

Atividade desinfetante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e compostos flavonóides em *Achyrocline satureioides* Lam. (macela)

Actividad desinfectante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y compuestos flavonoides en *Achyrocline satureioides* Lam. (macela)

Disinfectant activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and flavonoid compounds in *Achyrocline satureioides* Lam. (macela)

Jane Mari Corrêa Both,^I César Augusto Marchionatti Avancini,^{II} Bárbara Spaniol,^{III} Pedro Ros Petrovick^{IV}

^IFundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Brasil.

^{II}Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS. Brasil.

^{III}Faculdade Vale dos Sinos (Feevale). Brasil.

^{IV}Faculdade de Farmácia. UFRGS. Brasil.

RESUMO

Introdução: os *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) estão envolvidos nas infecções nosocomiais, na comunidade, nos animais de companhia e nos animais para produção de alimentos, estando a desinfecção e a antissepsia entre os procedimentos adotados como medidas de controle. O fenômeno de resistência bem como a necessidade de insumos de higiene para uso em sistemas de criação animal baseados no modelo agroecológico motivaram o desenvolvimento do trabalho com *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.- *Asteraceae* (macela).

Objetivos: testar atividade anti-MRSA de extrações da planta, e quantificar a presença de flavonóides.

Método: os extratos decoto e hidroetanólico foram elaborados na proporção 5 g dos capítulos florais secos para 100 mL de solvente (concentração 50 mg/mL). A ação antibacteriana foi determinada pelo teste europeu de suspensão quantitativa para avaliar a atividade de desinfetantes e antissépticos, frente o padrão *Staphylococcus*

aureus ATCC 6538 e 51 isolados MRSA, nas densidades populacionais iniciais de 10^6 , 10^5 e 10^4 UFC/mL. Para quantificação de flavonóides foi usada cromatografia a líquido de alta eficiência.

Resultados: frente a cepa padrão e aos 51 isolados, o decocto demonstrou maior atividade bactericida a partir das 8 h, inativando todos até às 24 h. Frente amostra de 21 isolados, na densidade populacional 10^6 UFC/mL o extrato hidroetanólico em quatro horas de contato já havia inativado 85,7 % deles, tendo o restante sofrido redução populacional. Na densidade 10^4 UFC/mL 71 % estavam inativados com uma hora de contato, e todos às 4 h. No decocto foram quantificadas, na média das concentrações em mg/100 mL, os metabólitos quercetina (66,96), luteolina (22,65) e 3-O-metilquercetina (81,42).

Conclusão: as evidências observadas sugerem o potencial das soluções, principalmente o extrato hidroetanólico, para uso de modo direto sobre as fontes de infecção em procedimentos de desinfecção, de descontaminação ou de antissepsia, ou ainda em formulações que lhe sirvam de veículo.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*; desinfetantes; *Staphylococcus aureus*; metilicina resistente.

RESUMEN

Introducción: *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) están involucrados en las infecciones nosocomiales, en la comunidad, en los animales de compañía y en los animales para la producción de alimentos, estando la desinfección y antisepsia entre las medidas para su control. El fenómeno de la resistencia y la necesidad de insumos de higiene para la ganadería agroecológica han motivado el trabajo con *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae ("Macela").

Objetivo: evaluar la actividad anti-MRSA de extractos de la planta y cuantificar la presencia de flavonoides.

Métodos: por el método de suspensión de evaluación cuantitativa de la acción bactericida de desinfectantes y antisépticos químicos, la decocción y el extracto hidroetanólico, en la proporción 5 g de los capítulos florales secos en 100 mL de solvente, fueron confrontados con el patrón *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 51 MRSA en las densidades poblacionales iniciales de 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/mL. Para la cuantificación de flavonoides se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia.

Resultados: frente a la cepa estándar y a los 51 aislados, la decocción demostró mayor actividad a partir de las 8 h, inactivando todos hasta 24 h. Frente a la muestra de 21 aislados, a la densidad poblacional 10^6 UFC/mL en cuatro horas de contacto el extracto hidroetanólico inactivó el 85,7 % de ellos. A la densidad 10^4 UFC/mL 71 % fueron inactivados en una hora de contacto, y todos hasta las 4 h. En la decocción se cuantificaron (concentraciones promedio en mg/100 mL) los metabolitos quercetina (66,96), luteolina (22,65) y 3-O-metilquercetina (81,42).

Conclusión: las evidencias observadas sugieren el potencial de las soluciones, principalmente el extracto hidroetanólico para el uso de modo directo sobre las fuentes de infección en procedimientos de desinfección, de descontaminación o de antisepsia, o también en formulaciones que le sirvan de vehículo.

Palabras clave: *Achyrocline satureioides*; desinfectantes; *Staphylococcus aureus*; metilicina resistente.

ABSTRACT

Introduction: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is present in nosocomial infections, in the community, in pets and in farm animals. Disinfection and antisepsis are among its control measures. The phenomenon of resistance and the need of hygiene products for agroecological cattle raising have aroused our interest in the species *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (macela).

Objective: Evaluate the anti-MRSA activity of extracts from the plant and quantify the content of flavonoids.

Methods: The methods used were quantitative suspension for evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics, decoction and hydroethanolic extract in a proportion of 5 g of dry floral capitula in 100 ml solvent, and confrontation with the pattern *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and 51 MRSA in initial population densities of 10⁶, 10⁵ and 10⁴ UFC/ml. Quantification of flavonoids was based on high performance liquid chromatography.

Results: The decoction displayed greater activity against the standard strain and the 51 isolates as of 8 h, inactivating all by 24 h. Against the sample of 21 isolates, at a population density of 10⁶ UFC/ml in four hours of contact, the hydroethanolic extract inactivated 85.7% of them. At a density of 10⁴ UFC/ml, 71% were inactivated in one hour of contact, and all by 4 h. The metabolites quercetin (66.96), luteolin (22.65) and 3-O-methylquercetin (81.42) were quantified in the decoction (average concentrations in mg / 100 ml).

Conclusion: The evidence observed points to the potential of the solutions, mainly the hydroethanolic extract, for direct use against infection sources in disinfection, decontamination or antisepsis procedures, as well as in formulations serving as vehicles.

Key words: *Achyrocline satureioides*, disinfectants, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é bactéria espécie não específica,¹ que evoluiu em mecanismos de resistência a antimicrobianos.^{2,3} O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) apresenta resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos⁴ e a sua transmissão, antes observada em hospitais, agora pode ser detectada na comunidade (CA-MRSA),⁵ animais de companhia e para produção de alimentos (LA-MRSA),⁶ podendo contribuir na contaminação de cadeias alimentares e no ciclo das enfermidades transmissíveis comuns entre humanos e animais.⁷

A gestão sanitária das doenças infecto-transmissíveis necessita procedimentos adotados sobre os agentes morbígenos tanto no corpo do paciente (seja humano ou animal) o que é feito, por exemplo, através da antibioticoterapia ou mesmo por antissepsia, quanto no ambiente, quando eles estão em vida livre, por procedimentos como a desinfecção e a descontaminação. Limitações no uso dos antimicrobianos convencionais podem ocorrer devido à resistência, seja intrínseca ou adquirida,^{8,9} dos micro-organismos, o que motiva a busca de novos compostos antimicrobianos. Ou mesmo devido sistemas tecnológicos de criação animal referenciados nos modelos agroecológico e orgânico que demandam insumos/recursos sanitários veterinários

considerados sustentáveis,¹⁰ renováveis, para que sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais.¹¹ A utilização de extratos vegetais brutos facilitariam o acesso de higienistas-sanitaristas à esses recursos.

Com esse sentido o estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais vem se desenvolvendo como no trabalho que selecionou vinte e uma plantas nativas do sul do Brasil com indicativo etnográfico medicinal, com ênfase à etnomedicina veterinária, etnosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele.¹² A triagem para verificação da atividade bioativa antimicrobiana das soluções obtidas por decocção e maceração hidroalcolica incluiu a *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae), tendo sido demonstrada a ação sobre *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis* padrões.

Os objetivos deste estudo foram testar a atividade anti-MRSA de extrações de *A. satureioides*, e quantificar a presença de flavonóides.

MÉTODOS

Material vegetal

A *A. satureioides* (Asteraceae) foi adquirida seca (em temperatura ambiente) de um único fornecedor/agricultor, colhida em abril de 2013, obtida por cultivo em sistema de permacultura na área rural da cidade de Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil. As partes utilizadas do vegetal foram os capítulos florais. A amostra foi identificada e depositada no acervo do Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS/BR, sob o registro ICN n° 164964.

Quantificação de flavonóides

A análise de flavonóides do decocto de *A. satureioides*, foi realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). A escolha pela determinação quantitativa de compostos flavonóides deveu-se ao fato de serem esses compostos majoritariamente presentes na droga vegetal.¹³

A quercetina e a luteolina foram empregadas como padrões externos. A curva padrão de luteolina foi utilizada para quantificação da luteolina e da 3-*O*-metilquercetina, dada à semelhança estrutural e de absorvância no comprimento de onda empregado.¹⁴ Os resultados foram expressos pela média da concentração em mg/100 mL, e informado o desvio padrão relativo (dpr).

Cepas

Foram utilizadas o padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e 51 isolados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os isolados foram obtidos pelo programa de vigilância para detectar MRSA em fossas nasais de adultos internados em unidade de tratamento intensivo em hospital geral da cidade e Porto Alegre/RS/BR. Estavam mantidos congelados (-20 °C), e a reativação feita por esgotamento em placas de Ágar Baird-Parker (OXOID®).

A densidade populacional inicial dos inóculos foi padronizada utilizando-se um controle de turbidez equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5 (equivalente a uma suspensão contendo de 10^7 a 10^8 UFC/mL).

O decocto foi confrontado com todos isolados. Quanto ao extrato hidroetanólico, após testes pilotos de verificação da atividade bactericida sobre MRSA com esse extrato, usando critério estatístico de seleção de amostra com fator de precisão de 0,1 e nível de confiança de 95% selecionou-se amostra significativa de 21 isolados para representar a população na confrontação.

Extrações

Usou-se a proporção (p: v) de 5 g dos capítulos florais para 100 mL de solvente (concentração de 50 mg/mL).

A decocção procedeu-se em frasco Erlenmeyer, com capacidade para 1 L, em fogo brando, durante 15 min, contados a partir do início da ebulição, estando a boca do frasco semifechada com uma placa de Petri. Após a cocção a solução foi filtrada em filtro de papel, e o volume inicial recomposto com água destilada estéril. O decocto foi preparado imediatamente antes do uso nos testes.

O extrato hidroetanólico hidratado foi obtido de maceração de 15 dias dos capítulos florais em álcool etílico 70 °GL. Após filtração a solução foi submetida à evaporação sob pressão reduzida, temperatura de 60 °C, em evaporador rotativo, após o que recompôs-se o volume inicial com água destilada estéril.

O controle de esterilidade das extrações vegetais foi feito junto à linha de testes de avaliação bactericida.

O teste

Para avaliar a atividade bactericida foi utilizado o Teste de Suspensão Quantitativo para Avaliar Atividade Bactericida de Desinfetantes e Antissépticos Químicos (fase 1), conforme o protocolo do Comitê Europeu de Padronização (CEN) BS EN 1040:2005¹⁵.

Nos testes foram confrontadas três diluições logarítmicas/densidades populacionais iniciais: 10^6 , 10^5 e 10^4 UFC/mL.

Os microrganismos foram submetidos ao decocto nos tempos de contato de uma, oito e 24 h e ao extrato hidroetanólico nos tempos de cinco e 30 min, uma, duas, três e quatro horas. Esses tempos foram definidos após testes pilotos para verificar período de contato necessário para a ação bactericida.

Após os tempos de contato, utilizando micropipeta, uma alíquota de 1 mL foi retirada e adicionada em tubos de ensaio contendo 9 mL do meio de cultura caldo Brain Heart Infusion (BHI- OXOID®) com agentes neutralizadores [3 % de polissorbato 80 (Synth®), 0,3 % de lecitina de soja (DELAWARE®) e 0,1 % de histidina (Synth®)], ficando em contato por cinco minutos. Deste tubo retirou-se uma alíquota de 0,1 mL que foi inoculada por espalhamento em superfície em placas com ágar Baird-Parker, incubadas a 35 °C por 48 h. Verificou-se se houve crescimento de colônias e, se positivo, contadas as colônias típicas, avaliando se houve inativação ou redução da densidade populacional inicial do inóculo.

O mesmo teste foi realizado com o composto químico desinfetante e antisséptico iodóforo, nas concentrações de 100 ppm (0,01 %), 50 ppm, 25 ppm e 12,5 ppm frente a amostra selecionada de 21 isolados *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes.

Análise estatística

As frequências relativas a redução logarítmica e inativação dos isolados foram realizadas por estatística descritiva. Já a comparação entre a atividade do decocto e a do extrato hidroetanólico foi realizada tendo como referência o tempo de ação 1 h, pelo teste não paramétrico de qui-quadrado no nível de significância de 5 %.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS para Windows, versão 18.0.

RESULTADOS

A análise de flavonóides do extrato aquoso de *A. saturoioides* detectou os flavonóides quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina, conforme demonstrado na [tabela 1](#).

Tabela 1. Concentração dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina presentes na solução extrativa aquosa de *A. saturoioides*

Metabólito secundário	Concentração (mg/100 mL) Média ± S (dpr %)
Quercetina	66,96 ± 7,92 (11,82)
Luteolina	22,65 ± 3,28 (14,52)
Metilquercitina	81,42 ± 14,17 (17,40)

No resultado do confronto com a cepa *S. aureus* ATCC 6538 observou-se que na primeira hora de contato o decocto provocou redução logarítmica das três densidades iniciais do inóculo, sendo que na leitura das 8 h a densidade populacional de 10⁴ UFC/mL já estava inativada e o mesmo tendo ocorrido nas 24 h com as outras duas densidades populacionais. O extrato hidroetanólico hidratado inativou essa cepa em todas as densidades populacionais até as três horas de contato, observando-se reduções logarítmicas progressivas nos tempos 30 min, uma e duas horas.

Na [tabela 2](#) estão apresentados os resultados da atividade do decocto sobre os 51 isolados MRSA. Observa-se que na leitura das 24 h, nas três densidades iniciais dos inóculos, 100 % deles estavam inativados. Pode-se observar que quanto menor a densidade inicial de confronto, maior número de isolados inativados por tempo de contato. Por exemplo, nas oito horas de contato, na densidade 10⁶ UFC/mL a ação de inativação pelo decocto foi observada sobre três (5,90 %) isolados, ao passo que na 10⁵ UFC/mL 21 (41,13 %) e na de 10⁴ UFC/mL 34 (66,60 %) dos inóculos estavam inativados.

Tabela 2. Atividade sobre *Staphylococcus aureus* padrão e número e percentual de isolados (N= 51) *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina que sofreram redução logarítmica ou foram inativados, em diferentes densidades populacionais iniciais e diferentes tempos de contato, quando confrontados com o extrato aquoso (decocto) de *A. saturoioides*, na proporção de 5 g: 100 mL

Cepas		1 h		8 h		24 h	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	DI 10 ⁶ UFC/mL	sem redução		redução de 2 log		inativado	
		Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)
Isolados MRSA	sem redução	42	82,40	3	5,90	0	0,00
	1	7	13,70	17	33,30	0	0,00
	2	2	3,90	16	31,40	0	0,00
	3	0	0,00	9	17,60	0	0,00
	4	0	0,00	3	5,90	0	0,00
	5	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	inativado	0	0,00	3	5,90	48	94,1
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	DI 10 ⁵ UFC/mL	1 h		8 h		24 h	
		sem redução		redução de 3 log		inativado	
		Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)
Isolados MRSA	sem redução	33	64,70	2	3,90	0	0,00
	1	16	31,40	5	9,80	0	0,00
	2	1	1,90	8	15,60	0	0,00
	3	0	0,00	14	27,40	0	0,00
	4	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	inativado	1	1,90	21	41,10	29	56,8
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	DI 10 ⁴ UFC/mL	1 h		8 h		24 h	
		redução de 3 log		inativado		inativado	
		Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)
Isolados MRSA	sem redução	31	60,80	2	3,92	0	0,00
	1	17	33,30	4	7,80	0	0,00
	2	1	1,90	9	17,64	0	0,00
	3	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	inativado	2	3,92	34	66,60	15	29,4

DI= Densidade populacional bacteriana inicial; Fa= Frequência absoluta; Fr= Frequência relativa.

A atividade bactericida do extrato hidroetanólico sobre os 21 isolados MRSA está apresentada na [tabela 3](#). Nas quatro horas de contato, na densidade populacional 10⁶ UFC/mL a ação de inativação desse extrato foi observada sobre 4 (19,04 %), na 10⁵ UFC/mL 1 (4,80 %) e na de 10⁴ UFC/mL todos os isolados estavam inativados.

Observou-se que houve diferença de sensibilidade entre os isolados quanto às variáveis densidade populacional e tempo de contato necessário para que fossem inativados pelos extratos aquoso e hidroetanólico. Por exemplo, frente ao decocto na densidade populacional 10⁵ UFC/mL, 21 isolados foram inativados no tempo de contato de 8 h, ao passo que os 30 restantes apenas na leitura das 24 h. Frente ao extrato hidroetanólico, na mesma densidade populacional citada, no tempo de 1 h 8 foram inativados, e outros 8 precisaram de duas horas de contato para a inativação.

Tabela 3. Atividade sobre *Staphylococcus aureus* padrão e número e percentual de isolados (n= 21) *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina que sofreram redução logarítmica ou foram inativados, em diferentes densidades populacionais iniciais e diferentes tempos de contato, quando confrontados com o extrato hidroetanólico hidratado (EH) de *A. saturoioides*, na proporção de 5 g: 100 mL

Cepas	DI 10 ⁶ UFC/mL	5 min		30 min		1 h		2 h		3 h		4 h	
		redução de 3 log		redução de 3 log		redução de 3 log		redução de 4 log		inativado		inativado	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538		Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)
	sem redução	14	66,70	5	23,80	4	19,00	1	4,80	1	4,80	0	0,00
Isolados MRSA	1	6	28,60	1	4,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	2	1	4,80	4	19,00	1	4,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	3	0	0,00	9	42,80	2	9,50	4	19,00	2	9,50	1	4,80
	4	0	0,00	2	9,50	3	14,30	3	14,30	1	4,80	2	9,50
	5	0	0,00	0	0,00	7	33,30	1	4,80	3	14,30	0	0,00
	inativado	0	0,00	0	0,00	4	19,00	8	38,10	2	9,50	4	19,04
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	DI 10 ⁵ UFC/mL	5 min		30 min		1 h		2 h		3 h		4 h	
		redução de 3 log		redução de 4 log		Redução de 4 log		inativado		inativado		inativado	
		Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)
	sem redução	9	42,80	2	9,50	1	4,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Isolados MRSA	1	11	52,40	2	9,50	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	2	1	4,80	7	33,30	2	9,50	1	4,80	0	0,00	0	0,00
	3	0	0,00	8	38,10	4	19,00	1	4,80	2	9,50	1	4,80
	4	0	0,00	1	4,80	5	3,80	2	9,50	0	0,00	0	0,00
	inativado	0	0,00	1	4,80	8	38,10	8	38,10	2	9,50	1	4,80
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	DI 10 ⁴ UFC/mL	5 min		30 min		1 h		2 h		3 h		4 h
		redução de 3 log		redução de 3 log		inativado		inativado		inativado		inativado	
		Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)	Fa	Fr (%)
	sem redução	1	4,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Isolados MRSA	1	17	80,90	5	23,80	1	4,80	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	2	3	14,30	4	19,00	3	14,30	1	4,80	0	0,00	0	0,00
	3	0	0,00	9	12,80	2	9,50	1	4,80	1	4,80	0	0,00
	inativado	0	0,00	3	14,30	12	57,10	4	19,00	1	4,80	1	4,80

DI= Densidade populacional bacteriana inicial; Fa= Frequência absoluta; Fr= Frequência relativa.

Fenômeno semelhante ocorreu na comparação da atividade dos extratos aquoso e hidroetanólico sobre a cepa padrão e os isolados MRSA, quando observou-se que não houve em grande parte das vezes coincidência de tempo de inativação entre a cepa estandar e os isolados. Exemplificando na mesma densidade populacional acima informada, de 10⁵ UFC/mL, nas 8 h de contato com o decocto enquanto o *S. aureus* padrão apenas havia sofrido a redução de 3 logaritmos, 28 MRSA foram inativados. E frente ao extrato hidroetanólico, em 1 h de contato o *S. aureus* padrão sofreu a redução de 4 logaritmos mas oito isolados foram inativados.

O composto desinfetante iodóforo, em todas as concentrações, inativou todos os isolados já nos primeiros cinco minutos de contato.

A análise estatística aplicada com o teste qui-quadrado, comparando a ação dos extratos no tempo de contato de uma hora, resultou significativo ($p < 0,05$), ou seja, as frequências observadas diferem das esperadas, o que indica que o extrato hidroetanólico foi mais eficaz do que o decocto para inativar, em todas as densidades populacionais, os isolados MRSA nesse tempo de contato.

DISCUSSÃO

A quantificação de flavonóides na extração aquosa foi importante para conferir a identidade e qualidade da amostra vegetal, já tendo sido estes flavonóides identificados como componentes majoritários das sumidades floridas, aos quais se atribui grande parte das atividades farmacológicas,¹⁶⁻¹⁹ entre elas a antimicrobiana. No entanto, julga-se necessário outras investigações fitoquímicas que auxiliem a compreensão da diferença na intensidade da atividade bactericida entre o decocto e o extrato hidroetanólico, sendo investigações sobre outros compostos²⁰ uma boa pista.

Para obter resultados confiáveis sobre a ação bactericida dos produtos testados, foi utilizado o caldo BHI com neutralizador. Este procedimento teve a finalidade de evitar observações falsas negativas, expressas pela possível ação somente bacteriostática, confundindo com a ação bactericida da extração vegetal. Os neutralizantes têm a função de inativar resíduos da substância antimicrobiana, após a exposição do inóculo. Como não são padronizados neutralizadores específicos para soluções da *A. satureioides* foram mantidos os indicados no protocolo do teste, que correspondem aos mesmos utilizados com bons resultados em outros estudos^{21,22} com extrações dessa planta.

O delineamento do protocolo do teste foi alterado confrontando as soluções vegetais com três densidades populacionais dos inóculos, ao invés de uma única densidade. Como em trabalho anterior²¹ já havia sido determinado em qual a proporção planta: volume das inflorescências de *A. satureioides* promove atividade antibacteriana, resolveu-se variar a densidade populacional de confronto. Confirmada a hipótese de que quanto menor o número de indivíduos presentes no meio de cultura também menor seria o tempo de contato necessário para inativá-los, a variação permitiu simular diferentes cenários de contaminação microbiana no ambiente.

A atividade antibacteriana do decocto e do extrato hidroetanólico da planta frente *S. aureus* padrões ATCC, mesmo que verificada utilizando outros métodos e técnicas, também foi relatado por outros autores.²³⁻²⁷ Relatos da atividade sobre cepas isoladas de situações-problema em doença humana e animal, alguns frente *S. aureus* resistentes à antibióticos, também pôde ser encontrado,^{21,28,29} o que reforça a confiança nos resultados aqui obtidos.

Observou-se que o modo de extração dos princípios ativos influenciaram na intensidade da atividade anti-*S. aureus*, tendo o extrato hidroetanólico promovido marcadamente atividade em menores tempos de contato. Evidências semelhantes, tendo como indicador o *S. aureus* padrão, foram também descritas em outros estudos.^{12,22,27-30} A explicação para isso pode estar no fato de que o solvente etanol promove, devido sua polaridade, bom rendimento na extração de compostos químicos, quanto no fato de que na decocção substâncias ativas podem ser alteradas devido ao aquecimento.^{18,31,32}

O protocolo que descreve a técnica (BS EN 1040:2005) usada nesta investigação determina que para ser demonstrada a eficácia do produto com ação antimicrobiana desinfetante e antisséptica, é necessária a redução da densidade populacional do inóculo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em, no mínimo, cinco unidades logarítmicas após tempo de contato com o desinfetante. Diante da constatação de que as duas soluções cumpriram esse requisito, tendo inativado os inóculos confrontados pode-se, então, considerá-los como desinfetantes adequados para controle dos MRSA, levando-se em conta o tempo de contato para sua inativação.

As evidências observadas sugerem o potencial das soluções, principalmente do extrato hidroetanólico bruto, para uso de modo direto sobre as fontes de infecção no ambiente inanimado em procedimentos de desinfecção, de descontaminação ou sobre tecidos vivos em antissepsia, ou ainda em formulações que lhe sirvam de veículo.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Cícero Dias-Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre/RS (UFCSPA), pela cedência dos isolados.

REFERÊNCIAS

1. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2001.
2. Cabrera CE, Gómez RF, Zuñiga AE. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica. 2007;38(2):149-58.
3. Tavares W. Bactérias multirresistentes: problema mundial. Revista Panamericana de Infectología. 2005;7(4):7-9.
4. Souza LBG, Figueiredo BB. Prevalência de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (M.R.S.A), no Hospital Universitário Regional de Maringá. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2008;40(1):31-4.
5. Souza MV, Reis C, Pimenta FC. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. Revista de Patologia Tropical. 2005;34(1):27-36.
6. Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz M, *et al.* Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009;64(6):1156-64.
7. Hunter PA, Dawson S, French GL, Goossens H, Hawkey PM, Kuijper EJ, *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010;65(Suppl 1):i3-i17.
8. Huet AA, Raygada JL, Mendiratta K, Seo SM, Kaatz GW. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. Microbiology. 2008;154(10):3144-53.
9. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides: antibiotic resistance effects of biocides. Brussels: European Commission. 2009. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf. Acessado em 10/2015.
10. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, de 6 de outubro de 2011. Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organico_s/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_046_de_06-10-2011_regulada_pela_IN_17.pdf. Acessado em 03/2016.
11. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2002. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf. Acessado em 06/2015
12. Avancini CAM, Wiest JM. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2008;10(1):21-8.

13. Oliveira AL, Padilha CD, Ortega GG, Petrovick PR. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (macela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. Caderno de Farmácia, v. 2001;17(1):33-8.
14. Bidone J, Bica VC, Petrovick PR, Simões CMO, Koester LS, Bassani VL, *et al.* Simultaneous quantification of flavonoids from *Achyrocline satureioides* by a polar-reversed phase LC method-application to skin permeation/retention studies. Pharmazie. 2014;69:5-9.
15. British Standards Institution. European Standard EN 1040:2005. Chemical disinfectants and antiseptics - quantitative - suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics: test method and requirements (phase 1). London: British Standards Institution. 2006.
16. Farmacopéia Brasileira. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1997.
17. Grassi-Zampieron RF, Vieira MC, Siqueira JM. Atividade antioxidante e captora de radicais livres dos extratos de *Achyrocline alata* (Kunth.) DC em comparação com extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009;19(2b):572-76.
18. Oliveira AL, Padilha CD, Ortega GG, Petrovick PR. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. Caderno de Farmácia. 2001;17(1):33-8.
19. Ferraro G, Anesini C, Ouviaña A, Retta D, Filip R, Gattuso M, *et al.* Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. Latin American Journal of Pharmacy. 2008;27(4):626-8.
20. Joray MB, Rollán MDR, Ruiz GM, Palacios SM, Carpinella MC. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina: isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. Planta Medica. 2011;77(1):95-100.
21. Sperotto VR, Murari AL, Silva DAR da, Possenti CGR, Wiest JM, Avancini CAM. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.)-Asteraceae ("macela") sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. Acta Scientiae Veterinariae. 2012;40(3):1-7.
22. Mota FM, Carvalho HHC, Wiest JM. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.-Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2011;13(3):298-04.
23. Fernandez VNV, Silva RKP, Ximenes RSF, Avancini CAM. Atividade desinfetante e antisséptica de extrações de plantas nativas no sul do Brasil, frente bactérias de interesse na área da Medicina Veterinária: I - resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. Asteraceae (macela). In: Resumos do XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 2003 (Porto Alegre, Brasil). Acesso em: 20 março 2016. p. 222. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/39910>
24. Gravino I, Corino R de, Fisch E, Avancini CAM. Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal (decocto) frente microorganismos padronizado de interesse em medicina veterinária: III- resultados preliminar do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C- Asteraceae ("macela"). In: Resumos do XVII

Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 2005 (Porto Alegre, Brasil). p. 179. Acesso em 24 março 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/39038>

25. Oliveira EA, Both JMC, Avancini CAM. Atividade antimicrobiana "in vitro" do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) frente à cepa de referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923) de interesse em medicina veterinária. In: Resumo do XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 2012 (Porto Alegre, Brasil). p. 1. Acesso em 24 março 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/64600>.

26. Anesini C, Perez C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 1993;39(2):119-28.

27. Schuch LFD, Wiest JM, Garcia EN, Prestes LS, Schramm R da C, Coimbra H *et al.* Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2008;36(3):267-71.

28. Calvo D, Cariddi LN, Demo MS, Maldonado AM. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp and immunomodulating effects on human lymphocytes. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 2006;48(3-4):247-55.

29. Lemos GCS, Oliveira LO, Bianca B, Motta OV, Folly M. Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC) and jaborandi-falso (*Piper aduncun* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2000;3(1):67-72.

30. Wiest JM, Carvalho HH, Avancini CAM, Gonçalves AR. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2009;11(2):209-215.

31. Reginatto FH, Introdução à análise fitoquímica. In: Simões CMO, Schenkel EP, Mentz LA, Petrovick PR, (Org). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2016.

32. Simões CMO, Rech N, Lapa AJ. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc., Compositae (marcela). *Caderno de Farmácia*. 1986;2(1):37-54.

Recibido: 13 de mayo de 2016.

Aprobado: 21 de noviembre de 2016.

César Augusto Marchionatti Avancini. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Correo electrónico: cesar.avancini@ufrgs.br