

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DESINFETANTES CONVENCIONAIS E DE
EXTRAÇÕES DE *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (“macela”) SOBRE
Staphylococcus aureus METICILINA RESISTENTES (MRSA)**

Jane Mari Corrêa Both

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DESINFETANTES CONVENCIONAIS E DE
EXTRAÇÕES DE *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (“macela”) SOBRE
Staphylococcus aureus METICILINA RESISTENTES (MRSA)**

Jane Mari Corrêa Both

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na especialidade de
Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto
Marchionatti Avancini

PORTO ALEGRE

2013

B749a Both, Jane Mari Corrêa

Atividade antibacteriana de desinfetantes convencionais e de extrações de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (“macela”) sobre *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA). / Jane Mari Corrêa Both. – Porto Alegre: UFRGS, 2013.

101 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2013. César Augusto Marchionatti Avancini, Orient.

1. Antissépticos: uso terapêutico 2. Desinfetantes 3. *Staphylococcus aureus* metilina resistente I. Avancini, César Augusto Marchionatti II. Título

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Jane Mari Corrêa Both

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DESINFETANTES CONVENCIONAIS E DE
EXTRAÇÕES DE *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (“macela”) SOBRE
Staphylococcus aureus METICILINA RESISTENTES (MRSA)

Aprovada em 29 de maio de 2013.

Aprovado por:

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch
Membro da Comissão

Prof. Dra. Mercedes Passos Geimba
Membro da Comissão

Prof. Dr. José Maria Wiest
Membro da Comissão

Aos meus filhos Eduardo e Daniel.

*Nossas vidas começam a terminar no dia em
que permanecemos em silêncio sobre as coisas
que importam.*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. César Avancini, pela confiança e orientação acadêmica.

À amiga Luci Lilge, como um anjo...

Às colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água do IPB-LACEN, pela paciência e solidariedade.

Aos colegas do Laboratório de Saneantes do IPB-LACEN, Judite e Sílvia, sempre disponíveis.

Aos colegas do PREMEC do IPB- LACEN, pelo apoio logístico.

À Direção do IPB-LACEN/RS.

À Débora Pellegrini pela imensa ajuda com os números.

À “turminha” do Laboratório de Medicina Preventiva pela alegria e acolhimento.

Aos “meus irmãozinhos” de Projeto de Pesquisa, Mônica e Felipe, pela amizade.

Pelo carinho e confiança da Ellusa.

À minha “grande família”, a da qual eu nasci e aquela que eu escolhi, meus amigos.

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é bactéria espécie não específica que, além de potencial patogenicidade, evoluiu em mecanismos de resistência a antimicrobianos. O *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) antes restrito a infecções nosocomiais, dispersou-se na comunidade e nos animais de companhia e para produção de alimento. Na conduta para o controle da transmissão, além do uso de antibióticos, a ação sobre os agentes causais nas fontes de contaminação exige atenção, sendo decisiva e crítica a escolha de desinfetantes e anti-sépticos. A busca por recursos frente a agentes patogênicos resistentes a antimicrobianos convencionais e a demanda por insumos sanitários aplicáveis em modelos sustentáveis de produção agropecuária, motivam a investigação de extrações vegetais que apresentem atividade antibacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade bactericida de desinfetantes convencionais sobre isolados MRSA, testar a hipótese da possibilidade de resistência cruzada entre grupos químicos antibióticos (beta-lactâmicos) e desinfetantes e também avaliar a atividade bactericida de extrações das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (“macela”), planta medicinal, de uso popular e tradicional, nativa na região sul do Brasil, sobre os mesmos inóculos. A técnica de referência foi o “Teste de Suspensão na Avaliação Quantitativa da Atividade Bactericida de Desinfetantes e Antissépticos Químicos”. Nos testes com os desinfetantes hipoclorito de sódio (HS), iodofór (I) e quaternário de amônio (QAC - cloreto de cetil trimetilamônio), quatro concentrações de cada grupo químico foram confrontadas com 21 MRSA, em tempos de contato de cinco, 15 e 30 minutos e densidade populacional inicial dos inóculos de 10^7 UFC/mL. Observou-se que os grupos químicos nas menores concentrações HS 25 ppm, I 12,5 ppm e QAC 125 ppm, apresentaram atividade bactericida frente a todos os isolados no menor tempo de contato. A proporção usada da *A. satureioides* foi de 5 g:100 mL de solvente e as densidades iniciais dos inóculos confrontados foram 10^7 , 10^6 e 10^5 UFC/mL. A atividade da forma decocto foi verificada frente a 51 isolados MRSA, em tempos de contato de uma, oito e 24 h. Vinte e um deles também foram submetidos ao extrato hidroetanólico hidratado (EH), obtido de maceração hidroetanólica 70° GL, desalcooalizada e hidratada ao volume inicial, nos tempos de contato de cinco e 30 minutos e de uma até quatro horas. Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi confirmada, no acesso da planta, a presença dos marcadores fitoquímicos quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. As extrações da *A. satureioides* apresentaram atividade antibacteriana frente a todos os isolados MRSA. O EH mostrou atividade de inativação em menor tempo. Tomando como exemplo a 1 h de contato, na maior densidade do inóculo, 19% dos isolados estavam

inativados, enquanto que no decocto não foi observada inativação. Em 4 horas de contato com o EH 85,7% dos isolados, na maior densidade desafio, estavam inativados e 100% dos isolados sofreram redução da densidade populacional. O decocto demonstrou maior atividade bactericida entre 8h e 24 horas, inativando 100% dos isolados até as 24 h. Concluiu-se que, controlados os conhecidos fatores limitantes da atividade bactericida, o hipoclorito de sódio o iodofor e o quaternário de amônio são adequados para controlar os MRSA nas fontes de contaminação em ambientes de saúde humana ou nos de saúde e de produção animal. Para os isolados resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos confrontados não foi observada relação de resistência com os desinfetantes. A atividade bactericida das soluções de *Achyrocline satureioides* frente aos isolados MRSA e ao microrganismo de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 sugere seu potencial uso, diretamente nas formas avaliadas ou em formulações, em procedimentos de higiene, tanto nas fontes de infecção de ambientes de saúde humana quanto nos de saúde e de produção animal.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, anti-séptico, bactericida, resistência cruzada, desinfetante, MRSA, *Staphylococcus aureus* metilicina resistente.

ABSTRACT

The bacterium Staphylococcus aureus is a species not specific and potential pathogenicity, which has evolved mechanisms for antimicrobial resistance. S. aureus methicillin resistant (MRSA) once restricted to nosocomial infections, dispersed in the community and in companion animals and production. In order to control the transmission, besides the use of antibiotics, the action on the causative agents in the sources of contamination requires attention, being decisive and critical the choice of disinfectants and antiseptics. The search for resources against pathogens resistant to conventional antibiotics and the demand for health inputs applicable in sustainable agriculture production motivated the investigation of plant extractions that have antibacterial activity. The aim of this study was to evaluate the bactericidal activity of conventional disinfectants on MRSA isolates, testing the hypothesis of the possibility of cross-resistance between chemical groups antibiotics (beta-lactams) and disinfectants and also assess the bactericidal activity of extractions of inflorescences Achyrocline satureioides (Lam.) Dc. (Asteraceae) ("macela"), a medicinal plant with a popular and traditional use, native from southern Brazil on the same isolates. The reference technique was the "Suspension Test in Quantitative Evaluation of Bactericidal Activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics." In tests with disinfectant sodium hypochlorite (HS), iodophor (I) and quaternary ammonium (QAC-cetyl trimethylammonium chloride), four concentrations of each chemical group were confronted with 21 MRSA on contact time of five, 15 and 30 minutes. The population density of the initial inoculum was 10^7 UFC/mL. It was observed that the chemical groups at lower concentrations HS 25 ppm, and 12.5 ppm I 125 ppm QAC showed bactericidal activity against all isolates in less contact time. The proportion used of A. satureioides was 5 g: 100 mL of solvent and the initial densities of the inocula confronted were 10^7 , 10^6 and 10^5 CFU / mL. The activity of decoction form was checked against 51 MRSA isolates, in times of a contact, eight and 24 h. Twenty-one of them also underwent hydroethanolic extract hydrate (EH) obtained by maceration hydroethanol 70 ° GL, de-alcoholised hydrated and the initial volume, the contact time of five and 30 minutes and one to four hours. By High performance liquid chromatography (HPLC) was confirmed in the access plan, the presence of markers phytochemicals quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin. The extractions of A. satureioides showed antibacterial activity against all MRSA isolates. The EH showed activity inactivation in less time. Taking as an example the 1 hr of contact, the greater density of the inoculum, 19% of the isolates were inactive, whereas the decoction did not show inactivation. In 4 hours of contact with the EH 85.7% of isolates in higher density challenge,

were inactivated and 100% of isolates reduced population density. The decoction showed greater bactericidal activity between 8 and 24 hours, inactivating 100% of isolates until 24 h. It was concluded that, controlling for known factors affecting the bactericidal activity, the sodium hypochlorite and quaternary ammonium iodophor are suitable for controlling MRSA in the sources of contamination in healthcare environments or in human health and animal production. For the isolates resistant to beta-lactam antibiotics no relationship was observed between resistance to disinfectants. The bactericidal activity of solutions of *Achyrocline satureioides* against MRSA isolates and reference microorganism *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suggests its potential use, directly in forms or formulations evaluated in hygiene procedures, both in the sources of infection in healthcare environments as in human health and animal production.

Keywords: *Achyrocline satureioides*, antiseptic, biocide, cross-resistance, disinfectant, MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 1

Tabela 1-	Número de isolados MRSA inativados (n=21), por tempo de contato, frente a quatro concentrações dos desinfetantes hipoclorito de sódio, iodofór e quaternário de amônio	39
-----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 2

Tabela 1-	Concentração dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercitina presentes na solução extrativa aquosa de <i>Achyrocline satureioides</i>	53
Tabela 2 -	Número de isolados (N=51) MRSA que sofreram redução logarítmica em diferentes densidades populacionais iniciais e nos diferentes tempos de contato, quando confrontados com o decocto de <i>Achyrocline satureoides</i> DC, na proporção de 5g: 100mL.....	54
Tabela 3 -	Número de isolados (N=21) MRSA que sofreram redução logarítmica em diferentes densidades populacionais iniciais e nos diferentes tempos de contato, quando confrontados com o Extrato Hidroetanólico Hidratado (EH) de <i>Achyrocline satureoides</i> DC, na proporção de 5g: 100mL.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion

BP: Baird Parker Agar

EH: Extrato Hidroetanólico Hidratado

FAVET: Faculdade de Veterinária

MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MSSA: *Staphylococcus aureus* meticilina sensível

OMS: Organização Mundial da Saúde

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RS: Rio Grande do Sul

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	TEMA DA PESQUISA	15
2.1	Problemas de pesquisa	15
2.2	Hipóteses de pesquisa	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistentes (MRSA).....	18
3.3	Desinfecção como controle de microrganismos no ambiente	20
3.4	Desinfetantes	21
3.4.1	Hipoclorito de sódio.....	23
3.4.2	Iodofór.....	23
3.4.3	Grupo químico Quaternário de Amônio- QAC.....	24
3.5	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	25
3.6	Resistência cruzada (<i>Cross-Resistência</i>), co-resistência e tolerância	26
3.7	Avaliação da atividade bactericida dos desinfetantes	27
3.8	Plantas medicinais	28
3.9	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. (<i>Asteraceae</i>).....	31
4	ARTIGO 1	33
5	ARTIGO 2	45
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A - Análise estatística NAE.....	78
	ANEXO B - Análise estatística- qui quadrado.....	93
	ANEXO C - Análise Fitoquímica da <i>Achyrocline satureioides</i>	95
	ANEXO D - Declaração Herbário ICN – UFRGS.....	96
	ANEXO E – Laudo de análise Hipoclorito de sódio.....	97
	ANEXO F - Certificado de análise Iodofór.....	98
	ANEXO G - Certificado de análise quartenário de amônio 50%.....	99

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo que tem grande capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos. Um exemplo dessa capacidade em adquirir resistência é o surgimento do *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), que por não ser espécie-específico dispersou-se entre homens e animais, podendo ainda transferir, horizontalmente, gens de resistência para outras espécies de bactérias.

A pressão de seleção de microrganismos resistentes pelos antimicrobianos é consequência não só do uso terapêutico ou profilático destas drogas em medicina e odontologia humanas, como também de seu emprego em medicina veterinária, na conservação de alimentos, no combate a elementos biológicos daninhos aos seres humanos e na engorda de animais destinados à alimentação (TAVARES, 2005).

Na conduta para o controle da transmissão, além do uso de antibióticos, a ação sobre os agentes causais, nas fontes de contaminação, exige atenção, sendo decisiva e crítica a escolha de desinfetantes e anti-sépticos. Porém, estudos indicam que bactérias quando expostas repetidamente a bactericidas (anti-sépticos, desinfetantes, conservantes e esterilizantes) podem desenvolver resistência aos bactericidas ou a antibióticos, denominando-se como resistência cruzada ou *cross-resistência* (HUET *et al.*, 2008). Faz-se então necessária a vigilância e monitoramento sobre a ação dos bactericidas convencionais como barreira sanitária.

A resistência aos antimicrobianos sintéticos, e a preocupação com os efeitos adversos das drogas sintéticas, traz o desafio de encontrar alternativas para confrontar o problema da resistência microbiana. A pesquisa de fatores de proteção antimicrobiana entre recursos naturais renováveis, como as plantas com indicativo medicinal, condimentar ou aromático, se justifica na epidemiologia e na profilaxia de doenças transmissíveis (WIEST *et al.*, 2009a).

Um caminho possível na busca de alternativas se dá por meio de extrações vegetais. Aliás, parte dos medicamentos (BRASIL, 2011) hoje disponíveis no mundo é, ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular, que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica.

Selecionou-se para estudo de atividade antibacteriana sobre MRSA a *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae), atendendo diretrizes da Organização Mundial de Saúde (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2002), que estimula os países para que estudem e explorem aqueles aspectos da medicina tradicional que possam fornecer práticas e medicamentos eficazes e seguros para serem usados na atenção primária à saúde, bem como do Estado brasileiro, que apóia estudos com plantas medicinais e fitoterápicos, como foi aprovado

no Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 e a criação de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006).

A *Achyrocline satureioides* é uma planta nativa no estado do Rio Grande do Sul, onde é conhecida popularmente por “macela, marcela, marcela-da-terra” (PEREIRA *et al.*, 2006) e que ocorre naturalmente em todo o Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai, onde também tem sido usada medicinalmente (RIVERA *et al.*, 2004).

Relatos sobre indicação de uso tradicional/popular da *A. satureioides* informam como digestiva, antiespasmódica, carminativa, colagoga, eupéptica, antiinflamatória, emenagoga. Indicam ainda para uso externo como antiinflamatória e anti-séptica. Investigações científicas demonstraram ação antiinflamatória, antiespasmódica, analgésica e sedativa dos extratos das inflorescências, das folhas e caules e que os extratos testados não apresentaram toxicidade excessiva (SIMÕES *et al.*, 1989).

Estudos também evidenciaram, por ensaios experimentais, a atividade antibacteriana de extrações da *A. satureioides*, tanto frente à amostras padronizadas quanto frente a isolados de situações-problema sanitários (LEMOS *et al.*, 2000; FERNANDEZ *et al.*; 2003; AVANCINI *et al.* 2006; TRESOLDI; OLIVEIRA; AVANCINI, 2006; AVANCINI; WIEST, 2008; MOTA, 2008; SPEROTTO *et al.*, 2012).

Considerando os estudos sobre a resistência bacteriana (resistência cruzada e co-resistência) os objetivos gerais deste estudo foram os de verificar se, para uma adequada ação sanitária seria possível selecionar os grupos químicos desinfetantes ou anti-sépticos que apresentem atividade frente aos MRSA, tomando como referência o antibiograma que estabelece o perfil de resistência à meticilina e aos antibióticos relacionados a este perfil de resistência, fornecendo assim, subsídios para o controle de possíveis resistências destes microrganismos aos desinfetantes e anti-sépticos. Também, na busca de novos agentes antimicrobianos e com base em resultados de estudos realizados sobre as atividades biológicas da *A. satureioides*, investigar a possibilidade de que extrações da planta tenham atividade bactericida compatível para seu uso como antimicrobiano frente às bactérias MRSA.

Este estudo teve como objetivo confrontar, “in vitro”, os grupos químicos amplamente utilizados em procedimentos de desinfecção e/ou anti-sepsia, hipoclorito de sódio, iodofór e composto quaternário de amônio, com isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) para monitorar a atividade bactericida verificando se há relação de resistência entre os desinfetantes e antibióticos e confrontar extrações de *A. satureioides* com os isolados para avaliar a atividade antibacteriana frente às bactérias MRSA.

2 TEMA DA PESQUISA

Atividade de desinfetantes convencionais e do decocto e extrato hidroetanólico hidratado (EH) de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (“macela”) sobre *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA).

2.1 Problemas de pesquisa

- a) Os grupos químicos desinfetantes hipoclorito de sódio, iodofór, quaternário de amônio têm capacidade de reduzir a densidade populacional inicial do inóculo ou promover a inativação sobre isolados MRSA?
- b) Existe significativa diferença na capacidade de redução da densidade populacional inicial ou de inativação do inóculo entre os desinfetantes convencionais hipoclorito de sódio, iodofór e quaternário de amônio, quando confrontados com isolados MRSA?
- c) Qual a capacidade do decocto e do extrato hidroetanólico hidratado (EH) de extrações de *Achyrocline satureioides* em reduzir ou inativar a densidade populacional inicial de isolados MRSA?

2.2 Hipóteses de pesquisa

- a) Quanto maior o tempo de contato dos desinfetantes convencionais, hipoclorito de sódio, iodofór e quaternário de amônio, e menor a densidade populacional inicial de isolados MRSA, maior a capacidade de redução das unidades formadoras de colônia viáveis e de inativação da bactéria;
- b) Há associação entre a ausência de inativação ou baixa redução da densidade populacional inicial dos isolados MRSA por grupo químico desinfetante e a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos;
- c) Quanto maior o tempo de contato das extrações decocto e extrato hidroetanólico hidratado de *Achyrocline satureioides* e, menor a densidade populacional inicial do inóculo de isolados MRSA, maior a capacidade de redução das unidades formadoras de colônia viáveis e de inativação da bactéria.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos pertencem à família Micrococcae, são cocos gram-positivos, imóveis, de forma esférica, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não esporulados, agrupados em massa irregular em forma similar a “cacho” de uva. Apresentam metabolismo aeróbio e anaeróbio, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, são catalase positivos e crescem bem em condições de alta pressão osmótica e pouca umidade. Os *Staphylococcus* são divididos em coagulase positivas e coagulase negativas e, entre os coagulase positiva, o *Staphylococcus aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas. É o mais patogênico dos *Staphylococcus* e produz toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria. Foi uma das primeiras bactérias a ser controlada com a descoberta dos antibióticos, mas devido à sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (TRABULSI *et al.*, 1999; TORTORA, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

Alguns fatores de virulência do *S. aureus*, como a capacidade de produção de adesinas de superfície, polissacarídeo capsular, exoenzimas e exotoxinas, podem ser de maior importância que os outros, em doenças diferentes ou em diferentes estágios da patogênese de infecções específicas, assim como nem todos os fatores são produzidos por cada estirpe (YANG *et al.*, 2012).

O *Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais patógenos humanos, são amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. Em ambiente nosocomial, é encontrado em um largo espectro de doenças, desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunodeprimidos. No indivíduo sadio, esse microrganismo é frequentemente um comensal das fossas nasais anteriores, pele úmida e até do intestino. O portador humano é umas das principais fontes de infecção, de 30 a 35% das pessoas sadias albergam essa bactéria. Quando de sua colonização e subsequente infecção em pacientes hospitalizados, esse microrganismo constitui um elevado risco, principalmente devido à possibilidade de apresentarem múltipla resistência aos antibióticos usualmente disponíveis no mercado. As infecções causadas por esse patógeno, tanto hospitalares, quanto domiciliares, apresentam morbidade e mortalidade elevadas (NOVAK, 1999; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005; MESQUITA *et al.*, 2006).

O homem pode contaminar-se diretamente de outra pessoa, ou indiretamente através da

água, do solo, ar, fômites e alimentos. Nesta cadeia epidemiológica, o alimento é um carreador de contaminação, que por sua vez pode receber uma contaminação diretamente das vias de eliminação do homem e dos animais. Os manipuladores de alimentos, quando portadores nasais de *S. aureus*, tendo as mãos como veículo de trabalho podem perpetuar a cadeia epidemiológica de intoxicação alimentar. Estudos epidemiológicos vêm sendo realizados na tentativa de estabelecer uma possível ligação entre portadores de *S. aureus*, a disseminação do mesmo e perpetuação de cepas resistentes, que se propagariam no ambiente familiar e de trabalho (SILVA JUNIOR, 2002; RADDI; LEITE; MENDONÇA, 1988).

A contaminação microbiana em superfícies, tocadas pelas mãos, em ambientes hospitalares, frequentemente são vistas como possíveis fontes de infecções. No mecanismo de transmissão de infecção nos hospitais, as mãos contaminadas do pessoal hospitalar atuam como importante meio de disseminação de agentes causais transmissíveis. A detecção e o controle de portadores de *Staphylococcus aureus* assumem significativa importância quando se trata de profissionais da área de saúde e manipuladores de alimentos (ANDRADE; ZELANTE, 1989; BRASIL, 1994).

Sob o ponto de vista epidemiológico, os animais também podem contribuir na contaminação por esse agente causal. O *S. aureus* é bactéria considerada espécie não específica. Suínos, aves, bovinos, animais de companhia e vários animais domésticos podem albergar este agente transmissível em sua pele ou no trato respiratório superior. Os animais produtores de leite e de carne podem contribuir significativamente na contaminação de cadeias alimentares, mantendo o ciclo das enfermidades transmissíveis comuns entre humanos e animais. A contaminação pode ser introduzida nos matadouros, através das mãos dos trabalhadores, da remoção de couro e da evisceração. A mastite bovina é uma das maiores preocupações da Medicina Veterinária, pelos prejuízos econômicos aliados às questões de saúde pública, pois alguns isolados produzem enterotoxinas estafilocócicas, que podem causar intoxicação alimentar se os alimentos que contenham uma ou mais dessas toxinas pré-formadas é ingerido (ACHA; SZIFRES, 2001; DUQUETTE; NUTTALL, 2004; MOLINA *et al.*, 2010; PELLEGRINO *et al.*, 2011; SPOHR *et al.*, 2011; ARSLAN; ÖZDEMIR, 2012;).

No ambiente hospitalar veterinário, a proximidade dos profissionais e trabalhadores em serviços de saúde animal com os animais doentes, oferece condições favoráveis para a transmissão de microrganismos pelo contato direto, através de secreções ou fluidos orgânicos ou indiretamente através de utensílios e superfícies inanimadas de contato. A via oposta de transmissão, ou seja, do humano para o animal igualmente pode acontecer nas mesmas condições (MCLEAN; NESS, 2008; HELLER *et al.*, 2009).

3.2 *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente- MRSA

Desde o descobrimento dos primeiros antibióticos os microrganismos têm sido capazes de escapar de sua ação. O *Staphylococcus aureus* é um exemplo de demonstrações evolutivas de resistência, pois em 1946 apresentava a maioria de suas cepas sensíveis à penicilina (CABRERA; GÓMEZ; ZUÑIGA 2007). Desde sua descoberta, a penicilina funcionou muito bem até o fim dos anos 50, quando começaram a surgir cepas resistentes a este antibiótico, incluindo a eritromicina e a tetraciclina. A introdução das penicilinas resistentes às penicilinases, na década de 60 possibilitou um avanço na terapêutica estafilocócica. Passou a ser usado o beta-lactâmico sintético, a meticilina, que era resistente à beta-lactamases que o *S. aureus* produzia. Entretanto, logo surgiram relatos de cepas resistentes também a esse antimicrobiano, e, além disso, expressando multirresistência, foram denominadas de MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes) que são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos (REMONATTO *et al.*, 2007).

Cerca de 70% dos *Staphylococcus aureus* isolados de infecções nosocomiais em hospitais brasileiros são MRSA e sua importância se dá pelo fato de além de apresentar resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos) é, frequentemente, também a diversas outras classes de antimicrobianos. A utilização de procedimentos invasivos como a cateterização, novas técnicas cirúrgicas e de diagnóstico, bem como o uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro trouxe benefícios, por outro lado, está sendo uma das causas do aumento na incidência de infecções por microrganismos multirresistentes (SOUZA; FIGUEIREDO, 2008).

A resistência do *S. aureus* à meticilina tem três mecanismos distintos: a hiperprodução de beta-lactamases; presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) e modificações na capacidade de ligação das PBPs. Os três mecanismos podem estar presentes numa mesma bactéria, inclusive agindo entre si, possui cinco PBPs, que são enzimas que catalizam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *MecA* (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005; KLEIN; GOULART, 2008; PANTOSTI, 2012).

O MRSA era considerado até então como um patógeno hospitalar (HA-MRSA), mas a

partir dos anos 90, cepas foram isoladas em pacientes da comunidade e essas cepas denominadas CA-MRSA. O CA-MRSA produz a toxina Panton Valentine Leucocidine – PVL. Esta toxina é capaz de destruir leucócitos humanos e causar dano tecidual grave, estando relacionada com infecções de pele, tecidos moles e, ocasionalmente, pneumonia necrotizante severa. Tem sido observado o aumento da incidência de MRSA comunitário (MRSA-CO ou CA-MRSA), os serviços de emergência de 11 cidades dos EUA, por exemplo, relataram a incidência de 59% de MRSA nas infecções de pele e partes moles (REMONATTO *et al.*, 2007; ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

Resultados do estudo de Rankin *et al.* (2005) são de relevância, pois demonstraram a presença do gen PVL em MRSA isolados em animais de companhia, o que sugere que estes animais ou o homem podem ser reservatórios do microrganismo, com a hipótese de transferência entre eles, como no caso relatado de infecção nosocomial transferida de animais para pessoas em hospital veterinário, quando um surto de dermatite infecciosa por *S. aureus* metilina-resistente ocorreu em estudantes que tiveram contato com um potro infectado (WEESE *et al.*, 2006).

Waller (2005) sugere ainda a possibilidade do *S. aureus* metilina resistente transferir essa resistência a outros microorganismos sensíveis, como o *Staphylococcus intermedius*, comum em animais, como no caso de cães com pioderma profunda, de onde foram isolados *Staphylococcus intermedius* metilina resistentes (MRSI), extremamente raro.

Na Alemanha, durante um levantamento em carne de frango e de peru frescos, bem como de produtos derivados, para presença de isolados MRSA, 37,2% de 86 amostras foram positivas. Uma grande variedade de fenótipos de resistência e genótipos foi detectada. Todas as amostras foram negativas para fatores de virulência importantes, como Panton-Valentina Leucoicidina, toxina da síndrome do choque 1, ou toxinas esfoliativas. No entanto, foi detectada a presença de gens de enterotoxina. A presença de MRSA enterotoxigênico enfatiza a necessidade de mais estudos para elucidar possíveis riscos para a saúde dos consumidores (FESSLER *et al.*, 2011).

Vários estudos relatam a disseminação de MRSA, antes restrito ao ambiente hospitalar, na comunidade, em animais domésticos e de companhia, em clínicas veterinárias, estabelecimentos de criação de animais para a produção de leite e carne (LA-MRSA) chamam a atenção, pois agentes patogênicos resistentes aos antibióticos estão associados ao sofrimento prolongado e maior risco de morte do paciente. A capacidade dos estafilococos antibióticos resistentes em colonizar animais abriu a possibilidade de transferência de gens para patógenos animais, e também sugere que o MRSA está emergindo como uma zoonose veterinária

importante. Apesar da incidência de resistência bacteriana em animais aparentemente ser baixa, todos os eventos evolutivos para a geração de uma pandemia animal futura estão disponíveis (WALLER, 2005; WEESE *et al.*, 2006; HUNTER *et al.*, 2010; FESSLER *et al.*, 2011; SPOHR *et al.*, 2011).

3.3 Desinfecção como controle de microrganismos no ambiente

Os microrganismos são as formas de vida mais difundidas na natureza. Sua presença tem efeitos positivos e negativos para a vida do homem, portanto, seu controle é fundamental, a fim de evitar que estes efeitos produzam conseqüências indesejáveis, para a saúde, o meio ambiente e os bens que fazem à qualidade de vida do ser humano (BRASIL, 2007).

Em 1977, Rosemberg ressaltou a importância de se ter bem claro que uma enfermidade não se determina pela simples presença do agente causal, mas em um controle de enfermidades, os objetivos primordiais são o de impedir a transmissão do agente causal a um novo hospedeiro, ou o de não deixar que o novo hospedeiro desenvolva a infecção (prevenção da ocorrência ou interrupção da evolução da doença).

Segundo Gelman, Clark e Omram (1978) a desinfecção e anti-sepsia, dentro dos níveis de prevenção de doenças transmissíveis, se localizam no período pré-patogênico, na prevenção primária e se inserem na categoria saneamento ambiental, como medida preventiva. Isso significa a remoção do meio ambiente de agentes vivos que escaparam de seus reservatórios humanos ou animais e estão aptos para sobreviver, por tempo variável, no ambiente animado ou inanimado.

A prevenção da ocorrência é quando a desinfecção é empregada com o objetivo de prevenir a contaminação, a instalação e a proliferação dos agentes causais no ambiente. O controle de agentes causais transmissíveis no ambiente merece atenção à medida que se comprova a teoria da causalidade múltipla das doenças, levando, como conseqüência, a aceitação de um conceito ecológico dos fenômenos saúde-enfermidade prevalentes no ecossistema, neste sentido a desinfecção como insumo crítico à medicina preventiva vem merecendo crescente atenção (WIEST, 1984).

Desinfecção é definida como o processo que elimina microrganismos patogênicos, com exceção de esporos bacterianos em objetos inanimados. Cada um dos vários fatores que afetam a eficácia da desinfecção pode anular ou limitar a eficácia do processo. Fatores que afetam a eficácia de desinfecção e esterilização incluem limpeza prévia do objeto, carga orgânica e inorgânica presente, tipo e nível de contaminação microbiana, a concentração e o tempo de

exposição ao germicida, natureza física do objeto (por exemplo, fendas, dobradiças e lúmens), presença de biofilmes, temperatura e pH do processo de desinfecção (RUTALA; WEBER, 2008).

A limpeza e a desinfecção de superfícies corroboram para o controle das infecções relacionadas à assistência à saúde, por garantir um ambiente com superfícies limpas, com redução do número de microrganismos, e apropriadas para a realização das atividades desenvolvidas nesses serviços. O ambiente é apontado como importante reservatório de microrganismos nos serviços de saúde, especialmente os multirresistentes. Ainda, a presença de matéria orgânica favorece a proliferação de microrganismos e o aparecimento de insetos, roedores e outros, que podem veicular microrganismos. Dessa forma, o aparecimento de infecções nos ambientes de assistência à saúde pode estar relacionado ao uso de técnicas incorretas de limpeza e desinfecção de superfícies e manejo inadequado dos resíduos em serviços de saúde. As superfícies podem contribuir para a contaminação cruzada secundária, por meio das mãos dos profissionais de saúde e de instrumentos ou produtos que poderão ser contaminados ao entrar em contato com essas superfícies e posteriormente, contaminar os pacientes ou outras superfícies. Assim, a higienização das mãos dos profissionais de saúde e a limpeza e a desinfecção de superfícies são fundamentais para a prevenção e redução das infecções relacionadas à assistência à saúde (BRASIL, 2010a).

Com relação aos alimentos, entre as causas mais frequentes apontadas como favorecedoras da contaminação são citadas: a falta de qualificação dos manipuladores no que diz respeito às boas práticas de processamento, as precárias condições de manuseio e conservação, bem como a deficiente higienização do ambiente onde esses alimentos são preparados (GERMANO; GERMANO, 2001).

As evidências de transferência horizontal de MRSA entre o homem e os animais exigem medidas de controle e prevenção. A higiene é uma importante medida de prevenção e controle geral, tanto em estabelecimentos de produção de alimentos, casas e ambientes de saúde humanos e animais, considerando-se que a contaminação ambiental atua como um reservatório para a infecção (FACCIOLI-MARTINS; CUNHA, 2012).

3.4 Desinfetantes

Por definição, desinfetante é um produto que mata todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas, em objetos e superfícies inanimadas e os anti-sépticos em tecidos vivos (CABRERA; GÓMEZ; ZUÑIGA,

2007; BRASIL, 2007; MAILLARD; MCDONNELL, 2012).

Para que a desinfecção atinja seus objetivos, torna-se imprescindível a utilização das técnicas de limpeza e utilização de desinfetantes com garantia de qualidade e que atendam aos requisitos básicos exigidos pela legislação em vigor. Atenção deve ser dada à avaliação da real necessidade do produto saneante, evitando o uso indiscriminado desse produto em serviços de saúde. Quando necessária a utilização do produto saneante, deve-se levar em consideração a área em que será utilizado o determinado princípio ativo, infraestrutura e recursos humanos e materiais disponíveis, além do custo do produto no mercado (BRASIL, 2010a).

Um desafio comum enfrentado por quem utiliza desinfetantes e anti-sépticos é o de selecionar o mais adequado para uso. Exige vigilância na escolha das substâncias utilizadas para interromper o ciclo de doenças no ambiente, sob pena de comprometer a eficácia. Uma intervenção química mal feita no ambiente pode selecionar agente ou amostras bacterianas afetando a relação (biocenose) entre a microbiota em vida livre (WIESTREICH; LECHTMAN, 1980; AVANCINI, 2002).

Há muitos tipos de químicos que podem ser usados como desinfetantes e, como existe um número e variedade crescente de produtos comerciais, as composições devem ser cuidadosamente escolhidas segundo necessidades específicas. Muitos germicidas podem ser nocivos aos seres humanos ou para o meio ambiente. Devem ser escolhidos, armazenados, manipulados, utilizados e eliminados com cuidado, respeitando as instruções dos fabricantes. No rótulo dos produtos saneantes deverá constar: o nome do produto; modo de utilização, destacando o tempo de contato do produto; precauções de uso quanto à toxicidade e necessidade de uso de EPIs; restrições de uso; composição do produto e teor do princípio ativo. As classes de germicidas mais usadas em serviços de saúde humana e em estabelecimentos de saúde e produção animal são: quaternário de amônio, clorexidina, iodóforos, hipoclorito de sódio, ácido peracético e álcool 70° (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004; BRASIL, 1988; BRASIL, 2007; RUTALA; WEBER, 2008; BRASIL, 2010a, BRASIL, 2010b).

A classificação do espectro de atividade de um agente químico descreve sua possível utilização nos programas de controle de infecção. Contudo, não existe desinfetante que pode servir a todas as situações e atender a todas as necessidades, devido à existência de diferentes condições de uso na rotina. É necessário que sejam desenvolvidos programas de rotina para avaliar a utilidade do produto (MAZZOLA; PENNA; MARTINS, 2003).

3.4.1 Hipoclorito de sódio

A ação bactericida dos compostos a base de cloro, com exceção do dióxido de cloro, está vinculada ao ácido hipocloroso (HClO). Várias teorias tentam explicar os mecanismos de ação dos derivados clorados sobre as formas vegetativas de bactérias. A hipótese mais aceita é a da oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) de certas enzimas do metabolismo de carboidratos e inibição de enzimas que participam da oxidação da glicose. Neste caso o ácido hipocloroso atravessa a membrana celular, oxida grupos sulfidrilas de certas enzimas que participam da via glicolítica, eliminando a célula. Outras hipóteses são ainda: de que ocorra a descarboxilação oxidativa de aminoácidos, formando nitrilas e aldeídos, ou combinação com proteínas e formação de compostos N-clorados tóxicos; indução da absorção de oxigênio e fosforilação oxidativa conjugada com a quebra de macromoléculas e danos à membrana, dificultando o transporte de carboidratos e aminoácidos e podendo levar ao extravasamento celular, a destruição da síntese protéica, reações com ácidos nucleicos, purinas e pirimidinas, ou ainda desequilíbrio metabólico após destruição de enzimas essenciais (MACÊDO, 2004; CABRERA; GÓMEZ; ZUÑIGA, 2007).

É um dos sanitizantes mais baratos encontrados no mercado, eficaz em diferentes diluições e de fácil preparo e aplicação, porém altamente corrosivo, danificam juntas de peças de borrachas e reagem com matéria orgânica, podendo irritar a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Os organismos diferem na sensibilidade ao cloro: as células bacterianas são as mais sensíveis, esporos bacterianos e de fungos são os menos sensíveis, e alguns parasitos são altamente resistentes (PIROVANI; GÜEMES; PIAGENTINI, 2006).

Segundo Rutala e Weber (2008) produtos clorados demonstraram atividade antimicrobiana em diversas concentrações de cloro livre, que vão de 25 ppm de cloro livre para o micoplasma, 5000 ppm de cloro livre para esporos de *Clostridium difficile* e, para *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *P. Aeruginosa*, em 10 minutos de contato com 100 ppm de cloro livre.

3.4.2 Iodofór

Sua ação é através de seu alto poder de penetração na parede celular, levando à ruptura de proteínas. Usualmente utilizados em concentração de 30 a 50 ppm por um tempo menor ou igual a 10 minutos. São menos irritantes à pele e menos corrosivos aos metais que o cloro, ativo

em baixa concentração, estável e de fácil preparo. Diminui a eficiência com a elevação do pH e pode alterar o sabor ou odor dos alimentos, bem como manchar os materiais plásticos. Possui um custo superior ao do cloro e não pode ser utilizado em temperaturas acima de 45°C (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Embora menos reativo que o cloro, o iodo é bactericida, fungicida, tuberculocida, virucida e esporicida. Na forma aquosa ou alcoólica, soluções de iodo têm sido usados por 150 anos como um anti-séptico, porém elas estão associados a irritação e coloração. Além disso, as soluções aquosas são geralmente instáveis. Estes problemas foram ultrapassados pelo desenvolvimento de iodóforos (agentes liberadores de iodo). Os mais amplamente utilizados são iodo-povidona-iodo e poloxâmero, ambos como anti-sépticos e desinfetantes. Os iodóforos são complexos de iodo e um agente ou veículo solubilizador, o qual atua como um reservatório da substância ativa Iodo "livre". Embora a atividade germicida sendo mantida, iodóforos são considerados menos ativos contra certos fungos e esporos que as tinturas. Semelhante ao cloro, a ação antimicrobiana do iodo é rápida, mesmo em concentrações baixas, mas o modo de ação exato é desconhecido. O Iodo penetra rapidamente nos microrganismos e ataca os grupos principais de proteínas, nucleotídeos e ácidos graxos livres, que termina na morte celular. Sabe-se menos sobre a ação antiviral do iodo, mas vírus e parvovírus não lipídicos são menos sensíveis do que vírus envelopados. Da mesma forma que as bactérias, é provável que o iodo ataque as proteínas de superfície do vírus com envelope, mas eles podem também desestabilizar os ácidos graxos da membrana (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

3.4.3 Grupo químico Quaternário de Amônio - QAC

Quando em contato com a membrana celular dos microrganismos, alteram sua permeabilidade estimulando a glicólise, provocando assim o esgotamento celular. Possuem a vantagem de ser de fácil preparo e aplicação, neutralizam odores e tem um amplo espectro de ação com exceção das bactérias gram-negativas. O custo desse composto é elevado, pouco eficiente em meio ácido e em contato com proteínas (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Agentes tenso-ativos (surfactantes) têm duas regiões em suas estruturas moleculares, um hidrocarboneto, repelentes de água (hidrofóbica) e o outro atraindo a água (hidrofílico ou polar) do grupo. Dependendo da base da carga ou ausência de ionização do grupo hidrofílico, os surfactantes são classificados em catiônicos, aniônicos, não iônicos, anfotéricos e anfotero. Dos compostos catiônicos os compostos quaternário de amônio (QAC) são os anti-sépticos e

desinfetantes mais úteis. Eles são algumas vezes conhecidos como detergentes catiônicos. QACs têm sido utilizados para uma variedade de propósitos clínicos, como a desinfecção pré-operatória de pele intacta, a aplicação às membranas mucosas e desinfecção de superfícies não críticas. Além de ter propriedades antimicrobianas, QACs também são excelentes para limpeza de superfície e desodorização. Têm como sítio-alvo predominantemente a membrana (interior) citoplasmática de bactérias ou a membrana plasmática em leveduras. Existe, portanto, uma perda de estrutura, organização e da integridade da membrana citoplasmática em bactérias, juntamente com outros efeitos prejudiciais para a célula bacteriana. Por esse mecanismo de ação não tem efeito sobre as bactérias gram- negativas (resistência intrínseca). Tem ação sobre vírus envelopados, e são mycobacteriostáticos e esporostáticos (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O quaternário de amônio é apresentado em diferentes formulações e deve ser diluído conforme instruções do fabricante.

3.5 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A ação de antimicrobianos resulta da sua interação com um número de diferentes alvos bioquímicos sobre ou na célula e, a susceptibilidade de diferentes micróbios para um agente pode variar significativamente. Considerando que a resistência a alguns antimicrobianos é também mediada por plasmídios, isto levantou preocupações. A exposição aos antimicrobianos pode contribuir para a propagação da resistência aos antibióticos por seleção e dispersão de plasmídeos (que produzem resistência a ambos os antibióticos e biocidas), Este plasmídeo pode ser um determinante de resistência para um local de destino comum, partilhada pelo antibiótico e um ou mais bactericidas, ou um determinante de resistência antimicrobiana, juntamente com os determinantes não relacionados estruturalmente, por exemplo, para resistência a antibióticos (proteínas de ligação à penicilina) (BEUMER *et al.*, 2003).

Atualmente pode-se raciocinar que a resistência microbiana é o resultado de uma complexa interação entre agentes antimicrobianos, microrganismos e meio ambiente. Contudo, a versatilidade microbiana de se adequar às condições impostas, representa um formidável mecanismo de defesa. Isto na realidade não deveria representar surpresa, tendo em vista que a história da evolução vem apontando que todo o organismo vivo busca sempre mecanismos de adequação às suas novas realidades, e a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos é uma condição inevitável. A resistência bacteriana aos antimicrobianos não respeita fronteiras, seu aparecimento em localidades remotas pode resultar em impacto para o mundo, em curto

espaço de tempo, representando atualmente um dos maiores problemas de saúde, em países desenvolvidos e emergentes, em todo mundo. Seu aumento tem ocorrido de forma alarmante nos últimos anos, sendo estimado que no futuro o uso destes fármacos possa resultar em perda da efetividade (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2005).

A múltipla resistência aos antibióticos é um problema de saúde pública que é observado a nível mundial desde o seu surgimento. A capacidade de adaptação dos microrganismos em escapar da ação de bactericidas e antibióticos tem levado à tentativas de elucidar se existem mecanismos de resistência compartilhados entre os antibióticos e bactericidas (CABRERA; GÓMEZ; ZUÑIGA 2007).

Os microrganismos possuem mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos, como por exemplo, a composição da membrana e parede, a expressão de bombas de efluxo e a produção de enzimas de neutralização. Além das propriedades intrínsecas, podem adquirir novos mecanismos de resistência, por meio de mutações causadas pela pressão seletiva de microbactericidas, que irá selecionar para a sobrevivência de organismos que são resistentes a ele e a troca de informações genéticas entre microrganismos através de plasmídeos e transposons que codificam fatores de resistência. Em bactérias, o desenvolvimento de resistência a desinfetantes não tem sido considerado tão importante como a resistência aos antibióticos, porém, estudos recentes sugerem que pode ser mais generalizada e significativa do que se pensava anteriormente. A clínica recente estuda a ligação com a resistência, e a resistência cruzada aos antibióticos (MAILLARD; MCDONNELL, 2012; RUSSEL, 2002; RUSSELL, 2004; HUET *et al.*, 2008).

A susceptibilidade reduzida do *S. aureus* a antimicrobianos é comumente associada com proteínas mediadas por plasmídeos de efluxo e a resistência a antibióticos, à hiperprodução de beta-lactamases e presença de uma proteína ligadora de penicilina alterada. Estudos de estirpes de *S. aureus* mostram genes que codificam o efluxo multidroga em conjunto com os determinantes de resistência a antibióticos nos plasmídeos de multirresistência (RUSSELL; MAILLARD, 1999).

3.6 Resistência cruzada (Cross-Resistência), co-resistência e tolerância

Estudos indicam a relação da diminuição da susceptibilidade das bactérias resistentes aos antibióticos, associada à resistência aos bactericidas. A resistência cruzada (cross-resistência) tem o potencial para ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo, iniciando uma via comum de morte celular, ou compartilham uma rota comum de

acesso a suas respectivas metas. Co-resistência ocorre quando os genes que especificam os fenótipos resistentes estão localizados em conjunto num elemento genético móvel, tal como um plasmídeo, transposon, ou integron. O resultado final é o mesmo: o desenvolvimento de resistência a um agente antibacteriano é acompanhado pelo aparecimento de resistência a outro agente. Observa-se ainda que algumas bactérias desenvolvem tolerância, que é a competência genética-bioquímica de, através de alguns mecanismos, apenas diminuir o efeito bactericida do antimicrobiano, sem alterar seu efeito bacteriostático. Multirresistência é o termo que se aplica quando uma bactéria é simultaneamente resistente a antimicrobianos que pertencem a diferentes classes químicas, utilizando vários mecanismos (FREITAS, 1989; TAVARES, 2000; LEVY, 2002; CHAPMAN, 2003; GILBERT; MCBAIN, 2003; RUSSELL, 2003; SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS, 2009; KREWER *et al.*, 2012).

3.7 Avaliação da atividade bactericida dos desinfetantes

Segundo Guerreiro (1984), o *Staphylococcus aureus* é importante no estudo e combate às doenças infecciosas, pois é uma das bactérias mais resistentes e produz resistência aos antimicrobianos, sendo utilizado como elemento principal de aferição de eficácia.

Quanto aos testes para avaliação da atividade biológica de desinfetantes e anti-sépticos, Reybrouck (1998) indica que existe um grande número deles, com a mesma finalidade: colocar em contato uma solução bactericida e o microrganismo com o objetivo de mensurar a atividade antimicrobiana de substâncias ou preparações químicas.

Segundo Holah *et al.* (1998), a adoção dos testes de suspensão para verificação da atividade biológica dos bactericidas tem inúmeras vantagens. Eles são relativamente práticos, não requerem extrema especialização nem dispendiosos equipamentos de laboratório sendo, assim, de baixo custo para realizá-los. Eles já estão bem descritos quanto a seus limites e possibilidades de avaliação de atividade microbiológica, sua repetibilidade e reprodutibilidade.

O European Standard EN 1040:2005 Fase 1 especifica um ensaio de suspensão quantitativo, para determinar se um anti-séptico ou desinfetante químico tem uma atividade bactericida básica em campos descritos no escopo (BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 2006).

3.8 Plantas medicinais

As plantas têm sido utilizadas pelo homem ao longo de toda sua história e muitas delas são referidas para tratar e controlar enfermidades infecciosas no homem e nos animais (SCHUCH *et al.*, 2008). No Brasil, animais e plantas são muito utilizados desde a antiguidade na medicina tradicional (SANTOS *et al.*, 2012).

O Brasil é, por natureza, o país da diversidade. Encontrado pelos portugueses no século XVI mostrou ao velho mundo uma das maiores biodiversidades do planeta, intensamente explorada pela diversidade de culturas que aqui se instalaram buscando no Novo Mundo um enorme campo de conhecimento. As culturas autóctones foram o berço do conhecimento do qual hoje desfrutamos e continuam ainda a nos mostrar a grandeza a ser explorada na terra brasileira. A grande maioria dos medicamentos, hoje disponíveis no mundo, é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica (BRASIL, 2011).

O reino vegetal tem sido a melhor fonte de soluções para cura de uma variedade de doenças e de dor. E por isso plantas medicinais têm desempenhado um papel importante na manutenção da saúde no mundo inteiro. Fitoterapia tradicional está intimamente relacionada com a cultura popular, seu uso tem origens baseadas no conhecimento ancestral. Produtos naturais de plantas superiores são uma fonte importante de agentes terapêuticos e, portanto, muitos grupos de investigação estão atualmente estudando as diferentes atividades biológicas das plantas. A ideia de que estes produtos são isentos de toxicidade torna o uso de medicamentos fitoterápicos cada vez maior e indiscriminado (ARAÚJO; ONOFRE, 2011; SALAZAR-ARANDA *et al.*, 2011).

Em 1978, a Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos. No Brasil a política de plantas medicinais e fitoterápicos que define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica remonta de 1981. Em 1982, o Ministério da Saúde (PPPM/Ceme) lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos para obter o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais. Ao longo dessa trajetória várias políticas envolvendo plantas medicinais e fitoterápicos foram implantadas, destacando a instituição da Política Nacional de Plantas Medicinais (2006) e o seu programa que insere as práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2008 (BRASIL, 2011).

Nesse sentido a Organização Mundial da Saúde estimula os países a que estudem e explorem aspectos da medicina tradicional que possam fornecer práticas e medicamentos eficazes e seguros, considerando-se que em muitos países, principalmente os mais pobres é a única fonte acessível de cuidados de saúde (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2002).

Da cultura popular aos cultivares, controlados por profissionais conhecedores do assunto, o Brasil está na linha de frente no estudo e aplicação da medicina não convencional, da complementar e alternativa a partir da medicina e do conhecimento tradicional (BRASIL, 2011).

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, uma vez que apresentam um amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos. A maioria dessas propriedades é conferida por produtos do metabolismo secundário como terpenóides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade (DUARTE *et al.*, 2004).

Nascimento *et al.* (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitofármacos frente a microrganismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como observaram o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais. Verificaram alto potencial antimicrobiano, inclusive, em alguns casos, com maior atividade sobre os microrganismos resistentes a antibióticos. A associação de antibióticos e extratos vegetais ou fitofármacos, sobre bactérias resistentes a antibióticos, mostrou que em alguns casos ocorreu sinergismo, possibilitando que antibióticos já ineficazes apresentassem ação sobre essas bactérias. Os dados obtidos no trabalho permitem concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados, principalmente sobre bactérias resistentes a antibióticos, seja na sua ação individual ou em menores concentrações associados com antibióticos.

Avancini (2002) demonstrou que das 38 plantas com indicação de uso tradicional, por ele testadas, 24 (69 %) apresentaram atividade antibacteriana. Crê-se desse modo, que a etnografia aplicada à obtenção de conhecimento tradicional sobre o uso de vegetais é um instrumento importante na descoberta de suas atividades biológicas como recursos em saúde humana ou animal.

Duarte *et al.* (2004) com o objetivo de estudar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais, encontraram resultados de inibição similar ao cloranfenicol contra o *Staphylococcus aureus*.

Wiest *et al.* (2009a) demonstraram que, resultados avaliados permitem prever que diferentes extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar possam ser empregados como fatores de proteção na epidemiologia e profilaxia de doenças por estafilococos, uma vez consideradas as peculiaridades em diferentes situações de risco apresentadas, como por exemplo desinfecção ou anti-sepsia de soluções de continuidade em saúde e produção animal. No trabalho foram utilizadas 80 plantas com indicativo etnográfico medicinal, condimentar ou aromático e das 39 descritas, que apresentaram atividade anti-estafilocócica, a *Achyrocline satureioides* foi uma das que se destacou.

Com o objetivo de avaliar extratos brutos de plantas com indicação etnográfica como antibióticos/anti-sépticos frente à *Staphylococcus* isolados de mastite bovina, Schuch (2007) testou cinco plantas. Concluiu que todas as plantas testadas apresentaram alguma atividade inibidora sobre o microrganismo.

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos, estudos buscam o ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor indício de resistência bacteriana. Esta atividade antimicrobiana pode ser encontrada em espécies de plantas medicinais. As espécies da flora brasileira em sua maioria ainda não foram pesquisadas cientificamente, quanto à sua ação antimicrobiana, pois o uso de plantas medicinais, muitas delas cultivadas no fundo do quintal, é prática secular, baseada no conhecimento popular e transmitida oralmente, na maior parte das situações (ALVARENGA *et al.*, 2007).

Ao estudar a atividade antibacteriana de 86 plantas, Wiest *et al.* (2009b) observaram que 50 delas apresentaram alguma atividade sobre *Salmonella* spp., demonstrando que faz-se necessária a reflexão sobre a validade da ferramenta etnográfica na prospecção de fatores de proteção antibacteriana em plantas, vinculando o senso comum e o senso científico relativo às plantas medicinais, condimentares e aromáticas como recursos antibacterianos naturais renováveis e, possíveis fatores de proteção cientificamente assegurados, socialmente aceitáveis e ecologicamente sustentáveis, nos princípios da atenção básica à saúde.

Girolometto *et al.* (2009) comprovaram que os resíduos na cadeia produtiva da *Ilex paraguariensis* (erva-mate), representados por folhas e cambitos, apresentam potencial como insumos anti-sépticos ou desinfetantes, aplicáveis na atenção básica à saúde e à produção em sistemas de agricultura familiar ou de pequeno porte, com ênfase à prevenção e ao controle específico de salmonelose, uma vez atendidos os aspectos de demanda tecnológica mínima e da sustentabilidade destas ações e cuidados básicos em saúde.

3.9 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae)

Achyrocline satureioides (Lam.) DC. (Asteraceae), espécie vegetal conhecido como “marcela ou macela”, têm um ampla gama de usos terapêuticos no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai, como antiinflamatório, digestivo, antiespasmódico, sedativo, carminativo, entre outros. O uso popular tem sido tradicionalmente feito por ingestão oral de infusões das inflorescências (SIMÕES; RECH; LAPA, 1986; PETROVICK; PETROVICK; BASSANI, 2010; CASTRO; CHEMALE, 1995 *apud* FACHINETTO *et al.*, 2007).

A *Achyrocline satureioides* é uma erva aromática anual da família Asteraceae, de tamanho médio e nativa da América do Sul sub-tropical (FERRARO *et al.*, 2008), comum no Brasil, ocorrendo de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Possui ramificações de até 1,5m de altura, coberta de pilosidades brancas. As folhas são alternas, inteiras, sésseis lineares, alanceoladas de até 12 cm de comprimento por 1,8 cm de largura. Possui inflorescências do tipo capítulos em dois tipos de flores, reunidas em panículas corimbosas. As flores são hermafroditas, em número de uma a duas e as flores marginais são quarto ou cinco. O fruto é do tipo aquênio, glabro e pardo (SOUZA; SCAPOVAL; BASSANI, 2002).

O significado da macela, sob o ponto de vista econômico, científico, tecnológico, cultural e da saúde, além do significado místico e religioso, parte importante da cultura das etnias que contribuíram para a formação do povo gaúcho, levou a criar a Lei nº 11.858, de 5 de dezembro de 2002 que instituiu como Planta Medicinal Símbolo do Rio Grande do Sul a *Achyrocline satureioides*, eloyatei-caá em Tupi Guarani.

Diversos estudos vêm demonstrando a atividade biológica desta planta em diversas linhas de pesquisa, buscando isolar e conhecer seus compostos bioativos.

Achyrocline satureioides é conhecida por possuir um amplo espectro de propriedades farmacológicas, medicinais e terapêuticas. Estudos demonstraram diversas capacidades protetoras dos extratos de marcela contra várias condições patológicas. No trabalho de Rivera *et al.* (2004), foi avaliada a toxicidade aguda (doses de 30-300 mg/kg) de um extrato aquoso de marcela, administrada por via intraperitoneal e por via oral em ratos e ratazanas. O extrato teve baixa toxicidade aguda quando administrado por via intraperitoneal e nenhuma toxicidade por administração oral. Sinais de toxicidade, estudos enzimáticos (transaminases e fosfatases) e avaliação histológica de diversos órgãos indicaram que o extrato foi desprovido de toxicidade aguda. Estes estudos demonstraram que um extrato aquoso da planta obtido após uma infusão de 2% é segura e não tem efeitos prejudiciais *in vivo* nas condições investigadas neste estudo.

Estudos indicam que os flavonóides presentes na planta, entre eles a quercetina, em

maior quantidade, devem ser os responsáveis pelas atividades biológicas a ela atribuídas. Os flavonóides são metabólitos secundários, compostos químicos originados dos metabólitos primários com elevado gasto de energia. Apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas. A hipótese é de que esses compostos são necessários para a sua sobrevivência e preservação, desestimulando a ingestão de frutos até o desenvolvimento da semente, ou são atrativos, como por exemplo, os pigmentos e os óleos voláteis, responsáveis pela polinização das plantas (VON POSTER; MENTZ, 2010).

A Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul desenvolve estudos há mais de trinta anos com a *A. saturoioides*. Dentre esses estudos podemos citar pesquisas tecnológicas para obtenção e padronização dos extratos, investigações farmacológicas, formas de extração dos princípios bioativos, determinação do teor de compostos flavonóidicos e polissacarídeos, atividade imunoestimulante e desenvolvimento de processos tecnológicos.

Em outra linha de pesquisa, a Faculdade de Veterinária e o Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da mesma Universidade, buscam alternativas de proteção antimicrobiana entre os recursos naturais renováveis, e nessas pesquisas ficou evidenciada a atividade antimicrobiana da *Achyrocline saturoioides* (FERNANDEZ *et al.*, 2003; AVANCINI *et al.*; 2006; TRESOLDI; OLIVEIRA; AVANCINI, 2006; AVANCINI; WIEST, 2008; MOTA, 2008; SPEROTTO *et al.*, 2012).

4 ARTIGO 1

Short Communication

ATIVIDADE BACTERICIDA DE TRÊS DESINFETANTES FRENTE A *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTES (MRSA)

BOTH, Jane Mari Corrêa¹, DIAS, Cícero², AVANCINI, César Augusto Marchionatti¹

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS- janeboth@gmail.com; cesar.avancini@ufrgs.br

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA)

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é bactéria espécie não específica que, além de potencial patogenicidade, evoluiu em mecanismos de resistência a antimicrobianos. Os *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) estão envolvidos em infecções nosocomiais (HA-MRSA), em infecções adquiridas na comunidade (CA-MRSA), nos animais de companhia e em animais para produção de alimentos (LA-MRSA). Na conduta para o controle da transmissão, além do uso de antibióticos, a ação sobre os agentes causais, nas fontes de contaminação, exige atenção, sendo decisiva e crítica a escolha de desinfetantes e anti-sépticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade bactericida, sobre isolados MRSA, dos grupos químicos hipoclorito de sódio (HS), iodofór (I) e quaternário de amônio (QAC - cloreto de cetil trimetilamônio), usados rotineiramente em ambientes nosocomiais e nos de produção e saúde animal, bem como testar hipótese da possibilidade de resistência cruzada entre grupos químicos antibióticos e desinfetantes. Pela técnica do Teste de Suspensão na Avaliação Quantitativa da Atividade Bactericida de Desinfetantes e Anti-sépticos Químicos, usando 21 isolados MRSA, com densidade populacional inicial dos inóculos de 10^7 UFC/mL, avaliou-se a atividade bactericida de quatro diluições sucessivas (fator 0,5) dos desinfetantes, nos tempos de contato de cinco minutos, 15 minutos e 30 minutos. Observou-se que o confronto dos desinfetantes nas concentrações HS 25 ppm, I 12,5 ppm e QAC 125 ppm, aos cinco minutos de contato, foram suficientes para inativar todos os MRSA. O hipoclorito de sódio, o iodofór e o quaternário de amônio cloreto de cetil trimetilamônio demonstraram atividade bactericida sobre os isolados MRSA e sobre a bactéria de referência *S.aureus* ATCC 6538. Para os isolados resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos confrontados não foi observada relação de resistência com os estes grupos químicos. O resultado evidencia que o *S.aureus* ATCC 6538 é uma cepa adequada na avaliação da atividade de desinfetantes e anti-sépticos a serem utilizados como barreira sanitária frente aos MRSA. Concluiu-se que, controlados os conhecidos fatores que interferem na eficácia dos desinfetantes, o hipoclorito de sódio, o iodofór e o quaternário de amônio são adequados para controlar os MRSA nas fontes de infecção, em ambientes de saúde humana ou nos de saúde e de produção animal.

Palavras-chave: anti-séptico, bactericida, biocida, resistência cruzada, desinfetante, MRSA, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente.

ABSTRACT

BACTERICIDE ACTIVITY OF THREE DISINFECTANTS AGAINST TO

METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA)

BOTH, Jane Mari Corrêa¹, DIAS, Cícero², AVANCINI, César Augusto Marchionatti¹

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS- janeboth@gmail.com; cesar.avancini@ufrgs.br

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

The bacterium Staphylococcus aureus is species not specific, and potential pathogenicity, evolved mechanisms for antimicrobial resistance. The S. aureus methicillin resistant (MRSA) are involved in nosocomial infections (HA-MRSA), infections in community-acquired (CA-MRSA), in companion animals and food producing animals (LA-MRSA). In order to control the transmission, and the use of antibiotics, the action on the causative agents, sources of contamination, requires attention, being decisive and critical the choice of disinfectants and antiseptics. The aim of this study was to evaluate the bactericidal activity on MRSA isolates, groups of chemicals sodium hypochlorite (HS), iodophor (I) and quaternary ammonium (QAC-cetyl trimethylammonium chloride), used routinely in nosocomial environments and production and animal health, as well as test the hypothesis possibility of cross-resistance between antibiotics and disinfectants chemical groups. For technical Suspension Test in Quantitative Evaluation of Bactericidal Activity of Disinfectants and Antiseptics Chemicals, using 21 MRSA isolates, we evaluated the bactericidal activity of four successive dilutions (factor 0.5) of disinfectants in contact times five minutes, 15 minutes and 30 minutes. The population density of the initial inoculum was 10⁷UFC/mL. It was observed that the comparison of disinfectants at concentrations HS 25 ppm, I 12.5 ppm and 125 ppm QAC, the contact time of five minutes were sufficient to inactivate all MRSA. Sodium hypochlorite, the iodine and the quaternary ammonium demonstrated bactericidal activity against MRSA isolates and the reference bacterium Staphylococcus aureus ATCC 6538. For the isolates resistant to beta-lactam antibiotics confronted no relationship was observed resistance with these chemical groups. The S. aureus ATCC 6538 is a suitable strain to evaluate the activity of disinfectants and antiseptics for use as a sanitary barrier against MRSA. It was concluded that, controlling for known factors that influence the effectiveness of disinfectants, sodium hypochlorite and iodophor the quaternary ammonium are suitable for controlling MRSA in the sources of infection in healthcare environments or in human health and animal production.

Keywords: antiseptic, bactericide, biocide, cross-resistance, disinfectant, MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é bactéria de importância no cenário das doenças transmissíveis devido à frequência em que aparece envolvido como agente causal de infecções (MESQUITA *et al.*, 2006), tanto no homem quanto em animais. O *Staphylococcus aureus* é bactéria espécie não específica (ACHA; SZIFRES, 2001). Cerca de 70% dos *S. aureus* isolados de infecções nosocomiais em hospitais brasileiros são meticilina resistentes (MRSA) e sua

importância se dá pelo fato de apresentar resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos) e freqüentemente às diversas outras classes de antimicrobianos (SOUZA; FIGUEIREDO, 2008). Este fato antes observado somente em hospitais (HA-MRSA) passou a ser detectado também na comunidade (CA-MRSA) (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005) e, recentemente animais de companhia e também animais para produção de alimentos (LA-MRSA) tem tido atenção como portadores e disseminadores de MRSA (KADLEC *et al.*, 2009).

Considerando-se as evidências de transferência horizontal de MRSA entre o homem e os animais e, a contaminação ambiental como fonte para a infecção, a higiene é uma importante medida de prevenção e controle (FACCIOLI-MARTINS; CUNHA, 2012). Para evitar ocorrência ou interromper a evolução de enfermidades infecto-contagiosas, o uso de um desinfetante capaz de agir sobre o agente causal quando em vida livre, no ambiente, é de fundamental importância (BOROWSKY *et al.*, 2006).

Porém, para uma adequada ação, deve-se levar em conta que a atividade do desinfetante pode ser afetada por diversas variáveis, como temperatura e tempo de contato do biocida, tipo de superfície, presença de matéria orgânica, a espécie, a densidade populacional do microrganismo e as características genótípicas das bactérias sobre as quais se quer agir (MAILLARD; MCDONNELL, 2012).

No entanto, o uso indiscriminado dos antibióticos e a pressão seletiva ambiental, produzida por biocidas (anti-sépticos, desinfetantes, conservantes e esterilizantes), tem gerado uma resposta de sobrevivência nos microrganismos (CABRERA; GÓMEZ; ZUÑIGA, 2007). consequência não só do uso terapêutico ou profilático dessas drogas em medicina e odontologia humanas, como também de seu emprego em medicina veterinária, na conservação de alimentos, no combate a elementos biológicos daninhos aos seres humanos e na engorda de animais destinados à alimentação (TAVARES, 2005).

Existem evidências do potencial de ocorrer resistência cruzada (*cross-resistência*), que é quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo, iniciando uma via comum de morte celular, ou compartilham uma rota comum de acesso a suas respectivas metas. A co-resistência ocorre quando os genes que especificam os fenótipos resistentes estão localizados em conjunto num elemento genético móvel, tal como um plasmídeo, transposon, ou integron. O resultado final é o mesmo: o desenvolvimento de resistência a um composto antibacteriano é acompanhado pelo aparecimento de resistência a outro composto. Ocorre ainda que, algumas bactérias podem desenvolver a tolerância, que é a competência genético-bioquímica de apenas diminuir o efeito bactericida do antimicrobiano, sem alterar seu efeito bacteriostático

(FREITAS, 1989; TAVARES, 2000; LEVY, 2002; CHAPMAN, 2003; GILBERT; MCBAIN, 2003; RUSSELL, 2003; SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS, 2009; KREWER *et al.*, 2012).

Ficou demonstrado em estudos que os genes *qac A, B, C e D*, que codificam efluxo multidroga em conjunto com os determinantes de resistência a antibióticos nos plasmídeos de multirresistência, estão amplamente distribuídos em isolados clínicos e de alimentos de *S. aureus* (BEUMER *et al.*, 2003).

Buscando instrumentalizar a escolha do desinfetante como barreira sanitária na prevenção ou controle de MRSA, nas fontes de contaminação, o objetivo deste trabalho foi avaliar/monitorar a atividade bactericida, bem como testar hipótese da possibilidade de relação de resistência entre grupos químicos antibióticos e desinfetantes, dos grupos químicos hipoclorito de sódio, iodofór e quaternário de amônio, os quais são utilizados rotineiramente em ambientes nosocomiais, nos de produção e saúde animal e nos de manipulação de alimentos de origem animal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolados MRSA

A bactéria de referência utilizada nos testes foi o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (BRITISH STANDARD INSTITUTION, 2006).

Utilizou-se 21 isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (CAIERÃO *et al.*, 2006).

Os isolados foram mantidos congelados (-20°C) em caldo de infusão cérebro e coração (BHI-OXOID®) e glicerol (na concentração de duas partes de BHI e uma parte do glicerol).

2.2 Reativação dos Isolados

Para reativação bacteriana, uma alíquota de 0,1 mL foi retirada, a partir das amostras congeladas, semeada em 3 mL de caldo BHI e incubada a 35°C, por 24 horas. O caldo foi semeado com alça de inoculação, por esgotamento, em placas de Ágar Baird-Parker (OXOID®), incubadas por 48 horas a 35°C, a fim de verificar a pureza da cultura e, se as colônias eram características de *Staphylococcus*: com coloração negra brilhante, forma arredondada, convexa,

com bordos regulares, circundadas por um halo branco e outro externo, maior e transparente. Uma colônia foi selecionada e inoculada por esgotamento em placa de TSA (OXOID®), incubada por 24 horas e a cultura utilizada imediatamente nos testes.

2.3 Desinfetantes

Foram testados três grupos químicos desinfetantes, cada um em quatro diluições sucessivas com fator de diluição constante de 0,5. O hipoclorito de sódio (HS) nas concentrações de 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm e 25 ppm, o iodofór (I) a 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm e 12,5 ppm e o quaternário de amônio (QAC) (cloreto de cetil trimetilamônio) 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm e 125 ppm. A diluição dos compostos químicos foi feita em água destilada estéril. Os produtos químicos desinfetantes testados possuíam laudos técnicos, confirmando as concentrações informadas. Para o hipoclorito de sódio foi verificada a concentração do cloro livre.

A escolha das concentrações iniciais dos desinfetantes foi baseada em referências de literatura sobre a ação dos grupos químicos em processos de higienização (RUTALA; WEBER, 2008; BRASIL, 2007, BRASIL, 2010). A utilização de quatro concentrações deveu-se a observações empíricas de erros de manipulação na diluição, resultando em subconcentrações, bem como ao fato da desinfecção ser procedimento executado após a limpeza, o que correntemente implica em rediluição devido à presença de água na superfície.

2.4 Caldo BHI com Neutralizador

O Caldo BHI foi preparado conforme indicação do fabricante. Antes da esterilização foram adicionados, para cada litro de caldo, 30g de polissorbato TWEEN 80 (Sinth®), 3 g de lecitina de soja (DELAWARE®) e 1 g de histidina (Sinth®) (BRITISH STANDARD INSTITUTION, 2006).

2.5 Teste da avaliação da atividade desinfetante dos grupos químicos sobre os isolados de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA)

Foi utilizado como referência o Teste de Suspensão Quantitativo para Avaliar Atividade Bactericida de Desinfetantes e Anti-sépticos Químicos (fase 1), conforme o protocolo do Comitê Europeu de Padronização BS EN 1040:2005 (BRITISH STANDARD, 2006 *op. cit.*).

Os microrganismos foram submetidos aos desinfetantes nos tempos de contato cinco, 15 e 30 minutos e em uma densidade populacional das suspensões bacterianas de aproximadamente 10^7 UFC/mL (padronizado por escala Mc Farland de 0,5).

Adicionou-se 1 mL da suspensão bacteriana a tubos de ensaio contendo 9 mL da solução desinfetante de cada diluição dos desinfetantes. 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 BHI com agentes neutralizadores, ficando em contato com o neutralizante por 5 minutos. Após, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada em placas de Baird Parker, por espalhamento em superfície, incubadas a 35°C por 48 horas. Foi observado se houve crescimento de colônias típicas e, se crescimento, contadas as colônias típicas, avaliando se ocorreu inativação ou redução da densidade populacional inicial do inóculo.

2.6 Tratamento estatístico

Devido à inexistência de variabilidade nos resultados, não houve necessidade dos resultados serem submetidos a tratamento estatístico analítico.

3 RESULTADOS

O *S. aureus* ATCC 6538, foi inativado pelos três desinfetantes nos primeiros cinco minutos de contato.

Na Tabela 1 pode ser observada a atividade bactericida dos desinfetantes frente aos 21 isolados MRSA.

Tabela 1 - Número de isolados MRSA inativados (n=21), por tempo de contato, frente a quatro concentrações desinfetantes hipoclorito de sódio (HS), iodofór (I) e quaternário de amônio (QAC- cloreto de cetil trimetilamônio).

CONCENTRAÇÃO DO DESINFETANTE	TEMPO DE CONTATO	HIPOCLORITO DE SÓDIO 200 ppm	IODOFÓR 100ppm	QAC (cloreto de cetil trimetilamônio) 1000 ppm
100 %	5min	21	21	21
	15min	21	21	21
	30min	21	21	21
50 %	5min	21	21	21
	15min	21	21	21
	30min	21	21	21
25 %	5min	21	21	21
	15min	21	21	21
	30min	21	21	21
12,5 %	5min	21	21	21
	15min	21	21	21
	30min	21	21	21

Fonte: o próprio autor

Observou-se que 100% dos isolados MRSA foram inativados pelos desinfetantes nas menores concentrações e tempo de contato.

4 DISCUSSÃO

O protocolo referenciado indica como bactéria padrão de confronto o *S.aureus* ATCC 6538. O resultado obtido evidencia que este microrganismo de referência é um adequado indicador na avaliação de desinfetantes e anti-sépticos a serem utilizados como barreira sanitária frente aos MRSA. A escolha do método para avaliação da atividade dos desinfetantes deu-se em função da legislação brasileira para o tema (BRASIL, 2007), que informa que os produtos com ação antimicrobiana poderão comprovar sua eficácia mediante dois protocolos adotados, entre eles o do CEN - Comitê Europeu de Padronização. O protocolo que descreve a técnica determina que para ser demonstrada a eficácia do antimicrobiano é necessária a redução da densidade populacional do inóculo em, no mínimo, cinco unidades logarítmicas após tempo de contato com o desinfetante. Diante da constatação de que os três compostos químicos cumpriram esse requisito, tendo inativado todos os inóculos nas menores

concentrações e tempo de contato confrontados, pode-se então, considerá-los como adequados para prevenção ou controle dos MRSA.

Resultados semelhantes, aos aqui apresentados, foram observados por Svidzinski *et al.* (2007), ao submeterem uma amostra MRSA isolada de um caso de infecção hospitalar a diversas diluições do hipoclorito de sódio (9.000 ppm a 0,09 ppm), obtendo inativação dessa bactéria com até 9 ppm, em 5 minutos e, também por Miyazaki (2006) ao submeter 74 isolados MRSA (79,73% deles com gene *qacA/B*) ao composto quaternário de amônio (cloreto de benzalcônio), nas concentrações de 2000 ppm e 1600 ppm, observando que todos foram inativados.

Para testar a ação de desinfetantes, Smith, Gemmell e Hunter (2008)) expuseram 94 isolados clínicos de *S. aureus* (HA-MRSA, CA-MRSA, MSSA, VISA) à desinfetantes contendo quaternário de amônio (cloreto de alquil dimetil benzil amônio e didecil cloreto de dimetil amônio), na concentração recomendada pelo fabricante e em concentrações sub-inibitórias. Todos os isolados apresentaram concentração bactericida mínima (MCB)10-1000 vezes mais baixa do que as concentrações recomendadas pelos fabricantes. Seus resultados mostraram, assim como os obtidos em nossa avaliação, que antimicrobianos comumente usados em ambientes hospitalares podem ser efetivos contra isolados clínicos MRSA. Porém deve-se considerar a questão das concentrações recomendadas pelo fabricante.

Guimarães *et al.* (2000), usando técnica da AOAC, observaram inativação das 5 amostras de MRSA, bem como a cepa padrão *S. aureus* ATCC 6538 confrontadas com o hipoclorito de sódio (1000 ppm). No entanto, quando confrontadas com o cloreto de benzalcônio a 950 ppm (também um quaternário de amônio), a atividade bactericida foi variada tanto frente aos isolados, quanto frente à bactéria de referência, pois três isolados MRSA e o *S. aureus* ATCC 6538 mostraram-se resistentes, o que parcialmente diferencia do resultado aqui obtido, onde todos os isolados MRSA e a bactéria de referência foram inativados, com igual concentração e tempo de contato.

Reynaldo *et al.* (2004) quando avaliaram como isolados hospitalares de estafilococos sensíveis e resistentes à metilina e o *S. aureus* ATCC 6538 respondem à ação de desinfetantes, encontraram susceptibilidade na maioria dos microrganismos, porém observaram que as concentrações necessárias de hipoclorito de sódio (12,5 ppm) e cloreto de benzalcônio (40 ppm) para inativar a bactéria de referência foram bem menores, enquanto que a concentração da iodopovidona (62,5 ppm) foi equivalente para os microrganismos testados. Os resultados, mesmo em parte divergentes dos encontrados na pesquisa aqui apresentada, reforçam a escolha do *S. aureus* ATCC 6538, como referência na avaliação da atividade de biocidas.

Buscando evidências científicas de ocorrência da co-resistência e da resistência cruzada entre os desinfetantes e os medicamentos antimicrobianos, a revisão dos trabalhos de Svidzinski *et al.* (2007), Miyazaki (2006), Smith, Gemmell e Hunter (2008), Guimarães *et al.* (2000) e Reynaldo *et al.*(2004) mostraram que, mesmo encontrando diferenças de respostas dos microrganismos, frente aos biocidas, não encontraram relação de resistência entre os três grupos químicos desinfetantes e os antibióticos, para os microrganismos confrontados, bem como a pesquisa aqui apresentada também não encontrou essa relação de resistência entre os desinfetantes testados e os isolados beta-lactâmicos resistentes.

No entanto, deve-se chamar atenção para o fato de que Miyazaki (2006) e Smith, Gemmell e Hunter (2008) em suas pesquisas não observaram essa relação de associação de resistência, especificamente para o quaternário de amônio, porém detectaram genes *qac* em alguns isolados MRSA, sendo que a presença desse gene de resistência aos compostos quaternários de amônio pode significar que esses microrganismos possuem um grande potencial para sobreviver no ambiente, expostos à pressão seletiva dos antimicrobianos. Então, com a crescente preocupação sobre o desenvolvimento de resistência a desinfetantes e à resistência cruzada com antibióticos, faz-se necessário que os isolados clínicos estejam sob vigilância contínua, bem como os possíveis mecanismos associados (GUIMARÃES *et al.*, 2000; BEUMER *et al.*, 2003).

5 CONCLUSÃO

O hipoclorito de sódio, o iodofór e o quaternário de amônio cloreto de cetil trimetilamônio demonstraram atividade bactericida sobre os isolados MRSA e sobre a bactéria de referência *S.aureus* ATCC 6538.

Nas condições dos isolados MRSA utilizados e no delineamento de confrontação adotado na pesquisa, não foi observada relação de resistência cruzada ou co-resistência com os desinfetantes testados.

O resultado evidencia que o *S.aureus* ATCC 6538 é uma cepa adequada na avaliação da atividade de desinfetantes e anti-sépticos a serem utilizados como barreira sanitária frente aos MRSA.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacteriosis and mycosis**. 3rd ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v. 1, n. 580. 395 p.

BEUMER, R. *et al.* **Biocide usage and antimicrobial resistance in home settings: an update: a review by the International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH)**. [S.l.]: IFH, 2003. Disponível em: <<http://www.ifh-homehygiene.org/best-practice-review/biocide-usage-and-antimicrobial-resistance-home-settings-update-2004>>. Acesso em: 7 out. 2011.

BOROWSKY, L. M. *et al.* Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1474-1479, set./out. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da resolução GMC n.50/06. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 mar. 2007, Seção 1, p. 29. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fded4db/RDC+14_2007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 mar. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: ANVISA, 2010. 120 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

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, 2006.

CABRERA, C. E.; GÓMEZ, R. F.; ZUÑIGA, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfetantes una manifestación de los mecanismos de supervivência y adaptacion. **Colombia Médica**, Cali, v.38, n.2, p.149-158, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf/rc07034>>. Acesso em: 2 out. 2009.

CAIERÃO, J. *et al.* Decrease in the incidence of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in carriers from an intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 34, n. 1, p. 6-9, Feb. 2006.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 271-276, June 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830503000441>>. Acesso em 2 out. 2009.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; CUNHA, M. L. R. S. MRSA epidemiology in animals. *In*: CUNHA, M. L. R. S. (Ed.). **Epidemiology insights**. Rijcka: In Tech, 2012. p. 79-94. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/epidemiology-insights/mrsa-epidemiology-in-animals>>. Acesso em: 2 nov. 2012.

- FREITAS, C. C. O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos. **DST Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 103-108. out./dez. 1989.
- GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 2, p. 189-208, Apr. 2003.
- GUIMARÃES, M. A. *et al.* Desinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, July/Sept. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v31n3/v31n3a08.pdf>>. Acesso em: 9 set. 2009.
- KADLEC, K. *et al.* Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 1156-1164, Dec. 2009.
- KREWER, C. C. *et al.* Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31, n. 11, p. 1116-1120, Nov. 2012.
- LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 65S-71S, May 2002. Supplement S1.
- MAILLARD, J. Y.; MCDONNELL, G. Selection and use of disinfectants. **In Practice**, London, v. 34, n. 4, p. 292-299, May 2012.
- MESQUITA, M. O. *et al.* Microbiological quality in the roast chicken process in nutritional and nourishment unit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 198-203, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100031&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 30 out. 2006.
- MIYAZAKI, N. H. T. **Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- REYNALDO, M. B. *et al.* Eficacia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 16, n. 3, p. 187-192, set. 2004.
- RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, n. 2, p. 794-803, Dec. 2003.
- RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities**. Chapel Hill: Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. 158 p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2009.

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. 87 p. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf>. Acesso em: 11 out. 2011.

SMITH, K.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of qac genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 61, n. 1, p. 78-84, Jan. 2008.

SOUZA, L. B. G; FIGUEIREDO, B. B. 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**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 27-36, jan./abr. 2005.

SVIDZINSKI, A. E. *et al.* Eficiência do ácido peracético no controle de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Maringá, v. 6, n. 3, p. 312-318, jul./set. 2007.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 281-301, maio/jun. 2000.

TAVARES, W. Bactérias multirresistentes: problema mundial. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 7-9, out./dez. 2005.

5 ARTIGO 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DECOCTO E DO EXTRATO HIDROETANÓLICO HIDRATADO DE *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - ASTERACEAE (“MACELA”) FRENTE A *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTES (MRSA)

BOTH, Jane Mari Corrêa¹; DIAS, Cícero²; SPANIOL, Bárbara; PETROVICK, Pedro Ros; AVANCINI, César Augusto Marchionatti¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Veterinária- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS- janeboth@gmail.com; cesar.avancini@ufrgs.br

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- UFCSPA

³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é bactéria espécie não específica que, além de potencial patogenicidade, evoluiu em mecanismos de resistência a antimicrobianos, tendo o *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA), antes restrito às infecções nosocomiais, disseminando-se na comunidade, entre animais de companhia e nos para produção de alimentos. Na conduta para o controle da sua transmissão, além do uso de antibióticos, a ação sobre os agentes causais, ao nível de fonte de infecção, por meio de desinfetantes e anti-sépticos, exige atenção. A busca por recursos frente a agentes patogênicos resistentes a antimicrobianos convencionais, bem como a demanda por insumos sanitários aplicáveis em modelos sustentáveis de produção agropecuária, motivam a investigação de extrações vegetais como insumo sanitário. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de duas formas de extração da *Achyrocline satureioides* ("macela"), planta considerada medicinal de uso popular e tradicional, nativa na região sul do Brasil, sobre cepa de referência de *S. aureus* e isolados MRSA. A técnica foi o Teste de Suspensão de Avaliação Quantitativa da Atividade Bactericida de Desinfetantes e Antissépticos Químicos. Com o decocto foram confrontados 51 isolados, nos tempos de contato de uma, oito e 24 horas. Vinte e um deles também foram confrontados com o extrato hidroetanólico hidratado (EH), obtido por maceração hidroetanólica 70 °GL, desalcoolizada e hidratada ao volume inicial, nos tempos de contato de cinco e 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas. A proporção da planta foi de 5 g:100 mL de solvente e a densidade populacional inicial dos inóculos foi de 10⁷, 10⁶ e 10⁵ UFC/mL. Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi detectada a presença dos marcadores fitoquímicos quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. As extrações de *Achyrocline satureioides* promoveram ação bactericida frente a todos os 51 isolados MRSA testados e, também frente ao microrganismo de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O EH promoveu a inativação dos isolados MRSA e do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em menor tempo de contato do que o decocto. Tomando como exemplo uma hora de contato, na maior densidade do inóculo, 19% dos isolados estavam inativados, enquanto que no decocto não foi observada inativação. Em quatro horas de contato com o EH 85,7% dos isolados, na maior densidade desafio, estavam inativados e 100% dos isolados sofreram redução da densidade populacional. O decocto demonstrou maior atividade bactericida entre 8 h e 24 horas, inativando 100% dos isolados até as 24 h. As evidências observadas neste estudo sugerem potencial uso das soluções, diretamente nas formas avaliadas ou em formulações, como bactericidas em procedimentos de higiene, tanto nas fontes de infecção de ambientes de saúde humana, quanto nos de saúde e produção animal.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, anti-séptico, biocida, bactericida, desinfetantes, MRSA, *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND THE DECOCTION OF THE HYDROETHANOLIC EXTRACT HYDRATED OF *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (ASTERACEAE) ("macela") AGAINST TO METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA)

BOTH, Jane Mari Corrêa¹; DIAS, Cícero²; SPANIOL, Bárbara³; PETROVICK, Pedro Ros³; AVANCINI, César Augusto Marchionatti¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Veterinária- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS- janeboth@gmail.com; cesar.avancini@ufrgs.br

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- UFCSPA

³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

The bacterium Staphylococcus aureus is species not specific, and potential pathogenic mechanisms evolved in antimicrobial resistance and the S. aureus methicillin resistant (MRSA), once restricted to nosocomial infections in the community disseminated among companion animals and food producing. In order to control its transmission, and the use of antibiotics, the action on the causative agents, the level of transmission by disinfectants and antiseptics, demands attention. The search for resources against pathogens resistant to conventional antibiotics, as well as the demand for health inputs applicable in sustainable production agriculture, motivating the investigation of plant extracts as input sanitary. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of two forms of extraction of Achyrocline satureioides ("macela"), considered a medicinal plant with a popular and traditional use, native from southern Brazil, on reference strain of S. aureus and MRSA isolates. The technique was the Test Suspension of Quantitative Evaluation of Bactericidal Activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics. We were confronted with the decoction, the contact time of one, eight and 24 hours, 51 isolates. Twenty-one subjects were also confronted with the hydroethanolic extract hydrate (EH) obtained by maceration hydroethanol 70 ° GL, de-alcoholised and hydrated to the original volume, the contact time of 5:30 minutes, one, two, three and four hours. The proportion of the plant was 5 g: 100 mL of solvent and the initial population densities of the inocula were 10⁷, 10⁶ and 10⁵ CFU / mL. By High performance liquid chromatography (HPLC) was detected marker phytochemicals quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin. The extractions of A. satureioides promoted bactericidal activity against all 51 MRSA isolates tested and also against the reference microorganism Staphylococcus aureus ATCC 6538. The EH promoted the inactivation of the isolated MRSA and Staphylococcus aureus ATCC 6538 in less contact time than the decoction. Taking the example 1 h of contact, the largest density of inoculum, 19% of the isolates were inactive, whereas the decoction was not observed inactivation. In four hours of contact with the EH 85.7% of isolates in higher density challenge, were inactivated and 100% of isolates were reduced population density. The decoction showed greater bactericidal activity between 8 and 24 hours, inactivating 100% of isolates until 24 h. Evidence observed in this study suggests the potential use of solutions, directly into forms or formulations evaluated as bactericides in hygiene procedures, both in the

sources of infection of environments on human health as health and animal production.

Keywords: *Achyrocline satureioides, antiseptic, biocide, bactericide, disinfectant, MRSA, methicillin-resistant Staphylococcus aureus.*

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é bactéria espécie não específica (ACHA; SZIFRES, 2001), considerada importante no cenário das doenças transmissíveis devido a frequência em que aparece envolvido como agente causal de infecções (MESQUITA *et al.*, 2006), tanto no homem quanto em animais. Cerca de 70% dos *Staphylococcus aureus* isolados de infecções nosocomiais em hospitais brasileiros são meticilina resistentes (MRSA) e sua relevância se dá pelo fato de apresentar resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos) e, frequentemente, a diversas outras classes de antimicrobianos (SOUZA; FIGUEIREDO, 2008). A transmissão dessa bactéria era observada somente em hospitais, mas agora pode ser detectada na comunidade (CA-MRSA) (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005). Recentemente animais de companhia e também animais para produção de alimentos (LA-MRSA) tem tido atenção como portadores e disseminadores de MRSA (KADLEC *et al.*, 2009), podendo contribuir significativamente na contaminação de cadeias alimentares. Certos clones de MRSA dispersaram-se entre os seres humanos e de humanos para animais, mantendo o ciclo das enfermidades transmissíveis comuns entre humanos e animais (ACHA; SZYFRES, 2001; HUNTER *et al.*, 2010).

O uso indiscriminado dos antibióticos e a pressão seletiva ambiental, produzida por biocidas (anti-sépticos, desinfetantes, conservantes e esterilizantes) tem gerado uma resposta de sobrevivência nos microrganismos (CABRERA; GÓMEZ; ZUÑIGA, 2007), consequência não só do uso terapêutico ou profilático desses fármacos em medicina e odontologia humanas, como também de seu emprego em medicina veterinária, na conservação de alimentos, no combate a elementos biológicos daninhos aos seres humanos e na engorda de animais destinados à alimentação (TAVARES, 2005).

Alguns mecanismos de resistência são comuns a ambos, biocidas e antibióticos, e o estresse seletivo exercido pelos biocidas podem favorecer bactérias a expressar mecanismos de resistência e sua disseminação, proporcionando condições que poderiam criar um risco potencial de desenvolvimento de resistência cruzada entre os antibióticos e biocidas (SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS, 2009), o que segundo Huet *et al.* (2008), pode estar fazendo com que a potencialmente

patogênica bactéria *Staphylococcus aureus* torne-se mais resistente à ação de antibióticos.

Extratos aquosos de plantas, sob a forma de infusos ou decoctos, têm sido usados desde os tempos antigos como remédios em muitas doenças humanas e animais e, a utilização de plantas medicinais está em contínua expansão mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitoterápicos como importantes alternativas terapêuticas (SOUZA; LIONZO; PETROVICK, 2006; GONZÁLEZ; MARIOLE, 2010).

Existe a necessidade de encontrar compostos e/ou métodos para obter um arsenal contra o MRSA, pois devido a sua natureza resistente, o tratamento com antibióticos convencionais não assegura resultado clínico desejado e as doenças por ele causadas são de grande impacto tanto na saúde humana, quanto animal.

A busca por recursos frente à emergência de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas e aos desinfetantes, uma vez que esses patógenos podem determinar graves infecções no homem e nos animais, a demanda por insumos sanitários aplicáveis em modelos sustentáveis de produção agropecuária e o custo dos produtos químicos sintéticos, motivam a investigação de extrações vegetais que apresentem atividade antimicrobiana como insumo sanitário.

A Organização Mundial de Saúde estimula os países para que estudem e explorem aspectos da medicina tradicional e popular que possam fornecer práticas e medicamentos eficazes e seguros. O Brasil, através da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, também que estimula estudos com plantas medicinais e fitoterápicos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2002; BRASIL, 2006).

Com base em resultados de pesquisa etnográfica e de estudos científicos, a *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) conhecida popularmente como “macela” ou “marcela”, planta nativa na região sul do Brasil, com ocorrência em quase todo o Brasil assim como na América Latina, considerada medicinal, foi escolhida para investigação quanto ao seu potencial antibacteriano (LE MOS *et al.*, 2000; FERNANDEZ *et al.*, 2003; AVANCINI *et al.*, 2006; TRESOLDI; OLIVEIRA; AVANCINI, 2006; AVANCINI; WIEST, 2008; MOTA, 2008; SPEROTTO *et al.*, 2012).

Investigações científicas constataram ação antiinflamatória, antiespasmódica, analgésica e sedativa dos extratos das inflorescências, das folhas e caules. Mostraram também que os extratos testados não apresentaram toxicidade excessiva. Análises fitoquímicas informaram a presença de flavonóides nos extratos polares desta planta, sendo a eles atribuídos a causa de

muitos dos relatos de atividade biológica (SIMÕES *et al.*, 1989; FERRARO *et al.*, 2008; GRASSI-ZAMPIERON; VIEIRA; SIQUEIRA, 2009).

Tomando como referência esses trabalhos, desenvolveu-se o projeto com o objetivo submeter o decocto e o extrato hidroetanólico hidratado (EH) de *Achyrocline satureioides* a teste padrão para avaliação quantitativa da atividade bactericida de desinfetantes e anti-sépticos, a fim de avaliar a atividade antibacteriana do decocto e do extrato hidroetanólico hidratado (EH) frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e a isolados *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Os isolados de *Staphylococcus aureus* Metilina Resistentes (MRSA)

Foram utilizados isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (CAIERÃO *et al.*, 2006).

Os isolados foram armazenados congelados (-20°C) em caldo de infusão cérebro e coração BHI (OXOID®) e glicerol estéril (na proporção de duas partes de caldo com crescimento da amostra e uma parte do glicerol).

Utilizou-se 51 isolados nos experimentos com o decocto e, após testes piloto de verificação da atividade bactericida do extrato hidroetanólico hidratado (EH) sobre os isolados da bacterioteca MRSA, selecionou-se amostra significativa de 21 isolados (precisão de 0,1 e nível de confiança de 95%) para representar a população na confrontação com o EH.

O microrganismo de referência utilizado nos testes foi o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2.3 Reativação dos isolados de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA)

Os isolados MRSA, armazenados a -20°C, foram reativados, transferindo-se 0,1 mL destas culturas, para 3 mL de caldo BHI e incubados a 35°C por 24 h. Retirou-se alíquotas do caldo com crescimento, utilizando alça de inoculação descartável, para semeadura por esgotamento em placas de Ágar Baird-Parker (OXOID®), que foram incubadas a 35°C por 24/48h. Verificada a pureza da cultura, uma colônia foi inoculada por esgotamento em placa de TSA (OXOID®) e incubada por 24 h para ser utilizada nos testes. O processo foi repetido para

cada isolado, utilizado imediatamente à reativação.

2.4 Amostra vegetal

A *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – ASTERACEAE foi adquirida de um único fornecedor/agricultor, obtida por cultivo em sistema de permacultura. A amostra foi identificada e depositada no acervo do Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS, sob o registro ICN n° 164964.

As partes utilizadas do vegetal foram os capítulos florais.

2.5 Padronização do inóculo para os testes

A densidade populacional inicial do inóculo usado nos testes 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) (BRITISH STANDARD INSTITUTION, 2005). Nos testes foram utilizadas três diluições logarítmicas do inóculo: 10^7 UFC/mL, 10^6 UFC/mL e 10^5 UFC/mL.

2.6 Extrações vegetais- decocto e extrato hidroetanólico hidratado (EH)

Para obtenção das extrações vegetais usou-se a proporção de 5g das inflorescências para 100 mL de solvente na proporção peso da planta e volume do solvente (p:v).

As extrações foram preparadas tendo como referência a Farmacopéia... (1959), com modificações (AVANCINI, 2002). A decocção procedeu-se em frasco Erlenmeyer, com capacidade para 1 L, em fogo brando, durante 15 minutos, contados a partir do início da fervura, tendo a boca do frasco fechada com uma placa de Petri. Após o tempo de cocção, o decocto foi arrefecido em temperatura ambiente acerca de 40°C e, transferido para outro frasco estéril por filtração em funil de vidro e filtro de papel, estéreis. Verificou-se o volume do decocto recuperado e acrescentou-se água destilada estéril até obter o volume de 100 mL. O decocto foi preparado imediatamente antes do uso nos testes.

O extrato hidroetanólico hidratado (EH) foi obtido por extração hidroetanólica, macerando as inflorescências por 15 dias na solução hidroetanólica álcool etílico 70° GL, em frasco de vidro fechado com tampa de rosca, mantido no escuro, agitando uma vez ao dia. Após filtração, o produto foi submetido à evaporação com pressão reduzida, em banho-maria, na

temperatura de 60°C, em evaporador rotativo, desprezando-se a porção alcoólica extraída e adicionando-se água destilada estéril até completar o volume inicial.

A solução hidroetanólica 70°GL foi preparada usando 736,84 mL da solução hidroetanólica concentrada 95°GL, diluída com água destilada estéril até completar 1L, em balão volumétrico calibrado.

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

2.7 Análise fitoquímica

A análise fitoquímica do decocto da *Achyrocline satureioides*, foi realizada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

A quercetina (Sigma Aldrich) e a luteolina (Alfa Aesar) 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 (BICA, 2009).

2.8 Caldo BHI com Neutralizador

O Caldo BHI foi preparado conforme indicação do fabricante. Antes da esterilização foram adicionados, para cada litro de caldo, 30g de polissorbato TWEEN 80 (Sinth®), 3 g de lecitina de soja (DELAWARE®) e 1 g de histidina (Sinth®) (BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 2006).

2.9 Teste de avaliação da atividade bactericida

Foi utilizado como referência o Teste de Suspensão Quantitativo para Avaliar Atividade Bactericida de Desinfetantes e Anti-sépticos Químicos (fase 1), conforme o protocolo do Comitê Europeu de Padronização (CEN) BS EN 1040:2005 (BRITISH STANDARDS INSTITUTION 2006).

Utilizou-se inóculos com a densidade populacional inicial de 10⁷UFC/mL, 10⁶UFC/mL e 10⁵UFC/mL.

Os microrganismos foram submetidos ao decocto nos tempos de contato de uma hora, oito horas e 24 horas e ao EH nos tempos de cinco minutos, 30 minutos, uma hora, duas horas,

três horas e quatro horas.

Adicionou-se 1 mL da suspensão bacteriana a tubos de ensaio contendo 9 mL da extração.

Após o tempo 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 BHI com agentes neutralizadores, ficando em contato com o neutralizador por cinco minutos. Após retirou-se uma alíquota de 0,1 mL que foi inoculada em placas de Baird Parker, por espalhamento em superfície, incubadas a 35°C por 48 horas. 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.

2.11 Análise Estatística

As frequências relativas referentes à atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* e do EH na redução logarítmica e inativação dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) foram analisadas por estatística descritiva e a comparação entre o desempenho do decocto de *Achyrocline satureioides* e do EH foi avaliada no tempo de ação 1 hora 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.

3 RESULTADOS

A análise fitoquímica da extração vegetal da *Achyrocline satureioides*, obtido por decocção, detectou os flavonóides quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercitina presentes na solução extrativa aquosa de *Achyrocline satureioides*

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)

Fonte: o próprio autor

O decocto demonstrou atividade bactericida sobre a bactéria de referência, o *S.aureus* ATCC 6538. Na leitura do resultado das 24 horas de contato, o microrganismo estava inativado, sendo que na primeira hora de contato observou-se redução de uma unidade logarítmica, nas três densidades iniciais do inóculo e, na leitura das 8 horas de contato, na densidade inicial de 10^4 UFC/mL o microrganismo estava inativado.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da atividade bactericida do decocto, frente aos 51 isolados MRSA. Os resultados demonstraram que o decocto da *Achyrocline satureioides* teve atividade bactericida frente a todos os isolados MRSA testados.

Pode-se observar que na densidade 10^6 UFC/mL a ação do decocto foi observada em três isolados após 8 horas de contato e, que no tempo de uma hora nenhum isolado havia sido inativado. Nas densidades inferiores (10^5 UFC/mL e 10^4 UFC/mL) a partir de uma hora já havia ocorrido inativação de alguns isolados (1 e 2, respectivamente). No tempo máximo avaliado (24 horas), 100% das cepas testadas (n=51) haviam sido inativadas. Com oito horas de contato 70% dos isolados na menor densidade inicial estavam inativados e na densidade 10^5 UFC/mL, 43% dos inóculos.

Tabela 2 – Número e percentual de isolados (N=51) MRSA que sofreram redução logarítmica, em diferentes densidades populacionais iniciais e nos diferentes tempos de contato, quando confrontados com o decocto de *Achyrocline satureioides* DC, na proporção de 5g: 100mL

Densidade Inicial	Redução Logarítmica	1h		8h		24h	
		Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr
10⁶ UFC/mL n= 51	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	94,10%
10⁵ UFC/mL n= 51	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	56,80%
10⁴ UFC/mL n= 51	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	29,40%

Fa= Frequência absoluta Fr= Frequência relativa

Fonte: o próprio autor

A atividade bactericida do EH sobre os 21 isolados MRSA está demonstrada na Tabela 3. Os resultados mostram que o EH da *A. satureioides* apresentou atividade bactericida frente aos 21 isolados MRSA testados.

No tempo de contato de 30 minutos já foi observada atividade do EH sobre os isolados MRSA, 14%. Pode-se observar que após duas horas de contato com o EH, mais de 57 % das cepas de MRSA na densidade de 10⁶ UFC/mL haviam sido inativadas. À medida que uma densidade menor do inóculo foi testada, a atividade bactericida ultrapassou 80% e, na menor

densidade populacional mais de 90%. Na leitura das quatro horas de contato, todos os isolados estavam inativados.

O extrato hidroetanólico hidratado (EH) demonstrou atividade bactericida sobre a bactéria de referência, o *S.aureus* ATCC 6538. Na leitura de três horas de contato o microrganismo estava inativado, em todas as densidades do inóculo. Nos primeiros 30 minutos observou-se redução de um logaritmo no inóculo de 10^4 UFC/mL. Na leitura do tempo de contato de uma e duas horas, a redução foi de três e quatro logaritmos respectivamente nas três densidades do inóculo.

Tabela 3 - Número e percentual de isolados (N=21) MRSA que sofreram redução logarítmica, em diferentes densidades populacionais iniciais e nos diferentes tempos de contato, quando confrontados com o Extrato Hidroetanólico Hidratado (EH) de *Achyrocline satureioides* DC, na proporção de 5g: 100mL

Densidade Inicial	Redução Logarítmica	5min		30min		1h		2h		3h		4h	
		Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr
10⁶ UFC/mL n=21	sem redução	14	66,70%	5	23,80%	4	19,00%	1	4,80%	1	4,80%	0	0,00%
	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
10⁵ UFC/mL n= 21	sem redução	9	42,80%	2	9,50%	1	4,80%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	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%
10⁴ UFC/mL n= 21	sem redução	1	4,80%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	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%

Fa= Frequência absoluta Fr= Frequência relativa

Fonte: o próprio autor

Na comparação da ação dos extratos no tempo de contato de uma hora foi aplicado o teste qui-quadrado. O resultado obtido na análise foi significativo, ou seja, as frequências observadas diferem das esperadas, o que indica que o EH foi mais ativo do que o decocto no período de ação de uma hora para inativar os isolados MRSA analisados, em todas as densidades do inóculo testadas ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A avaliação fitoquímica detectando presença de flavonóides e, a identificação pelo Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS, foi importante para conferir a identidade e qualidade da amostra vegetal e do decocto, sendo que estes flavonóides são componentes majoritários das sumidades floridas, aos quais se atribui grande parte das atividades farmacológicas (FARMACOPÉIA..., 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A escolha do método de suspensão quantitativo do CEN - Comitê Europeu de Padronização para avaliar a atividade antimicrobiana do decocto e do EH da *A. satureioides*, deu-se em função da sua capacidade de proporcionar um maior número de informações sobre a sua atividade, não apenas desinfetante, mas qualquer atividade antimicrobiana, como a bacteriostasia.

O protocolo utilizado indica como bactéria padrão de confronto o *S.aureus* ATCC 6538 para avaliar a atividade antibacteriana de desinfetantes e anti-sépticos. Considerando que a atividade bactericida do decocto e do EH, frente à bactéria de referência foi semelhante à promovida frente aos isolados MRSA testados, evidencia que é um adequado indicador na avaliação das extrações vegetais da *A. satureioides* a serem utilizadas como barreira sanitária frente aos MRSA.

Joray *et al.* (2011) também em busca de compostos com capacidade de inibir agentes causadores de doenças, observaram que o extrato hidroetanólico da *Achyrocline satureioides* foi o que apresentou maior atividade frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, atividade comparada com a dos antibióticos comerciais testados eritomicina e gentamicina.

Utilizando técnicas diferentes Gravino *et al.* (2005), Fisch *et al.* (2005), Tresoldi, Oliveira e Avancini (2006), Oliveira, Both e Avancini (2011) e Oliveira, Both e Avancini (2012) em seus experimentos observaram atividade bactericida do decocto frente ao *S.aureus* ATCC 6538 semelhantes aos aqui apresentados. Quanto à atividade do EH, Mota, Carvalho e Wiest (2011), utilizando técnica do sistema dos tubos múltiplos e o *S.aureus* ATCC 25923 obtiveram resultados semelhantes sobre a atividade bactericida da extração da *A. satureioides*.

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 das extrações vegetais. Os neutralizantes têm a função de inativar resíduos da substância antimicrobiana, após a exposição do inóculo. São frequentemente usados em testes de verificação de eficácia de desinfetantes. Como não são padronizados neutralizadores específicos para soluções da *Achyrocline satureioides*, foram mantidos os indicados no protocolo, que correspondem aos mesmos utilizados no trabalho de Mota (2008) e Sperotto *et al.* (2012), que constataram interferência na atividade antimicrobiana do decocto da *Achyrocline satureioides*.

A proporção usada da *A. satureioides* de 5 g:100 mL teve como referência a pesquisa de Sperotto *et al.* (2012), onde não observaram diferença na atividade do decocto sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizando as proporções da matéria vegetal 5g:100mL, 6,5g:100mL e 7, 5 g:100 mL, obtendo inativação em 24 horas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Calvo *et al.* (2006) quando avaliaram a atividade antimicrobiana do decocto da *Achyrocline satureioides*, usando a proporção do vegetal de 5g:100 mL, frente à 20 amostras de estafilococos coagulase positivos isolados de pacientes com acne e de material clínico. Observaram a atividade antibacteriana sobre 95% dos isolados.

O decocto inativou 100% dos isolados MRSA em 24 horas nas três densidades iniciais do inóculo, no entanto deve-se observar que a densidade populacional inicial deve ser considerada, pois quanto menor a densidade inicial, um maior número de isolados foi inativado. Nas densidades iniciais menores, de 10^5 e 10^4 UFC/mL, a atividade de inativação da extração pode ser observada no tempo de contato de uma hora.

Ao avaliar a variável tempo de contato, observa-se que à medida que o tempo de contato foi maior, um maior número de isolados foi inativado, o que também foi observado por Sperotto *et al.* (2012), utilizando o *S.aureus* ATCC 25923 e amostras de *S.aureus* isoladas em situações-problema sanitários, obteve inativação de 80% dos inóculos em 24 horas, enquanto que em uma hora dos 15 isolados, um foi inativado.

Se levarmos em consideração as duas variáveis, tempo de contato e densidade inicial do inóculo, observando os resultados expressos na Tabela 2, podemos concluir que quanto menor a densidade inicial e maior o tempo de contato, maior o número de isolados foram inativados, como por exemplo, na leitura das oito horas de contato, na densidade inicial de 10^6 UFC/mL, três isolados estavam inativados, no entanto na densidade de 10^4 UFC/mL, foram 38 isolados.

Para melhor avaliar a atividade bactericida da *A. saturoioides* devem-se considerar as variáveis: tempo e densidade do inóculo, pois observando a Tabela 3, pode-se ver que é significativa a interferência destas. Quando avaliada a atividade do extrato hidroetanólico hidratado (EH), podemos observar que na menor densidade inicial do inóculo, nos 30 minutos de contato, 14% dos isolados estavam inativados, porém, na densidade inicial de 10^6 UFC/mL, foi necessária uma hora para inativar 19% dos isolados, demonstrando que a quanto menor a densidade do inóculo, mais rápida a ação bactericida do EH. Resultados semelhantes foram encontrados por Mota, Carvalho e Wiest (2011), que mesmo utilizando outro delineamento de pesquisa, confrontando o *S.aureus* ATCC 25923 em quatro tempos de contato, observou que o quanto maior o tempo de contato, maior atividade bactericida.

Ao analisar a Tabela 2 e a Tabela 3 é possível verificar que quanto maior a densidade inicial bacteriana, maior o tempo necessário para iniciar o processo de inativação, independente da forma de extração.

Comparando os resultados da Tabela 2 com os da Tabela 3, pode-se observar que a atividade do EH foi mais precoce, quando comparado ao decocto, em todas as densidades testadas, apesar dos tempos avaliados distintos dos utilizados para avaliar a atividade bactericida.

Quando comparados resultados de avaliação da atividade de diferentes extrações de *A. saturoioides*, frente a organismo de referência, se bem que diferente do usado no presente trabalho, ficou demonstrado que a forma de extração deve ser levada em consideração quanto à ação sobre o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Quando comparados, a ação de hidroalcoólatura (MOTA; CARVALHO; WIEST, 2011), extratos alcoólicos (ASOLINE *et al.*, 2006), maceração hidroalcoólica (AVANCINI; WIEST, 2008) e hidro-alcoólatura (WIEST *et al.*, 2009), apresentaram maior atividade bactericida se comparados ao decocto.

A diferença de atividade das extrações pode ser explicada por alguns estudos indicando que os efeitos biológicos da *Achyrocline saturoioides* dependem da metodologia usada para a extração. Alguns meios extrativos, como o etanol, aumentam o rendimento da extração de compostos aos quais são atribuídas diversas propriedades farmacológicas (LEMOS *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001). Na decocção, substâncias ativas podem ser alteradas por um aquecimento prolongado. Entretanto, o decocto foi uma das formas de extração escolhida por ser considerada uma solução estéril (após os 15 minutos de fervura), por seu preparo ser rápido, simples e de baixo custo, sendo assim, considerada acessível a diferentes classes da população. O etanol também se apresenta mais próximo do acesso popular, de fácil preparo e menor toxicidade à manipulação e ao uso dos extratos (SIMÕES; RECH; LAPA, 1986;

FALKENBERG *et al.*, 2010; SOUZA; LIONZO; PETROVICK, 2006; ALVARENGA *et al.*, 2007; SCHUCH *et al.*, 2008).

Anesini e Perez (1993), em uma triagem de plantas utilizadas na medicina popular da Argentina, usando extratos em meio aquoso, com outra técnica, constataram a atividade antimicrobiana da *Achyrocline satureioides* sobre *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina G. A atividade antibacteriana apresentada foi equivalente à do antibiótico Cephazolin. O que sugere que esta planta poderia proporcionar interessante alternativa aos antimicrobianos já utilizados, permitindo alcançar a recomendação da Organização Mundial da Saúde de otimizar os recursos naturais.

Podemos comparar também, os resultados obtidos em nossa pesquisa com os encontrados por Avancini e Wiest (2008), que em busca de antimicrobianos aplicáveis em ambientes de produção animal, realizaram pesquisa com o objetivo de selecionar plantas nativas do sul do Brasil e submeter suas extrações à avaliação antibacteriana. Usando de referência metodológica a etnomedicina veterinária e a etnografia aplicada, selecionaram a *Achyrocline satureioides* quanto à sua possível atividade antimicrobiana. Utilizaram um microrganismo desafio diferente do testado neste estudo, confrontaram o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com o decocto e com a maceração hidroetanólica da planta. A inibição bacteriana produzida pelo decocto foi de 5 reduções logarítmicas e a do macerado hidroetanólico foi de 8 reduções, compatível com a de um desinfetante convencional. Resultados semelhantes foram obtidos por Wiest *et al.* (2009), demonstrando a importância da prospecção de antimicrobianos por meio do conhecimento tradicional de plantas consideradas medicinais.

4 CONCLUSÃO

As extrações de *Achyrocline satureioides* demonstraram ação bactericida frente a todos os 51 isolados MRSA testados e, também frente ao microrganismo de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

O extrato hidroetanólico hidratado promoveu a inativação dos isolados MRSA e do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em menor tempo de contato do que o decocto.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacteriosis and mycosis**. 3rd ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v. 1, n. 580. 395 p.

ALVARENGA, A. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, n. 2, p. 119-128, June 1993.

ASOLINE, F. B. *et al.* Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 209-215, jul./set. 2006.

AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hipericum caprifoliatum* cham. e Schlecht – Hypericaceae (guttiferae) – (escadinha/ sinapismo) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AVANCINI, C. A. M. *et al.* Atividade antibacteriana “*in vitro*” de extração vegetal (decocto) frente microrganismos padronizados de interesse em medicina veterinária: resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. – Asteraceae (“macela”). In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO RIO GRANDE DO SUL, 17., CONGRESSO ESTADUAL DA ANCLIVEPA, 2., 2006, Gramado. **Anais...**, Gramado: ANCLIVEPA, 2006. 1 CD-ROM. Resumo n. 97.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. 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**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2008.

BICA, V. C. **Avaliação do comportamento de compressão de dois extratos secos de *A. satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. 2009. 304 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p. 2. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em 5 jul. 2012.

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, 2006.

CABRERA, C. E. GÓMEZ, R. F.; ZUÑIGA, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos,

antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivência y adaptacion. **Colombia Médica**, Cali, v. 38, n. 2, p. 149-158, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?rc07034>>. Acesso em: 2 out. 2009.

CAIERÃO *et al.*, 2006. Decrease in the incidence of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in carriers from an intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 34, n. 1, p. 6-9, Feb. 2006.

CALVO, D. *et al.* *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, Cidade do Mexico, v. 48, n. 3-4, p. 247-255, jul./dec. 2006.

FALKENBERG, M. B. *et al.* Introdução à análise fitoquímica. *In*: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 10, p. 230-246.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. Rio de Janeiro: Governo Federal, 1959. 658 p. Disponível em: <http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1469_a.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2011.

FARMACOPÉIA brasileira, 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. v. 2.

FERNANDEZ, V. N. V. *et al.* 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*: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2003, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 222.

FERRARO, G. *et al.* Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 4, p. 626-628, 2008.

FISCH, E. *et al.* Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal (decocto) frente microorganismos padronizados de interesse em medicina veterinária: IV: resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C- Asteraceae ("macela"). *In*: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2005, Porto Alegre. **Livro de Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. p. 143, resumo 031.

GONZALEZ, M. J.; MARIOLI, J. M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 104, n. 3, p. 209-213, July 2010.

GRAVINO, I. *et al.* 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*: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2005, Porto Alegre. **Livro de Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. p. 179, resumo 134.

GRASSI-ZAMPIERON, R. F.; VIEIRA, M. C.; SIQUEIRA, J. M. 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**, São Paulo, v. 19, n. 2b, P. 572-576, abr./jun. 2009.

HUET, A. A. *et al.* Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. **Microbiology**, Washington, v. 154, Pt. 10, p. 3144-3153, Oct. 2008.

HUNTER, P. A. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, p. i3-i17, 2010. Supplement. 1.

JORAY, M. B. *et al.* Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina: isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 77, n. 1, p. 95-100, jan. 2011.

KADLEC, K. *et al.* Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 1156-1164, Dec. 2009.

LEMOS, G. C. S. *et al.* 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**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 67-72, 2000.

MESQUITA, M. O. *et al.* Microbiological quality in the roast chicken process in nutritional and nourishment unit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 198-203, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100031&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 30 out. 2006.

MOTA, F. M. **Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – Asteraceae – (“macela”, “marcela”) como fator de proteção em zoonoses.** 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MOTA, F. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. 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**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011.

OLIVEIRA, A. L. *et al.* *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 33-38, jan./jun. 2001.

OLIVEIRA, E. A.; BOTH, J. M. C.; AVANCINI, C. A. M. **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: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24., 2012, Porto Alegre. Pôster. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/64600/Poster_22205.pdf?sequence=2>.

Acesso em: 5 nov. 2012.

OLIVEIRA, E. A.; BOTH, J. M. C.; AVANCINI, C. A. M. **Resultados preliminares do sub-projeto atividade desinfetante “in vitro” do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (macela) frente bactéria padronizada de interesse em medicina veterinária.** In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 23., 2011, Porto Alegre. Pôster. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/47868/Poster_9483.pdf?sequence=2>. Acesso em: 5 nov. 2012.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** Ginebra, 2002. 58 p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2012.

SCHUCH, L. F. D. *et al.* Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 3, p. 267-271, 2008. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/36-3/art796.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

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. 87 p. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf>. Acesso em: 11 out. 2011.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1989. 174 p.

SIMÕES, C. M. O; RECH, N.; LAPA, A. J. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc., Compositae (marcela). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p. 37-54, jan./jul. 1986.

SOUZA, L. B. G; FIGUEIREDO, B. B. Prevalência de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à Metecilina (M.R.S.A), no Hospital Universitário Regional de Maringá. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 27-36, jan./abr. 2005.

SOUZA, T. P.; LIONZO, M. I. Z.; PETROVICK, P. R. Avaliação da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, jan./mar. 2006.

SPEROTTO, V. R. *et al.* Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 3, p. 1052, 2012.

TAVARES, W. Bactérias multirresistentes: problema mundial. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 7-9, out./dez. 2005.

TRESOLDI, G.; OLIVEIRA, F. C.; AVANCINI, C. A. M. Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal frente a microrganismos padronizados de interesse em Medicina Veterinária: V- resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – Asteraceae. *In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 18., FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., SALÃO UFRGS JOVEM, 1., Porto Alegre, 2006. **Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Trabalho 243, p. 205. 1 CD-ROM.

WIEST, J. M. *et al.* Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2009.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se que surtos de MRSA, muitas vezes decorrentes de higiene inadequada ou práticas de controle de infecção ineficazes, podem ser controlados com a melhora da limpeza e desinfecção e o adequado uso de desinfetante, o treinamento para a equipe de serviços ambientais e a vigilância ambiental, reduzem os níveis de contaminação ambiental com patógenos multirresistentes. Portanto, a atividade bactericida demonstrada pelos antimicrobianos: hipoclorito de sódio, iodofór e composto quaternário de amônio, frente aos *Staphylococcus aureus* metilicina resistente nos permite dizer que os três desinfetantes são adequados para o controle desses microrganismos no ambiente, pois não foram encontrados dados que demonstrem a relação de resistência entre os grupos químicos desinfetantes e os antibióticos betalactâmicos, no entanto, as evidências permanecem como válidas.

Os resultados apresentados neste estudo, quanto à atividade bactericida da *Achyrocline satureioides*, sobre os MRSA e sobre o *S. aureus* ATCC 6538, são de importância médico-veterinária e, sugerem a continuidade de estudos científicos, buscando qualificar o uso desta planta medicinal como barreira sanitária, de forma alternativa ou complementar aos antimicrobianos convencionais, nas fontes de infecção e contaminação, evitando a disseminação deste microrganismo resistente antes restrito aos ambientes nosocomiais.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacteriosis and mycosis**. 3rd ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v. 1, n. 580. 395 p.
- ALVARENGA, A. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.
- ALVAREZ, C. LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, p. S108-S120, Dec. 2010. Suplemento 2.
- ANDRADE, G. P; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 277-284, ago. 1989.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, n. 2, p. 119-128, June 1993.
- ARAÚJO, D.; ONOFRE, S. B. Ação do extrato hidroalcoólico de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt., (amaranthaceae) sobre a atividade de antimicrobianos utilizados na terapêutica. **SaBios: revista de saúde e biologia**, Campo Mourão, v. 6, n. 1, p.1-8, jan./abril, 2011.
- ARSLAN, S. E.; ÖZDEMİR, F. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from human and food against Linezolid, Quinupristin-Dalfopristin, Quinolones and Imipenem. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 6, n. 11, p. 2616-2621, Mar. 2012. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJMR>>. Acesso em: 20 jul. 2012.
- ASOLINE, F. B. *et al.* Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 209-215, jul./set. 2006.
- AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hipericum caprifoliatum* cham. e Schlecht – Hypericaceae (guttiferae) – (escadinha/ sinapismo) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- AVANCINI, C. A. M. *et al.* Atividade antibacteriana “*in vitro*” de extração vegetal (decocto) frente microrganismos padronizados de interesse em medicina veterinária: resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureoides* D.C. – Asteraceae (“macela”). In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO RIO GRANDE DO SUL, 17., CONGRESSO ESTADUAL DA ANCLIVEPA, 2., 2006, Gramado. **Anais...**, Gramado: ANCLIVEPA, 2006. 1 CD-ROM. Resumo n. 97.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. 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**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2008.

BEUMER, R. *et al.* **Biocide usage and antimicrobial resistance in home settings**: an update: a review by the International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH). [S.l.]: IFH, 2003. Disponível em: <<http://www.ifh-homehygiene.org/best-practice-review/biocide-usage-and-antimicrobial-resistance-home-settings-update-2004>>. Acesso em: 7 out. 2011.

BICA, V. C. **Avaliação do comportamento de compressão de dois extratos secos de *A. satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. 2009. 304 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BOROWSKY, L. M. *et al.* Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1474-1479, set./out. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de fitoterápicos da farmacopéia brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011. 126 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterpicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do paciente em serviços de saúde**: limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília: ANVISA, 2010a. 120 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 10 jul. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 ago. 2010b, Seção 1, p. 44-46.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p. 2. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 5 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 set. 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Portaria nº 89, de 25 de agosto de 1994. Determina que o registro dos produtos saneantes domissanitários "água sanitária" e "alvejante" categoria congênere a detergente alvejante e desinfetante para uso geral seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. **Diário**

Oficial [da] União, Brasília, DF, 26 ago. 1994. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/publi>>. Acesso em: 24 jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC n.14 de 28/02/2007. Aprova regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da resolução GMC nº 50/06. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 mar. 2007, Seção 1, p. 29. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fdded4db/RDC+14_2007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 mar. 2009.

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, 2006.

CALVO, D. *et al.* *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus spp.* **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, Mexico, v. 48, n. 3-4, p. 247-255, jul./dec. 2006.

CABRERA, C. E. GÓMEZ, R. F.; ZUÑIGA, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptacion. **Colombia Médica**, Cali, v. 38, n. 2, p. 149-158, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?rc07034>>. Acesso em: 2 out. 2009.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 271-276, June 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830503000441>>. Acesso em: 2 out. 2009.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidoalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, p. 6-8, 2004. Suplemento.

DUQUETTE, R. A.; NUTTALL, T. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 591-597, Dec. 2004.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; CUNHA, M. L. R. S. MRSA epidemiology in animals. *In*: CUNHA, M. L. R. S. (Ed.). **Epidemiology insights**. Rijcka: In Tech, 2012. p. 79-94. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/epidemiology-insights/mrsa-epidemiology-in-animals>>. Acesso em: 2 nov. 2012.

FACHINETTO, J. M. *et al.* Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

FALKENBERG, M. B. *et al.* Introdução à análise fitoquímica. *In*: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

cap. 10, p. 230-246.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. v. 2.

FERNANDEZ, V. N. V. *et al.* 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: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2003, Porto Alegre. Resumos.* Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 222.

FERRARO, G. *et al.* Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 4, p. 626-628, 2008.

FESSLER, A. T. *et al.* characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 20, p. 7151-7157, Oct. 2011.

FISCH, E. *et al.* Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração Vegetal (decocto) frente microorganismos padronizados de interesse em medicina veterinária: IV: resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C- Asteraceae ("macela"). *In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2005, Porto Alegre. Livro de Resumos.* Porto Alegre: UFRGS, 2005. p. 143, resumo 031.

FREITAS, C. C. O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos. **DST Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 103-108. Out./dez. 1989.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual de procedimentos para determinação da suscetibilidade antimicrobiana em enterobactérias.** Rio de Janeiro, 2005. 1 CD ROM.

GELMAN, A. C.; CLARK, E. G.; OMRAM, A. R. A. Prevenção da doença transmissível. *In: LEAVELL, H. R.; CLARK, E. G. Medicina preventiva.* São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978. Parte II.5, p.133-181.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 2, p. 189-208, Apr. 2003.

GIROLOMETTO, G. *et al.* Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n. 1, p. 49-55, 2009.

GONZÁLEZ, M. J.; MARIOLI, J. M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 104, n. 3, p. 209-213, July 2010.

GRASSI-ZAMPIERON, R. F.; VIEIRA, M. C.; SIQUEIRA, J. M. 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**, Curitiba, v. 19, n. 2B, p. 572-576, abr./jun. 2009.

GRAVINO, I. *et al.* 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: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 17., 2005, Porto Alegre. **Livro de Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. p. 179, resumo 134.

GUERREIRO, M. G. *et al.* **Bacteriologia especial**: com interesse em saúde animal e saúde pública. Porto Alegre: Sulina, 1984. 492 p.

GUIMARÃES, M. A. *et al.* Desinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, July/Sept. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v31n3/v31n3a08.pdf>>. Acesso em: 9 set. 2009.

HELLER, J. *et al.* Prevalence and distribution of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* within the environment and staff of a university veterinary clinic. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 168-173, Apr. 2009.

HOLAH, J. T. *et al.* Future techniques for disinfectant efficacy testing. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 41, n. 3-4, p. 273-279, 1998.

HUET, A. A. *et al.* Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. **Microbiology**, Washington, v. 154, Pt. 10, p. 3144-3153, Oct. 2008.

HUNTER, P. A. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, p. i3-i17, 2010. Supplement 1.

JORAY, M. B. *et al.* Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina: isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 77, n. 1, p. 95-100, Jan. 2011.

KADLEC, K. *et al.* Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 1156-1164, Dec. 2009.

KLEIN, G.; GOULART, L. S. Prevalência de *Staphylococcus aureus* multirresistentes em amostras biológicas do Laboratório Osvaldo Cruz, Uruguaiana-RS. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 121-124, 2008.

KREWER, C. C. *et al.* Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31, n. 11, p. 1116-1120, nov. 2012.

- LEMOS, G. C. S. *et al.* 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**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 67-72, 2000.
- LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 65S-71S, May 2002. Supplement S1.
- MACÊDO, J. A. B. **Águas & águas**. 2. ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2004. 977 p.
- MAILLARD, J. Y.; MCDONNELL, G. Selection and use of disinfectants. **In Practice**, London, v. 34, n. 4, p. 292-299, May 2012.
- MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V.; MARTINS, A. M. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 3, p. 24, Oct. 2003. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/24>>. Acesso em: 15 out. 2010.
- MCLEAN, C. L.; NESS, M. G. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a veterinary orthopaedic referral hospital: staff nasal colonisation and incidence of clinical cases. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 170-177, Apr. 2008.
- MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, Jan. 1999.
- MESQUITA, M. O. *et al.* Microbiological quality in the roast chicken process in nutritional and nourishment unit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 198-203, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100031&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 30 out. 2006.
- MIYAZAKI, N. H. T. **Análise molecular associada ao estudo dos genes de resistência em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- MOLINA, P. D. S. *et al.* Simulação in vitro de condições de uso de desinfetantes e avaliação da eficácia frente bactérias sobreviventes a higienização de superfícies em matadouro-frigorífico de bovinos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 17, n. 3-4, p. 134-138, set./dez. 2010.
- MOTA, F. M. **Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – Asteraceae – (“macela”, “marcela”) como fator de proteção em zoonoses**. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- MOTA, F. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. 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**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011

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

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. V. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes comocontroladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 11-13, jun. 2010.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

OLIVEIRA, A. L. *et al.* *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 33-38, jan./jun. 2001.

OLIVEIRA, E. A.; BOTH, J. M. C.; AVANCINI, C. A. M. **Atividade antimicrobiana "in vitro" do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) frente a cepa de referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923) de interesse em medicina veterinária**. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24., 2012, Porto Alegre. Pôster. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/64600/Poster_22205.pdf?sequence=2>. Acesso em: 5 nov. 2012.

OLIVEIRA, E. A.; BOTH, J. M. C.; AVANCINI, C. A. M. **Resultados preliminares do sub-projeto atividade desinfetante "in vitro" do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (macela) frente bactéria padronizada de interesse em medicina veterinária**. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 23., 2011, Porto Alegre. Pôster. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/47868/Poster_9483.pdf?sequence=2>. Acesso em: 5 nov. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual de segurança biológica em laboratório**. 3. ed. Genebra, 2004. 215 p. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2012.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra, 2002. 58 p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2012.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 127, p. 1-12, Apr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321498/pdf/fmicb-03-00127.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

PELLEGRINO M. S. *et al.* Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. **REDVET: Revista Electrónica de Veterinaria**, Málaga, v. 12, n. 7, p. 1-14, 2011. Disponível em:

<<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711/071110.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2011.

PEREIRA, L. P. *et al.* Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 678-681, mar./abr. 2006.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, Asteraceae: desenvolvimento de grânulos de pó seco por pulverização. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 803-811, out./nov. 2010.

PIROVANI, M. E.; GÜEMES, D. R.; PIAGENTINI, A. M. Lavado desinfección con soluciones cloradas: Una etapa para mejorar la calidad microbiológica de vegetales de hoja frescos cortados. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4., SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE VEGETAIS FRESCOS CORTADOS, 1., São Pedro, 2006. **Anais...** São Pedro: ESALQ/USP, 2006. p. 23-28.

RADDI, M. S. G.; LEITE, Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 36-40, 1988.

RANKIN, S. *et al.* Panton valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 145-1488, June 2005.

REMONATTO, G. *et al.* CA-MRSA: um patógeno emergente. **NewsLab**, São Paulo, v. 80, p. 92-96, 2007.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 41, n. 3-4, p. 269-272, 1998.

REYNALDO, M. B. *et al.* Eficacia de algunos bactericidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 16, n. 3, p. 187-192, sept. 2004.

RIVERA, F. *et al.* Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, local, v. 95, n. 2-3, p. 359-362, Dec. 2004.

ROSEMBERG, F. J. **Princípios de epidemiologia**. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa, 1977. 92 p.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. **Journal of Hospital Infection**, New York, v. 57, n. 2, p. 97-104, June 2004.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, n. 2, p. 794-803, Dec. 2003.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, n. 4, p. 597-599, Apr. 2002. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/49/4/597>>. Acesso em: 28 out. 2006.

RUSSELL, A. D; SULLER, M. T. E.; MAILLARD, J. Y. Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance? **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 48, n. 7, p. 613-615, July 1999.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities**. Chapel Hill: Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. 158 p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2009.

SALAZAR-ARANDA, R. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Cairo, v. 2011, article ID 536139, p. 1-6, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/536139/>>. Acesso em: 5 jul. 2012.

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

SANTOS, I. J. M. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of the decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) used by the traditional medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Cairo, v. 2012, article ID 747969, p. 1-6, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/747969/>>. Acesso em: 5 jul. 2012.

SCHUCH, L. F. D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária**: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e dermatófitos. 2007. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SCHUCH, L. F. D. *et al.* Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 3, p. 267-271, 2008. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/36-3/art796.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

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. 87 p. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf>. Acesso em: 11 out. 2011.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2002. 479 p.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989. 174 p.

SIMÕES, C. M. O; RECH, N.; LAPA, A. J. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc., Compositae (marcela). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p. 37-54, jan./jul. 1986.

SMITH, K.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 61, n. 1, p. 78-84, Jan. 2008.

SOUZA, K. C.; SCAPOVAL, E. E.; BASSANI, V. L. Determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-*O*-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 28, n. 3-4, p. 771-777, May 2002.

SOUZA, L. B. G; FIGUEIREDO, B. B. 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**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 27-36, jan/abr. 2005.

SOUZA, T. P.; LIONZO, M. I. Z.; PETROVICK, P. R. Avaliação da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, jan./mar. 2006.

SPEROTTO, V. R. *et al.* Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 3, p. 1052, 2012.

SPOHR, M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 58, n. 4, p. 252–261, June 2011.

SVIDZINSKI, A. E. *et al.* Eficiência do ácido peracético no controle de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Maringá, v. 6, n. 3, p. 312-318, jul./set. 2007.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 281-301, maio/jun. 2000.

TAVARES, W. Bactérias multirresistentes: problema mundial. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 7-9, out./dez. 2005.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRABULSI, L. R. *et al.* **Microbiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. 590 p.

TRESOLDI, G.; OLIVEIRA, F. C.; AVANCINI, C. A. M. Atividade antibacteriana

desinfetante "in vitro" de extração vegetal frente a microrganismos padronizados de interesse em Medicina Veterinária: V- resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – Asteraceae. *In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 18., FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., SALÃO UFRGS JOVEM, 1., Porto Alegre, 2006. **Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Trabalho 243, p. 205. 1 CD-ROM.

VON POSTER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. *In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. cap. 6, p. 76-90.

WALLER, A. The creation of a new monster: MRSA and MRSI: important emerging veterinary and zoonotic diseases. **Veterinary Journal**, London, v. 169, n. 3, p. 315-316, May 2005.

WEESE, J. S. *et al.* An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1-2, p. 160-164, Apr. 2006.

WIEST, J. M. Desinfecção e desinfetantes. *In: GUERREIRO, M. G. et al. (Ed.). Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal*. Porto Alegre: Sulina, 1984. p. 51-66.

WIEST, J. M. *et al.* Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2009a.

WIEST, J. M. *et al.* Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 119-127, fev. 2009b.

WIESTREICH, G. A.; LECHTMAN, M. D. **Microbiologia das doenças humanas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 661 p.

YANG, F. L. *et al.* Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 8, p. 1821-1826, Dec. 2012.

**ANEXO A - Análise estatística
NAE- UFRGS**

Análise Estatística: Estatísticas Descritivas Decocto (Tabelas de Frequência e Gráficos de Colunas)

Frequências [DataSet2] C:\Users\gilberto_26052011\Ass_2012\Jane Both_Elsa\Gilberto_Decocto_29012013\TAB RESULTADOS FINAIS DECOCTO NAE 29-01-2013.sav

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	51
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

RedLogaritmica^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	17	33,3	33,3	33,3
	2	1	2,0	2,0	35,3
	INAT	2	3,9	3,9	39,2
	SEM RED LOG	31	60,8	60,8	100,0
	Total	51	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	49
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

RedLogaritmica^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	4	8,2	8,2	8,2
	2	9	18,4	18,4	26,5
	INAT	34	69,4	69,4	95,9
	SEM RED LOG	2	4,1	4,1	100,0
	Total	49	100,0	100,0	

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	49
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 24hStatistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	15
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid INAT	15	100,0	100,0	100,0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 01hStatistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	52
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	16	30,8	30,8	30,8
2	1	1,9	1,9	32,7
3	1	1,9	1,9	34,6
INAT	1	1,9	1,9	36,5
SEM RED LOG	33	63,5	63,5	100,0
Total	52	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	50
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	5	10,0	10,0	10,0
2	8	16,0	16,0	26,0
3	14	28,0	28,0	54,0
INAT	21	42,0	42,0	96,0
SEM RED LOG	2	4,0	4,0	100,0
Total	50	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	29
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid INAT	29	100,0	100,0	100,0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	51
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

RedLogaritmica^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	7	13,7	13,7	13,7
	2	2	3,9	3,9	17,6
	SEM RED LOG	42	82,4	82,4	100,0
	Total	51	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 01h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	51
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

RedLogaritmica^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	17	33,3	33,3	33,3
	2	16	31,4	31,4	64,7
	3	9	17,6	17,6	82,4
	4	3	5,9	5,9	88,2
	INAT	3	5,9	5,9	94,1
	SEM RED LOG	3	5,9	5,9	100,0
	Total	51	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 08h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	48
	Missing	0

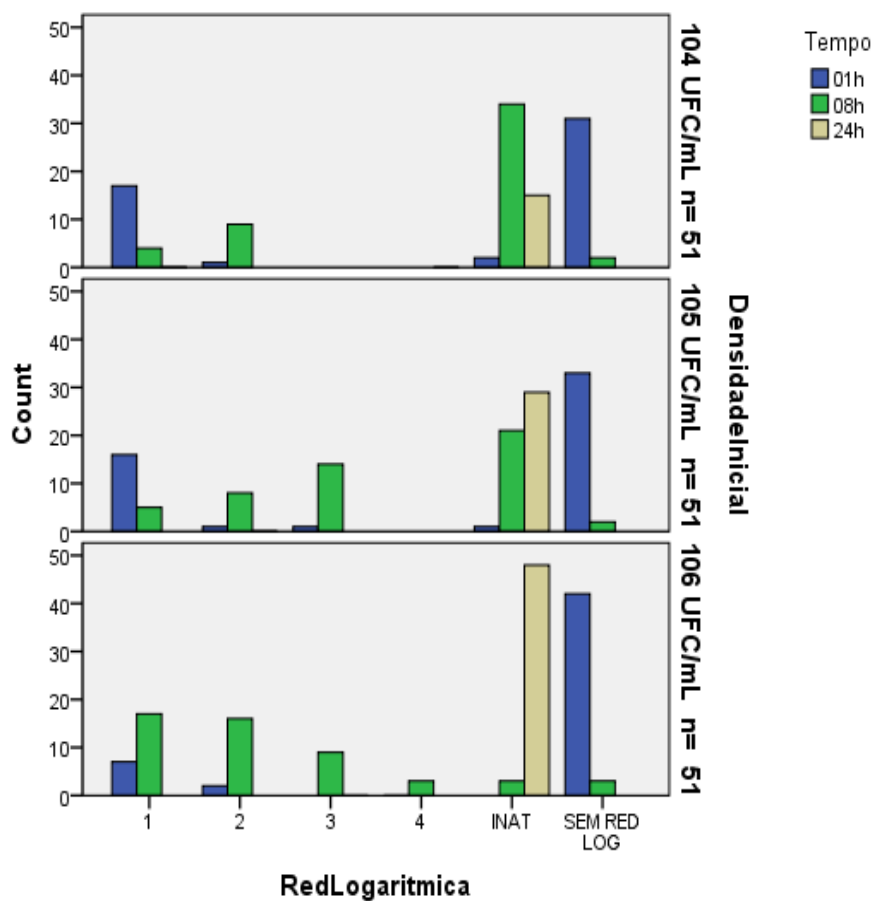
a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h

RedLogaritmica ^a					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	INAT	48	100,0	100,0	100,0

a. DensidadelInicial = 106 UFC/mL n= 51, Tempo = 24h

Graph

[DataSet2] C:\Users\gilberto_26052011\Ass_2012Jane Both_Elsa\Gilberto_Decocto_29012013\TAB RESULTADOS FINAIS DECOCTO NAE 29-01-2013.sav



Cases weighted by Numlsolados

**Análise Estatística: Estatísticas Descritivas Extrato Hidroetanólico Hidratado(EH)
(Tabelas de Frequência e Gráficos de Colunas)**

Frequencies

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

RedLogaritmica^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	17	81,0	81,0	81,0
	2	3	14,3	14,3	95,2
	SEM RED LOG	1	4,8	4,8	100,0
Total		21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

RedLogaritmica^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	5	23,8	23,8	23,8
	2	4	19,0	19,0	42,9
	3	9	42,9	42,9	85,7
	INAT	3	14,3	14,3	100,0
Total		21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	18
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	1	5,6	5,6	5,6
2	3	16,7	16,7	22,2
3	2	11,1	11,1	33,3
INAT	12	66,7	66,7	100,0
Total	18	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	6
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 2	1	16,7	16,7	16,7
3	1	16,7	16,7	33,3
INAT	4	66,7	66,7	100,0
Total	6	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	2
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	1	50,0	50,0	50,0
INAT	1	50,0	50,0	100,0
Total	2	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	1
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid INAT	1	100,0	100,0	100,0

a. DensidadeInicial = 104 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	11	52,4	52,4	52,4
2	1	4,8	4,8	57,1
SEM RED LOG	9	42,9	42,9	100,0
Total	21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	2	9,5	9,5	9,5
2	7	33,3	33,3	42,9
3	8	38,1	38,1	81,0
4	1	4,8	4,8	85,7
INAT	1	4,8	4,8	90,5
SEM RED LOG	2	9,5	9,5	100,0
Total	21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	20
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 2	2	10,0	10,0	10,0
3	4	20,0	20,0	30,0
4	5	25,0	25,0	55,0
INAT	8	40,0	40,0	95,0
SEM RED LOG	1	5,0	5,0	100,0
Total	20	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	12
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 2	1	8,3	8,3	8,3
3	1	8,3	8,3	16,7
4	2	16,7	16,7	33,3
INAT	8	66,7	66,7	100,0
Total	12	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	4
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	2	50,0	50,0	50,0
INAT	2	50,0	50,0	100,0
Total	4	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	2
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	1	50,0	50,0	50,0
INAT	1	50,0	50,0	100,0
Total	2	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 105 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	6	28,6	28,6	28,6
2	1	4,8	4,8	33,3
SEM RED LOG	14	66,7	66,7	100,0
Total	21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 05min

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	1	4,8	4,8	4,8
2	4	19,0	19,0	23,8
3	9	42,9	42,9	66,7
4	2	9,5	9,5	76,2
SEM RED LOG	5	23,8	23,8	100,0
Total	21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 30min

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	21
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 2	1	4,8	4,8	4,8
3	2	9,5	9,5	14,3
4	3	14,3	14,3	28,6
5	7	33,3	33,3	61,9
INAT	4	19,0	19,0	81,0
SEM RED LOG	4	19,0	19,0	100,0
Total	21	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 01h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	17
	Missing	0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	4	23,5	23,5	23,5
4	3	17,6	17,6	41,2
5	1	5,9	5,9	47,1
INAT	8	47,1	47,1	94,1
SEM RED LOG	1	5,9	5,9	100,0

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid	17		
	Missing	0		
Total		17	100,0	100,0

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 2h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	9		
	Missing	0		

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

RedLogaritmica^a

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	2	22,2	22,2	22,2
4	1	11,1	11,1	33,3
5	3	33,3	33,3	66,7
INAT	2	22,2	22,2	88,9
SEM RED LOG	1	11,1	11,1	100,0
Total	9	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 3h

DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h**Statistics^a**

RedLogaritmica

N	Valid	7		
	Missing	0		

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h

RedLogaritmica^a

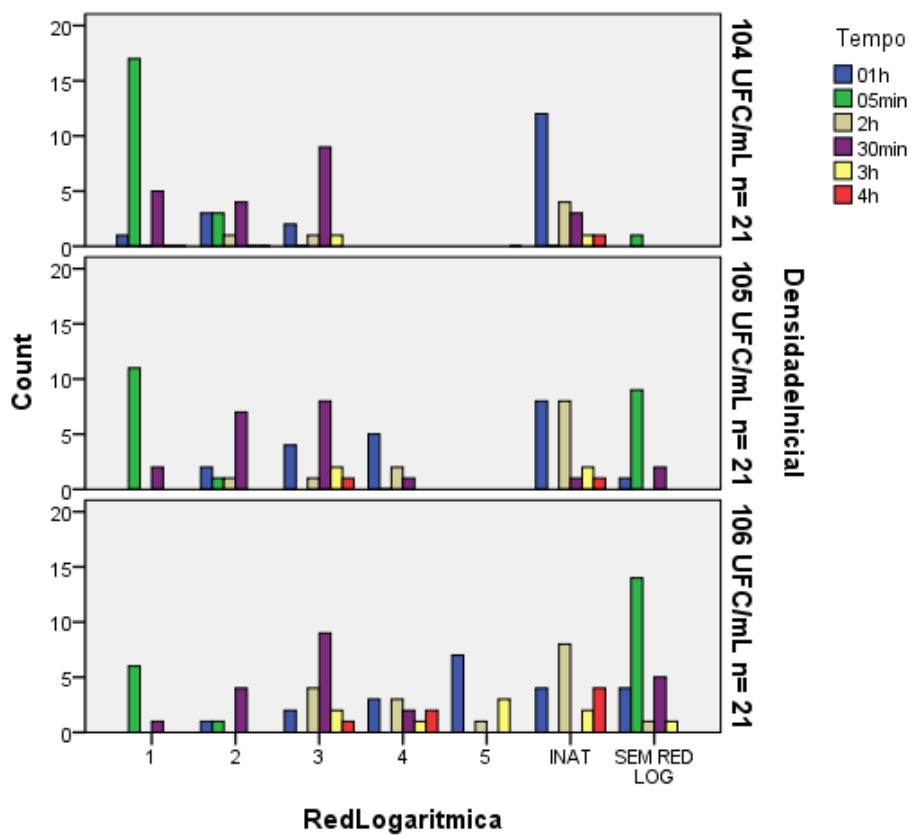
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 3	1	14,3	14,3	14,3

Statistics^a

RedLogaritmica

N	Valid				7
	Missing				0
4		2	28,6	28,6	42,9
INAT		4	57,1	57,1	100,0
Total		7	100,0	100,0	

a. DensidadeInicial = 106 UFC/mL n= 21, Tempo = 4h



Cases weighted by Numlsolados

ANEXO B - Teste do qui-quadrado

Elaborado por Débora da Cruz Payão Pellegrini

Análise estatística

Quadro 1- Número de isolados MRSA (n=21) inativados no tempo de contato de uma hora da densidade populacional inicial analisada: 10^6 UFC/mL

Ação nos MRSA	T1 (Decocto)	T2 (EH)	Total
Inativadas	0	4	4
Não inativ	51	17	68
Total	51	21	72

Tratamento 1: Decocto; **Tratamento 2:** Extrato Hidroetanólico Hidratado (EH); **Tempo de ação:** 1 hora
 $X^2 = 10,2857$ ($p = 0,001$)

Quadro 2- Número de isolados MRSA (n=21) inativados no tempo de contato de uma hora da densidade populacional inicial analisada: 10^5 UFC/mL

Ação nos MRSA	T1 (Decocto)	T2 (EH)	Total
Inativadas	1	8	9
Não inativ	50	12	62
Total	51	20	71

Tratamento 1: Decocto; **Tratamento 2:** Extrato Hidroetanólico Hidratado (EH); **Tempo de ação:** 1 hora
 $X^2 = 12,7796$ ($p = 0,00001$)

Quadro 3- Número de isolados MRSA (n=21) inativados no tempo de contato de uma hora da densidade populacional inicial de analisada: 10^4 UFC/mL

Ação nos MRSA	T1 (Decocto)	T2 (EH)	Total
Inativadas	2	12	14
Não inativ	49	6	55
Total	51	18	69

Tratamento 1: Decocto; **Tratamento 2:** Extrato Hidroetanólico Hidratado (EH); **Tempo de ação:** 1 hora
 $X^2 = 32,3862$ ($p = 0,0000$)

O teste qui-quadrado tem como objetivo testar a hipótese de que as duas variáveis são independentes. Para isso, ele compara as frequências observadas e esperadas considerando

como hipótese nula a igualdade dos tratamentos (o tratamento 1 não difere do tratamento 2 quanto à inativação das cepas de MRSA). O resultado obtido na análise (Quadros 1, 2 e 3) foi extremamente significativo, ou seja, as frequências observadas diferem das esperadas, o que indica que o EH foi extremamente mais eficiente do que o decocto no período de ação de uma hora em todas as concentrações testadas para inativar os isolados MRSA analisados ($p < 0,05$).

ANEXO C – Análise Fitoquímica da *Achyrocline satuireioides*

Elaborado por Bárbara Spaniol

Amostra 1		Amostra			ug/mL de SE		mg/100 mL de solução extrativa
12	[] ug/mL	Área	Cam	C (ug/ml)	por SE		
QUERCETINA	área 1	648432	7,749010907	645,7250789	Média	647,3407144	64,73407144
	área 2	651980	7,787787711	648,95635	DesvPad	2,284853683	
	área 3	635513	7,607816564	633,9593543	CV%	0,352959984	
LUTEOLINA	área 1	176395	2,940071461	244,9961548	Média	245,838185	24,5838185
	área 2	177645	2,960280993	246,6802152	DesvPad	1,190810485	
	área 3	153179	2,564723857	213,718439	CV%	0,484387926	
3OMQ	área 1	562419	9,181163099	765,066321	Média	765,6321653	76,56321653
	área 2	563259	9,194743905	766,1980096	DesvPad	0,800224646	
	área 3	539570	8,811749014	734,2830453	CV%	0,104518159	

FD= 83,33

Amostra 2		Amostra			ug/mL de SE		mg/100 mL de solução extrativa
12	[] ug/mL	Área	Cam	C (ug/ml)	por SE		
QUERCETINA	área 1	584821	7,053793526	587,7926145	Média	604,0268373	60,40268373
	área 2	604374	7,267492186	605,6001238	DesvPad	2,224963211	
	área 3	600919	7,229731797	602,4535507	CV%	0,368355026	
LUTEOLINA	área 1	155253	1,96715209	163,9227836	Média	188,3324981	18,83324981
	área 2	178527	2,255850503	187,9800224	DesvPad	0,498475854	
	área 3	179209	2,264310257	188,6849737	CV%	0,264678618	
3OMQ	área 1	651570	8,123632733	676,9423156	Média	703,240514	70,3240514
	área 2	677625	8,446827592	703,8741433	DesvPad	0,896087092	
	área 3	676399	8,431619882	702,6068847	CV%	0,127422564	

Se fizer a coluna E *10, dá o valor em m/V %

Amostra 3		Amostra			ug/mL de SE		mg/100 mL de solução extrativa
12	[] ug/mL	Área	Cam	C (ug/ml)	por SE		
QUERCETINA	área 1	770786	9,086242322	757,1565727	Média	757,6425991	75,76425991
	área 2	771546	9,094548515	757,8487277	DesvPad	0,42252422	
	área 3	771627	9,095433378	757,9224969	CV%	0,055768277	
LUTEOLINA	área 1	233142	2,933313073	244,4329784	Média	244,5911273	24,45911273
	área 2	234372	2,948570401	245,7043715	DesvPad	1,043199615	
	área 3	232371	2,923749333	243,6360319	CV%	0,426507546	
3OMQ	área 1	938082	11,67762259	973,0962901	Média	973,8891019	97,38891019
	área 2	939074	11,68992768	974,1216738	DesvPad	0,705871452	
	área 3	939391	11,69385986	974,4493418	CV%	0,072479654	

Concentração final em (ug/mL)			
	Quercetina	Luteolina	3-O-MQ
Média	669,6700503	226,2539368	814,2539271
Desvpad	79,20479784	32,846848	141,7241028
dpr%	11,82743618	14,51769126	17,40539383

Concentração final em (mg/ 100mL)			
	Quercetina	Luteolina	3-O-MQ
Média	66,96700503	22,62539368	81,42539271
Desvpad	7,920479784	3,2846848	14,17241028
dpr%	11,82743618	14,51769126	17,40539383

	Quercetina	Luteolina	3-O-MQ
Conc. (mg/mL)	0,66967005	0,226253937	0,814253927
Conc. (mg/100 mL)	66,96700503	22,62539368	81,42539271
Conc. (g/100 mL) = %	0,066967005	0,022625394	0,081425393

ANEXO D - Declaração do Herbário ICN – UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Herbário ICN

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o material botânico pertencente à espécie *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. coletado no projeto de doutorado “Atividade antibacteriana de desinfetantes convencionais e do decocto de *Achyrocline satureioides* DC.– Asteraceae (“macela”) sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA)”, aluna Jane Mari Corrêa Both, orientador César Avancini, encontra-se depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o número tomo 164964.

Porto Alegre, 28 janeiro de 2013.

D^{ra}. Mara Rejane Ritter
Curadora do Herbário ICN

ANEXO E - Laudo de análise hipoclorito de sódio



Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul
 Instituto de Pesquisas Biológicas
 Laboratório Central de Saúde Pública - IPB/LACEN/RS
 Av. Ipiranga, 5.400 – Bairro Jardim Botânico – Porto Alegre/RS
 CEP 90610-000 – Fone/fax: (51) 3288-4000 – E-mail: lacen@fepps.rs.gov.br



LAUDO DE ANÁLISE Nº 12264/10

MODALIDADE DA ANALISE: Orientação.
 DATA DE ENTRADA: 07/10/2010. N ° DO LACRE: Não consta.
 SOLICITANTE: Jane Mari Corrêa Both.
 NOME DO PRODUTO: Qboa – Água Sanitária. MARCA: QBoa.
 FABRICANTE: Indústria Anhembí S/A.
 ENDEREÇO: Rua André Rovai, 481 – Centro – Osasco – São Paulo.
 REGISTRO: MS. 3.1940.0002.003-7. LOTE: 1-2073.
 DATA DE FABRICAÇÃO: 18/08/2010. VALIDADE: Seis meses.
 UNIDADES/AMOSTRAS: Uma. VOLUME: 1,0 L.
 LOCAL DE COLETA: Av. Ipiranga, 5400 – Porto Alegre – RS.

UNIDADE ANALITICA: Seção de Físico - Química - Laboratório de saneantes.

Características Gerais do Produto: O produto consiste em um líquido amarelo-pálido com odor característico de cloro e está acondicionado em embalagem plástica, opaca e vedada com tampa ajustada em forma de rosca.

Análise de Rótulo

Referências: ANVISA - Decreto 79094/77 de 05/01/77, Resolução RDC 184 de 22/10/2001, Portaria 89 de 25/08/1994 e Portaria 10 DISAD de 15/09/1980.

Resultado: De acordo.

Nome do Ensaio: Teor de cloro ativo.

Referência: Portaria 89 de 25/08/94.

Valor de Referência: (2,0 a 2,5) % p/p.

Resultado: 2,31 % p/p.

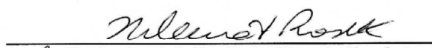
Parecer técnico: Amostra de acordo com a legislação vigente quanto aos parâmetros analisados.

CONCLUSÃO: Amostra de acordo com a legislação vigente.

Obs.: 1 - Os resultados deste relatório de ensaio têm significação restrita e se aplicam exclusivamente à amostra analisada.

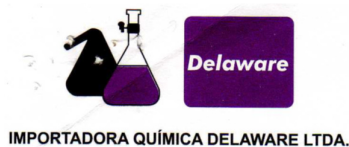
2 - Estes resultados de ensaio não podem ser utilizados em publicidade e propaganda ou para fins comerciais.


 Técnico Responsável
Sívio Santos Fernandes
 Mat. 13130200
 CRQ: 05100688


 12
 Chefe da Divisão de Análise de Produtos
Helena Jansson Rosek
 ID: 3041514
 Diretora IPB-LACEN/RS

Concluído em: 15/10/2010.

ANEXO F - Certificado de análise iodofór

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Documento: N° 43737/11

Data Emissão: 04/10/2011

Ordem de Fracionamento: 3797

Insumo		IODOFOR CONCENTRADO	20%
Origem	BRASIL	Procedência	BRASIL
Lote Interno	2028/11	Lote Fabricante	4508
Data Fabricação	01/09/2011	Data Validade	01/09/2013

Análises Físico-Químicas

Testes	Especificações	Resultados
Aspecto	Líquido viscoso de cor marrom escuro.	De acordo
pH (Solução Aquosa a 10 %)	2,0 a 4,0	2,18
Teor de Iodo ativo	Mínimo 19,0 %	20,51 %

Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Referência Bibliográfica: Conforme literatura do fornecedor.

Conservação: Em recipientes herméticos, ao abrigo da luz, calor e umidade.

*Cópia do Certificado de Análise original do fornecedor.

Resultado APROVADO

M. Brandalise
 Mariana Brandalise
 Farmacêutica Responsável
 CRF-RS 12356

CONTROLE DE QUALIDADE

RUA MORRETES, 376 - FONE/FAX: (51) 3341.0812 - CEP 91030-300 - SANTA MARIA GORETTI - PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
 E-mail: vendas@delaware.com.br

ANEXO G - Certificado de análise quartenário de amônio 50%



IMPORTADORA QUÍMICA DELAWARE LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Documento: N° 43570/11

Data Emissão: 08/09/2011

Ordem de Fracionamento: 3639

Insumo		QUARTENÁRIO DE AMÔNIO 50%	
Nome Químico	Cloreto de Cetil Trimetilamônio		
Origem	BRASIL	Procedência	BRASIL
Lote Interno	1861/11	CAS	8030-78-2
Fabricante	DEGANI-VADUZ	Lote Fabricante	081601
Data Fabricação	16/08/2011	Data Validade	15/08/2012

Análises Físico-Químicas

Testes	Especificações	Resultados
*Aspecto (a 25 °C)	Líquido incolor a levemente amarelado, odor característico.	De acordo
*pH (Solução aquosa a 10 %)	5,0 a 8,0	5,79
*Densidade (20 °C)	0,85 a 0,95 g / mL	0,894 g / mL
Princípio Ativo (Catiônico)	49,0 % a 51,0 %	50,3 %

Os resultados presentes neste Certificado de Análise, tem seus valores restritos a este lote.

Referência Bibliográfica: Conforme literatura do fornecedor.

Conservação: Em recipientes herméticos, ao abrigo da luz, calor e umidade.

*Testes realizados em nosso Laboratório de Controle de Qualidade.

Resultado APROVADO

M. Brandalise

Mariana Brandalise
Farmacêutica Responsável
CRF-RS 12356

CONTROLE DE QUALIDADE

RUA MORRETES, 376 - FONE/FAX: (51) 3341.0812 - CEP 91030-300 - SANTA MARIA GORETTI - PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
E-mail: vendas@delaware.com.br

CURRICULUM

BOTH, Jane Mari Corrêa

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Jane Mari Corrêa Both

Endereço Profissional: Laboratório de Análises Microbiológicas de Água e Alimentos. Instituto de Pesquisas Biológicas - IPB/LACEN/RS. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.
Av. Ipiranga, 5400 – Jardim Botânico
90610-000 – Porto Alegre, RS – Brasil
Telefone: (51) 3288-4045
URL da Homepage: <http://www.fepps.rs.gov.br/>
E-mail: janeboth@gmail.com

2 FORMAÇÃO

2005 – 2007: Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: A desinfecção como barreira sanitária na prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA): Sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos no IPB/LACEN/RS, nos anos de 2002 a 2006, frente ao hipoclorito de sódio. Ano de obtenção: 2007.

Orientador: Cesar Augusto Marchionatti Avancini.

1988 – 1989: Especialização em Biologia Celular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

1980 – 1987: Graduação em Biologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Porto Alegre, 29 de maio de 2013.

JANE MARI CORRÊA BOTH