estratégia para controlar o *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina: A Experiência de Cinco Anos de um Hospital, *Acta Med Port* 2014 Jan-Feb;27(1):67-72.

Rossi, Flávia; Andreazzi, Denise B; Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma / Bacterial resistance: interpreting the antibiograma, São Paulo; Atheneu; 2005. 118 p. ilus, tab.

SALES, Michele de Sousa Leal et al., *Cereus jamacaru* do Candolle (Cactaceae), O

mandacaru do Nordeste Brasileiro, DOI: 10.5212/Publ.Biologicas.v.20i2.0006.

SILVA, Nathalia Cristina Cirone, Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas; BOTUCATU – SP, 2010.

SILVEIRA, Gustavo Pozzaet al., Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana, Quim. Nova, Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006.

VIGNOTO, Vanessa Kelly Capoiat al., Avaliação do sinergismo e antagonismo do extrato de própolis com antibacterianos em isolados bacterianos de urina de animais, Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ., v. 1, supl. 1, p. 076, 2014