

ARTIGO ORIGINAL

Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de Assa-peixe (*Vernonia polyanthes*) contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

*Evaluation of the antibacterial activity of assa-peixe leaves (*Vernonia polyanthes*) against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa**

Giancarlo Miranda Carnicelli¹, Yago Querido Correa Leite¹, Mariléia Chaves Andrade²

¹ Acadêmico do 6º ano da Faculdade de Medicina de Itajubá

² Professora da Faculdade de Medicina de Itajubá

Contato

Giancarlo Miranda Carnicelli

giancarlomc@hotmail.com

Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de Assa-peixe (*Vernonia polyanthes*) contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Resumo

Introdução: Com o aumento da resistência antimicrobiana frente aos antibióticos tradicionais, a ciência está empenhada no desenvolvimento de novas formas de tratamento contra bactérias multirresistentes. A planta *Vernonia polyanthes*, conhecida no Brasil principalmente como “Assa-peixe”, tem sido usada como alternativa pela cultura popular para o tratamento de infecções respiratórias e lesões de pele. Estudos científicos demonstram capacidade antiinflamatória e antimicrobiana. **Objetivo:** Avaliar o efeito antibacteriano das folhas de *Vernonia polyanthes* contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecções hospitalares. **Métodos:** Utilizou-se 10 cepas de *E. coli*, 10 de *S. aureus* e 10 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com infecções hospitalares. As folhas de *Vernonia* foram secas em estufas, trituradas e filtradas para constituição do extrato bruto, que em seguida foi diluído para análise da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em placa. Dois antibióticos foram utilizados para fins de controle de atividade antimicrobiana. **Resultados:** Nas concentrações de 100 mg/ml e 50 mg/ml houve total atividade antimicrobiana do extrato contra as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, semelhante à efetividade dos antibióticos utilizados, e sua eficácia foi progressivamente diminuída conforme redução da concentração do extrato. **Conclusão:** Encontrou-se uma satisfatória atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *Vernonia polyanthes* contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo que na concentração do extrato de 100 mg/ml e 50 mg/ml houve total atividade antibacteriana.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vernonia*, Fitoterapia

Evaluation of the antibacterial activity of Assa-peixe leaves (*Vernonia polyanthes*) against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Introduction: With the increase of antimicrobial resistance against traditional antibiotics, science is committed to the development of new forms of treatment against multidrug resistant bacteria. The *Vernonia polyanthes* plant, known in Brazil as "Assapeixe", has been used as an alternative by popular culture for the treatment of respiratory infections and skin injuries. Scientific studies demonstrate antiinflammatory and antimicrobial capacity. **Objective:** This article aims to evaluate the antibacterial effect of *Vernonia polyanthes* leaves against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital infections. **Methods:** Ten strains of *E. coli*, ten strains of *S. aureus* and ten strains of *P. aeruginosa* isolated from patients with nosocomial infections were used. The leaves of *Vernonia* were dried in greenhouses, crushed and filtered to form the crude extract, which was then diluted for analysis of the antimicrobial activity by the plate microdilution method. Two antibiotics were used for antimicrobial activity control purposes. **Results:** At the concentrations of 100 mg/ml and 50 mg/ml there was total antimicrobial activity of the extract against the strains of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, which is similar to the effectiveness of the antibiotics used, and its efficacy was progressively lower as the concentration of the extract decreased. **Conclusion:** A satisfactory antimicrobial activity of the leaf extract of *Vernonia polyanthes* against strains of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* was found. In the extract concentration of 100 mg/ml and 50 mg/ml there was total antibacterial activity.

Keywords: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vernonia*, Phytotherap

Introdução

A utilização de plantas com fins medicinais, para prevenção, tratamento e cura de doenças, é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade, tendo sua importância ressaltada até mesmo pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que divulgou na década de 90 que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam dessas plantas como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde.^{1,2} O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, e desse modo, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em vigor a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.³ Diante disso, percebe-se atualmente, além do interesse governamental e profissional, a importância da associação do avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável, visando uma política de assistência à saúde eficaz e abrangente.⁴

Dentre as inúmeras plantas utilizadas como fitoterápicos temos a planta *Vernonia polyanthes*, da família *Asteraceae*, popularmente conhecida no Brasil como “Assa-Peixe” ou “Cambará-Açu”, que possui extensa distribuição por diferentes países da América Central e do Sul. No Brasil, é nativa principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e seu uso empírico para fins medicinais são principalmente por meio de chás e xaropes para tratamento de doenças do trato respiratório, tais como gripe, tosse, bronquite, pneumonia e resfriado, além do uso tópico para lesões de pele.⁵ Estudos científicos acerca da *Vernonia polyanthes* demonstram diversas ações, como atividade antiulcerogênica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antifúngica e antimicrobiana.⁶ Esses estudos ganham ainda mais relevância uma vez que, no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos frequentemente utilizados para o tratamento dos pacientes. Ainda, pessoas infectadas com esses patógenos apresentam maior tempo de internação hospitalar e requerem tratamento com fármacos de segunda e terceira geração, que podem ser menos efetivos, mais tóxicos ou mais caros.⁷

No contexto sobre novas formas de controle de infecções hospitalares, destacam-se três bactérias, foco de vários estudos por representarem importantes causadores de contaminação em meio hospitalar.

Escherichia coli (*E.coli*) é uma bactéria gram-negativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Está presente em maior parte no trato intestinal humano e a maioria dos seus sorotipos faz parte da microbiota comensal do intestino dos mamíferos, mas existem cepas deste gênero responsáveis por causar doenças.⁸ A transmissão das infecções causadas por esta bactéria se dá principalmente por três maneiras: o contato direto com animais, o contato com outros indivíduos e o consumo de alimentos contaminados. A *E. coli* está relacionada a aproximadamente 50% das infecções hospitalares, e de 70 a 90% dos episódios de infecções do trato urinário (ITU) atingindo indivíduos vulneráveis como crianças, idosos e gestantes, e é responsável por morbidade e altos custos financeiros no tratamento para pacientes e para sistemas públicos e privados de saúde.⁹⁻¹¹

Por sua vez, em se tratando de gram-positivos, *Staphylococcus* destaca-se por seu papel na infecção hospitalar. Descritos pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião Alexandre Ogston, após análise do pus de abscessos cirúrgicos, trata-se de uma bactéria presente em diversas regiões do corpo humano como pele, intestinos, garganta e, em maior parte, as narinas cuja prevalência de colonização chega a 40% na população adulta.¹²⁻¹⁶ Na década de 1930, o uso de sulfanilamida para combate das doenças infecciosas parecia promissor, mas, a análise das características da espécie *Staphylococcus aureus* mostrou o surgimento das primeiras cepas resistentes a esse quimioterápico. Com o uso da penicilina anos depois, observou-se o crescimento da resistência a esse fármaco pela produção de enzimas betalactamases, responsáveis pela quebra do anel beta lactâmico cuja estrutura confere o poder antibacteriano dessa classe de medicamentos. Enquanto no ano de 1944 somente 5% dos *S. aureus* eram resistentes à penicilina, em 1959 essa resistência já alcançava 80%.¹⁷⁻¹⁹ Estudos recentes demonstraram a existência de cepas multirresistentes inclusive à Vancomicina, um dos principais agentes antimicrobianos no combate a infecções graves causadas por *S. aureus*.²⁰

Diferente das bactérias anteriores, mas também associada a infecções hospitalares, principalmente em casos de imunossupressão do paciente, *Pseudomonas aeruginosa* está presente na microbiota humana e representa importante causa de morbimortalidade na população.²¹ Diante da realidade do crescimento exponencial da resistência antimicrobiana, uma rede de laboratórios mundial criou o programa

SENTRY para monitorar os perfis de sensibilidade/resistência de bactérias associadas às infecções hospitalares. Os dados de 1998 mostraram que a *P. aeruginosa* foi o patógeno mais encontrado isoladamente em pacientes com pneumonia hospitalar, além de uma das causas mais comuns de infecção urinária, infecção de ferida cirúrgica e infecções da corrente sanguínea nos hospitais abrangidos.²²

P. aeruginosa pode expressar resistência natural ou adquirida a inúmeros antibióticos, fato esse associado a difícil erradicação de doenças causadas por esse microrganismo. O intercâmbio de material genético é um dos principais responsáveis pela aquisição dessa resistência, o que torna a antibioticoterapia adequada uma escolha difícil em hospitais pelo país.²³⁻²⁵

Diante desse contexto mundial do crescimento da resistência aos antimicrobianos por bactérias que causam infecções hospitalares e devido ao crescente avanço do estudo científico de plantas vislumbrando uma perspectiva terapêutica, esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de inibição do extrato aquoso de *Vernonia polyanthes* frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes com infecções hospitalares.

Materiais e Métodos Seleção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas na pesquisa são provenientes do Banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Itajubá (FMIt), e foram obtidas de pacientes hospitalizados no Hospital Escola (HE) da instituição, no período de 2001 a 2007, provenientes de diversos sítios (urina, pele, corrente sanguínea, trato genital, sítio cirúrgico e outros) nas diferentes unidades: Pediatria, Clínica Particular, Ginecologia-Obstetrícia, Clínica Cirúrgica, Clínica Médica e Unidade de Terapia Intensiva.

Após processo de reavivamento em caldo de cultura (detalhado no item seguinte) para verificar a viabilidade das cepas para inclusão na pesquisa, assim ficou o número de cada espécie:

- Staphylococcus aureus*: 12 de 14 amostras/cepas selecionadas inicialmente apresentaram-se viáveis;
- Escherichia coli*: 10 de 10 amostras apresentaram-se viáveis;
- Pseudomonas aeruginosa*: 11 de 12 amostras apresentaram-se viáveis.

Reavivamento das amostras

As amostras foram retiradas do freezer e depois de descongeladas à temperatura ambiente, foram vortezadas, repicadas em placas com meio seletivo ágar MacConkey para *E. coli*, ágar nutriente para *P. aeruginosa* e manitol para *S. aureus* e incubadas em estufa microbiológica à 37°C por 48 horas. Após esse tempo, foram selecionadas as amostras que apresentaram crescimento significativo, e aquelas que não apresentaram crescimento significativamente no meio apropriado, foram colocadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas novamente em estufa microbiológica por 48 horas a 37°C.²⁶ As amostras que tiveram crescimento satisfatório, identificado pela turvação do meio, foram selecionadas e as que não apresentaram crescimento, excluídas do estudo. Assim, das 37 amostras pré-selecionadas para o estudo, foram inicialmente incluídas 10 amostras de *E. coli*, 12 de *S. aureus* e 11 de *P. aeruginosa*.

Dentre essas, analisou-se ainda as amostras com crescimento mais pronunciado/evidente, restando finalmente 10 amostras de *S. aureus*, 10 amostras de *E. coli* e 10 amostras de *P. aeruginosa* escolhidas para dar prosseguimento à pesquisa.

Preparação das amostras

As cepas selecionadas foram coletadas das placas de Petri e então transferidas uma pequena massa bacteriana, coletada com alça de repicagem, para microtubos contendo 5mL de solução salina estéril (0,85%). Esses microtubos foram vortezados e, após a homogeneização da suspensão, a densidade do inóculo foi verificada através da aferição da turbidez, empregando o cartão de Wickeman até atingir 3+ (quando ocorre o desaparecimento das linhas), que corresponde à escala 0,5 de McFarland, correspondendo a aproximadamente 10⁸ UFC/mL.²⁷

Obtenção do extrato das folhas de *Vernonia polyanthes*

Dez gramas das folhas de *Vernonia polyanthes* adquiridas de produtores rurais da região foram secas em estufas com circulação de ar à 40°C por 24 horas, após esse tempo, foram trituradas com auxílio de um pilão e constituiu a base seca. O extrato aquoso foi obtido por 12 minutos de infusão em água filtrada à 100°C na proporção de 1:10 (planta: água). Essa mistura foi filtrada com o auxílio de um filtro de papel, colocada em geladeira a 8°C até atingir peso constante e para posterior uso como extrato. ²⁸ A partir do extrato bruto realizaram-se oito diluições da planta em salina estéril para obtenção das seguintes concentrações/teste do estudo: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL e 0,78 mg/mL. Foi definida a utilização do extrato aquoso pela aplicabilidade metodológica relacionada à infraestrutura do laboratório da instituição em que a pesquisa foi realizada.

Análise da atividade antimicrobiana de folhas de *Vernonia polyanthes* pelo teste da Microdiluição em placas

Essa análise foi realizada segundo metodologia padronizada de microdiluição em caldo, com adaptações. ²⁹

Em três placas de poliestireno de 96 poços (uma placa para análise de cepas de *E. coli*, outra para análise de cepas de *S. aureus* e outra para análise de cepas de *P. aeruginosa*), foi colocado 40µL de caldo *Müller Hinton* em todos os poços da placa. Em seguida, adicionou-se 20µL de cada uma das 10 cepas/testes bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, previamente preparadas (item “Preparação das amostras”), nos poços de cada coluna de 1 a 11 em suas respectivas placas. Em seguida, adicionou-se 40µL do extrato de *Vernonia polyanthes* nas concentrações 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL e 0,78mg/mL nas colunas apropriadas, ou seja, nas linhas horizontais (1 a 10 da placa), como mostra a Figura 1. A fileira A recebeu extrato na concentração de 100 mg/ml, a B, extrato na concentração de 50 mg/mL e assim por diante. A coluna

de número 11 de cada placa recebeu o controle positivo contendo 40 μL de caldo *Müller Hunton* e 20 μL de uma cepa bacteriana controle, e a coluna 12 recebeu o controle negativo: 40 μL do caldo *Müller Hunton* mais 40 μL do extrato nas diferentes concentrações. Em seguida as placas foram incubadas em estufa 35°C por 24h.²⁹

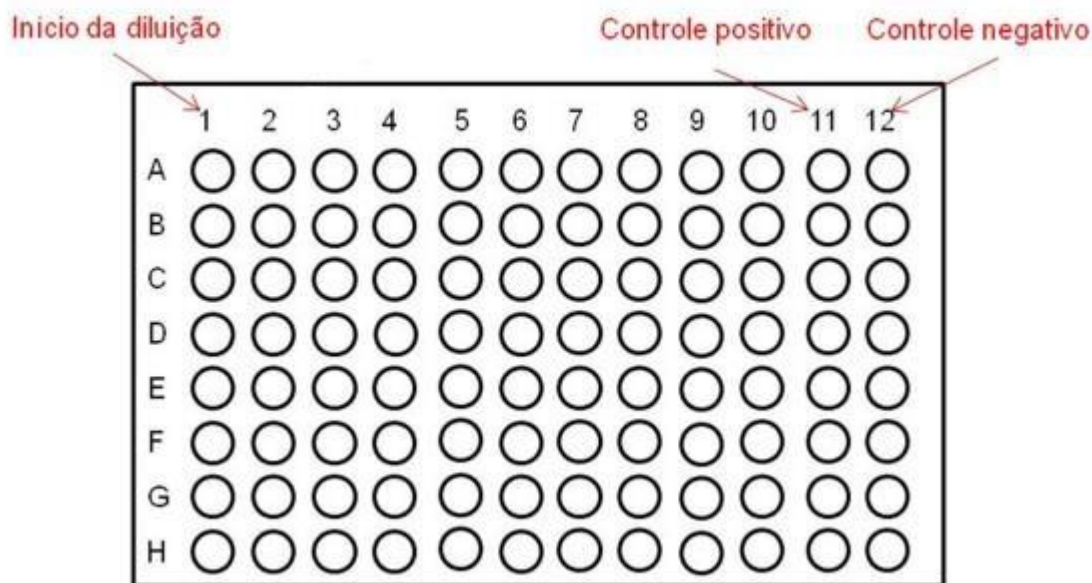


Figura 1. Esquema da microplaca utilizada na diluição do extrato. As diluições do extrato foram realizadas nas colunas 1 a 10 (ver texto para maiores explicações); na coluna 11 foi utilizado o controle positivo para crescimento bacteriano, na ausência do extrato; na coluna 12 foi utilizado o controle negativo, meio estéril.

Após esse tempo, adicionou-se 20 μL do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 2,5% em todos os poços, para a avaliação do crescimento microbiano por aspectos colorimétricos, seguido de incubação em estufa de 35°C por 3 horas. Concluído o período de 3 horas, realizou-se a leitura das placas através da coloração obtida com o revelador TTC, revelando, assim como demonstrado a Figura 2, que a coloração avermelhada ou rosada interpretou-se como crescimento bacteriano (indicativo de mudança de cor do TTC – crescimento bacteriano); coloração marrom, ausência de crescimento bacteriano, provável efeito inibitório da solução/teste.³⁰

Para fins de controle da atividade antimicrobiana, usamos dois antibióticos de princípios distintos, mas com espectro expandido: Amoxicilina + Clavulanato, com concentração de 57,3 mg/mL e Ceftriaxona com concentração de 285,7 mg/mL.

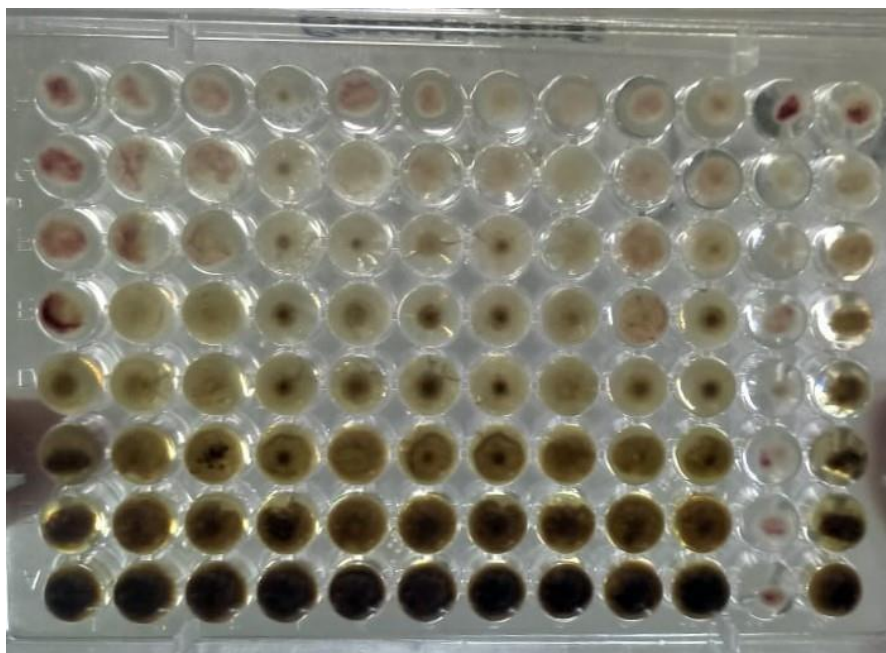


Figura 2. Placa demonstrando aspectos colorimétricos após uso do revelador TTC. Poços que tiveram efeito inibitório apresentaram coloração marrom, enquanto nos poços em que não houveram efeito inibitório, apresentaram coloração avermelhada (arquivo pessoal).

Resultados

Análise da inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por diferentes concentrações do extrato bruto de *Vernonia polyanthes*:

O perfil de inibição do crescimento de *S. aureus* foi diretamente proporcional à concentração do extrato. A título de ilustração, pegamos a menor e a maior concentração do extrato e fizemos uma análise de correlação de Spearman. A Figura 3 mostra que houve uma correlação direta entre a concentração do extrato e o percentual de cepas inibidas. A concentração de 0,78mg/mL foi capaz de inibir 50% das cepas testadas, já a concentração de 100 mg obteve 100% de inibição.

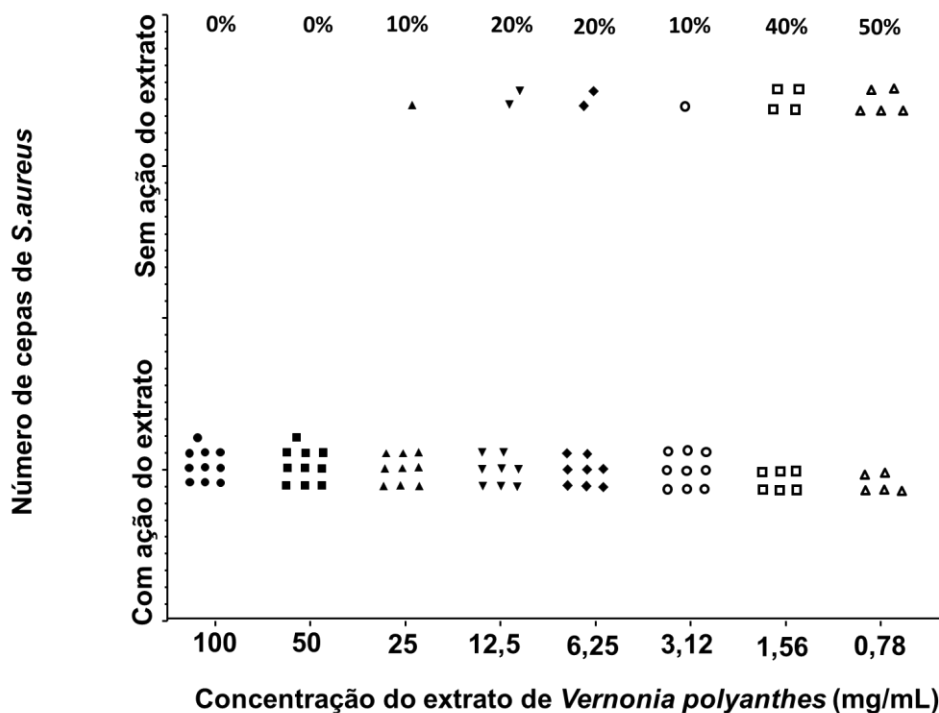


Figura 3. Perfil de sensibilidade de cepas de *S. aureus* diante do extrato de flores de *Vernonia polyanthes*. Após adicionar o caldo Müller Hunton, o extrato de *Vernonia polyanthes* e as cepas bacterianas na placa de poliestireno, seguindo a técnica descrita em “Materiais e Métodos”, adicionouse 20 µL do revelador cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 2,5% em todos os poços para a avaliação do crescimento microbiano por aspectos colorimétricos. Após a análise da placa, os valores foram plotados no programa GraphPad Prisma 8.0 para a elaboração dos gráficos de dispersão.

Análise da inibição do crescimento de *Escherichia coli* por diferentes concentrações do extrato bruto de *Vernonia polyanthes*:

O perfil de inibição do crescimento de *E. coli* foi diretamente proporcional à concentração do extrato, mas em uma apresentação não linear. A título de ilustração, analisou-se a menor e a maior concentração do extrato para uma correlação de Spearman (Figura 4). Demonstrou-se uma correlação direta entre a concentração do extrato e o percentual de cepas inibidas, exceto pelo fato da concentração de 0,78mg/mL não ter tido papel na inibição do crescimento de nenhuma das cepas testadas. A menor concentração capaz de inibir um percentual significativo de cepas foi de 1,56mg/mL, apresentando 10% de inibição, enquanto a concentração de 100 mg/mL obteve a maior capacidade inibitória, alcançando 100% das cepas testadas.

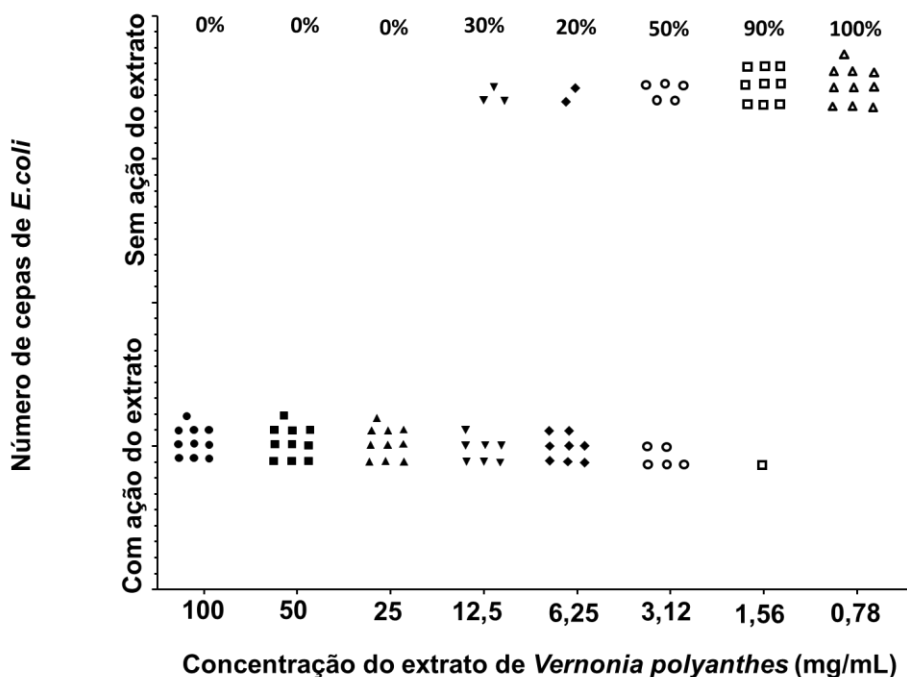


Figura 4. Perfil de sensibilidade de cepas de *E. coli* diante do extrato de flores de *Vernonia polyanthes*. Após adicionar o caldo *Müller Hinton*, o extrato de *Vernonia polyanthes* e as cepas bacterianas na placa de poliestireno, seguindo a técnica descrita em “Materiais e Métodos”, adicionou-se 20 µL do revelador cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 2,5% em todos os poços para a avaliação do crescimento microbiano por aspectos colorimétricos. Após a análise da placa, os valores foram plotados no programa *GraphPad Prisma 8.0* para a elaboração dos gráficos de dispersão.

Análise da inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* por diferentes concentrações do extrato bruto de *Vernonia polyanthes*:

Interessantemente, o perfil de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* foi diretamente proporcional à concentração do extrato, como se observa na Figura 5. Demonstrou-se uma correlação direta entre a concentração do extrato e o percentual de cepas inibidas, exceto pelo fato da concentração de 1,56mg/mL e 0,78mg/mL não terem papel na inibição do crescimento de nenhuma das cepas testadas. A menor concentração capaz de inibir um percentual significativo de cepas foi de 3,12mg/mL, apresentando 50% de inibição, enquanto a concentração de 100 mg/mL obteve a maior capacidade inibitória, alcançando 100% das cepas testadas.

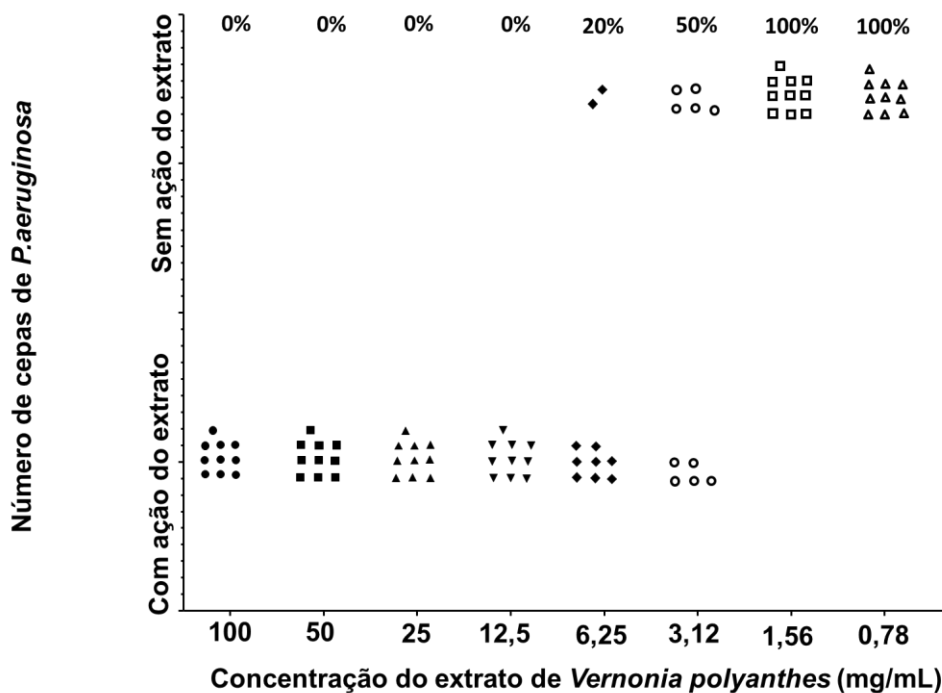


Figura 5. Perfil de sensibilidade de cepas de *P. aeruginosa* diante do extrato de flores de *Vernonia polyanthes*. Após adicionar o caldo *Müller Hunton*, o extrato de *Vernonia polyanthes* das cepas bacterianas na placa de poliestireno, seguindo a técnica descrita em “Materiais e Métodos”, adicionouse 20 µL do revelador cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 2,5% em todos os poços para a avaliação do crescimento microbiano por aspectos colorimétricos. Após a análise da placa, os valores foram plotados no programa *GraphPad Prisma 8.0* para a elaboração dos gráficos de dispersão.

Análise comparativa do perfil de inibição das 3 espécies bacterianas em diferentes concentrações do extrato bruto de *Vernonia polyanthes*

Os resultados obtidos para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram positivos, o que demonstrou que as três espécies são inibidas pelo extrato bruto de *Vernonia polyanthes*. Por um lado, *S. aureus* apresentou resistência ao extrato a partir da concentração de 25mg/mL. Na concentração de 0,78 mg/mL, a menor utilizada dentro deste trabalho, ainda existiu efeito inibitório do crescimento bacteriano de *S. aureus* em 50%. Enquanto isso, as cepas de *E. coli* apresentaram resistência ao extrato a partir da concentração de 12,5mg/mL, ocorrendo uma diminuição significativa de sua sensibilidade nas demais diluições. Por fim, *P. aeruginosa* apresentou resistência frente ao extrato apenas a partir da concentração de 6,25mg/mL. Na concentração de 1,56mg/mL e 0,78mg/mL não houve inibição do crescimento em nenhuma das cepas utilizadas de *P. aeruginosa*.

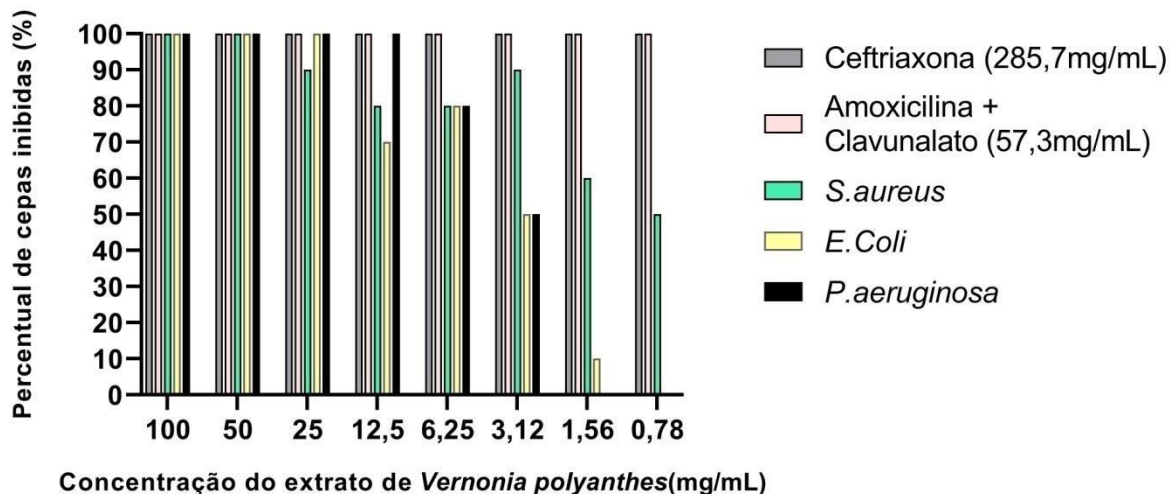


Figura 6. Comparação entre a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato de *Vernonia polyanthes* e dos antibióticos Ceftriaxona e Amoxicilina + Clavulanato frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os antibióticos utilizados foram descritos no gráfico com a concentração de 285,7mg/mL para Ceftriaxona e 57,3mg/mL para Amoxicilina + Clavulanato e, portanto, não seguem as concentrações apresentadas pelo extrato. Após a análise da placa obtida pelo método de microdiluição em placa, os resultados obtidos de ambas as cepas foram comparados e foi utilizado o programa *GraphPad Prisma 8.0* para plotagem dos dados.

Discussão

A descoberta de novos agentes terapêuticos pode ter grande importância, sobretudo em uma época que a ciência está empenhada na pesquisa de tratamentos alternativos para combater o avanço da resistência bacteriana hospitalar com antibióticos comumente usados. Nesse sentido, cientes da limitação técnica dos nossos resultados, mas vislumbrando importantes perspectivas, nossos dados apontam que o extrato das folhas de *Vernonia polyanthes* possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo tanto cepas Gram-positivas (*S. aureus*) quanto Gramnegativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

É interessante notar a inibição bacteriana em altas/médias concentrações do extrato tanto para *E. coli* quanto para *P. aeruginosa*, atingindo 100% das cepas nas concentrações de 25mg/mL para a primeira e 12,5mg/mL para a segunda, em contraste com a resistência frente ao extrato a partir de concentrações menores. O significado desse resultado está em conformidade com outros estudos que sugerem uma alta susceptibilidade dessas bactérias quando confrontada com grandes concentrações, mas que em concentrações menores a eficácia reduz

consideravelmente.³¹ A sensibilidade da *P. aeruginosa* frente ao extrato de *Vernonia* pode apontar uma potencial droga eficaz contra esse microrganismo.

De forma igualmente notável, as cepas de *S. aureus* apresentaram resistência mesmo nas concentrações mais altas, porém mantendo um grau de inibição até a concentração mais baixa. Ou seja, mesmo que a bactéria já apresente cepas resistentes à maiores concentrações, ainda assim o extrato permanece agindo com eficácia contra boa parte da bactéria, podendo assim deduzir que uma futura droga com componentes de *Vernonia* poderia atuar não só como droga principal, mas como uma droga adjuvante a outro antibiótico.

Uma análise comparativa da eficácia do extrato com os antibióticos testados, observase que as duas maiores concentrações (100mg/mL e 50mg/mL) tiveram o mesmo poder inibitório que os antibióticos Amoxicilina + Clavulanato e Ceftriaxona para todas as cepas analisadas, resultando em 100% de inibição. Nas diluições de 25mg/mL e 12,5mg/mL, apenas as cepas de *P. aeruginosa* foram inibidas de maneira semelhante aos antimicrobianos, e nas diluições seguintes nenhuma cepa teve sensibilidade notável. Apontamento interessante se refere ao fato de que as concentrações de antibióticos são muito maiores que do extrato utilizado, sendo que a atividade de ambos foi similar a partir do exposto anteriormente. Assim sendo, os achados da nossa pesquisa podem entrar em consonância com outros estudos que afirmam que extratos de plantas medicinais em baixas concentrações são ativas contra bactérias multirresistentes.^{32,33}

Apesar do presente estudo não ter realizado o exame fitoquímico da planta e demonstrar seus componentes, outros estudos com a planta *Vernonia* foram capazes de atribuir a ação antimicrobiana aos flavonóides e taninos, componentes reconhecidos como agentes antimicrobianos e presentes nos extratos aquosos e alcoólicos^{28,34}. A ação dos flavonoides está provavelmente ligada à capacidade de solubilizar proteínas, entre elas a membrana da bactéria. Com relação aos taninos, sua ação antimicrobiana parece estar relacionada à quebra de moléculas durante a biossíntese da membrana e da parede celular do microorganismo.^{35,36}

Há de se ressaltar que nosso estudo contou com um limitado número de amostras das bactérias em questão, além de ter realizado apenas o estudo com extrato aquoso, deixando de fora outros tipos de extratos, como o alcoólico, que poderia

trazer diferentes resultados à pesquisa. Apesar disso, é importante frisar que as pesquisas na literatura sobre estudos semelhantes foram feitas com metodologia diferente ao do presente estudo, sendo possível que este relato seja o pioneiro mostrando a ação antimicrobiana em diversas concentrações e pode se tornar o ponto de partida para futuras pesquisas desta espécie de planta.

Em suma, os dados abrem perspectivas de que o extrato de *Vernonia* poderia ser uma nova ferramenta, de ação isolada ou em associação com antibióticos, no tratamento de bactérias multirresistentes.

Conclusão

Os resultados gerais indicam que o extrato aquoso das folhas de *Vernonia* apresenta capacidade antimicrobiana de amplo espectro e foram capazes de inibir significativamente as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* nos testes *in vitro*, em consonância com os achados na literatura.

Referências Bibliográficas

1. Lopes CMC, Lazzarini JR, Soares JJM, Baracat EC. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? Rev. Assoc. Med. Bras.2018;64(9):765-768.
2. Jr VFV, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura. Quim. Nova.2005;28(3):519-528.
3. Maciel MAM, Pinto AC, Jr VFV, Echevarria A, Grynberg NF. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. Quim. Nova.2002;25(3):429-438.
4. França ISX, Souza JA, Baptista RS, Brito VRS. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Rev. bras. enferm.2008;61(2):201-208.
5. Ministério da Saúde. Monografia da espécie *Vernonia polyanthes*("Assa-peixe"). Brasília, Ministério da Saúde, 2014[acesso em 15 Jan 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Vernonia-polyanthes.pdf>
6. Rodrigues KC, Chibli LA, Santos BC, Temponi VS, Pinto NCC, Scio E, et al. Evidence of Bioactive Compounds from *Vernonia polyanthes* Leaves with Topical Antinflammatory Potential. Int J Mol Sci.2016;17(12):1929
7. Buitrago EM, Hernández C, Pallares C, Pacheco R, Hurtado K, Recalde M. Frequency and antibiotics resistance profiles of microbiological isolates at 13

- clinics and referral hospitals in Santiago de Cali - Colombia. *Infect.*2014;18(1):3-11.
8. Souza CO, Melo TRB, Melo CSB, Menezes EM, Carvalho AC, Monteiro LCR. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioagênica versátil. *Rev PanAmaz Saude.*2016;7(2):79-91.
 9. Korb A, Nazareno ER, Mendonça FA, Dalsenter PR. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Rev Biol Ciênc Terra.*2013;13(1):72-9.
 10. De Carvalho, F, Neto E, Brito J, Almeida K. Infecção urinária de repetição e os aspectos gerais, microbiológicos e imunológicos associados à saúde da mulher. *Revista de saúde reAGES.*2018;1(3),24-30.
 11. Palou J, Pigrau C, Molina I, Ledesma JM, Angulo J. Etiología y sensibilidad de los uropatógenos identificados en infecciones urinarias bajas no complicadas de la mujer (Estudio ARESC): implicaciones en la terapia empírica. *Medicina Clínica,* 2011;136(1):1-7.
 12. Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EAS. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis.*2005;9(1):70-6.
 13. Koneman E. et al. Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.
 14. Trabulsi LR, Altherthum F. Microbiologia: *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.cap.20, p.175-82.
 15. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. Em: Murray PR. et al, editors. *Man Clin Microbiol.* 8. ed. Washington, DC: ASM Press, 2003.p.384-404.
 16. Carvalho CE, Berezin EN, Pistelli IP, Mímica L, Cardoso MRA. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. *J Pediatr.*2005;81(1):29-33.
 17. Cavalcanti SMM, França ER, Cabral C, Vilela MA, Montenegro F, Menezes D et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz J Infect Dis,*2005;9(1):5663.
 18. Harkins CP, Pichon B, Doumith M, Parkhill J, Westh H, Tomasz A, et al. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.*2017;18(1):130.
 19. Mamisuka E. Projeto de resistência microbiana em serviços de saúde, *Staphylococcus*. ANVISA, 2005.

20. Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. J. Bras. Patol. Med. Lab,2007;43(6):399-406.
21. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. J Virol. 2015;89(15):7449– 7456.
22. Paviani ER, Stadnik CB, Heinek I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. Infarma, 2004;15(11-12):66-70.
23. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 2002;34(5):634-40.
24. Yoneda K. et al. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. 2005
25. Lincopan N, Trabulsi LR. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.369-81
26. Arekemase MO, Kayode RMO, Ajiboye AE. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of *Jatropha Curcas* Plant against Some Selected Microorganisms. Int J Biology; 2011.
27. Hentz SM, Santin MC. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Evidência Interdisciplinar; 2007
28. Waltrich KK, Hoscheid J, Prochnau IS. Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe) flowers. Revista Brasileira de Plantas Medicinai,2015;17(4, Suppl. 2):909-14.
29. Bebear C, Robertson J. Determination of the minimal inhibitory concentration. Tully JG, Razin S. (eds). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma. San Diego: Academic Press.1996;(2):189-97.
30. Bastião DWF. Epidemiologia e fatores de risco associados à colonização por VRE e MRSA em uma unidade de terapia intensiva em adultos [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2010.
31. Kitonde CK, Fidahusein DS, Lukhoba CW, Jumba MM. Antimicrobial activity and phytochemical study of *Vernonia glabra* (Steetz) Oliv. & Hiern. in Kenya. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2012;10(1):149-57.
32. Mariita RM, Ogot CKP, Oguge NO, Okemo PO. Antitubercular and Phytochemical Investigation of Methanol Extracts of Medicinal Plants used by the Samburu Community in Kenya. Trop Journal of Pharm Research. 2010;9(4):379-85.

33. Aiyegoro OA, Okoth AI. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research*,2009;3(13):1147–52.
34. Santana PM, León TO, Martínez MM, Payrol JA, Ruíz O, García ELP. Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.(Asteraceae) endémica de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*,2013;18(1):131-9.
35. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*,1999;12(4):564-82.
36. Suraya S, Darah I. Sem and TEM studies of the structural modifications of *Candida albicans* cells after treatment with extract from *Cuculigo latifolia* Dryand. *Proceedings of The Fourth Regional IMT-GT UNINET Conference*, Penang, Malaysia, 2002. p.203.