UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Igor Alves da Silva RA 097482 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Efeito do extrato da guaçatonga (*Casearia sylvestris*) sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina" no ano de 2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 02 de Outubro de 2012

Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Efeito do extrato da guaçatonga (*Casearia sylvestris)* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina.

Igor Alves da Silva

Piracicaba
2012

Igor Alves da Silva

“Efeito do extrato da guaçatonga (*Casearia sylvestris)* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina.”

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do diploma de cirurgião dentista

Orientadora: Michelle Franz Montan Braga Leite

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Si38e

Silva, Igor Alves da, 1990-
Efeito do extrato da guaçatonga (Casearia sylvestris) sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de Staphylococcus aureus resistentes à penicilina / Igor Alves da Silva. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fitoterapia. 2. Infecções Bacterianas. 3. Bactérias aeróbias. I. Franz-Montan, Michelle. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, e meus amigos, que acreditaram em mim.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais que possibilitaram eu realizar o meu sonho de me formar como cirurgião-dentista.

Agradeço muito ao Prof Fancisco Carlos Groppo que me orienta há dois anos na Área de Farmacologia, e que me proporcionou grande oportunidade de aprendizagem.

*“*Saber não é o bastante,
é preciso aplicar. Querer não é o bastante,
é preciso fazer.*”*

RESUMO

Relatos de multi-resistência a antibacterianos começaram já no início da era dos antibióticos. Este fenômeno é preocupante, pois tem sido cada vez mais difícil tratar infecções associadas às bactérias resistentes. Novos antibióticos e novas terapias, além de apresentarem um alto custo, demandam um tempo considerável para estarem disponíveis para terapêutica medicamentosa. A estratégia contemporânea tem sido melhorar as propriedades e características dos fármacos que já existem. Vários fitoterápicos têm mostrado potencial antimicrobiano, mas seu uso ainda é restrito. A proposição deste estudo foi avaliar o efeito do extrato de guaçatonga ou casearia (*Casearia sylvestris*) sobre a ação antibacteriana da amoxicilina no tratamento da infecção estafilocócica, induzida por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina MRSA, em ratos. Quatro espojas de PVC foram implantadas separadamente no dorso de 24 animais. Após 14 dias, os granulomas formados foram infectados com MRSA ATCC 33591. Após 24h da infecção, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 6 animais que foram sacrificados após a administração dos fármacos nos tempos 0h (somente para o grupo controle) e 24 horas. A divisão dos grupos quanto à administração dos fármacos foi: 1) Grupo Controle 0h; 2) Grupo Controle 24h – soro fisiológico 1 mL/kg a cada 8 horas; 3) Grupo amoxicilina – 50 mg/kg da suspensão de amoxicilina a cada 8 horas; 4) Grupo amoxicilina/casearia - amoxicilina 50 mg/kg e casearia 60 mg/kg a cada 8 horas; 5) Grupo casearia – 60 mg/kg a cada 8 horas. Após os tratamentos, os granulomas retirados foram acondicionados em tubos de ensaio, sofreram dispersão em ultra-som e a suspensão resultante foi cultivada em meio de cultura (ágar sal e manitol). Após 18 horas as colônias de MRSA sobre o ágar foram contadas manualmente. Os resultados foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. O extrato de casearia foi capaz de reduzir o número de UFC/ml significativamente ($p<0.05$) em relação aos grupos controle e também melhorou a atividade antimicrobiana da amoxicilina.

Palavras-Chave: Fitoterapia; Infecções Bacterianas; Bactérias aeróbias.

ABSTRACT

Reports of multi-resistance to antibiotics started early in the era of antibiotics. This phenomenon is worrisome because it has been increasingly difficult to treat infections associated with resistant bacteria. New antibiotics and new therapies, in addition to having a high cost, require considerable time to be available to drug therapy. The contemporary strategy has been to attempt the improvement in the properties and characteristics of drugs that already exist. Several herbal medicines have shown antimicrobial potential, but its use is still limited. The purpose of this study was to evaluate the effect of the extract of guaçatonga or Casearia (*Casearia sylvestris*) on the antibacterial activity of amoxicillin for the treatment of staphylococcal infection induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA in rats. Four PVC sponges were separately implanted in the dorsum of 24 animals. After 14 days, the developed granulomas were infected with MRSA ATCC 33591. After 24h of infection, the animals were randomly divided into five groups of six animals and were sacrificed after drug administration at the times: 0h (only for control group) and 24 hours. Groups division regarding drug administration were the following: 1) Control Group 0h, 2) Control Group 24h – 1 mL/kg saline every 8 hours; 3) Group amoxicillin - amoxicillin suspension of 50 mg/kg every 8 hours; 4) Group amoxicillin / Casearia - amoxicillin 50 mg/kg and 60 mg/kg Casearia every 8 hours; 5) Group Casearia – 60 mg/kg every 8 hours. After treatments, the granulomas removed were placed into test tubes, were submitted to ultrasound dispersion and the resulting suspension was grown in culture medium (agar and mannitol salt). After 18 hours MRSA colonies on agar were counted manually. The results were compared using the Kruskal-Wallis test, with significance level of 5%. Casearia extract was able to reduce the number of CFU / ml significantly ($p < 0.05$) compared to control groups and also improved the antimicrobial activity of amoxicillin.

Key words: Phytotherapy; Bacterial Infections; Bacteria, Aerobic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA 1
2. PROPOSIÇÃO 5
3. MATERIAL E MÉTODOS 6
3.1. MATERIAIS 6
3.2. ANIMAIS 6
3.3. CULTURA DO MICRORGANISMO STAPHYLOCOCCUS AUREUS PARA INFECÇÃO DO GRANULOMA 6
3.4. INDUÇÃO DE GRANULOMA, INFECÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO E TRATAMENTOS REALIZADOS 7
FORMA DE ANÁLISE DOS DADOS 9
4. RESULTADOS 10
5. DISCUSSÃO 12
6. CONCLUSÃO 14
REFERÊNCIAS 15
ANEXO 1 20
ANEXO 2 21
ANEXO 3 22

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O uso excessivo de antimicrobianos para infecções menores e doenças não-bacterianas vem submetendo os seres humanos à toxicidade destes fármacos e a possibilidade de super infecções. Cada vez mais o fenômeno da resistência múltipla (capacidade de um microrganismo sobreviver a altas concentrações de várias classes de antimicrobianos diferentes) vem se mostrando presente em diversos tipos de infecção tais como: meningites, infecções estafilocócicas, estreptocócicas, causadas por *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeroginosa* entre outras (JONES et al., 2004). Este fato torna necessária a procura incessante por novos agentes ou novos métodos de combate às infecções.

Dentre os estafilococos, o *S. aureus* é o mais importante agente causador de patologias infecciosas em seres humanos. Entretanto, este microrganismo faz parte da microbiota normal humana, podendo causar infecções oportunistas significantes sob condições apropriadas. Frequentemente é isolado de infecções em feridas pós-cirúrgicas, as quais podem servir como nicho, possibilitando o desenvolvimento de infecções sistêmicas (KONEMAN et al., 1994).

Alguns trabalhos avaliaram a concentração inibitória mínima capaz de inibir o desenvolvimento de cepas de *S. aureus* sensíveis para a amoxicilina de 0,06 µg/mL (PHILIPS et al., 1991), 0,1 µg/mL (GROPPO, 1996) e 0,25 a 1 µg/mL (KONEMAN et al., 1994).

Essas bactérias adquiriram importância ainda maior a partir da observação de que a incidência de endocardite estafilocócica tem aumentado drasticamente. Cepas de *S. aureus* sensíveis aos antibióticos beta-lactâmicos são os agentes etiológicos responsáveis pela endocardite em mais de 70% dos casos da doença diagnosticada em pacientes que fazem uso de drogas por via endovenosa. Outra razão é o fato de que os estafilococos são patógenos importantes em infecções hospitalares (MCCARTNEY, 1992). Este tipo de infecção causa significante morbidade e mortalidade nos pacientes. O *S. aureus* vem sendo reconhecido como patógeno importante e é também o causador mais comum das infecções hospitalares (PERL & GOLUB, 1998).

KAMIYA (1997) argumenta que o uso de drogas antimicrobianas no Japão é extremamente alto. Só em 1994 o custo total da produção delas ficou em 3,38 bilhões de dólares. O uso intensivo de drogas de amplo-espectro, especialmente no tratamento de um crescente número de pacientes idosos e imunocomprometidos, resultou numa emergencial e expansiva resistência nos microrganismos. Um dos principais patógenos identificados dentro desta característica foram cepas MRSA.

FARIAS et al. (1997) avaliaram o padrão de sensibilidade de cepas de *S. aureus* oxacilina-susceptíveis e oxacilina-resistentes (ORSA) a agentes antimicrobianos comumente utilizados em infecções causadas por estes patógenos. As cepas (117) foram isoladas de vários hospitais em São Paulo, Campinas e João Pessoa. Obtiveram a concentração inibitória mínima para 24 agentes antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, etc. Os resultados mostraram uma alta e preocupante taxa de resistência entre as cepas de *S. aureus* obtidos nos hospitais brasileiros. Poucas drogas podem ainda ser efetivas contra doenças infecciosas provocadas por este microrganismo.

ROZENBAUM et al. (2009) relataram um dos primeiros casos de infecção severa causada por MRSA adquirida no ambiente, a qual causou infecções graves em uma criança no Rio de Janeiro. FORTES et al. (2008) observaram um paciente que desenvolveu endocardite a partir de uma cepa MRSA também oriunda do ambiente. DE CARVALHO et al. (2009) encontraram MRSA em saliva de profissionais de saúde, enquanto que SOUSA JÚNIOR et al. (2009) observaram uma preocupante taxa (41,5%) de prevalência de MRSA em pacientes hospitalizados num hospital maternidade em Natal, RN.

Desta forma, os estudos que visam o tratamento de doenças infecciosas provocadas por estafilococos, particularmente *S. aureus*, sensíveis ou não aos beta-lactâmicos, tendem a se tornar cada vez mais importantes, porque as cepas resistentes são de difícil controle.

As plantas medicinais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas como drogas convencionais no futuro ou ainda como ferramentas bioquímicas para a elucidação de aspectos etiológicos de determinadas patologias que ainda permanecem obscuros (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Estimativas sobre o número de espécies de plantas e flores em todo o mundo apontam para uma faixa entre 200.000 e 250.000 em 300 famílias e 10.500 gêneros. Segundo a OMS, 80% da população mundial utilizam a medicina popular (principalmente através do uso de plantas medicinais) para suprir as necessidades de assistência médica primária (ELISABETSKY, 1987).

A *Casearia sylvestris* pertence à família *Flacourtiaceae* e é popularmente conhecida como "Guaçatonga" (Guassatonga), “herva de brugre”, “pau de lagarto”, “erva de pontada” ou “chá de bugre”. É muito difundida na medicina popular, devido às suas propriedades anti-sépticas, antivirais, antiúlcera e cicatrizantes. A casearia está oficializada na Farmacopéia Brasileira de 1929 (SATO, 1998); provém de árvores com 4 a 6 metros de altura e é uma planta perene e pioneira, sendo que seus frutos são consumidos por pássaros e floresce nos meses de junho a agosto (MARQUETE, 2001).

O extrato bruto aquoso mostrou propriedades inibitórias sobre fosfolipases A2, miotoxinas, proteases e hemorraginas presentes em venenos de serpentes (RASLAN *et al.*, 2002). Quando administrado oralmente em ratos, o extrato alcoólico das folhas de casearia provocou a inibição da secreção gástrica, sendo mais efetivo que o misoprostol na supressão de lesões gástricas leves (BASILE et al., 1990).

Os experimentos toxicológicos indicaram um valor oral da DL_{50} (dose letal para 50% dos animais) maior do que 1840 mg/Kg, sendo esta 32 vezes maior do que a dose efetiva DE_{50} (dose eficaz em 50% dos indivíduos, para um determinado efeito) que foi de 57,5 mg/Kg (BASILE et al., 1990). A dose letal média DL_{50} do extrato aquoso a quente foi de 1,792g de resíduo/kg de peso, para camundongos albinos (SILVA et al., 1986).

O estudo da atividade antimicrobiana de substâncias, tais como a casearia, são usualmente realizados *in vitro* e existem poucas evidências da eficácia deles em modelos de infecção *in vivo*. Os modelos de infecção em animais são úteis para prever o comportamento de fármacos, pois a dinâmica da infecção, particularmente em roedores, é similar a dos seres humanos. Os modelos experimentais que utilizam a reação a algum corpo estranho, usualmente implantado via subcutânea e estudam o impacto de fármacos (ou qualquer tratamento) sobre ele, são chamados de modelos *ex vivo.* A implantação de corpos estranhos porosos resulta na

encapsulação dos mesmos por tecido granulomatoso ou fibrinoso, sendo a sua cavidade preenchida por fluido tipo exsudato. Este tipo de material permite a difusão de antimicrobianos e a entrada de fagócitos e anticorpos, ocasionando uma oportunidade para se examinar a efetividade de antimicrobianos conjuntamente com as defesas do hospedeiro.

Estes modelos podem ser válidos para determinação da capacidade de um antimicrobiano em penetrar em locais específicos de infecção, seu nível bactericida, seu efeito na fisiologia e morfologia da bactéria e a possibilidade da ocorrência de seleção ou resistência (RENNEBERG, 1993). Dentre os vários métodos utilizados para indução desta injúria, a implantação de esponjas de policlorovinil (PVC), como agente desencadeador, no dorso de animais, tem sido utilizado (BAGLIE et al., 2000; GROPPO et al., 2000). Esse tecido tem morfologia e sequência de formação bem estudada. A imunossupressão do hospedeiro em modelos de infecção em animais, particularmente em ratos e camundongos, foi descrita em muitos trabalhos (FUENTES et al., 1995; BRUN-PASCAUD et al., 1998; SMITH et al., 1998; FUENTES et al., 1998). Entretanto, GIRARD et al. (1996) não observaram diferenças nos níveis teciduais de azitromicina quando compararam camundongos imunossuprimidos (através da utilização de ciclosporina) ou não.

Obviamente, os efeitos farmacológicos ocasionados por fitoterápicos são oriundos de um ou mais de seus constituintes. Grupos farmacológicos distintos, dentro de uma mesma planta, podem ser responsabilizados pelas várias atividades farmacológicas verificadas em uma só espécie vegetal. Embora a maioria dos pesquisadores tenha tendência a preconizar o uso de princípios ativos das plantas de origem, é possível mostrar através de muitos exemplos, que o uso das plantas pode ser efetivo quando usado *in natura* ou através de extratos de preparação simples (MATOS, 1997).

Os extratos vegetais usualmente apresentam baixo custo, são mais facilmente aceitos pela população e não envolvem grande investimento inicial para sua produção. Além disso, a Portaria 971 (03 de maio de 2006), a qual aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, contempla a fitoterapia, entre outras, como prática desejável nas políticas de saúde públicas brasileiras (Diário Oficial da União, 2006).

2. PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo foi avaliar o efeito do extrato de guaçatonga ou casearia (*Casearia sylvestris*) sobre a ação antibacteriana da amoxicilina no tratamento da infecção estafilocócica, induzida por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina MRSA, em modelo *ex vivo* em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Os principais materiais utilizados para a realização do presente trabalho foram:

- *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina ATCC 25923;
- esponjas de policlorovinil (PVC) com densidade de 35 kg/m3, PRO301 – Proespuma Com. e Ind. Ltda;
- suspensão de amoxicilina (Sigma, EUA) triidratada de 60 mg/mL;
- quetamina 100 mg/mL (Dopalen, VetbrandsTM);
- xilasina 100 mg/mL (Rompun® , Bayer);
- extrato de *Casearia sylvestris* a 10%: obtido diretamente de uma farmácia de manipulação (Gerson E. Cecon Farm. de Manipulação Ltda, Limeira, SP);
- agulha especial para administração oral, curva, 70x15, Arkansas®

3.2. ANIMAIS

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP (protocolo 2380-1). Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos jovens (60 dias), machos, pesando entre 150 e 200 g, S.P.F. que foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Após a chegada dos animais à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os animais permaneceram cerca de uma semana, para adaptação, nas dependências do biotério de experimentação da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica. Durante a fase de adaptação e também durante a fase experimental, os animais receberam ração balanceada comercial e água *ad libitum*.

3.3. CULTURA DO MICRORGANISMO STAPHYLOCOCCUS AUREUS PARA INFECÇÃO DO GRANULOMA

Para a manutenção da cepa de *S. aureus* foram utilizados tubos de ensaio esterilizados com TSB (caldo de tripticaseina) 24 horas antes de sua utilização. Para

obtenção do inoculo padrão contendo 10^8 cfu/mL foram realizados os procedimentos a baixo:

- Uma alçada de colônias cultivada em TSB foi colhida com alça de platina esterilizada;
- Os microrganismos foram dispersos em um tubo de ensaio contendo 10 mL de BHI e encubados em aerobiose por 4 a 5 horas a 37 ^oC;
- O espectrofotômetro foi calibrado com soro fisiológico e ajustado para 800 nm de comprimento de onda;
- 0,1 mL da dispersão foi diluída em um tubo contendo soro fisiológico até obtenção de uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 60% de transmitância.

3.4. INDUÇÃO DE GRANULOMA, INFECÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO E TRATAMENTOS REALIZADOS

O tecido granulomatoso foi induzido por meio do implante de quatro discos de esponja estéreis de policlorovinil (PVC) com 12 mm de diâmetro por 5 mm de altura (densidade de 35 kg/m^3, PRO301 – Proespuma Com. e Ind. Ltda), no tecido subcutâneo no dorso dos animais, de acordo com a técnica descrita previamente (GROPPO et al., 2000).

Brevemente, após a indução de anestesia geral nos ratos (administração intramuscular de quetamina e xilasina) foi realizado a tricotomia da região dorsal mediana, seguida de antissepsia com solução de álcool iodado a 2%. Foi realizado uma incisão de aproximadamente 1 cm, perpendicularmente à coluna vertebral, na derme, sem invasão de tecido muscular, com tesoura de ponta reta fina e divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba. As esponjas foram introduzidas o mais distante possível da incisão, em posições laterais, uma à esquerda e outra à direita, duas em direção à cabeça e outras duas em direção à cauda. A incisão foi suturada com dois pontos simples, com fio de algodão número zero.

Decorridos 14 dias da implantação das esponjas, 0,5 mL de uma suspensão bacteriana contendo $1x10^{10}$ de células ATCC 25923 em solução de cloreto de sódio a 0,9% (ajustada por espectrofotometria conforme descrito anteriormente) foi

injetado em cada uma das quatro esponjas implantadas (tecidos granulomatosos) com uma seringa e agulha estéreis.

Vinte e quatro horas após a infecção, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos do estudo.

Divisão dos grupos	Tratamento	Período de sacrifício (em horas)	N
1. Grupo controle 0h	Dose única de soro fisiológico (1 ml/kg)	0	6
2. Grupo controle 24h	Soro fisiológico (1 ml/kg) a cada 8 horas	24	6
3. Grupo Amoxicilina	Amoxicilina em suspensão (50 mg/kg) a cada 8 horas	24	6
4. Grupo Amoxicilina/casearia	Amoxicilina em suspensão (50 mg/kg) e casearia 60 mg/kg a cada 8 horas	24	6
5. Grupo Casearia	Casearia 60mg/kg a cada 8 horas	24	6

Para a administração oral das drogas nos animais foi utilizado uma agulha especial (Agulha para administração oral, curva, 70x15, Arkansas®), acoplada à seringa hipodérmica. A administração dos fitoterápicos foi realizada sempre 15 minutos após a administração da amoxicilina.

Após a conclusão dos tratamentos (0 ou 24 horas após os tratamentos realizados), os animais foram novamente anestesiados, exsanguinados através da secção do plexo carotídeos e então os tecidos granulomatosos infectados foram cuidadosamente retirados, mediante técnica cirúrgica. Em seguida, os animais foram sacrificados através do aprofundamento da anestesia.

As amostras dos granulomas foram colocadas em diferentes tubos tipo *falcon*, contendo 10 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada, previamente pesado.

Após nova pesagem para determinar o peso do granuloma, as amostras foram submetidas à agitação em vortex por 5 minutos. Após este período, foram colhidas alíquotas de 10 µL e espalhadas, através de uma alça de vidro em L, em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 25 mL de meio de cultura Salt Manitol Agar.

Todas as placas foram levadas à estufa a 37 °C, durante 18 horas para incubação. Decorrido este período, foram submetidas ao procedimento de contagem manual.

FORMA DE ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados das contagens de colônias provenientes dos granulomas foram comparados em termos de porcentagem de redução com relação ao grupo controle, através do teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, com auxílio do pacote estatístico BioEstat 5.0.

4. RESULTADOS

A figura 1 mostra o peso dos fibromas após infecção com o *S. aureus* ATCC 33591. Como pode ser observado, o peso variou pouco entre os grupos. O tratamento utilizando a combinação de amoxicilina com casearia (Grupo 4) apresentou fibromas com massa significativamente menor ($p<0.05$) em relação ao grupo controle 0 horas (Grupo 1). Nos demais grupos não foram observadas diferenças significativas.

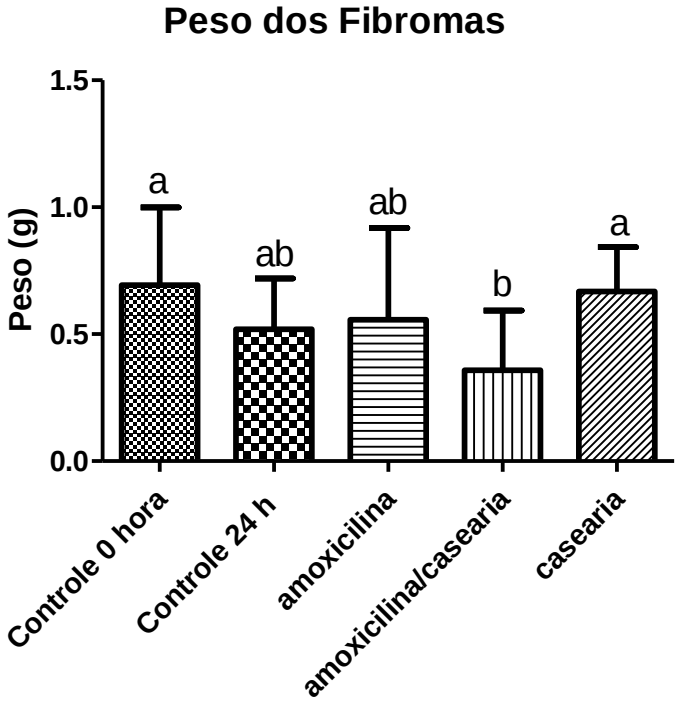

Figura 1: Média do peso dos fibromas entre os grupos. Letras diferentes mostram diferença estatística. p< 0,05 (Kruskal-Wallis / Student-Newman Kells).

A figura 2 mostra os resultados da contagem das colônias provenientes dos granulomas. Foi possível verificar que os grupos Amoxicilina/casearia (Grupo 4) e casearia (Grupo 5) apresentaram uma média significantemente menor em comparação com os controles (0 e 24h, Grupos 1 e 2) ($p<0,05$), mas não diferiram do grupo amoxicilina (Grupo 3) (Figura 2).

No entanto, o grupo em que a amoxicilina foi utilizada isoladamente, a contagem de colônias não diferiu dos grupos controles ($p>0,05$).

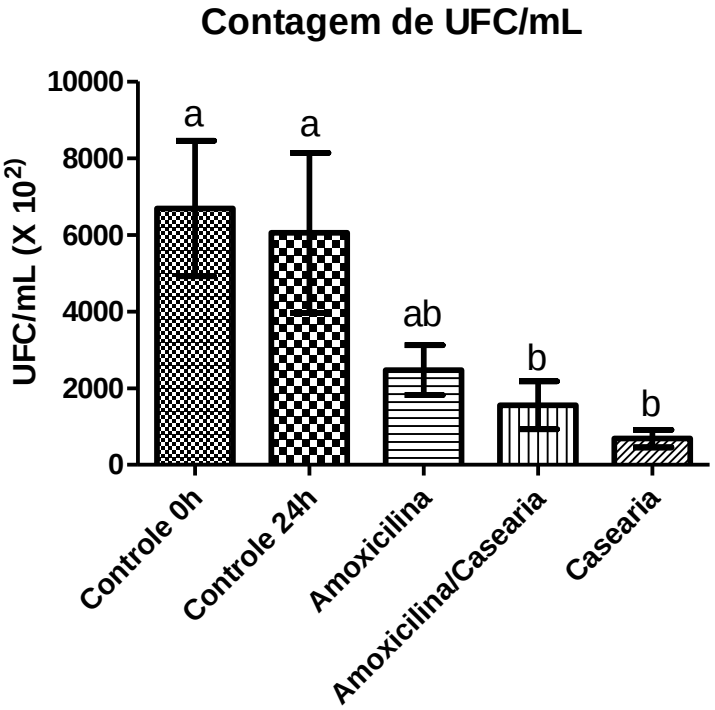

Figura 2. Média da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) entre os grupos. Letras diferentes mostram diferença estatística. p< 0,05 (Kruskal-Wallis / Student-Newman Kells).

5. DISCUSSÃO

Uma das mais conhecidas espécies de bactéria responsável por muitas infecções adquiridas no ambiente hospitalar é o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (GIBBONS, 2008). A ocorrência de MRSA e outras cepas multirresistentes tem levado a necessidade do descobrimento de novas classes de antimicrobianos (GIBBONS, 2004).

O uso de plantas medicinais tem sido sugerido como "antibióticos alternativos" na tentativa de combater bactérias resistentes (MATHEWS et al., 1998). Fitoquímicos e produtos naturais em geral possuem uma grande variedade de compostos bioativos, os quais podem ser estruturalmente distintos dos antimicrobianos convencionais, exibindo novos modos de ação (GIBBONS, 2008). Na etnobotanica existem muitos exemplos de plantas que são usadas na forma tópica ou sistemicamente para tratar infecções bacterianas, porém ainda não há nenhum antimicrobiano derivado de planta utilizado clinicamente.

A literatura tem reportado a ação de muitos extratos de plantas ou de seus metabolitos isolados sobre a inibição do crescimento do MRSA. Óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Eucalyptus globulus* demonstraram ação antimicrobiana "in vitro" sobre 14 cepas de isolados clínicos de MRSA. *T. vulgaris* apresentou uma ação mais efetiva com menores valores de MIC e sua ação antimicrobiana foi atribuída à presença de thymol (TOHIDPOUR et al., 2010).

Um composto isolado da fração hexânica do extrato preparado a partir das raízes de *Angelica dahurica*, tradicional planta chinesa, exibiu um forte poder inibitório sobre as cepas de MRSA e cepas multirresistentes, com MIC variando entre 8 a 32 µg/mL (LECHNER et al., 2004). O extrato metanólico das folhas de *Ocinum tenuiflorum (Lamiaceae) e* os extratos aquoso e metanólico do fruto imaturo de *Momordica charantia (Curcubitaceae)* também foram capazes de inibir o crescimento de cepas MRSA (MAHOMOODALLY et al., 2010).

Isoflavonóides isolados de *Erthrina variegata* apresentou ação inibidora *in vitro* sobre o crescimento de MRSA (TANAKA et al., 2002) assim como de extratos de plantas da família *Leguminosae* como *Acacia auriculiformis*, *Bauhinia kockiana, Bahiana purpurea*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Calliandra tugemina*, *Cassia*

suratenssis, *Leucaena leucocephala* e *Peltophorum pterocarpum* (CHEW et al., 2011).

Casearia sylvestris é uma planta conhecida pelas suas propriedades medicinais, usada tradicionalmente na América do Sul como antisséptica, anestésica, antiúlcera e antidoto para venenos de cobra. Metabólitos secundários isolados de extratos da folha *C. sylvestris* como *casearinas* e *casearventrinas* tem demonstrado efeitos citotóxicos contra células tumorais principalmente contra as células KB, com a possibilidade de aplicação como quimioterápicos no futuro (GUIL-GUERREIRO & CAMPRA, 2009). As casearventrinas (A,B,C) também demonstraram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger in vitro* (OBERLIES et al., 2002).

Alguns estudos tem demonstrado a ação antimicrobiana de extratos ou compostos isolados de *C. sylvestris in vitro*. Porém até o momento a literatura indexada carece de dados provenientes de testes *in vivo*. O extrato etanólico de *C. sylvestris* obtido da Estação Ecológica Juréia-Itatins, não foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* ATCC 25923 *in vitro* (AGRIPINO et al., 2004). Já ao se testar isoladamente composto isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE), um derivado do ácido gálico extraído do extrato etanólico de *C. sylvestris,* observou-se uma inibição do crescimento de leveduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondi*) e as bactérias Gram-Positiva *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (DA SILVA et al., 2008). No presente estudo verificou-se que os extratos de casearia isoladamente ou em combinação com amoxicilina foram capazes de reduzir significativamente a concentração de *S. aureus* nos fibromas em comparação com o controle.

6. CONCLUSÃO

O extrato de guaçatonga ou casearia (*Casearia sylvestris*) demonstrou capacidade de reduzir o número de UFC/mL nos fibromas infectados por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, isoladamente ou quando aplicado em conjunto com a amoxicilina. Novos estudos devem ser conduzidos em outros modelos animais para verificar a efetividade do tratamento, uma vez que, apesar de reduzir o número de colônias bacterianas, os grupos tratados com casearia não apresentaram diferença em relação ao grupo tratado apenas com amoxicilina, indicando que o tratamento a base de extrato de casearia pode não ser suficientemente efetivo.

REFERÊNCIAS*

1. AGRIPINO, D.G., LIMA, M.E.L., DA SILVA, M.R., MEDA, C.I., BOLZANI, V. S., CORDEIRO, I., YOUNG, M.C.M., MORENO, P.R.H. Screening Of Brazilian Plants For Antimicrobial And Dna- Damaging Activities. I. Atlantic Rain Forest Ecological Station Juréia-Itatins. Biota Neotropica v4 (n2) http://www.biotaneotropica.org.br/v4n2/pt/abstract?article+BN03804022004 2004.
2. BAGLIE, S., GROPPO, F.C., FILHO, T.R., Tissue pharmacokinetics of amoxicillin. An experimental design in rats. Braz J Infect Dis. 4(4):197-203. 2000.
3. BASILE, A.C., SERTIE, J.A., PANIZZA, S., OSHIRO, T.T., AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of Casearia sylvestris. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. J Ethnopharmacol, v.30, p.2, p.185-197, 1990.
4. BRUN-PASCAUD, M., CHAU, F., DEROUIN, F., GIRARD, P.M., Experimental evaluation of roxithromycin combined with dapsone or sulphamethoxazole on Pneumocystis carinii and Toxoplasma gondii infections in a rat model. J. Antimicrob. Chemother., Washington. 41:57-62. 1998. [Supplement B].
5. CHEW, Y.L., CHAN, E.W.L., TAN, P.L., LIM, Y.Y., STANSLAS, J., GOH, J.K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. BMC Complementary and Alternative. Medicine 2011, 11:12 doi:10.1186/1472-6882-11-12
6. CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. 22;100(1-2):72-9. 2005.
7. DA SILVA, S.L., CHAAR, J.S., DAMICO, D.C.S., FIGUEIREDO, P.M.S., YANO, T. Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from Leaves of Casearia sylvestris. *Pharmaceutical Biology., Vol. 46, No. 5, Pages 347-351. 2008.*
8. DE CARVALHO, M.J., PIMENTA, F.C., HAYASHIDA, M., GIR, E., DA SILVA, A.M., BARBOSA, C.P., CANINI, S.R., SANTIAGO, S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible S. aureus in the saliva of health professionals. Clinics (Sao Paulo). 64(4):295-302. 2009.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Ministério da Saúde. Edição n. 84 de 04/05/2006. Publicação da Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006, Aprova A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema único de Saúde.
10. ELIZABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. Ciência e Cultura, 39(8): 697-702. 1997.
11. FARIAS, W.V. et al. Sensitivity pattern of 117 clinical isolates of Staphylococcus aureus from 12 hospitals. Revta. Ass. med. bras., São Paulo. 43(3):199-204. 1997.
12. FORTES, C.Q., ESPANHA, C.A., BUSTORFF, F.P., ZAPPA, B.C., FERREIRA, A.L., MOREIRA, R.B., PEREIRA, N.G., FOWLER, V.G. JR, DESHMUKH, H. First reported case of infective endocarditis caused by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus not associated with healthcare contact in Brazil. Braz J Infect Dis. 12(6):541-3. 2008.
13. FUENTES, F., MARTIN, M.M., IZQUIERDO, J., GOMEZ-LUS, M.L., PRIETO, J. In vivo and in vitro study of several pharmacodinamic effects of meropenem. Scand J. Infect Dis. 27(5):469-474. 1995.
14. FUENTES. F., IZQUIERDO, J., MARTIN, M.M., GOMEZ-LUS, M.L., PRIETO, J. Postanitbiotic and sub-MIC effects of azithromycin and isepamicin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother. 42(2):414-8. 1998.
15. GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat. Prod. Rep. 21: 263–77. 2004.
16. GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance--strengths, weaknesses and opportunities. Planta Med. 74(6):594-602. 2008.
17. GIRARD, D., REGAN, P. A., MILISEN, W.B., RETSEMA, J.A., SWINDELL, A .C. Influence of immunosuppression on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of azithromycin in infected mouse tissues. J. Antimicrob. Chemother. 37:21-35. 1996 [Supplement C].
18. GROPPO, F.C., MATTOS-FILHO, T.R., DEL-FIOL, F.S. Bioassay of amoxicillin in rats. Biol Pharm Bull. 23(9):1033-5. 2000.
19. GROPPO, F.C. Influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo ex vivo, em ratos. Piracicaba, 1996.

70p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

20. GUIL-GUERRERO, J.L., CAMPRA, P. Cytotoxicity screening of endemic plants from Guayana highlands. Trop Biomed. 26(2):149-54. 2009.
21. JONES, M.E., DRAGHI, D.C., KARLOWSKY, J.A., SAHM, D.F., BRADLEY, J.S. Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from central nervous system specimens as reported by U.S. hospital laboratories from 2000 to 2002. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 25(3):3. 2004.
22. KAMIYA, Y. Experiences and studies on antimicrobial resistance in Japan: useful lessons for developing countries. East Afr. Med. J., Kenya. 74(3)174-176. 1997.
23. KONEMAN, E.W. et al. Introduction to diagnostic microbiology. 2.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.
24. LECHNER, D., STAVRI, M., OLUWATUYI, M., PEREDA-MIRANDA, R., GIBBONS, S. The anti-staphylococcal activity of Angelicadahurica (Bai Zhi). Phytochemistry. 65(3): 331–335. 2004.
25. MAHOMOODALLY, M.F., GURIB-FAKIM, A., SUBRATTY, A.H. Screening for Alternative Antibiotics: An Investigation into the Antimicrobial Activities of Medicinal Food Plants of Mauritius. Journal of Food Science. 75(3):M173–M177. 2010.
26. MARQUETE, 2001 MARQUETE, R. Reserva Ecológica do IBGE (Brasília - DF) – Flacourtiaceae. Rodriguésia, v.52, n.80, p.5-16, 2001.
27. MATHEWS, H.L., CONTI, S., WITEK-JANUSEK, L., POLONELLI, L. Effect of Pichia anomala killer toxin on Candida albicans. Med Mycol. 36(4):199-204. 1998.
28. MATOS, F.J.A. Living pharmacies. Ciência e Cultura, v.49, n.5-6, p.409-412, Sep-Dec. 1997.
29. MCCARTNEY, 1992 McCartney, A.C. Changing trends in infective endocarditis. J. clin. Path., London, 45(11):945-948. 1992.
30. OBERLIES, N.H., BURGESS, J.P., NAVARRO, H.A., PINOS, R.E., FAIRCHILD, C.R., PETERSON, R.W., SOEJARTO, D.D., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D., WANI, M.C., WALL, M.E. Novel Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Leaves and Twigs ofCasearia sylvestris. J. Nat. Prod. 65 (2), pp 95–99. 2002.

31. PERL, T.M. & GOLUB, J.E. New approaches to reduce Staphylococcus aureus nosocomial infection rates: treating S. aureus nasal carriage. Ann. Pharmacother., 32(1):S7-S16. 1998.
32. PHILIPS, I. A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. J Antimicrob Chemother. 27 Suppl D:1-50. 1991.
33. RASLAN, D.S., JAMAL, C.M., DUARTE, D.S., BORGES, M.H., DE LIMA, M. E. Anti -PLA2 action test of Casearia sylvestris. Boll ChimFarm, v.141, p.457-460, 2002.
34. RENNEBERG, 1993 RENNEBERG, J. Definitions of antibacterial interactions in animal infection models. J. Antimicrob. Chemother. 31:167-175. 1993 [Supplement D].
35. ROZENBAUM R, SAMPAIO MG, BATISTA GS, GARIBALDI AM, TERRA GM, SOUZA MJ, VIEIRA EN, SILVA-CARVALHO MC, TEIXEIRA LA, FIGUEIREDO AM. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). Braz J Med Biol Res. 42(8):756-60. 2009.
36. SATO, M.E.O. Estudo da estabilidade de uma formulaçäo na forma gel, veiculando o extrato fluido de Casearia sylvestris Sw., Flacourtiaceae ("guaçatonga"). São Paulo, 1998. 180p. Dissertação(Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
37. SILVA, F.A.; SILVA, E.S.; APOLINARIO, J.C.G.; BAISCH, A.L.M.; ALAM, M.F.; OLIVEIRA, B.T.; BATTASTINI, A.M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; LAPA, A.J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos da Casearia sylvestris Swartz. Vittalle, v.2, p.57-66, 1986.
38. SMITH, G. M., SLOCOMBE, B., ABBOTT, K.H., MIZEN, L.W. Activity of amoxicillin-clavulanate against penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae in an experimental respiratory infection model in rats. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington. 42(4): 813-817. 1998.
39. SOUSA JUNIOR, F.C., NUNES, E.W., NASCIMENTO, E.D., OLIVEIRA, S.M., MELO, M.C., FERNANDES, M.J. Prevalência de Staphylococcus spp meticilina-resistentes isolados num hospital maternidade escola de Natal, Rio Grande do Norte. Rev Soc Bras Med Trop. 42(2):179-82. 2009.

40. TANAKA, H., SATO,M., FUJIWARA, S., HIRATA, M., ETOH, H., TAKEUCHI, H. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from Erythrina variegataagainst methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Letters in Applied Microbiology. 35(6):494–98. 2002.
41. TOHIDPOUR, A., SATTARI, M., OMIDBAIGI, R., YADEGAR, A., NAZEMI J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Phytomedicine. 17(2): 142–145. 2010.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNICAMP

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Igor Alves da Silva RA 097482 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Efeito do extrato da guaçatonga (*Casearia sylvestris)* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina" no ano de 2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 02 de Outubro de 2012

Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

ANEXO 2

PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – QUOTA INSTITUCIONAL UNICAMP

(quota de agosto de 2010 a julho de 2011)

PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Bolsista: IGOR ALVES DA SILVA – RA 97482

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) FRANCISCO CARLOS GROPPO

Projeto: Efeito do extrato da guaçatonga (*Casearia sylvestris*) sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina.

PARECER

Relatório apresentado com resultados e discussão.

Conclusão do Parecer:

APROVAR (SIM)
REFORMULAR (NÃO)
REJEITAR (NÃO)

ANEXO 3

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto **"Efeito do extrato da guaçatonga (*Casearia sylvestris)* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina"** (protocolo nº **2380-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo / Igor Alves da Silva**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de abril de 2011.

Campinas, 03 de setembro de 2012.
2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/