



AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMI-ÁRIDO ISSN 1868-4586

## **EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE *Momordica charantia* LINN ISOLADO E EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES**

*Rodrigo Rafael Maia*

Bolsista PIBIC, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

*Maria do Socorro Vieira Pereira*

Prof. Associado do Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

*Jane Sheila Higino*

Prof. Associado do Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Pernambuco, Recife, PE

*José Pinto de Siqueira Júnior*

Prof. Associado do Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

*Ana Carolina Lyra de Albuquerque*

Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, email: lina.lyra@gmail.com

*Luciana Filgueira Pereira*

<sup>5</sup>Pós- Graduação em Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE

*Maria Regina Macedo-Costa*

Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

*Andréia Vieira Pereira*

Pós-Graduação Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

**RESUMO** - A versatilidade do *Staphylococcus aureus* no desenvolvimento de resistência a vários agentes antimicrobianos contribui para a sua sobrevivência em ambientes hospitalares e difusão entre os pacientes. A cefalosporina e norfloxacinina representam um grupo de agentes antimicrobianos ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e são freqüentemente utilizadas na prática clínica no combate a infecções por *Staphylococcus aureus*. O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima da cefalexina e norfloxacinina isolada e em associação com o extrato hidroalcoólico de *Momordica charantia* L. sobre isolados clínicos de *S. aureus*. Foram utilizadas no presente trabalho cepas de *S. aureus* de origem bovina e humana hospitalar caracterizadas fenotipicamente como sensíveis e resistentes a metilicina (MSSA e MRSA, respectivamente). A concentração inibitória mínima (CIM) da cefalexina isolada e em associação, foi determinada pelo método da diluição em placas e difusão. A associação Cefalexina - alcoolatura de Melão de São Caetano, produziu um efeito sinérgico em todas as amostras; como também a associação norfloxacinina - alcoolatura de Melão de São Caetano. O extrato do Melão de São Caetano, demonstrou potencial atividade antimicrobiana sobre as amostras bovinas e nas amostras humanas, dados que estimularam a avaliação por método de difusão de um maior número de amostras. Os resultados deste estudo mostram a importância de se avaliar meios alternativos no combate a infecções e ao desenvolvimento de resistência a drogas em *S. aureus*, particularmente em linhagens multirresistentes, contribuindo para uma melhor compreensão sobre os aspectos genéticos da resistência aos antimicrobianos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Efeito antimicrobiano; *Momordica charantia* Linn; *S. aureus*

## **ANTIMICROBIAL EFFECT OF EXTRACT *Momordica charantia* LINN ISOLATED AND IN COMBINATION WITH ANTIBIOTICS ON RESISTANT *Staphylococcus aureus***

ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido, v.04, 12-17, 2008.

[www.cstr.ufcg.edu.br/acsa](http://www.cstr.ufcg.edu.br/acsa)

**ABSTRACT** - The versatility of the *Staphylococcus aureus* in the development of resistance to some agent antimicrobials contributes for its survival in hospital environments and diffusion between the patients. The cefalosporin and norfloxacin represent a group of antimicrobials agent active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and frequently are used in the practical clinic in the combat the infections for *Staphylococcus*. The objective of the present was to determine the minimum inhibitory concentration of the cefalexin and isolated norfloxacin and in association with the *Momordica charantia* L. extract of on isolated of *S. aureus*. They had been used in the present work strains of *S. aureus* of bovine origin and hospital human being characterized as sensible and phenotypically resistant the meticilin (MSSA and MRSA, respectively). The minimum inhibitory concentration (CIM) of the isolated cefalexin and in association, was determined by the method of the dilution in plates and diffusion. The Cefalexin association - ethanolic extract of *Momordica charantia* Linn, produced a synergic effect in all the samples; as well as the norfloxacin association - ethanolic extract of *Momordica charantia* Linn. The extract of the *Momordica*, demonstrated antimicrobial activity on bovine and in the samples human beings, data that had stimulated the evaluation for method of diffusion of a bigger number of samples. The results of this study show the importance of if evaluating alternative ways in the combat the infections and to the development of resistance the drugs in *S. aureus*, particularly in multiresistant, contributing for one better understanding on the genetic aspects of the resistance to antimicrobials.

**KEY WORDS:** Antimicrobials effect; *Momordica charantia* Linn; *S. aureus*

## INTRODUÇÃO

### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria que se apresenta na forma de cocos Gram-positivos e produz um amplo espectro de doenças desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e outros animais. É um importante patógeno nosocomial, sendo descrito como agente etiológico significativo em infecções hospitalares; é também o mais freqüente microrganismo associado às mastites caprina e bovina (WATTS, 1988).

A patogênese de *S. aureus* é devida a fatores de virulência na forma de toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à parede celular, mediados por genes plasmidiais ou cromossômicos, que combinados conduzem à doença. *S. aureus* utiliza extensivas estratégias para sobrepujar as defesas microambientais do hospedeiro infectado e potencialmente colonizar os tecidos.

Linhagens de *S. aureus* têm sido isoladas de diversas espécies de animais sadios, fato este que é de grande importância no campo da saúde pública e no da saúde animal (PEREIRA, 2000). No Brasil, linhagens de *S. aureus* foram isoladas de bovinos em fase de lactação, na pele do úbere e tetas e menos frequentemente nas fossas nasais (PEREIRA; SIQUEIRA-JUNIOR, 1995).

### Resistência a Antimicrobianos em *S. aureus*

Há muito tempo têm-se estudado várias formas de controle e erradicação de doenças causadas por *Staphylococcus aureus* através de agentes antimicrobianos, grandemente variados em suas ações, aplicações e eficácia, porém o uso abusivo e indiscriminado de agentes na prática clínica humana e veterinária tem um efeito seletivo no surgimento e manutenção de resistência a drogas.

Particularmente, em *S. aureus* a sua versatilidade no desenvolvimento de resistência a vários agentes antimicrobianos contribui para a sobrevivência em ambientes hospitalares e difusão entre os pacientes, como é o caso do *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que usualmente é resistente não somente as penicilinas e cefalosporinas, mas também aminoglicosídeos, lincomicinas, tetraciclina, rifampicinas e mais

recentemente a vancomicina (VAN WAMEL et al., 1995; GILLESPIE et al, 1997).

Além da vasta resistência aos mais diversos antibióticos, o *S. aureus* pode ainda apresentar resistência a íons metálicos, como arsenato, cádmio e mercúrio, e a biocinas, tais como acriflavina, cloreto de benzalcônio, ceftrimida 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 anti-séptico (PEREIRA, 2000).

Uma tentativa de manter o uso de antimicrobianos atuais poderia ser encontrada em sua combinação com outros produtos, como os produtos naturais, que representariam uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e outros patógenos, no que diz respeito ao aparecimento crescente de resistência múltipla (MUSUMECCI et al., 2003; PEREIRA, 2000).

### Considerações sobre fitoterapia

A medicina tem falhado, geralmente no tratamento de infecções em longo prazo, nas doenças degenerativas associadas ao desenvolvimento da resistência a agentes antimicrobianos, particularmente nas infecções causadas por *S. aureus*. Desta forma, um conjunto de medidas preventivas e curativas são necessárias, em particular a busca de novos agentes antimicrobianos, e este é o papel mais importante dos produtos naturais potencialmente capazes de resolver algumas condições crônicas e constituir excelente alternativa para solucionar o problema da resistência aos antimicrobianos colocados à disposição na prática clínica.

A utilização das plantas pela medicina popular, particularmente seu uso em medicina veterinária e a divulgação dos êxitos conduziram a exploração científica, proporcionando um conhecimento químico-farmacológico de milhares de plantas (SILVA et al., 2003)

### *Momordica charantia* Linn. (Melão de São Caetano)

A *Momordica charantia* L. pertencente à família das *Cucurbitáceas*, planta herbácea rasteira, apresenta muitos ramos, flores amarelo-pálidas ou brancas. No

Brasil é pouco consumido embora na Europa seja consumido e produzido em larga escala. Bastante comum nos terrenos abandonados e muitos bem climatizados no Brasil do sul até o nordeste. As partes da planta mais utilizadas pela medicina popular são principalmente as folhas e em menor medida os talos e os frutos. Podendo ser preparada em varias formas: infusão (folha e raiz), cataplasma (fruto), unguentos (folhas), azeite (sementes). Sua utilização é bastante variada, a cada dia pesquisadores de todo mundo comprovam a eficácia dita pela medicina popular trazendo relatos de atividades em parasitoses intestinais, calculo renal, piolhos e grandes propriedades antiinflamatória, anti-séptica, anti-diarréica e teratogênico. O extrato preparado nas formas aquosa e etanóica apresentam também ação antibacteriana, antifúngica, antielmíntica (PEREIRA et al., 2006).

### As fluorquinolonas

Para superar o surgimento de resistência por parte das bactérias, estudos têm sido reportados com a combinação de extratos vegetais com antibióticos, como as fluoroquinolonas, contra bactérias de importância clínica. (YAM; HAMILTON-MÜELLER; SHAH, 1998; NASCIMENTO et al., 2000).

O objetivo do trabalho foi o de determinar a atividade antimicrobiana *in vitro*, através da Concentração Inibitória mínima, do extrato do Melão de São Caetano (*Momordica charantia* Linn), em associação com a cefalexina e uma fluorquinolona, sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem humana hospitalar, caracterizadas fenotipicamente em sensíveis e resistentes a metilina (MRSA) e linhagens bovinas isoladas no Estado da Paraíba.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação do extrato da *Momordica charantia* Linn.

A matéria prima (folhas) da *Momordica Charantia* Linn (Melão de São Caetano) foram obtidas e identificadas botanicamente no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal de Pernambuco. As folhas foram colocadas para secar em estufa a 33<sup>o</sup>C.

### Linhagens bacterianas

Foram utilizadas neste trabalho, amostras de *S. aureus* de origem animal, isoladas de bovinos em fase de lactação, na região de Patos – PB (PEREIRA; SIQUEIRA-JÚNIOR, 1995) e amostras de *S. aureus* de origem humanas obtidas a partir de pacientes internados no hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB, caracterizadas fenotipicamente como sensíveis e resistentes a metilina .

### Determinação da concentração inibitória mínima do extrato da *Momordica charantia* Linn em associação com cefalexina

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de Melão de São Caetano em associação com a

cefalexina sobre amostras representativas de *S. aureus* de origem bovina e humana foi realizado a determinação das CIMs de cada droga isolada, para isso, foi utilizada uma escala de antibióticos e da Fluoroquinolona com concentrações crescentes de cefalexina e Norfloxaxina, que variaram de 0,01565 a 512 µg da droga por mL do meio de cultivo com o extrato. As amostras de *S. aureus* foram cultivadas em caldo nutritivo (Brain Heart Infusion – DIFCO); incubadas a 37°C por 18 a 20 horas, diluídas a 10<sup>-2</sup> em solução salina e inoculada com uma multialça. As placas foram incubadas a 37°C por 18 – 24 horas e foi considerada como CIM a menor concentração da droga que inibiu completamente o crescimento bacteriano.

### Determinação da atividade antimicrobiana do extrato *Momordica charantia* Linn em associação com Norfloxaxina

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato do Melão de São Caetano em associação com norfloxaxina, sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion – DIFCO); incubadas a 37°C por 18-20 horas. Foram realizadas perfurações no meio de cultura (Agar Müller Hinton – DIFCO) de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nos orifícios foram colocados um volume de 50µl da solução do extrato diluída, variando da diluição 1:1 até 1:1024. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano observada pela presença do halo de inibição. Em estudo comparativo foi realizado em todas as amostras, o teste de sensibilidade a antibióticos com discos de norfloxaxina (Bioclin - 10 UD). Como controle da atividade do extrato foi empregada a linhagem ATCC 29213.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos na prática clínica humana e veterinária tem um efeito seletivo no surgimento e manutenção de resistência a drogas. Particularmente, em *S. aureus* a sua versatilidade no desenvolvimento de resistência a vários agentes antimicrobianos contribui para a sobrevivência em ambientes hospitalares e difusão entre os pacientes, como é o caso do *S. aureus* resistente a metilina (MRSA).

Da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da associação da Cefalexina e norfloxaxina com o extrato de melão de São Caetano sobre amostras representativas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina e humana (Tabela 1).

Uma tentativa de manter o uso de antimicrobianos atuais poderia ser encontrada em sua combinação com outros produtos, como os produtos naturais, que representariam uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e outros patógenos, no que diz respeito ao aparecimento crescente de resistência múltipla (MUSUMECI et al., 2003; PEREIRA, 2000).

**Tabela 1** - Concentração inibitória mínima Cefalexina em associação com o extrato do Melão sobre amostras representativas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

Linhagens Bacterianas	CIM das amostras em ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Cef	Ext + Cef
<i>S. aureus</i>		
316U	8	256
249FN	8	64
313FN	2	8
ATCC	2	256
311FN	8	256

Cefalexina, Ext – Diluições do extrato

Da atividade antimicrobiana por difusão da São Caetano sobre amostras de *Staphylococcus aureus* de associação da Norfloxacin com o extrato do Melão de origem bovina e humana (Tabelas 2 e 3; Figuras 1 e 2).

**Tabela 2** – Concentração inibitória mínima da Norfloxacin em associação com o extrato do melão de São Caetano sobre amostras representativas de *Staphylococcus aureus* de origem humana.

Linhagens Bacterianas	Assoc.	Diâmetro dos halos de inibição (mm)								
		Diluições								
<i>S. aureus</i>		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
01H	40	37	35	34	31	26	23	19	18	12
03H	36	35	34	32	30	27	24	19	18	12
06H	37	35	34	33	32	30	29	25	23	20
08H	41	38	37	33	29	27	21	17	12	00
09H	39	37	35	29	27	25	21	19	12	00
104H	35	33	31	28	25	21	17	14	12	00
117H	32	29	26	25	23	20	16	13	00	00
126H	33	32	29	27	25	20	16	12	00	00
148H	39	31	30	29	26	23	20	15	00	00
05C	34	30	26	25	23	19	15	12	00	00
08C	32	31	28	26	25	24	21	17	14	12
10C	31	29	26	25	21	20	18	13	12	00
149L	18	16	14	13	12	00	00	00	00	00
173I	33	30	28	25	22	18	14	00	00	00
201I	30	26	24	23	19	16	12	00	00	00
209I	33	32	30	28	27	26	25	23	22	18
13N	34	29	28	27	24	20	14	12	00	00

Nor = 27 mm Melão de São Caetano = 13 a 32 mm

ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido, v.04, 12-17, 2008.

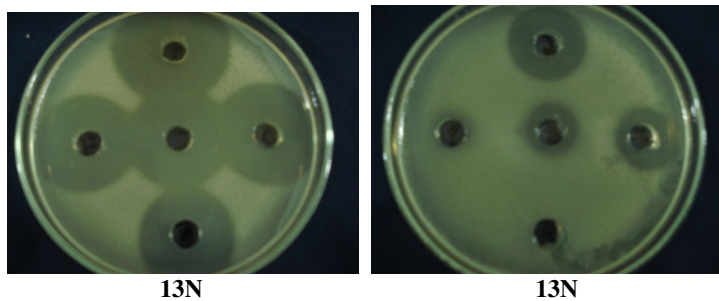
[www.cstr.ufcg.edu.br/acsa](http://www.cstr.ufcg.edu.br/acsa)

Os resultados obtidos da associação dos antimicrobianos cefalexina + melão de São Caetano variaram de 8 a 256 µg/ml. O extrato do Melão de São Caetano, demonstrou potencial atividade antimicrobiana sobre as amostras bovinas (halos de inibição entre 16 a 30 mm) e nas amostras humanas de 13 a 32 mm, dados que estimularam a avaliação por método de difusão da associação de um maior número de amostras.

**Tabela 3** Concentração inibitória mínima Norfloxaxina em associação com o extrato do Melão de São Caetano sobre amostras representativas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

Linhasgens	<u>Diâmetro dos halos de inibição (mm)</u>									
	Bactérias									
S. aureus	Concentração do extrato (mg/ml)									
	ASSOC. 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
ATCC	28	27	25	24	23	21	17	15	12	00
121FN	38	35	34	30	29	26	21	20	18	00
233FN	36	34	32	31	28	27	23	18	16	15
311FN	33	31	30	26	25	19	14	12	11	00
322FN	21	20	19	18	16	13	12	10	00	00
102U	36	35	33	31	29	24	18	17	12	00
122U	40	38	37	36	32	28	21	18	13	11
250U	30	29	27	26	24	22	18	17	13	00
313FN	19	18	18	17	15	14	12	11	00	00
314FN	32	31	29	28	27	26	21	20	18	17
223U	35	33	26	23	18	15	14	12	00	00
303U	38	34	32	28	24	14	00	00	00	00

FN = Fossa Nasal; U = Úbere; L = Leite  
 Nor = 27 mm  
 Goiabeira 12 – 16 mm



**Figura 1-2.** Atividade antimicrobiana norfloxaxina em associação com o extrato do Melão de São Caetano (*Momordica charantia* Linn) sobre *Staphylococcus aureus* de origem humana.

A associação norfloxacina + melão de São Caetano sobre as amostras humanas, os halos de inibição foram de 18 a 41 mm e sobre as amostras bovinas produziu halos de inibição que variaram de 27 a 46 mm. A norfloxacina em associação com o extrato do melão apresenta excelente efeito sinérgico. A combinação com produtos naturais frequentemente utilizados pela população e os antibióticos aqui ensaiados, poderiam representar uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e outros patógenos, como também, a prevenção do desenvolvimento crescente de resistência múltipla.

## CONCLUSÕES

A cefalexina em associação com o extrato do Melão sobre amostras representativas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina apresenta um efeito sinérgico.

Norfloxacina em associação com o extrato do melão de São Caetano sobre amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina e humana, apresenta um efeito sinérgico.

## REFERÊNCIAS

GILLESPIE, S. H.; MCHUGH, T. D. The biological cost of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, v.9, p. 337-338, 1997.

MUSUMECI, R. et al. Berberis aetnensis C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Journal Antimicrobial Agents*. v. 22, n. 1, p.48-53, 2003.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistance bacteria. *Braz. J. Microbiol.* v.31, p. 247– 256, 2000.

PEREIRA, M. S. V. *Atividade in vitro de Fluoroquinolonas e Ação sobre Plasmídeos em Amostras de Staphylococcus aureus Humanas e Bovinas*. Recife, Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Pernambuco, 2000.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, p. 391-395. 1995.

PEREIRA, L. F. Efeito antimicrobiano dos extratos de momordica charantha linn. e psidium Gecajava Linn. isolados e em associação sobre linhagens de *staphylococcus aureus*. In: Anais do XIV encontro de iniciação científica da UFPB, 2006.

SILVA, M. A. R. et al. Influencia do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) sobre plasmídeos nos processos de cura e transmissibilidade genética em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. In: Congresso Brasileiro de Genética, Gramado, 2003

VAN WAMEL, W. J. B. et al. Phenotypic characterization of epidemic versus sporadic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical Microbiology*, v. 7, p. 1769-1774. 1995.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 16, p. 41-66. 1988.

YAM, T.S., HAMILTON-MÜELLER, J.M.T., SHAH, S. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' Synthesis, and  $\beta$ -lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. v. 42, p. 211–216, 1998.