



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

SAMARA LOWISI BEZERRA QUARESMA

**IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E AOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora* L.**

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2014

SAMARA LOWISI BEZERRA QUARESMA

IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E AOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora* L.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em cumprimento à exigência para obtenção do Título de bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª. Raissa Mayer Ramalho Catão

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Q18i Quaresma, Samara Lowisi Bezerra.

Identificação de *Staphylococcus aureus* e avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos e aos extratos de *Eugenia uniflora* L. [manuscrito] / Samara Lowisi Bezerra Quaresma. - 2014.

50 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Raïssa Mayer Ramalho Catão, Departamento de Farmácia".

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Antimicrobianos. 3. Extratos vegetais. 4. Pitangueira. I. Título.

21. ed. CDD 579

SAMARA LOWISI BEZERRA QUARESMA

IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E AOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora* L.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em cumprimento à exigência para obtenção do Título de bacharel em Farmácia.

APROVADA: 24/ novembro / 2014

Raissa Mayer Ramalho Catão

Profª Drª Raissa Mayer Ramalho Catão

(Orientadora – UEPB)

Harley da S. Alves

Prof. Dr. Harley da Silva Alves (UEPB)

Examinador

Maricelma Ribeiro Moraes

Profª. Drª. Maricelma Ribeiro Moraes (UEPB)

Examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela força e coragem durante toda essa longa caminhada. O que seria de mim sem a fé que eu tenho Nele. Porque Ele é grande e misericordioso. A Ele sejam a glória e a honra para todo sempre. Amém!

Aos meus pais, Darci Bezerra e Djaildo Quaresma pelo incentivo e apoio.

A professora Dra. Raíssa Catão, pela disponibilidade em orientar, por ser essa pessoa sempre alegre e bem humorada, por estar sempre acessível, durante todo este período de estudo.

Aos professores do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, pelos ensinamentos compartilhados, pois se tornam em parte, responsáveis pela pessoa que serei como profissional, em especial ao Prof. Dr. Harley Alves e a Prof^ª. Dr^ª Maricelma Moraes por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Aos colegas de classe que se tornaram amigos para vida, os quais me acolheram quando cheguei deslocada na turma Farmácia 2010.1, vocês foram essenciais: Gabriela, Nadjaele, Renata, Ízola e Vannuty.

Aos amigos de sempre, Amanda, Arthur, César, Joyce, Fabrícia, Ivna, Targino e a família Santino pela amizade e carinho a mim ofertado.

Aos colegas de laboratório, Wilma Raianny e Luis Augusto, pela prontidão em ajudar e possibilitar a realização deste trabalho.

Aos que fazem a família Bukan (galera Underground) por me proporcionarem a descontração necessária nos momentos de grande preocupação, vocês tornaram-se indispensáveis.

A todos, enfim, que de maneira direta ou indireta se mostraram atenciosos e me apoiaram fazendo assim parte dessa conquista.

A vocês o meu muito obrigada!

Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece.
(Filipenses 4:13)

RESUMO

QUARESMA, S.L.B. **Identificação de *Staphylococcus aureus* e avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos e aos extratos de *Eugenia uniflora* L.** Campina Grande, Monografia. 2014. 48p. Universidade Estadual da Paraíba.

O gênero *Staphylococcus* compõe grande grupo de micro-organismos de importância clínica e é responsável por inúmeras e variadas afecções e síndromes em humanos e animais. Dentre as principais espécies, destaca-se *Staphylococcus aureus*, considerada como a de maior poder patogênico, pela capacidade de produzir inúmeros fatores de virulência, além de apresentar grande resistência aos antimicrobianos de uso clínico. Nos últimos anos, muitas plantas têm sido avaliadas não só pela atividade antibacteriana, mas também como agente modificador da atividade antibiótica. O uso associado de antimicrobianos às plantas medicinais e/ou seus subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, bem como não interferir na resposta esperada. Os objetivos deste estudo foram confirmar pelos métodos convencionais a identificação e pureza de 20 cepas de *Staphylococcus* sp. pertencentes a coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos usuais e extratos vegetais, produzidos a partir da *Eugenia uniflora* L. além de avaliar o efeito interativo por associação entre estes extratos e alguns antimicrobianos. Os ensaios microbiológicos *in vitro* para avaliação da atividade antiestafilocócica, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do efeito interativo dos extratos com antimicrobianos foram realizados por difusão em meio sólido utilizando discos de papel de filtro. Os antimicrobianos utilizados nos testes de interação foram discos de penicilina G (10 UI) e eritromicina (15 µL) embebidos em 20 µL dos extratos ativos na sua CIM. Os resultados mostraram que os extratos isolados das folhas e frutos apresentam ação antiestafilocócica, porém, no estudo de interação apresentaram efeito antagônico e/ou indiferente quando associados aos antimicrobianos, evidenciando que o uso de produtos derivados de plantas quando associadas aos antimicrobianos podem interagir com estes produzindo *in vitro* diferentes efeitos interferentes.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*; antimicrobianos; extratos vegetais; pitangueira.

ABSTRACT

QUARESMA, S.L.B. **Identification of *Staphylococcus aureus* and evaluation of the antimicrobial susceptibility and extracts from *Eugenia uniflora* L.** Campina Grande, Monografia. 2014. 48p. Universidade Estadual da Paraíba.

The *Staphylococcus* genus comprise a large group of microorganisms of clinical importance and are responsible for numerous and varied diseases and syndromes in humans and animals. Among the main species, *Staphylococcus aureus* stands out, considered as having the most pathogenic power, through the ability to produce numerous virulence factors, besides showing great resistance to antimicrobials in clinical use. In recent years, many plants have been evaluated not only for antibacterial activity, but also as a modifier agent of the antibiotic activity. The combined use of antimicrobials and medicinal plants and /or their byproducts may act by inhibiting or intensifying the therapeutic effect of conventional drugs, as well as not interfering with the expected response. This study aimed to confirm by conventional methods the identification and purity of 20 strains of *Staphylococcus sp.* that belong to the collection of samples of the Laboratory of Microbiology at Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), evaluate the susceptibility profile to the usual antimicrobial and vegetal extracts produced from *Eugenia uniflora* L., as well as evaluating the interaction effect between these extracts and some antimicrobials. The Microbiological assays *in vitro* to evaluate antistaphylococcal activity, determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the interactive effect of the extracts with antimicrobial agents were performed by diffusion in solid medium using filter paper discs. The Antimicrobials used in interaction tests were discs of penicillin G (10 IU) and erythromycin (15 µL) soaked in 20 µL of the active extract in its MIC. The results indicate that the isolated extracts of leaves and fruits have antistaphylococcal activity, however, in the interaction study, they showed an antagonistic and / or indifferent effect when associated with antimicrobials, evidencing that plant-derived products, when associated with antimicrobials, can interact with them and produce different interfering effects *in vitro*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; antimicrobials; vegetal extract; pitangueira.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	<i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitangueira).....	24
FIGURA 2.	Fluxograma metodológico.....	26
FIGURA 3.	Fluxograma dos testes realizados para identificação das cepas.....	27
FIGURA 4.	Processo de maceração para obtenção dos extratos de <i>E. uniflora</i> L.	28
FIGURA 5.	Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>E. uniflora</i> L.	29
FIGURA 6.	Procedimento metodológico para determinação da CIM dos extratos de <i>E. uniflora</i> L.	30
FIGURA 7.	Colônias de <i>S. aureus</i> em Ágar Manitol Salgado.....	32
FIGURA 8.	Perfil de sensibilidade e resistência das cepas de <i>S. aureus</i> frente aos antimicrobianos.....	35
FIGURA 9.	Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de <i>E. uniflora</i> L. frente à <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	36
FIGURA 10.	Determinação da CIM na cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	38
FIGURA 11.	Determinação da CIM dos extratos hidroalcoólicos de <i>E. uniflora</i> L. frente às cepas de <i>S. aureus</i> (n = 20).....	39
FIGURA 12.	Efeito da interação entre os extratos de <i>E. uniflora</i> L.e os antimicrobianos. (A) <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (B) <i>S. aureus</i> multirresistente (nº 12)	41
FIGURA 13.	Perfil de sensibilidade de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>S. aureus</i> multirresistente nº 12 frente a eritromicina (ERI) e penicilina G (PEN)	42
FIGURA 14.	Perfil de sensibilidade de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>S. aureus</i> multirresistente nº 12 frente a eritromicina e penicilina G após associação com os extratos de <i>E. uniflora</i> L. (pitanga) a 25%	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Perfil de sensibilidade das cepas de <i>S. aureus</i> frente aos antimicrobianos convencionais.....	33
TABELA 2.	Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>E. uniflora</i> L. frente à <i>S. aureus</i> ATCC 25923	36
TABELA 3.	Diâmetro dos halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de <i>E. uniflora</i> L. em diferentes concentrações frente às cepas de <i>S. aureus</i>	38
TABELA 4.	Avaliação da associação da CIM dos extratos hidroalcoólicos de <i>E. uniflora</i> L. com a eritromicina frente a <i>S. aureus</i>	40
TABELA 5.	Avaliação da associação da CIM dos extratos hidroalcoólicos de <i>E. uniflora</i> L. com a penicilina G frente a <i>S. aureus</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
AMS	Ágar Manitol Salgado
AS	Ágar Sangue
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CRO	Ceftriaxona
CLSI	ClinicalLaboratory Standards Institute
EF	Extrato do Fruto
EFL	Extrato das Folhas
ERI	Eritromicina
ET	Extrato dos Talos
GEN	Gentamicina
GISA	Glycopeptide Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NOR	Norfloxacin
ORSA	Oxacillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

OXA	Oxalicina
PBP2	Penicillin-binding protein 2
PEN	Penicilina G
RIF	Rifampicina
SUT	Sulfazotrim
TET	Tetraciclina
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UI	Unidades Internacionais
VISA	Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Considerações gerais sobre o gênero <i>Staphylococcus</i>	16
3.2	Principais patologias causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.3	Antibióticos de uso clínico e mecanismos de ação.....	19
3.3.1	Antibióticos.....	19
3.3.2	Resistência bacteriana aos antimicrobianos	20
3.4	Extratos vegetais	22
3.5	<i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitangueira)	23
4	METODOLOGIA	26
4.1	Identificação dos micro-organismos.....	26
4.2	Avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma).....	27
4.3	Determinação da atividade antimicrobiana do extrato de <i>E.</i> <i>uniflora</i> L. (Pitangueira).....	28
4.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de <i>E. uniflora</i> L.	29
4.5	Estudo da interação entre antimicrobianos convencionais e os extratos hidroalcoólicos de <i>E. uniflora</i> L.	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	Identificação dos micro-organismos.....	32
5.2	Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	32
5.3	Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>E.</i> <i>uniflora</i> L.	35
5.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de <i>E. uniflora</i> L.	37

5.5	Estudo de interação entre os antimicrobianos selecionados e os extratos de <i>E. uniflora</i> L.	39
6	CONCLUSÃO E PESPECTIVAS	43
	REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

As bactérias Gram positivas, especialmente os cocos, compõem um grupo de grande importância clínica, estão entre os micro-organismos mais frequentemente isolados de amostras biológicas humanas em laboratórios de microbiologia e são responsáveis por inúmeras e variadas afecções e síndromes (HIRAI, 2014).

Os estafilococos são células esféricas Gram positivas, são as bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente podendo estar presente na pele e mucosas do homem e de outros animais (JAWETZ et al., 2012).

Dentro do gênero *Staphylococcus*, o *Staphylococcus aureus* é reconhecido como o agente de maior poder patogênico além de ser considerado como um grande problema mundial, responsável por problemas relacionados à assistência à saúde causando infecções comunitárias e nosocomiais. Esta espécie produz grande variedade de fatores de virulência além de toxinas extracelulares que estão relacionados à sua patogenicidade. Apresenta também resistência a maioria dos antimicrobianos utilizados rotineiramente na clínica médica (CARDOSO et al., 2000).

Apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção hospitalar, o *S. aureus* continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos sadios são colonizados intermitentemente por este agente e podem albergar o micro-organismo na nasofaringe, na pele e na vagina. A partir destes sítios o *S. aureus* pode contaminar outras áreas do corpo, objetos inanimados por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções graves e muitas vezes letais (BRASIL, 2013).

Uma estratégia atual no tratamento de doenças causadas por bactérias vem sendo a busca por alternativas que visem minimizar danos à saúde e proporcionem maior ação contra processos infecciosos, tendo em vista que alguns antibióticos convencionais têm perdido a eficácia na sua atividade (NASCIMENTO, 2013).

Segundo Sena Filho et al (2006), muito antes da humanidade descobrir a existência dos micróbios, já se tinha ideia do potencial de cura de certas plantas, de fato, que continham o que nós atualmente caracterizamos como princípios antimicrobianos.

A utilização de plantas na medicina popular constitui uma prática muito antiga e “o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos”, tornando-se cada vez mais importante a investigação, o estudo sistematizado e científico de diferentes espécies (MACIEL et al., 2002).

Uma alternativa na busca de melhorar a ação de determinados antimicrobianos seria associa-los a extratos vegetais oriundos de plantas medicinais de uso popular que possuem atividade terapêutica já conhecida e comprovada.

Contudo, é difícil selecionar as espécies vegetais a investigar quanto ao potencial farmacológico, levando-se em conta a imensa quantidade de espécies a explorar. Os relatos da medicina popular costumam ser vistos como eficazes na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas e, são orientadores nas pesquisas com plantas medicinais (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

Deste modo, conhecendo-se a problemática que envolve diversos tipos de infecções causadas por estes micro-organismos, bem como os mecanismos de resistência que os mesmos vêm desenvolvendo frente às várias classes de antimicrobianos é importante a realização do estudo de avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para se aplicar uma terapia antimicrobiana adequada além de avaliar o comportamento desses micro-organismos frente a produtos vegetais e as possíveis interações entre os antimicrobianos e extratos vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Identificar e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* sp. mantidas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar às cepas de *Staphylococcus* sp. utilizando metodologia convencional;
- Determinar o perfil de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* frente a antimicrobianos convencionais utilizados na clínica médica;
- Determinar o perfil de sensibilidade das cepas de *S. aureus* frente a extratos de *Eugenia uniflora* L. produzidos no Laboratório de Fitoquímica da UEPB;
- Avaliar o efeito interativo entre a associação de antimicrobianos convencionais e extratos de *E. uniflora* L. frente às cepas de *S. aureus*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Considerações gerais sobre o gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus*, pertence à família Micrococaceae e foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e atualmente é um dos micro-organismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (SANTOS et al.,2007).

Os representantes desse gênero apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, imóveis, isolados ou agrupados em “cachos de uva”. São anaeróbios facultativos ou aeróbios, não formadores de esporos e catalase positivo. É constituído por pelo menos 40 espécies, porém, as de importância clínica encontradas com maior frequência são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. (JAWETZ et al., 2012).

Os estafilococos existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos e nos equipamentos de processamentos de alimentos, nas superfícies, nos seres humanos e nos animais, sendo esses dois últimos os principais reservatórios do agente (FORSYTHE, 2002). São suscetíveis a altas temperaturas, desinfetantes e soluções antissépticas. No entanto, o micro-organismo pode sobreviver em superfícies secas por longos períodos. Os organismos podem ser transferidos a um indivíduo suscetível tanto por contato direto como através de fômites, como, vestimentas e roupas de cama contaminadas (MURRAY; ROSENTHAL, PFALLER, 2009).

De acordo com Trabulsi e Alterthum (2004), o *S. epidermidis* é uma das espécies, frequentemente mais encontrada dentre os *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN). Geralmente encontram-se colonizando a microbiota normal da pele e mucosas e são responsáveis por causarem infecções em indivíduos expostos a fatores de risco. As infecções geralmente ocorrem em ambientes hospitalares, durante tratamentos e intervenções cirúrgicas, nas quais são utilizados cateteres e implantes plásticos.

S. saprophyticus é outra espécie, também frequentemente relatada como habitante normal da pele e da região periuretral do homem e mulheres, sendo considerado, inclusive como um dos agentes mais comuns de infecção urinária, depois da *Escherichia coli*, principalmente em mulheres na faixa de 20 a 40 anos de idade. A patogenidade está relacionada à sua capacidade de aderir às células do epitélio urinário (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

O *S. aureus* é assim denominado devido à pigmentação amarela e da formação de um halo de hemólise ao redor de suas colônias (aureus = dourado) (TORTORA et al., 2005). É uma bactéria também do grupo dos cocos Gram-positivos, que faz parte da microbiota humana, e é frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis (SANTOS et al.,2007). Essa espécie é produtora da enzima coagulase (coagulase positiva), e sua patogenicidade está relacionada à presença de vários fatores de virulência, destacando-se à produção de toxinas (VANSO et al., 2013).

Um dos patógenos humanos mais importantes é o *S. aureus*, uma vez que atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; BARBALHO, 2011).

De acordo com Murray, Rosenthal e Pfaller (2009), aproximadamente 30% dos adultos saudáveis são portadores persistentes de *S. aureus* na nasofaringe, com uma incidência maior em pacientes hospitalizados, médicos, indivíduos com doença equizematosa de pele e aqueles que usam agulhas regularmente, tanto de forma ilícita ou por questões médicas. Pelo fato dos estafilococos serem encontrados na pele e na nasofaringe, a disseminação das bactérias é comum e o micro-organismo é responsável por muitas das infecções adquiridas no hospital.

É importante lembrar que, devido à sua capacidade de resistir à dessecação e ao frio, o *S. aureus* consegue permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira, o que torna sua distribuição ainda mais ampla (CAVALCANTI et al., 2006).

Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são os componentes da superfície celular e toxinas. Algumas evidências sugerem que determinadas enzimas também podem ser consideradas fatores de virulência (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A característica mais extraordinária do *S. aureus* é a sua elevada capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Nenhuma outra espécie bacteriana, com semelhante nível de virulência para o organismo humano, apresenta tamanho grau de flexibilidade para suportar e sobreviver à terapia antimicrobiana (SOUZA, 2011).

3.2. Principais patologias causadas por *Staphylococcus aureus*

As doenças infecciosas são as principais causas de mortes prematuras no mundo, sendo estimado 15 milhões de óbitos por ano. O crescimento da resistência bacteriana é um

fator importante na ocorrência deste quantitativo de mortes, além de que, esta ameaça também dificulta a cura e eleva os gastos com a assistência à saúde (WHO, 2008).

As infecções estafilocócicas podem ser classificadas em superficiais e profundas. As superficiais afetam a pele e o tecido superficial subcutâneo e, geralmente, são decorrentes da invasão direta dos tecidos por amostras de *S. aureus* existentes na pele ou mucosa. Com exceção da pneumonia por aspiração, as infecções profundas são decorrentes de bacteremias que se originam nos focos da infecção superficial ou, eventualmente, numa pneumonia por aspiração (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Este micro-organismo tem ocupado um lugar de destaque na etiologia de infecções hospitalares sendo que aproximadamente 70% a 100% são causadas por amostras multirresistentes (VIOLANTE, 2008).

O sinal característico de infecção estafilocócica é a formação de abscesso que acompanha o processo inflamatório. O abscesso é uma cavidade cheia de exsudato purulento e revestida por uma camada de fibrina e de células fagocitárias, cuja função é impedir o progresso da infecção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos. Algumas infecções por *S. aureus* são agudas, piogênicas, e pode disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais, são também frequentemente documentados (LOWY, 1998).

O *S. aureus* causa doença pela produção de toxina ou por invasão direta e destruição tecidual. As manifestações clínicas de algumas doenças estafilocócicas são quase exclusivamente o resultado da atividade de uma toxina, enquanto outras doenças resultam da proliferação dos organismos, o que leva à formação de abscessos e a destruição dos tecidos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Segundo Lowy (1998), portadores nasais e pacientes colonizados por *S. aureus* têm sido descritos como fator de risco para o desenvolvimento de infecções, e 11% a 43% dos pacientes colonizados adquirem infecção. O aspecto do processo infeccioso depende dos fatores de virulência do patógeno e de mecanismos de defesa do hospedeiro.

Mortes associadas a infecções bacterianas variam de 12% a 81% no mundo todo, dependendo das condições e particularidades dos tipos de pacientes e tratamentos utilizados, observando-se que a elevação das taxas de mortalidade está associada, fundamentalmente, ao aumento do espectro de resistência dos patógenos (MURRAY et al, 2003).

Cerca de 50% a 87% das infecções hospitalares, têm como agente responsável o *S. aureus*, sendo que em 16% a 43% dos casos os pacientes evoluem para o óbito em função do

amplo espectro de resistência deste micro-organismo (METAN et al, 2005). Entretanto, estes valores percentuais podem variar de acordo com a realidade de cada hospital (CATÃO et al., 2013). Bacteremia por *S. aureus* é uma das principais causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DAS; O'CONNELL; LAMBERT, 2007). No entanto, estes micro-organismos também podem ser isolados de várias amostras biológicas, destacando-se as secreções de feridas diversas, sangue, urina e ponta de cateter (KLUCZYNICK et al., 2010; CATÃO et al., 2013).

A maioria das infecções provocadas por *S. aureus* resulta de portadores assintomáticos, em que o indivíduo pode ser colonizado por períodos curtos ou longos, causando doenças quando há algum comprometimento do sistema imunológico (RUBIN et al., 1999; KLUCZYNICK et al., 2010).

O diagnóstico das infecções estafilocócicas é feito pelo exame bacterioscópico de esfregaços corados pelo método de Gram, isolamento e identificação do micro-organismo. No exame bacterioscópico das secreções purulentas, as células bacterianas podem ser observadas formando arranjos em cachos ou isoladamente. O isolamento é realizado nos meios de cultura comuns, como ágar sangue onde a bactéria forma colônias relativamente grandes e, com frequência, beta-hemolíticas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

3.3. Antibióticos de uso clínico e mecanismos de ação

3.3.1. Antibióticos

Antibióticos são substâncias químicas derivadas de organismos vivos, ou produzidos por eles, capazes de inibir processos vitais de outros organismos. Os primeiros antibióticos foram isolados de micro-organismos, mas alguns são obtidos de plantas e animais superiores. A literatura registra milhares de antibióticos, dos quais muitos são de origem microbiana. Contudo, apenas algumas dezenas encontram emprego na medicina (HARAGUCHI, 2014).

Os antibióticos são classificados segundo vários critérios: pela sua estrutura química, pela ação predominante ou espectro de ação, pela ação biológica, pela sua origem e pelo mecanismo de atuação (BRUMANO; GATTÁS, 2009).

De acordo com os critérios de classificação, é possível dividir os antimicrobianos em cinco classes: Inibidores da síntese da parede celular peptidoglicana, onde estão incluídos os β -lactâmicos e glicopeptídeos, são exemplos de β -lactâmicos as penicilinas, cefalosporinas, carbapenéns, monobactâmicos e inibidores da β -lactamase, no grupo dos glicopeptídeos

destacam-se a vancomicina e bacitracina. Outra classe são os inibidores da síntese da membrana citoplasmática, como as polimixinas e a anfotericina B; as quinolonas, rifampicina e as nitrofurantoínas pertencem à classe dos modificadores da síntese de ácidos nucleicos. Temos ainda a classe dos inibidores da síntese proteica, como os aminoglicosídeos, as tetraciclina, o clorafenicol, as eritromicinas, entre outros; e por fim, os modificadores do metabolismo energético, como as sulfonamidas e o trimetoprima (TAVARES, 1999; SCHAECHTER et al., 2002).

Os estafilococos são conhecidos pela capacidade de desenvolver resistência a vários antibióticos, principalmente dentro do ambiente hospitalar, onde esses medicamentos são amplamente utilizados (FINAN et al., 2001).

O primeiro antimicrobiano utilizado clinicamente na terapia das infecções por *S. aureus*, foi a penicilina, com eficácia até a década de 1960, quando começaram a aparecer os primeiros isolados resistentes. Desde então, o *S. aureus* tem ganhado espaço, posto que novas cepas resistentes têm surgido a cada novo antibiótico introduzido no tratamento das patologias a ele atribuídas (SANTOS et al., 2007; GELATTI et al., 2009).

Embora o *S. aureus* possa ser susceptível à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), é também conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a todas. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de testes de susceptibilidade. No entanto, deve ser lembrado que amostras isoladas de pacientes hospitalizados frequentemente são mais resistentes do que amostras isoladas de paciente na comunidade (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; CATÃO et al., 2012).

Mais de 95% dos *S. aureus* isolados de pacientes com infecções, em todo o mundo, não são sensíveis a tratamentos com antibióticos como penicilina e ampicilina (RUBIN et al., 1999). No Brasil, mais de 70% das cepas isoladas de *Staphylococcus*, seja de ambiente hospitalar ou da comunidade, são resistentes às penicilinas (G, ampicilina e amoxicilina), não se devendo, portanto, fazer indicação empírica destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas (TAVARES, 2000; CATÃO et al., 2013).

3.3.2. Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* é determinada por mutações em seus genes e/ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie, ou

eventualmente, de outras espécies. Em geral, a resistência por mutação é decorrente de uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve destruição ou inativação do antibiótico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

As cepas de *S. aureus* que apresentam resistência à meticilina são denominados MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) e os resistentes à oxacilina de ORSA (Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus*) (CRUZ, 2008; KOBAYASHI et al., 2009). Os *Staphylococcus* sp. oxacilina-resistentes geralmente também apresentam resistência a fluoroquinolonas, lincosamidas e macrolídeos, e a opção terapêutica atual são os glicopeptídeos (CATÃO et al., 2013). Porém há publicações em que se constata o isolamento de *S. aureus* oxacilina-resistentes com sensibilidade reduzida a glicopeptídeos (GISA), tornando, desta forma, mais restritas as opções terapêuticas (NICODEMO et al., 2002).

O aumento da frequência de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistentes a oxacilina (ORSA), também conhecidos como *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foi paralelamente acompanhado da aquisição de resistência à maioria dos antimicrobianos com atividade antiestafilocócica atualmente disponíveis. Por conseguinte, os glicopeptídeos, principalmente a vancomicina, tornaram-se uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes causadas por cepas ORSA ou MRSA. Contudo, a emergência de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) limitou consideravelmente as possibilidades de tratamento dessas infecções (OLIVEIRA et al., 2001).

A meticilina foi introduzida em 1959 para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina. Em 1961, no Reino Unido, ocorreram os primeiros relatos de cepas isoladas de MRSA, que rapidamente emergiram em outros países europeus, onde ocorreram surtos de infecções hospitalares provocados por este micro-organismo. Desde então, MRSA tornou-se um importante problema clínico, sendo considerado uns dos principais causadores de infecções, de tratamento cada vez mais difícil, especialmente em pacientes graves, devido às limitadas opções terapêuticas (ENRIGHT et al., 2002; SHOPSIN e KAREISWIRTH, 2001; TVERDEK et al., 2008; CATÃO et al., 2013).

Começando nos anos 1980, as cepas MRSA se disseminaram rapidamente em pacientes hospitalizados, alterando drasticamente a terapia disponível para a prevenção e o tratamento das infecções por estafilococos. Embora as infecções por MRSA fosse relativamente incomuns entre indivíduos sadios na comunidade, uma dramática alteração foi observada em 2003, quando novas cepas de MRSA foram relatadas como responsáveis por

surtos de infecções cutâneas e pneumonias graves adquiridas na comunidade (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A penicilina é a droga de escolha se a amostra for suscetível. No entanto, a ampla disseminação de amostras resistentes a esse antimicrobiano reduziu consideravelmente o seu valor. A resistência à penicilina é atribuída à produção de enzimas (β -lactamases) capazes de inativar essa droga. Além disso, o surgimento e a disseminação progressiva da resistência a meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas tiveram grande impacto na terapia das infecções estafilocócicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A resistência à meticilina é conferida por um gene (*mecA*), que codifica uma proteína que se liga à penicilina (*penicillin-binding protein 2* – PBP2) com baixa afinidade pelo antimicrobiano. As amostras que a apresentam são frequentemente referidas pela sigla MRSA e, muitas vezes, são resistentes a vários outros antimicrobianos. As amostras resistentes à meticilina são também consideradas resistentes aos demais β -lactâmicos, inclusive aqueles semi-sintéticos, como carbapenens e cefalosporinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A vancomicina consiste na droga de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas graves, especialmente as causadas por amostras de MRSA. Entretanto, o surgimento de amostras com susceptibilidade diminuída a esse antimicrobiano, as denominadas VISA (Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*), e que atualmente são denominados simplesmente de VRSA (Vancomycin Resistant *S. aureus*), chamam a atenção para a contínua problemática relacionada ao tratamento e ao controle das infecções causadas pelos estafilococos, sobretudo por *S. aureus* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

3.4. Extratos vegetais

Nos últimos anos, após o uso excessivo de medicamentos antimicrobianos pela população, houve um grande índice de micro-organismos que se tornaram resistentes à terapia convencional. Isso fez com que pesquisas de novas substâncias ativas para combater infecções, tanto em fontes animais como vegetais, fossem intensificadas (PEREIRA, 2007).

As estimativas apontam que cerca de 80% da população mundial emprega as medicinas indígenas ou tradicionais em cuidados básicos da saúde, especificamente àquelas que fazem uso de terapias que envolvem o uso de fitoterápicos (BAGETTA et al., 2010).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com

frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de nem sempre terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

Os produtos naturais são uma excelente fonte para a busca de novas drogas antimicrobianas, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (NOVAIS et al., 2003). Pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas representam um grande desafio para a descoberta, isolamento e identificação de fármacos (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011). Produtos naturais de origem vegetal podem alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando ou reduzindo a atividade antibiótica (COUTINHO et al., 2008).

Nos últimos anos, muitas plantas têm sido avaliadas não só pela atividade antibacteriana, mas também como um agente modificador da atividade antibiótica (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Para tanto, o estudo das associações de extratos e frações de plantas de uso medicinal com os medicamentos utilizados se faz necessário, em particular, as interações com os antimicrobianos utilizados na clínica, que podem causar interferência na ação farmacológica dos antibacterianos (SARAIVA et al., 2013).

A avaliação dos efeitos farmacológicos de extratos vegetais é utilizada como estratégia para pesquisa de novos medicamentos de origem vegetal. O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com plantas medicinais por ter a mais rica biodiversidade do planeta, distribuído em seis biomas distintos (NOLDIN et al., 2006). Estudos sobre a atividade de extratos vegetais e seu mecanismo de ação têm demonstrado que eles agem nas estruturas da parede celular dos micro-organismos (GONÇALVES, 2007).

Por tudo isso, justifica-se, inicialmente, o estudo *in vitro* para determinar-se o grau de sinergismo/antagonismo dos extratos e frações com alguns antibióticos utilizados na terapêutica clínica, frente à micro-organismos que tenham seu perfil de sensibilidade e resistência determinado (STERMITZ et al. 2000; WANG et al. 2003).

3.5. *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira)

O gênero *Eugenia* L. é um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 podem ser encontradas no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais. Neste gênero, uma das espécies é a *Eugenia uniflora* L., conhecida como Pitangueira, a qual se apresenta como arbusto ou árvore verde durante todo o ano. No Brasil a *E. uniflora* pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato

Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ANGELY, 1965; AURICCHIO; BACCHI, 2003).

A pitangueira é uma árvore medianamente rústica, de porte pequeno a médio. A copa globosa é dotada de folhagens perenes. As folhas pequenas e verde-escuras, quando amassadas, exalam um forte aroma característico, as flores são de cor branca, pequenas, solitárias ou em grupos (SCALON, 2001). A pitanga é o fruto da pitangueira. É uma dicotiledônea, apresenta-se na forma de drupa, globosos e sulcados, brilhantes e de cor vermelhas (a mais comum), amarela ou preta, com polpa carnosa e agridoce contendo uma a duas sementes. (LORENZI, 1998; LORENZI; MATOS, 2002).

As folhas da *E. uniflora* L são usadas na medicina popular brasileira e como hipotensora, antidiarreica, antigotosa, estomáquico, hipoglicemiante, e ainda como diurético, antirreumático e antifebril. Extratos da folha de pitanga tem sido a base para a verificação de ação anti-inflamatória (AURICCHIO; BACCHI, 2003; SCHAPOVAL et al., 1994). Alguns compostos do extrato de folha de pitanga têm sido mencionados como eficiente na ação inibitória para o *Epstein-Barr* vírus e também para alguns fungos além de atividade antimicrobiana sobre bactérias (HOLETZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006;).

Figura 1. *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira)



Fonte: <http://dorasantoro.blogspot.com.br/2013/03/pitanga.html>

Segundo Schapoval et al (1994) as folhas da *E. uniflora* são ricas em óleos essenciais contendo citronelol, geraniol, cineol e sesquiterpenos os quais têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana.

Tais propriedades biológicas ocorrem a partir de substâncias produzidas pela planta conhecidas por metabólicos secundários, os quais representam uma interface química entre as

plantas e o ambiente circundante, portanto sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

São exemplos de fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários: desenvolvimento, ritmo circadiano, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, entre outros. Alguns destes apresentam correlação entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

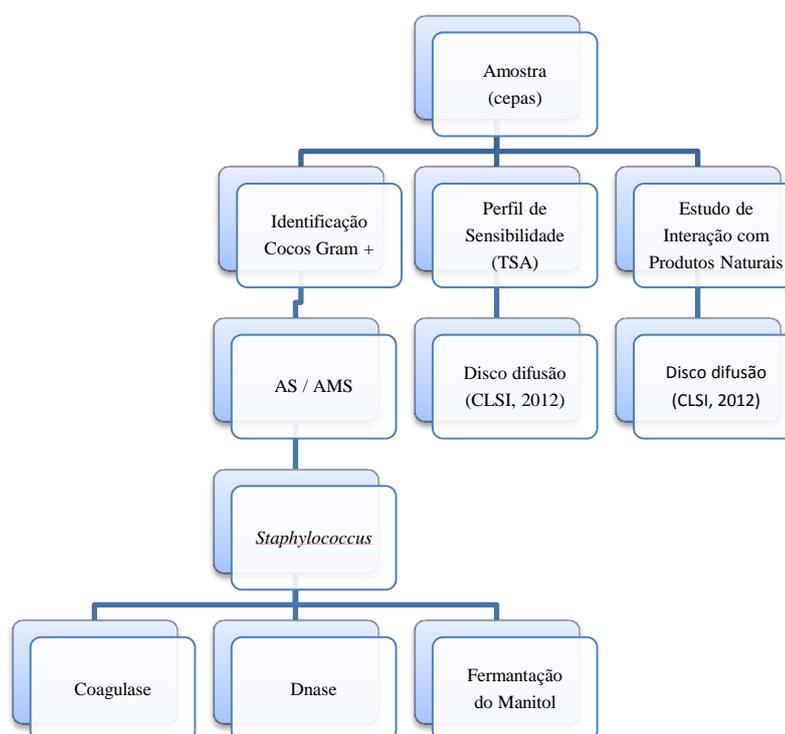
Tendo por base informações anteriores de que a composição do óleo essencial de frutos e de folhas de *E. uniflora* L. varia qualitativamente e quantitativamente, dependendo do momento da colheita, estação do ano, estágio de maturidade antes da colheita, Adebajo et al. (1989), estudou estas variações por meio da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E. uniflora* L., colhidos em diferentes estágios de maturação.

Em estudos fitoquímicos sobre amostras de *E. uniflora* L., verificou-se a presença de flavonóides e taninos (AURICCHIO et al., 2007), corroborando com os resultados relatado por Panizza (1998), que registrou nas folhas de *E. uniflora* L, além de taninos e flavonóides, a presença de saponinas, sais minerais e vitamina C. As saponinas são componentes importantes para ação de muitas drogas vegetais. Os flavonoides, por sua vez, são utilizados para em tratamentos como antiinflamatórios e antimicrobianos (FIUZA et al., 2008).

4. METODOLOGIA

Neste estudo, foram analisadas 20 cepas de *Staphylococcus* sp. cedidas pela bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), além de uma cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, foram realizados testes para confirmação da identificação e de pureza das cepas.

Figura 2. Fluxograma metodológico



4.1 Identificação dos micro-organismos

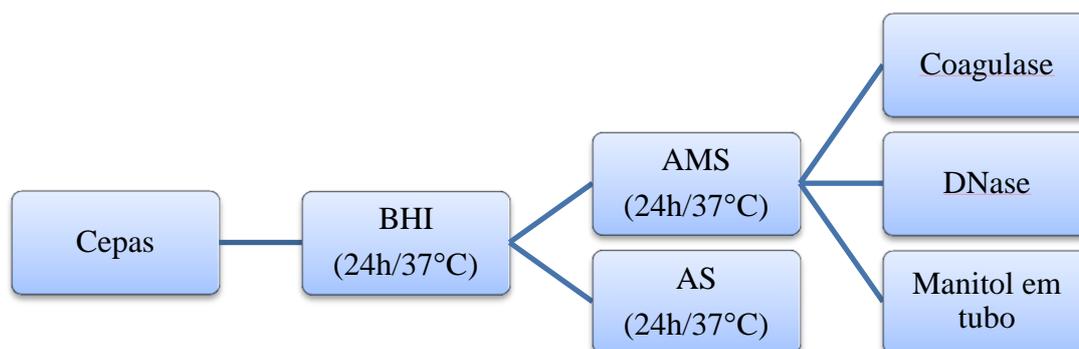
As cepas foram reativadas em caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI), com o objetivo de torná-las viáveis para o cultivo bacteriano. As mesmas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h.

Para verificar a pureza das cepas, bem como confirmar a identificação do gênero e da espécie desses micro-organismos, foram realizadas técnicas microbiológicas rotineiras, tais como, semeio pela técnica de estrias nos meios Ágar Sangue (AS) e Ágar Manitol Salgado (AMS), os quais foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante e

distribuídos em placas de Petri. De acordo com Hirai (2014), o aspecto macroscópico da colônia em meio sólido e a presença de pigmento e hemólise em Ágar Sangue são características auxiliares na identificação destes micro-organismos.

Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas e a partir das colônias isoladas no meio AMS partiu-se para os testes de identificação das espécies do gênero *Staphylococcus*. Conforme a metodologia estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), foram realizados os seguintes testes: coagulase em tubo, DNase e teste do manitol em tubo, a Figura 3, representa as atividades que foram realizadas.

Figura 3. Fluxograma dos testes realizados para identificação das cepas



4.2 Avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma)

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) foi realizado em meio Ágar Mueller-Hinton conforme as recomendações do CSLI (2012). Além das 20 cepas selecionadas, foi utilizada uma amostra de inóculo padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), também cedida pela bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

As suspensões das cepas utilizadas para o semeio foram preparadas em solução salina (NaCl a 0,85%) tomando-se como referência a produção de leve turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônias – UFC/mL (CLSI, 2012).

O procedimento foi realizado de acordo com o método de difusão em meio sólido utilizando placa de Petri estéril, contendo Ágar Mueller-Hinton no qual, utilizando-se de um *swab* estéril, o inóculo bacteriano foi distribuído de maneira uniforme sobre a superfície do meio. Com o auxílio de uma pinça, os monodiscos de antimicrobianos de concentrações pré estabelecidas foram distribuídos sobre o meio. As placas foram encubadas por 24h/37°C.

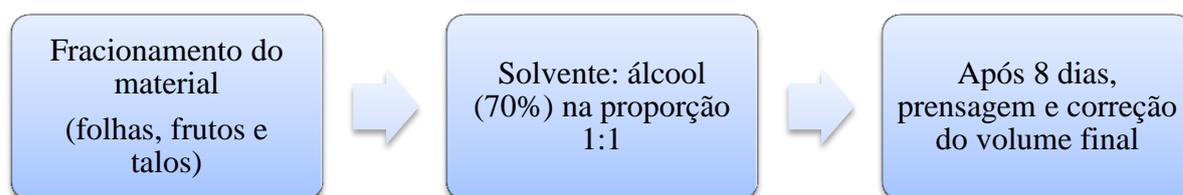
A avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada utilizando-se discos de antibióticos de concentração definida destinados a micro-organismos Gram positivos. As cepas foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) de acordo com o diâmetro do halo de inibição que foi formado quando comparados com os valores indicados na tabela do fornecedor dos discos dos antimicrobianos utilizados.

Foram testados 14 antimicrobianos do tipo monodisco (DME[®]), sejam eles: eritromicina (ERI), oxalicina (OXA), norfloxacin (NOR), cloranfenicol (CLO), penicilina G (PEN), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), gentamicina (GEN), sulfazotrim (SUT), cefoxitina (CFO), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), cefalotina (CFL), amicacina (AMI).

4.3 Determinação da atividade antimicrobiana do extrato de *E. uniflora* L. (Pitangueira)

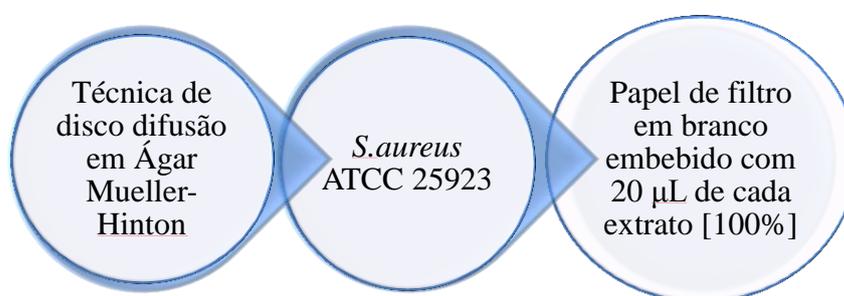
Os extratos utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Fitoquímica da UEPB, os mesmos foram obtidos pelo processo de maceração, utilizando-se como solvente o álcool etílico a 70% (Figura 4).

Figura 4. Processo de maceração para obtenção dos extratos de *E. uniflora* L.



A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. deu-se também pelo método de difusão em meio sólido sobre a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923. Foram testados os extratos hidroalcoólicos brutos (100%) das folhas (EFL), do fruto (EF) e do talo (ET). A análise da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada em placa de Petri estéril, em meio Ágar Mueller-Hinton e seguindo a mesma técnica adotada para a realização do TSA. Os extratos foram incorporados em discos estéreis, distribuídos sobre o meio e incubados por 24h/37°C (Figura 5).

Figura 5. Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *E. uniflora* L.



Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a leitura das placas para determinar se houve atividade antiestafilococos dos extratos de pitanga. Para esse estudo, foi considerado como produto ativo aquele que apresentou halo de inibição de crescimento, com diâmetro igual ou superior a 8 mm (WONG-LEUNG, 1988; NAQUI et al., 1991; CATÃO et al., 2005).

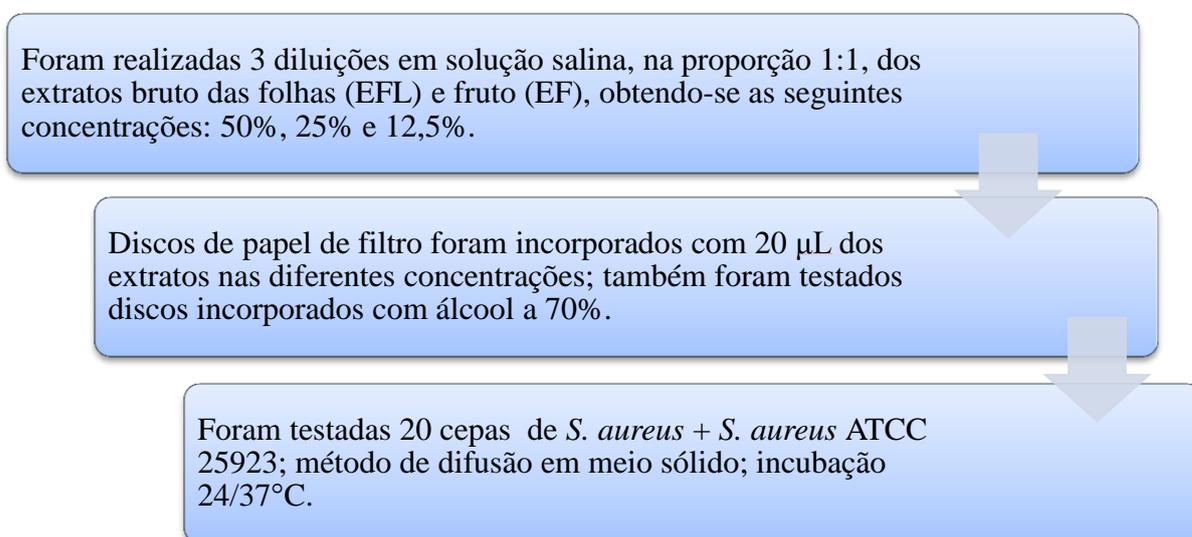
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *E. uniflora* L.

Comprovada a atividade antiestafilocócica dos extratos bruto sobre a cepa padrão, foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando-se a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 de *S. aureus* e as demais 20 cepas em estudo. Os extratos hidroalcoólicos [100%], de folhas e frutos, foram diluídos progressivamente em solução salina, na proporção de 1:1 obtendo-se as seguintes diluições: 50%, 25% e 12,5%. Após o preparo das diluições, adicionou-se 20µL de cada concentração do extrato diluído em disco de papel de filtro estéril. Foram também testados discos incorporados com álcool a 70%,

representando o controle negativo, para que fosse avaliado se este estaria ou não interferindo na atividade dos extratos (Figura 4).

O procedimento técnico utilizado continuou sendo o do antibiograma, no qual cada suspensão bacteriana, preparada em solução salina (NaCl a 0,85%) e tomando-se como referência a escala 0,5 de McFarland, foi semeada em Ágar Mueller-Hinton e os discos impregnados com álcool e com os extratos em diferentes concentrações foram colocados sobre a superfície do meio (BAUER, 1966; CLSI, 2012).

Figura 6. Procedimento metodológico para determinação da CIM dos extratos de *E. uniflora* L.



Passado o período de incubação, 24h/37°C, as placas foram lidas e determinou-se a CIM, ou seja, a menor concentração em que houve inibição de crescimento. Mais uma vez considerou-se como produto ativo aquele em que o halo de inibição apresentou diâmetro ≥ 8 mm.

4.5 Estudo da interação entre antimicrobianos convencionais e os extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L.

Para o estudo da interação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas e frutos de *E. uniflora* L., com os antimicrobianos convencionais, foram utilizados dois antimicrobianos de diferentes classes, a penicilina G (10 UI), e a eritromicina (15 µg).

A técnica utilizada para avaliar a interferência dos extratos sobre os antimicrobianos foi a de disco difusão em meio sólido utilizando discos de papel de filtro de concentração já definida (BAUER, 1966; CLSI, 2012).

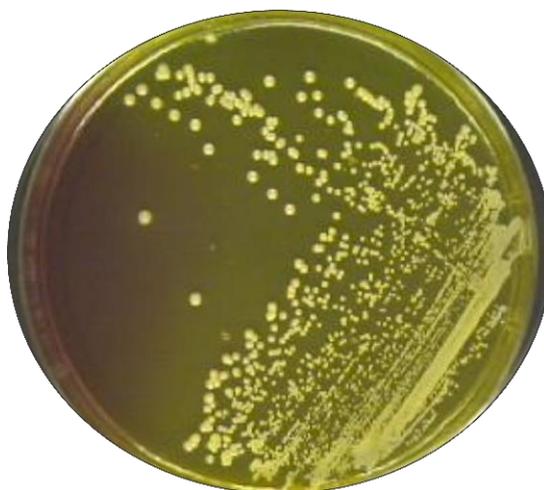
O estudo foi realizado com a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 de e uma cepa considerada multirresistente dentre as 20 cepas analisadas no TSA. O procedimento deu-se em placa de Petri contendo meio Ágar Mueller-Hinton no qual o inóculo bacteriano foi distribuído de maneira uniforme. Os discos de papel de filtro contendo os antibióticos convencionais em suas respectivas concentrações, foram embebidos com 20 µL dos extratos em sua CIM, e com o auxílio de uma pinça esterilizada os mesmos foram dispostos sobre a superfície do meio. Após o período de incubação em estufa bacteriológica (24h/37°C), foi realizada com o auxílio de um halômetro, a leitura dos halos de inibição do crescimento (NUNES, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação dos micro-organismos

Os testes da coagulase em tubo, DNase e manitol em tubo, confirmaram a identificação e a pureza das 20 cepas selecionadas, classificando-as como *S. aureus*. Testes semelhantes também foram realizados por Santos et al. (2007), para identificação e classificação de amostras de *S. aureus*, destacando o crescimento característico no meio seletivo e diferencial de Ágar Manitol Salgado (Figura 7).

Figura 7. Colônias de *S. aureus* em Ágar Manitol Salgado



Fonte: <http://medchrome.com/wp-content/uploads/2010/05/s.aureus-agar.jpg>

5.2. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade das cepas frente aos antimicrobianos testados (Tabela 1) mostrou que a maioria das cepas (65%) apresentou resistência a penicilina e a eritromicina (55%), (Figura 8). Dados semelhantes foram relatados por outros autores, os quais observaram que 98% e 72,7% das cepas nosocomiais eram resistentes à penicilina (ALMEIDA et al., 2007; MENEGOTTO; PICOLI, 2007). Estes dados estão compatíveis com outros autores que também relataram elevado número de cepas resistentes a estes antimicrobianos (CATÃO et al., 2013).

Tabela 1. Perfil de sensibilidade das cepas de *S. aureus* frente aos antimicrobianos convencionais

CEPAS	ANTIBIÓTICOS TESTADOS/ DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (mm)														
	ERI 15µg	OXA 01µg	NOR 10µg	CLO 30µg	PEN 10UI	TET 30µg	RIF 5µg	GEN 10µg	SUT 25µg	CFO 30µg	CRO 30µg	CIP 05µg	CFL 30µg	AMI 30µg	Nº de R aos Antimic./cepa
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	30 S	18 S	18 S	24 S	30 S	30 S	24 S	18 S	24 S	24 S	24 S	24 S	36 S	18 S	0
1	36 S	14 S	30 S	10 R	24 R	24 S	36 S	18 S	12 I	18 S	24 S	18 I	24 S	24 S	2
2	8 R	20 S	30 S	12 R	24 R	24 S	36 S	18 S	18 S	18 S	24 S	18 I	0 R	24 S	4
3	30 S	30 S	30 S	22 S	30 S	30 S	30 S	24 S	30 S	30 S	30 S	26 S	30 S	24 S	0
4	8 R	28 S	24 S	24 S	30 S	30 S	30 S	24 S	12 I	22 S	24 S	0 R	30 S	30 S	2
5	8 R	26 S	18 S	24 S	30 S	30 S	26 S	30 S	12 I	24 S	22 S	8 R	30 S	30 S	2
6	0 R	16 S	22 S	24 S	30 S	24 S	30 S	30 S	28 S	24 S	20 S	18 I	30 S	30 S	1
7	8 R	24 S	18 S	22 S	30 S	30 S	30 S	30 S	0 R	18 S	24 S	0 R	30 S	30 S	3
8	10 R	18 S	20 S	18 S	16 R	24 S	30 S	24 S	0 R	22 S	24 S	18 I	30 S	30 S	3
9	36 S	14 S	30 S	24 S	24 R	30 S	36 S	30 S	24 S	24 S	24 S	28 S	30 S	30 S	1
10	30 S	20 S	24 S	24 S	22 R	24 S	30 S	30 S	12 I	20 S	20 S	24 S	30 S	30 S	1
11	12 R	18 S	30 S	22 S	24 R	24 S	34 S	24 S	0 R	18 S	24 S	18 I	24 S	30 S	3
12	12 R	18 S	24 S	24 S	16 R	30 S	30 S	30 S	8 R	22 S	24 S	24 S	30 S	30 S	3
13	18 R	18 S	30 S	22 S	24 R	24 S	36 S	28 S	12 I	24 S	20 S	24 S	28 S	28 S	2
14	36 S	18 S	30 S	24 S	20 R	30 S	36 S	26 S	18 S	24 S	24 S	24 S	30 S	30 S	1
15	24 S	14 S	18 S	24 S	18 R	30 S	30 S	30 S	24 S	30 S	28 S	24 S	30 S	24 S	1
16	0 R	18 S	30 S	22 S	24 R	30 S	36 S	30 S	30 S	24 S	24 S	24 S	30 S	30 S	2
17	36 S	16 S	30 S	24 S	24 R	12 R	36 S	30 S	30 S	24 S	24 S	24 S	30 S	30 S	2
18	0 R	14 S	30 S	24 S	30 S	30 S	40 S	12 R	24 S	24 S	24 S	24 S	30 S	20 S	2
19	30 S	12 I	24 S	24 S	18 R	36 S	30 S	24 S	24 S	18 S	18 I	20 I	30 S	24 S	1
20	34 S	24 S	30 S	10 R	34 S	36 S	36 S	24 S	26 S	28 S	30 S	22 S	30 S	18 S	1
Total de cepas R	11	0	0	3	13	1	0	1	4	0	0	3	1	0	

Legenda: ERI= eritromicina, OXA=oxalicina, NOR = norfloxacina, CLO = cloranfenicol, PEN = penicilina G, TET = tetraciclina, RIF = rifampicina, GEN = gentamicina, SUT = sulfazotrim, CFO = cefoxitina, CRO = ceftriaxona, CIP = ciprofloxacina, CFL = cefalotina, AMI = amicacina. S = Sensível, R = Resistente, I = Intermediário

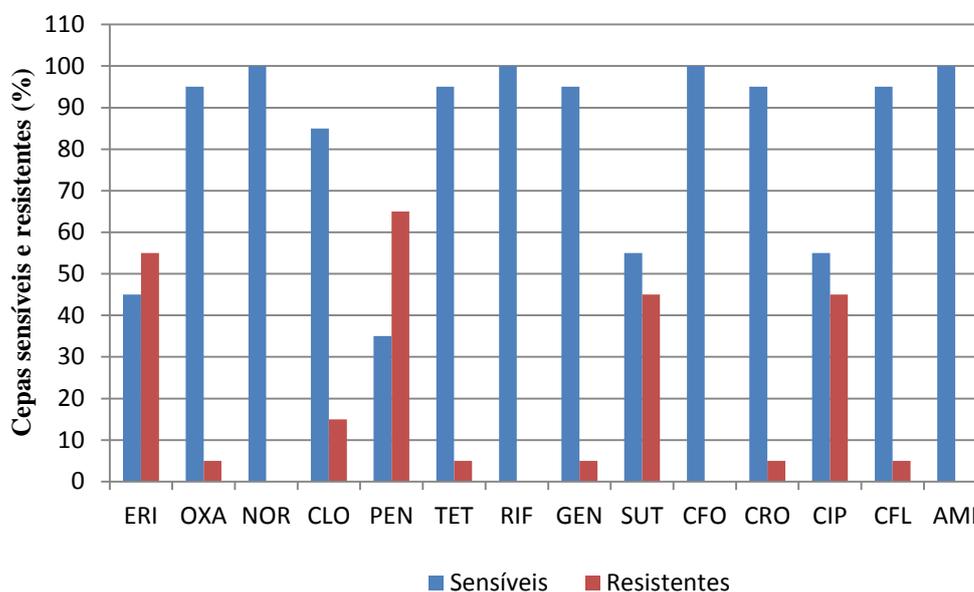
Segundo Nunes (2011), o perfil de sensibilidade de cepas de *S. aureus* frente aos antimicrobianos, evidenciou o uso inadequado de drogas antimicrobianas. O autor relatou que a penicilina G apresentou elevado percentual (45,5%) de cepas de *S. aureus* resistentes, o que corrobora com os resultados apresentados neste estudo.

As bactérias Gram positivas geralmente apresentam uma maior sensibilidade aos antimicrobianos em virtude da constituição da sua parede celular, é o que afirma Lambert, (2002). Neste estudo, percebe-se um elevado índice de cepas de *S. aureus* apresentando resistência frente a mais de duas classes de antimicrobianos, sendo denominadas de cepas multirresistentes. Apenas uma cepa mostrou-se sensível a todos os antimicrobianos testados, tendo as demais apresentado resistência a pelo menos um tipo. Este resultado reflete o grau de resistência adquirido pelo *S. aureus*, limitando cada vez mais as opções terapêuticas.

Os antimicrobianos NOR, RIF, CFO e AMI mostraram-se sensíveis às 20 cepas analisadas, o que mostra que os mesmos podem se constituir drogas de escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas.

Os resultados mostram também, cepas com sensibilidade intermediária, o que implica dizer que, quando do uso *in vivo* a bactéria poderá ser erradicada, dependendo das concentrações antimicrobianas alcançadas no sítio de ação, porém não é a opção mais segura a ser usada no tratamento.

Figura 8. Perfil de sensibilidade e resistência das cepas de *S. aureus* frente aos antimicrobianos

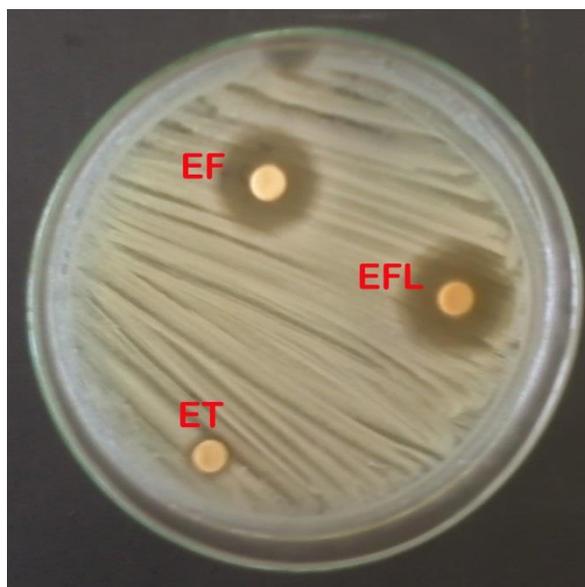


Legenda: ERI = eritromicina, OXA = oxalicina, NOR = norfloxacina, CLO = cloranfenicol, PEN = penicilina G, TET = tetraciclina, RIF = rifampicina, GEN = gentamicina, SUT = sulfazotrim, CFO = cefoxitina, CRO = ceftriaxona, CIP = ciprofloxacina, CFL = cefalotina, AMI = amicacina

5.3. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *E. uniflora* L.

O ensaio realizado para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos das folhas e dos frutos de *E.uniflora* L. apresentaram atividade frente à *S. aureus* ATCC 25923. Porém, o extrato obtido a partir dos talos (caule), não apresentou atividade frente à cepa padrão em estudo (Figura 9). Considerou-se com atividade o produto que apresentou halo de inibição com diâmetro igual ou superior a 8 mm (NASCIMENTO et al., 2000; CATÃO, 2007).

Figura 9. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. frente à *S. aureus* ATCC 25923



Legenda: EF = Extrato do Fruto, EFL = Extrato das Folhas, ET = Extrato dos Talos.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *E. uniflora* L. frente à *S. aureus* ATCC 25923

EXTRATOS	DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO (mm)
EF	11
EFL	12
ET	0

Legenda: EF = Extrato do Fruto, EFL = Extrato das Folhas, ET = Extrato dos Talos

Estes resultados estão em concordância com os relatos de Nascimento (2013), que em estudo semelhante, observou que os extratos brutos de *E. uniflora* L. de folhas e do fruto apresentaram atividade frente ao *S. aureus*, havendo formação de halos com diâmetro de 13 e 9 mm, respectivamente e, que o extrato bruto dos talos não apresentou atividade.

Bezerra et al. (2012), também comprovou a atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* L. sob cepas de *S. aureus*. Do mesmo modo, há relatos de

estudos para três espécies do gênero *Eugenia*, observando-se a presença de ação inibidora sobre linhagens de *S. aureus* (BERTUCCI et al.,2009).

Pessini et al. (2003), avaliou 13 plantas utilizadas pela medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas, dentre essas plantas a *E. uniflora* L. inibiu o desenvolvimento de algumas cepas de bactérias e fungos, o que reforça a crença popular da utilização desta planta no tratamento de várias doenças infecciosas.

5.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *E. uniflora* L.

O extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *E. uniflora* L. se mostrou ativo frente a 90% das cepas de *S. aureus*, enquanto que na concentração a [50%] apresentou atividade para 75% das cepas. Quando a [25%] houve inibição apenas em 55% das cepas, sendo esta concentração determinada como sendo a CIM, uma vez que na diluição subsequente, ou seja a [12,5%] o produto não mais apresentou atividade frente às cepas em estudo.

Para o extrato do fruto de *E. uniflora* L., quando a [100%] apresentou atividade frente a 95% das cepas de *S. aureus*. Nas diluições a [50%] e [25%] observou-se atividade para 75% e 50% das cepas, respectivamente, sendo também esta última concentração a CIM encontrada para esse extrato, uma vez que a [12,5%] o extrato não mostrou-se ativo frente às cepas analisadas.

No que diz respeito aos discos controle de álcool a 70% utilizado como diluente, não foi verificada atividade, ou seja, não houve formação de halos de inibição nas cepas (Figura 10), confirmando assim que este solvente não interferiu no crescimento das cepas testadas.

A Tabela 3 apresenta as diferentes concentrações nas quais os extratos foram testados, bem como o comportamento, diâmetro dos halos de inibição de crescimento, apresentado pelas cepas neste estudo.

Figura 10. Determinação da CIM na cepa *S. aureus* ATCC 25923

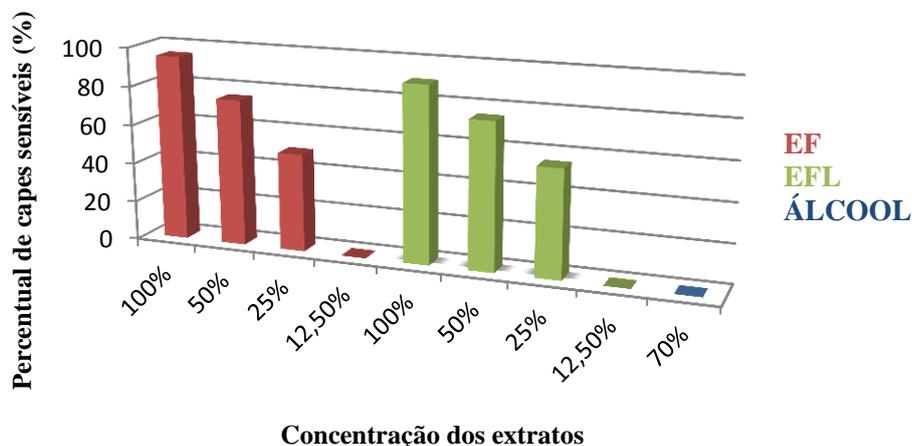
Legenda: ÁLC = Álcool a 70%
 Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3. Diâmetro dos halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. em diferentes concentrações frente às cepas de *S. aureus*

DETERMINAÇÃO DA CIM – DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm)									
CEPAS	EFL				EF				ÁLC
	100%	50%	25%	12,5%	100%	50%	25%	12,5%	70%
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12	12	8	0	11	11	10	0	0
1	12	10	8	0	12	10	10	0	0
2	12	12	8	0	12	10	10	0	0
3	12	12	12	0	14	12	10	0	0
4	12	10	8	0	11	8	8	0	0
5	0	0	0	0	8	10	0	0	0
6	0	0	12	0	0	12	12	0	0
7	12	8	8	0	12	8	0	0	0
8	12	8	0	0	12	0	0	0	0
9	12	10	0	0	12	12	0	0	0
10	12	8	8	0	12	12	8	0	0
11	12	10	0	0	12	0	0	0	0
12	12	10	8	0	12	8	0	0	0
13	12	0	0	0	12	0	0	0	0
14	12	8	8	0	12	8	10	0	0
15	12	12	8	0	12	12	0	0	0
16	12	8	0	0	11	0	0	0	0
17	12	8	0	0	12	10	8	0	0
18	12	0	0	0	12	0	8	0	0
19	12	8	8	0	12	8	12	0	0
20	12	0	0	0	12	8	0	0	0
Total de cepas sensíveis	18	15	11	0	19	15	10	0	0

Legenda: EF = Extrato do Fruto, EFL = Extrato das Folhas, ÁLC = Álcool

Figura 11. Determinação da CIM dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. frente às cepas de *S. aureus* (n = 20)



EF = Extrato do Fruto, EFL = Extrato das Folhas

5.5. Estudo de interação entre os antimicrobianos selecionados e os extratos de *E. uniflora* L.

Para o estudo de interação foram selecionadas duas drogas antimicrobianas dentre as que foram utilizadas no TSA: a penicilina G (PEN) e a eritromicina (ERI), as quais pertencem a diferentes classes de antibióticos e apresentaram neste estudo o maior número de cepas resistentes. A interação foi realizada com os extratos de *E. uniflora* L. das folhas e do fruto, na concentração a 25%, que foi a CIM determinada para ambos.

O teste foi realizado frente à cepa *S. aureus* ATCC 25923 e com a cepa número 12; esta cepa foi selecionada aleatoriamente dentre as que se mostraram multirresistentes neste estudo.

De acordo com Nascimento (2000), o uso associado de antimicrobianos derivados de plantas medicinais e/ou seus subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, bem como não interferir na resposta esperada.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os diâmetros dos halos de inibição dos antimicrobianos e dos extratos antes da interação, bem como os resultados advindos das interações.

Tabela 4. Avaliação da associação da CIM dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. com a eritromicina frente a *S. aureus*

DIÂMETRO DOS HALOS (mm) ANTES E DEPOIS DA ASSOCIAÇÃO		
ERITROMICINA/EXTRATOS/ ASSOCIAÇÕES	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> multirresistente (Nº 12)
ERI [25 µg]	30	12
EFL [25%]	8	8
EF [25%]	10	0
ERI [25 µg] + EFL [25%]	24 ↓	12
ERI [25 µg] + EF [25%]	24 ↓	12

Legenda: ERI = eritromicina; EFL = extrato das folhas; EF = extrato do fruto

Tabela 5. Avaliação da associação da CIM dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. com a penicilina G frente a *S. aureus*

DIÂMETRO DOS HALOS (mm) ANTES E DEPOIS DA ASSOCIAÇÃO		
PENICILINA G/EXTRATO S/ ASSOCIAÇÕES	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> multirresistente (Nº 12)
PEN [10 UI]	30	16
EFL [25%]	8	8
EF [25%]	10	0
PEN [10 UI] + EFL [25%]	24 ↓	14 ↓
PEN [10 UI] + EF [25%]	24 ↓	12 ↓

Legenda: PEN = penicilina G; EFL = extrato das folhas; EF = extrato do fruto

O efeito da interação dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. em sua CIM com os antimicrobianos frente a *S. aureus* ATCC 25923 foi antagônico, uma vez que houve redução do diâmetro do halo de inibição. Antes da associação a penicilina G e a eritromicina apresentaram halos com 30 mm de diâmetro, com a adição do extrato a 25% houve redução da zona de inibição que passou a ser de 24 mm para todas as interações realizadas com esta cepa.

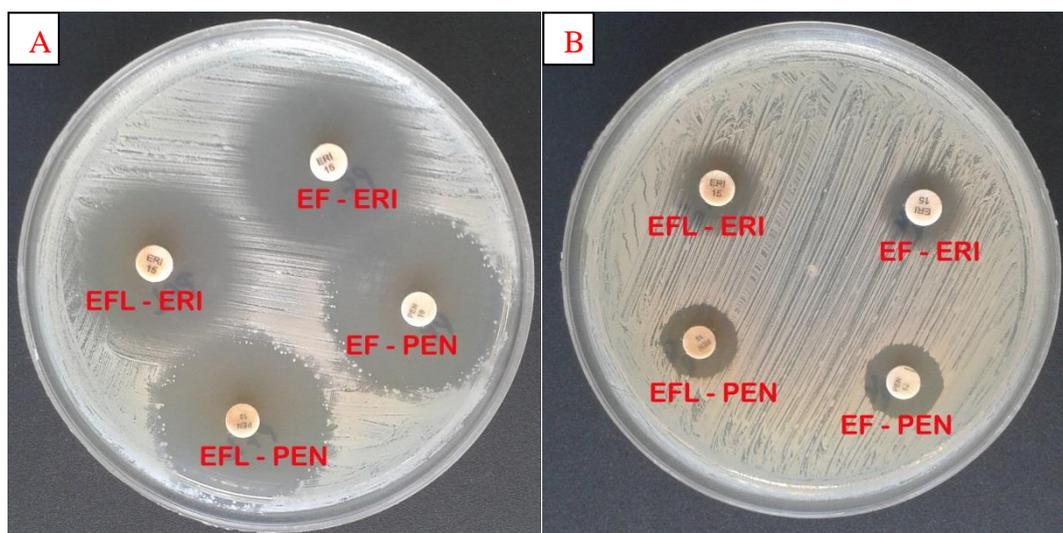
No estudo com a ATCC, mesmo a interação tendo apresentado efeito negativo, uma vez que levou a formação de um halo menor, não foi suficiente para inibir a ação da droga.

Para a cepa multirresistente, o resultado foi semelhante, mas apenas em relação a interação entre os extratos hidroalcoólicos e a penicilina G, pois mais uma vez observou-se efeito antagônico, havendo redução da zona de inibição que era de 16 mm e passou a ser de 14 e 12 mm, respectivamente, para os extratos das folhas e do fruto. Frente a eritromicina a adição dos extratos não interferiu no diâmetro do halo formado, tendo continuado o mesmo que fora observado anteriormente no teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Apesar de não ter sido observada atividade sinérgica, os resultados obtidos no estudo de interação são satisfatórios no sentido de que foi possível identificar a ação antagônica que os extratos produzidos a partir de folhas e fruto da *E. uniflora* L. podem promover se usados em associação com a penicilina G e a eritromicina.

Embora os extratos quando testados isoladamente tenham apresentado efeito inibitório sobre as cepas, quando em associação com os antimicrobianos convencionais mostraram-se indiferentes ou provocaram ação antagônica sobre os mesmos. O que em parte, concorda com Eller (2010), quando relata que o efeito interativo produzido a partir da combinação de extratos hidroalcoólicos era antagônico, não favorecendo o potencial antimicrobiano das plantas.

Figura 12. Efeito da interação entre os extratos de *E. uniflora* L. e os antimicrobianos. (A) *S. aureus* ATCC 25923 (B) *S. aureus* multirresistente (nº 12)



Legenda: EF-ERI = interação extrato do fruto e eritromicina, EF-PEN = interação extrato do fruto e penicilina G, EFL-ERI = interação extrato das folhas e eritromicina, EFL-PEN = interação extrato das folhas e penicilina G.

Fonte: Dados da pesquisa

As figuras 13 e 14 apresentam os resultados obtidos antes e depois do estudo de interação entre os extratos de *E. uniflora* L. de folhas e fruto e os antimicrobianos selecionados.

Figura 13. Perfil de sensibilidade de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* multirresistente n° 12 frente a eritromicina (ERI) e penicilina G (PEN)

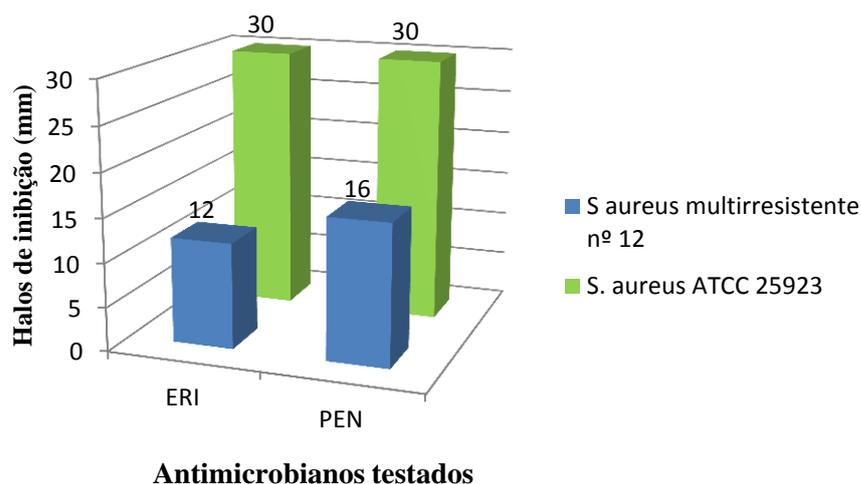
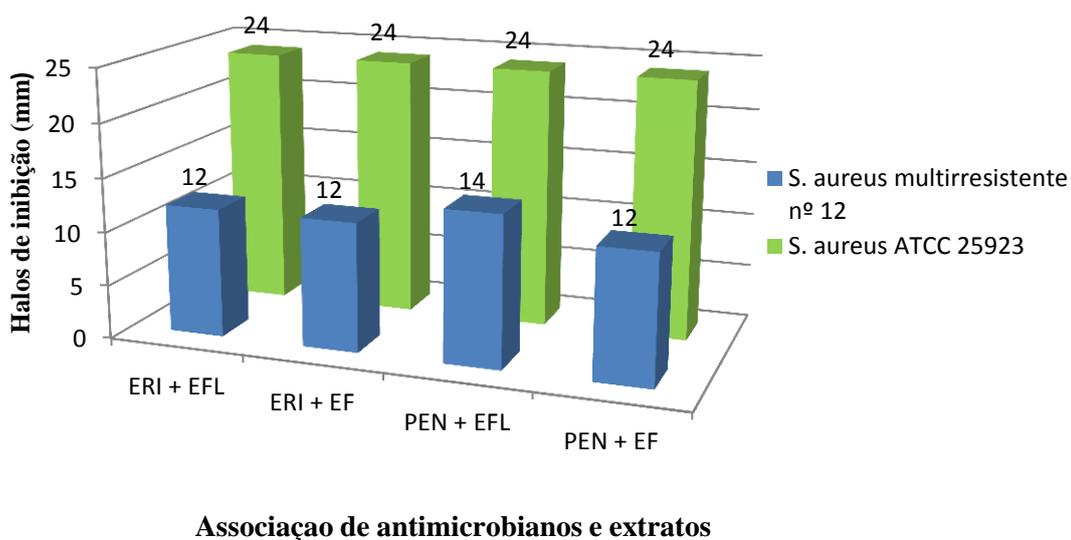


Figura 14. Perfil de sensibilidade de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* multirresistente n° 12 frente a eritromicina e penicilina G após associação com os extratos de *E. uniflora* L. (pitanga) a 25%



Legenda: ERI+EFL = disco de eritromicina [15 µg] + CIM do extrato das folhas (pitanga); ERI+EF = disco de eritromicina [15 µg] + CIM do extrato do fruto (pitanga); PEN+EFL = disco de penicilina G [10UI] + CIM do extrato das folhas (pitanga); PEN + EF = disco de penicilina G [10UI] + CIM do extrato do fruto (pitanga)

6 CONCLUSÕES E PESPECTIVAS

- Foi possível confirmar a identificação e pureza das 20 cepas de *Staphylococcus* sp.;
- Na determinação do perfil de sensibilidade observou-se a presença de cepas multirresistentes;
- Constatou-se a atividade *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* L. frente a *S. aureus*, confirmando sua ação antiestafilocócica já relatada na literatura;
- Nos testes de interação entre os extratos hidroalcoólicos de folhas e fruto de *E. uniflora* L. e os antimicrobianos eritromicina e penicilina G, obteve-se dois tipos de efeitos: antagônico e indiferente;
- Os resultados mostram a importância de se fazer um estudo de interação com extratos oriundos de plantas utilizadas na medicina popular e drogas antimicrobianas usadas na clínica, uma vez que aqueles podem interferir na ação destes de maneira a diminuir sua ação.
- Sugere-se pesquisas futuras para que sejam feitos outros testes de interação com o intuito de se observar o comportamento desses extratos frente a outras classes de antimicrobianos e para que se possa estudar formas de se aproveitar a ação antiestafilocócica apresentada pelos extratos hidroalcoólicos da *E. uniflora* L. sobre *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

ADEBAJO A.C.; OLOKE K.J.; ALADESANMI A.J. Antimicrobial activity of the leaf and extract of *Eugenia uniflora*. **Phytotherapy Research** 3: 258-259, 1989.

ALMEIDA, M.I. et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v. 09, n. 02, p. 489 - 495, Mai-Ago, 2007.

ANGELY, J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: USP, p.487-491, 1965.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. 62, 55-61, 2003.

AURICCHIO, M.T. et al. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.1, p.76-81, 2007.

BAGETTA, G. et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 354-461, 2010.

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 2(2): 31-36, 2011.

BAUER, A.N. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, (45) 4, 493-496, 1966.

BERTUCCI, A. et al. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1A, p.20-25, 2009.

BEZERRA, N.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. **Biofar - Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, n. 2, p.40-48, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: **Detecção e identificação de bactérias de importância médica** /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

BRUMANO, G., GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.3, p.953-959, Maio/Junho, 2009.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina – 1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.7-10, 2000.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, n.4, p.247-9, 2005.

CATÃO, R.M.R.; BELÉM, L.F.; SILVA, P.M.F.; LUIZA, F.P.; NUNES, E.L.; FERNANDES, S.F.C. Avaliação da colonização por *Staphylococcus aureus* em funcionários de um serviço de saúde em Campina Grande-PB. **BioFar - Revista de Biologia e Farmácia**, 7(1):10-7, 2012.
http://eduep.uepb.edu.br/biofar/v7n1/avaliacao_da_colonizacao_nasal_por_staphylococcus_aureus.pdf

CATÃO, R.M.R.; SILVA, P.M.F.; FEITOSA, R.J.P.; PIMENTEL, M.C.; PEREIRA, H.S. Prevalence of hospital-acquired infections caused by *staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile. **Journal of Nursing UFPE on line**, Recife, 7(8):5257-64, 2013.
DOI: 10.5205/r euol.3452-28790-4-ED.0708201325 ISSN: 1981-8963.

CAVALCANTI, S.M.M. et al . Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, Dez 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement M100-S22**. CSLI, Wayne, PA, USA, 2012.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 670-675, 2008.

CRUZ E. D. A. ***Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em trabalhadores de um hospital universitário: colonização e crenças em saúde**. Ribeirão Preto. 187 p. Tese de Doutorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da USP, 2008.

DAS, I.; O'CONNELL, N.; LAMBERT, P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. **Journal of Hospital Infection**. 65: 117-123, 2007.

ELLER, S.C.W. de S. Avaliação da atividade antimicrobiana interativa de extratos vegetais. Monografia. Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, 2010.

ENRIGHT, M.C. et al. The evolutionary history methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings os the National Academy of Sciences USA**. 99:76,87-92, 2002.

FINAN, J. E. Conversion of oxacillin resistant *Staphylococci* from heterotypic to homotypic resistance expression. **Antimicrobial Agent Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 24-30, 2001.

FIUZA T. S. et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (myrtaceae). in: **Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p, 2002.

GELATTI, L.C. et al. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, n. 4, p. 458-460, jul-ago. 2009.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, 21: 263-277, 2004.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Nova Química**, São Paulo, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GONÇALVES, A.L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. 209p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Paulista, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects Medicine**, 27: 1-93, 2006.

HARAGUCHI, T. **Antibióticos: classificação geral**. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=69&fase=imprime> Acesso em 30 de out de 2014.

HIRAI, C.K. Microbiologia em Foco: S Gram positivos. **Revista Analítica**, n. 72, p.34, ago/set. 2014.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 40:135-6, 1997.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, 1027–1031, 2002.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia Médica**, 25ª ed. Mcgraw Hill, Rio de Janeiro, 828p, 2011.

KOBAYSHI CCBA, Sadoyama G & Viera JDG. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42(4): 404-410, 2009.

KLUCZYNIK, C.E.N.; SILVA, D.R.; SOUSA NETO, J.B.; CATÃO, R.M.R. Occurrence of bacteriuria asymptomatic in pregnant women in a public maternity. **Journal Nursing UFPE on line** [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Nov 26];4(1):270-78. Available from: http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/773/pdf_320. DOI: 10.5205/reuol.773-5563-2-LE.0401201035

KUTCHAN, T. M. **Plant Physiology**. 125, 58, 2001.

LAMBERT, P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement** 92: 46S-54S, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 352p, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LOWY FD. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine** 339:520-532, 1998.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Nova Química**, São Paulo, v. 25, n. 3, p.429-438, maio 2002.

MENEGOTTO, F.R, PICOLI, S.U. *Staphylococcus aureus* oxalicina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 39(2): 147-150, 2007.

METAN, G.; ZARAKOLU, P.; UNAL, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. **Journal of Hospital Infection**. London, v. 61, p. 93-99, 2005.

MURRAY, R.P. et al. **Manual of clinical microbiology**. 8 ed., Washington: American Society for Microbiology, p. 129-139, 2003.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Staphylococcus* e *Cocos* Gram Positivos Relacionados. In: MURRAY, P.,R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 21, 2009.

NAQUI, S.H.; KILIAN, M.S.Y.; VOHORA, S.B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v.62, n.3, p.221-8, 1991.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.4, p.247-256, Oct./Dec., 2000.

NASCIMENTO, A.L.D.R. **Ação antimicrobiana do extrato de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli***. 30 p. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2013.

NICODEMO, A.C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p.191-197, 2002.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância clínica e farmacológica. **Química Nova**, v.29, p.549-54, 2006.

NOVAIS, T. S., et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.05-08, 2003.

NUNES, L.E. **Estudo de intrações “in vitro” entre extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais e drogas antimicrobianas sobre linhagens multirresistentes de *Staphylococcus sp.*** 74 p. (Monografia de Graduação em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2011.

OLIVEIRA, G.A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 239-246, 2001.

OLIVEIRA, R.A.G. et al. Study of the interference of essential oils on the activity of some antibiotic used clinically. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.

PANIZZA, S. **Plantas que curam** (Cheiro de Mato). 3ª ed. São Paulo: IBRASA, 1998.

PEREIRA, J.F.S. **Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engler: um estudo baseado na indicação etnofarmacológica.** 60p. (Monografia de Graduação em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2007.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 13 (Supl. 1): 21-24, 2003.

RUBIN R. J. et al. The economic impact of *Staphylococcus aureus* in New York city hospitals. **Emerging Infectious Diseases**, 5:9-17, 1999.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p.413-423, dez 2007.

SCALON, S.P.Q. et al. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sobre condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.652-655, dez 2001.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: mecanismos das ações infecciosas.** 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Evaluation of some pharmacological activities on *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 44, p. 137-142, 1994.

SENA FILHO, J. G. et al. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 4, Dez 2006.

SHOPSIN, B.; KAREISWIRTH, B.N. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**. 7:323-326, 2001.

SILVA, F.R.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Biofar - Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 2, p.27-36, 2011.

SOUZA, M.P. *Staphylococcus aureus* Resistente à Oxalicina. **NewsLab**, ano XVIII, n.105, p.120-132, abr-mai 2011.

SOUZA, M.V.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. REVISÃO SOBRE A AQUISIÇÃO GRADUAL DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* AOS ANTIMICROBIANOS. **Revista de Patologia Tropical**, v. 1, n. 34, p.27-36, jan-abr, 2005.

STERMITZ, F.R. et al. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Applied Biological Sciences**, v.97, n. 4, p.1433-1437, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2 ed. Atheneu: São Paulo, 792 p., 1999.

TAVARES W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33(3):281-301, 2000. <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v33n3/2477.pdf>

TORTORA, G.J.; FUNKE B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia** 8 ed. Artemed: Porto Alegre, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, p. 175-182, 2005.

TVERDEK, F.P.; CRANK, C.W.; SEGRETI J. Antibiotic Therapy of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Critical Care. **Critical Care Clinics**. 24:249-260, 2008.

VANSO, K.L.T. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos sobre cepa de *Staphylococcus aureus*. **Encontro de pós graduação e iniciação científica**, 2013.

VIOLANTE, I.M.P. **Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste**. 72p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

WANG, Z.Y. et al. An approach for the evolution of synergy between antimicrobials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.3, p.274-278, 2003.

WHO (World Health Organization). **The Global Burden of Disease- 2004 UPDATE**. WHO Press, 146p, 2008.

WONG-LEUNG, Y.L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia**, v.69, p.11-6, 1988.