



Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

In vitro* antimicrobial activity of *Luffa operculata^{☆,☆☆}

Rodolfo Alexander Scalia^{a,b,*}, José Eduardo Lutaif Dolci^c, Suely Mitoi Ykko Ueda^d,
Suzethe Matiko Sassagawa^d

^a Departamento de Otorrinolaringologia, Irmandade da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Programa de Pós-graduação em Pesquisa em Cirurgia, Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo (FCMSC/SP), São Paulo, SP, Brasil

^c Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo (FCMSC/SP), São Paulo, SP, Brasil

^d Departamento de Ciências Patológicas, Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo (FCMSC/SP), São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 23 de junho de 2014; aceito em 24 de julho de 2014

KEYWORDS

Luffa operculata;
Sinusitis;
Products with
antimicrobial action;
Phytotherapeutic
drugs

Abstract

Introduction: *Luffa operculata* is probably one of the most popular herbal medicines used in the treatment of rhinitis and rhinosinusitis. However, its specific mechanism of action is still unknown.

Objective: To evaluate *in vitro* antibacterial activity of *Luffa operculata* against three ordinary agents of upper respiratory tract infection: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*.

Methods: Different concentrations of *Luffa operculata* alcoholic extract were applied to bacterial broth containing reference and community strains of the three described agents. After a 24-h incubation period, the bacterial culture turbidity was measured. The samples were then inoculated onto Mueller-Hinton and human blood agar plates. Bacterial growth was analyzed after 24- and 48-h incubation period. The test was considered negative when there was no environmental turbidity, confirmed by the absence of bacterial growth into the inoculated plates. Tests were considered positive when either turbidity changes were observed on the bacterial broth or when bacterial growth was detected on inoculated plates. Appropriate statistical analysis of the data was performed.

Results: *Luffa operculata* extracts showed antibacterial activity mainly to *Streptococcus pyogenes* followed by *S. pneumoniae* and *S. aureus*.

Conclusion: *Luffa operculata* extract showed promise in antibacterial activity *in vitro* against the studied agents.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.07.015>

☆ Como citar este artigo: Scalia RA, Dolci JEL, Ueda SMY, Sassagawa SM. *In vitro* antimicrobial activity of *Luffa operculata*. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;81:422-30.

☆☆ Instituição: Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSC/SP), para obtenção do título de Doutor em Pesquisa em Cirurgia.

* Autor para correspondência.

E-mail: rodolfoscalvia@yahoo.com.br (R.A. Scalia).

PALAVRAS-CHAVE

Luffa operculata;
Sinusite;
Produtos com ação
antimicrobiana;
Medicamentos
fitoterápicos

Atividade antimicrobiana *in vitro* da *Luffa operculata***Resumo**

Introdução: A *Luffa operculata* é, provavelmente, o fitoterápico mais utilizado no tratamento das rinites e rinossinusites. Apesar de amplamente utilizada pela população, seus mecanismos de ação ainda não estão completamente estabelecidos.

Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Luffa operculata* em agentes causadores de infecções de vias aéreas superiores: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*.

Métodos: Foram utilizadas diferentes concentrações de extrato alcoólico de *Luffa operculata* em caldo de bactérias dos agentes avaliados. Após incubação de 24 horas foi realizada a leitura de turvação do meio, e posteriormente, semeadura em placas de ágar-sangue e ágar Muller-Hinton, após 24 e 48 horas de incubação. Foram considerados testes negativos aqueles em que não houve a turvação do meio, confirmados pela ausência do crescimento das bactérias nas semeaduras. Foram considerados positivos os testes que apresentaram turvação do caldo ou positividade nas semeaduras de 24 ou 48 horas. Os resultados foram submetidos à análise estatística pertinente.

Resultados: Os extratos de *Luffa operculata* apresentaram atividade antimicrobiana, especialmente para *Streptococcus pyogenes*, seguido dos *Streptococcus pneumoniae* e *Sthaphylococcus aureus*.

Conclusão: O extrato de *Luffa operculata* apresentou promissora atividade antimicrobiana *in vitro* contra os agentes estudados.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

A vasta utilização de antibióticos no tratamento de rinossinusites bacterianas, além da erradicação do agente agressor, visa restabelecer a função normal da mucosa nasal, assim como dos seios paranasais, abreviando a duração dos sintomas e prevenindo complicações locais e intracranianas.¹

Apesar de amplamente utilizados, os antibióticos não são a única opção terapêutica para as rinossinusites²; tratamentos adjuvantes devem ser utilizados, de acordo com os sintomas, necessidades e limitações de cada paciente. De a forma geral, lavagens nasais com soluções salinas, corticosteroides tópicos e sistêmicos, anti-histamínicos, descongestionantes nasais, mucolíticos, dentre outros, também podem ser adotados.¹⁻⁴

Uma das opções terapêuticas empregadas por grande parte da população no tratamento das rinossinusites é a fitoterapia. Tradicionalmente utilizada pela população rural carente, especialmente no Norte, Nordeste e Centro-oeste do Brasil, a fitoterapia vêm sendo cada vez mais utilizada nos centros urbanos de todo o país, por pacientes dos mais variados níveis socioeconômicos e culturais.⁴

Dentre os fitoterápicos utilizados informalmente para o tratamento das rinites e rinossinusites, a *Luffa operculata*, conhecida como “cabacinha” ou “buchinha-do-norte” é, provavelmente, a mais utilizada.^{5,6} A *Luffa operculata* apresenta uma série de propriedades terapêuticas difundidas pela população brasileira. Apesar de diversos estudos na literatura buscarem encontrar os mecanismos pelos quais a *Luffa operculata* apresenta tais propriedades, não foram encontradas evidências de atividades anti-histamínicas, vasoconstritoras, anti-inflamatórias ou antivirais desse fitoterápico.⁷⁻¹⁰ Alterações estruturais sobre a mucosa respiratória foram

descritas por trabalhos experimentais, porém, sem estabelecer com segurança, a concentração e o modo pelo qual a *Luffa operculata* pode ser utilizada.^{4,11}

Em recente revisão sistemática da eficácia da *Luffa operculata* no tratamento clínico das rinossinusites, concluiu-se que ainda faltam muitos dados científicos esclarecedores sobre o tema e que as informações disponíveis atualmente ainda são muito controversas.¹² Desta forma, tornam-se necessários novos estudos, criteriosos e confiáveis, para que a *Luffa operculata* possa ser utilizada com segurança e eficiência no tratamento das doenças nasossinusais.^{12,13}

Na tentativa de elucidar tais propriedades, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Luffa operculata* em agentes causadores de rinossinusites.

Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Ciências Patológicas e no Departamento de Otorrinolaringologia, após aprovação dos respectivos comitês científicos. O comitê de ética em pesquisa da instituição dispensou a avaliação do projeto por não se tratar de estudo em seres humanos ou em animais de experimentação.

Obtenção dos microorganismos

Para a realização do ensaio microbiológico, foram selecionados espécimes de origem clínica, armazenados no Laboratório de Microbiologia da instituição, assim como cepas de origem American Type Culture Collection (ATCC).

As cepas ATCC são cepas padrão, com perfil e suscetibilidade conhecidos, ou seja, apresentam número de série que possibilitam saber, independentemente de onde sejam avaliadas, sua resposta frente a antibióticos previamente testados, garantindo assim, a reprodutibilidade do estudo.

Apesar das cepas ATCC apresentarem perfil conhecido, não é possível avaliar a atividade antimicrobiana de um novo medicamento sem a presença de cepas de origem clínica, pois, as cepas ATCC não representam as bactérias que acometem as doenças no dia a dia. Cepas de origem clínica são necessárias, pois apresentam perfis diferentes de suscetibilidade, o que garante maior fidedignidade da avaliação da ação antimicrobiana aos agentes de interesse.

As cepas ATCC podem ser sensíveis ou resistentes. As sensíveis, utilizadas neste estudo, apresentam sensibilidade aos antibióticos utilizados na prática clínica, enquanto as resistentes não. As cepas ATCC, conceitualmente, quando apresentam resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos que seriam originalmente sensíveis, são classificadas em multirresistentes.

Apesar dos agentes etiológicos mais prevalentes das rinosinusites bacterianas serem o *Streptococcus pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis*, existem muitos fatores envolvidos na obtenção, cultura e manutenção de cada agente bacteriano, que influenciaram na escolha dos agentes do nosso estudo.

O *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis* são bactérias fastidiosas, apresentam crescimento lento e necessitam de meios especiais de cultura e nutrientes para o seu desenvolvimento. Tal fato, associado à questão de que a maioria dos pacientes cujas culturas encaminhadas para o laboratório apresentaram tratamento antimicrobiano prévio à coleta do material, fez com que, no período da criação de nossa bacterioteca (26 meses), poucas cepas de *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae* fossem isoladas. Mesmo após seu isolamento, por dificuldade na preservação, nenhuma delas permaneceu viável, impossibilitando seu uso em nossa pesquisa.

Por serem agentes prevalentes nas infecções de vias aéreas superiores, bactérias menos exigentes e, consequentemente, não necessitarem de meios de cultura especiais para manutenção de sua viabilidade e crescimento, foram selecionadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* para este estudo.

A seleção das cepas se deu da seguinte forma:

a. *Staphylococcus aureus* (25 cepas):

1 amostra ATCC-25923 - cepa padrão, com perfil de suscetibilidade sensível e conhecido.

24 amostras de origem clínica com perfil de suscetibilidade variável.

b. *Streptococcus pneumoniae* (25 cepas):

1 amostra ATCC-49619 - cepa padrão, com perfil de suscetibilidade sensível e conhecido.

24 amostras de origem clínica com perfil de suscetibilidade variável.

c. *Streptococcus pyogenes* (25 cepas):

1 amostra ATCC-19615 - cepa padrão, com perfil de suscetibilidade sensível e conhecido.

24 amostras de origem clínica com perfil de suscetibilidade variável.

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* foram transferidas para tubos de ensaio com 10 mL de caldo peptona de caseína de soja, *Tryptic Soy Bean* (TSB), meio que permite a manutenção da viabilidade das bactérias. As suspensões dos microorganismos foram padronizadas comparando-as a 0,5 na escala de Mc Farland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro).

A escala de Mc Farland (tabela 1) é uma escala nefelométrica de 11 tubos, numerada de 0,5 a 10, cujo padrão de turvação é o mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia do Brasil e dos Estados Unidos, para determinar a intensidade de multiplicação bacteriana em meios de cultivo líquidos. A multiplicação bacteriana se opõe à passagem da luz, o que provoca a turvação e a opacificação do meio. Quanto maior o número de bactérias presentes na amostra, maior será o grau de turvação do meio de cultura. Recomendada pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) nos Estados Unidos, a escala nefelométrica de Mc Farland foi adotada e também recomendada pela ANVISA no Brasil.¹⁴ Com essa regulamentação, é possível estabelecer um padrão que pode ser aferido em qualquer local do país, tornando a leitura de seus resultados correspondente.

Obtenção das concentrações de *Luffa operculata*

A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da *Luffa operculata* frente aos agentes testados foi realizada por meio da técnica de macrodiluição em caldo, com a *Luffa operculata* nas concentrações de 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 1% e 2%, em meio de cultura TSB.

Foi utilizado o extrato alcoólico de *Luffa operculata* da empresa farmacêutica Schraiber®, lote número 5.343, de 125 mL, com teor alcoólico de 65% e concentração de *Luffa operculata* de 10%, fabricado em 6/10/2010, com validade até 6/10/2015.

Para obter essas diluições, foi utilizada uma pipeta milimetrada, que permitiu coletas precisas do extrato alcoólico de *Luffa operculata* a 10%, com conteúdo mínimo de 0,1 mL, e tubos de ensaio estéreis e secos, com capacidade para 10 mL de solução. Foram preparados diversos tubos com 10 mL, nas diferentes concentrações, que foram utilizados de acordo com a necessidade, sem que fosse preciso mantê-los armazenados. Ou seja, um novo tubo contendo *Luffa operculata* e TSB, nas diferentes concentrações, foi preparado somente após o término do tubo anterior, visando assim, a evitar qualquer tipo de contaminação decorrente de seu armazenamento (tabela 2).

Tabela 1 Escala nefelométrica de MC Farland com número de bactérias estimado em cada tubo

Tubo nº	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº aproximado de bactérias ($\times 10^8$)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Tabela 2 Cálculo das diluições a partir da concentração inicial do extrato alcoólico de *Luffa operculata* a 10%

Concentrações de <i>Luffa operculata</i> (%)	<i>Luffa operculata</i> 10% (mL)	TSB (mL)	<i>Luffa operculata</i> + TSB (mL)
0,2	0,2	9,8	10
0,3	0,3	9,7	10
0,4	0,4	9,6	10
0,5	0,5	9,5	10
1	1	9	10
2	2	8	10

TSB = Tryptic Soy Bean.

Após essa diluição, foi colocado 1 mL do extrato alcoólico nas diferentes concentrações, em diferentes tubos secos e estéreis de 10 cm × 1,5 cm. Nesses tubos foi acrescido 1 mL de caldo de bactérias a uma concentração de 0,5 Mc Farland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Todos os testes de turvação, semeaduras de 24 e 48 horas e controles foram realizados em duplicata para todas as concentrações, para descartar qualquer tipo de contaminação da amostra.

Controles

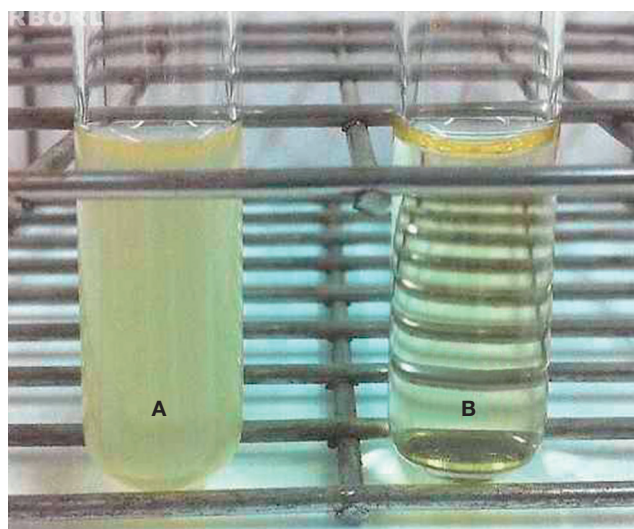
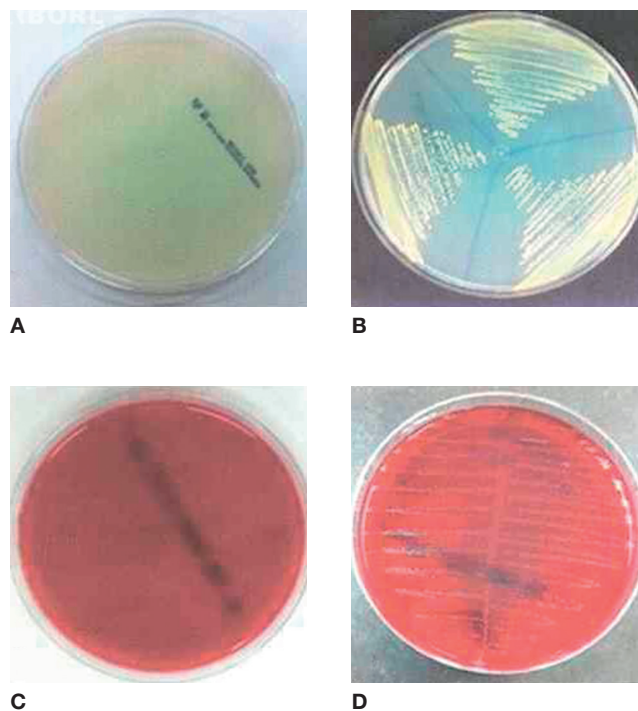
Para evitar viés na interpretação dos dados, foram realizados três controles das amostras: controle negativo, controle positivo e controle alcoólico.

Para a realização do controle negativo, foi utilizado um tubo com 2 mL de *Luffa operculata*, e, para o controle positivo, outro tubo com 2 mL de caldo de bactérias. Esses tubos foram levados à estufa, onde foram incubados a aproximadamente $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 horas. Após as 24 horas, foi feita a leitura dos tubos para verificar se houve ou não crescimento bacteriano, indicado pela turvação do meio. Todos os tubos foram semeados, em placas de ágar-sangue de 90 mm, para avaliar crescimento e viabilidade dos *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, e em placas

de 150 mm de ágar Muller-Hinton, para avaliar crescimento e viabilidade dos *Staphylococcus aureus*. A leitura das placas foi realizada pós 24 e 48 horas.

Para os critérios de análise, foram considerados testes negativos aqueles em que não houve a turvação do meio após a inoculação das bactérias, confirmados pela ausência do crescimento das bactérias nas semeaduras de 24 e 48 horas. Foram considerados positivos os testes que apresentaram turvação do caldo ou positividade nas semeaduras de 24 ou 48 horas (figs. 1 e 2).

A ausência de turvação nos tubos de ensaios não possibilita, se considerada isoladamente, afirmar se existe ou não a erradicação das bactérias no meio contendo *Luffa operculata* e caldo de bactérias. Permite dizer que houve uma concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a mínima concentração na qual o crescimento bacteriano foi inibido.

**Figura 1** A, Presença de turvação; B, ausência de turvação.**Figura 2** Placas de ágar Muller-Hinton: (A) sem crescimento bacteriano; (B) com crescimento bacteriano. Placas de ágar-sangue: (C) sem crescimento bacteriano; (D) com crescimento bacteriano.

Se houve crescimento bacteriano nas sementeiras de 24 e 48 horas, é necessária maior concentração de *Luffa operculata* para que ocorra a morte de todas as bactérias. Quando a ausência de turvação na leitura dos tubos de ensaio é confirmada pela ausência de crescimento bacteriano nas sementeiras de 24 e 48 horas, podemos estabelecer a concentração bactericida mínima (CBM), ou seja, a mínima concentração necessária para a morte de todas as bactérias.

Após a diluição do extrato de *Luffa operculata* a 10% e teor alcoólico de 65% para extratos de *Luffa operculata* nas concentrações de 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 1% e 2%, foram calculados os teores alcoólicos das mesmas (tabela 3).

O maior teor alcoólico encontrado foi de 13%, na concentração de *Luffa operculata* a 2%. Para confirmar a ausência de ação antimicrobiana do etanol nessas diferentes concentrações, tubos com etanol nos diferentes teores alcoólicos entre 1,35% e 13%, e caldo de bactérias foram levados à estufa, onde foram incubados a aproximadamente $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após 24 horas foi realizada a leitura dos tubos para verificar se houve ou não crescimento bacteriano, indicado pela turvação do meio, e sementeira de todos os tubos em placas de ágar-sangue de 90 mm para avaliar crescimento e viabilidade dos *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* e placas de 150 mm de ágar Muller-Hinton para os *Staphylococcus aureus*. O mesmo procedimento foi realizado após 48 horas de incubação.

Para verificar a concordância entre os métodos de turvação e sementeira de 24 e 48 horas, foi utilizado o método Kapa, que visa, por medida de associação, estabelecer concordância entre variáveis qualitativas. Seu valor pode ser igual a zero, ou diferente de zero. Quando diferente de zero, calcula-se o valor de concordância. É considerada fraca concordância, quando $p < 0,4$; moderada concordância, quando $0,4 < p < 0,6$; e forte concordância, quando $p > 0,6$. Todas as amostras foram realizadas em duplicata. O programa utilizado para análise estatística foi o SPSS 13.0 para Windows.

Resultados

Controles

Nenhum dos tubos de controle negativo com *Luffa operculata* apresentou turvação visível ou crescimento de qualquer linhagem de bactérias nas diferentes concentrações.

Todos os controles positivos com caldo de bactérias e todos os controles alcoólicos apresentaram turvação visível e crescimento bacteriano específico de cada caldo, sem contaminação das amostras.

Todos os controles negativos, positivos e com álcool foram realizados em duplicata para todas as amostras e confirmaram seus resultados.

Microorganismos

Todos os tubos que continham *Luffa operculata* nas concentrações a 0,2% e 0,3% e caldo de bactérias com *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* apresentaram turvação após incubação de 24 horas. As sementeiras de 24 e 48 horas confirmaram a presença de bactérias e mostraram crescimento somente dos agentes testados, o que excluiu qualquer tipo de contaminação das amostras.

Nenhum dos tubos que continha *Luffa operculata* na concentração de 0,4% e caldo de bactérias com *Streptococcus pyogenes* apresentou turvação após incubação de 24 horas. Porém, dentre as 25 amostras de *Streptococcus pyogenes* (ATCC - 19615 e 24 amostras clínicas) testadas, uma amostra clínica (4%) apresentou crescimento bacteriano nas sementeiras de 24 horas e de 48 horas (tabela 4).

Dentre os 25 tubos que continham *Luffa operculata* na concentração de 0,4% e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC - 49619 e 24 amostras clínicas), a amostra ATCC e duas amostras clínicas (12%) não apresentaram turvação após incubação de 24 horas nem crescimento bacteriano nas sementeiras de 24 e 48 horas. Cinco outras amostras clínicas (20%) não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, porém apresentaram crescimento após sementeiras de 24 e 48 horas. Dezesete amostras clínicas (68%) apresentaram turvação após incubação de 24 horas e crescimento bacteriano nas sementeiras em 24 e 48 horas. Essas 25 sementeiras apresentaram crescimento somente de *Streptococcus pneumoniae*, o que excluiu qualquer tipo de contaminação das amostras. A análise estatística mostrou Kapa $\neq 0$ e $p < 0,449$, indicando resultado moderadamente sugestivo de resposta antimicrobiana (tabela 4). Todos os tubos que continham *Luffa operculata* nas concentrações a 0,4% e 0,5% e caldo de bactérias com *Staphylococcus aureus* apresentaram turvação após incubação de 24 horas. As sementeiras de 24 e 48 horas confirmaram a presença dessas bactérias.

Tabela 3 Cálculo das diluições e do teor alcoólico a partir da concentração inicial do extrato alcoólico de *Luffa operculata* a 10% e teor alcoólico de 65%

Concentrações de <i>Luffa operculata</i> (%)	<i>Luffa operculata</i> 10% (mL)	TSB (mL)	<i>Luffa operculata</i> + TSB (mL)	Teor alcoólico (%)
0,2	0,2	9,8	10	1,30
0,3	0,3	9,7	10	1,95
0,4	0,4	9,6	10	2,60
0,5	0,5	9,5	10	3,25
1	1	9	10	6,50
2	2	8	10	13,00

TSB = Tryptic Soy Bean.

Tabela 4 Resultados de turvação e semeaduras da *Luffa operculata* nas diferentes concentrações, nos agentes bacterianos

Agente	Concentração	Turvação (n = 25)	Semeaduras de 24 horas e 48 horas (n = 25)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Luffa operculata</i> 0,4%	Negativa 25 (100%)	Negativas 24 (96%) Positivas 1 (4%)
	Kapa = 0 (p não calculado)	Positiva (0%)	Negativas (0%) Positivas (0%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Luffa operculata</i> 0,4% (Kapa ≠ zero p < 0,449)	Negativa 8 (32%)	Negativas 3 (12%) Positivas 5 (20%)
		Positiva 17 (68%)	Negativas (0%) Positivas 17 (68%)
	<i>Luffa operculata</i> 0,5% (Kapa ≠ zero p < 0,528)	Negativa 18 (72%)	Negativas 12 (48%) Positivas 6 (24%)
		Positiva 7 (28%)	Negativas (0%) Positivas 7 (28%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Luffa operculata</i> 1% (Kapa = 0 (p não calculado)	Negativa 4 (16%)	Negativas (0%) Positivas 4 (16%)
		Positiva 21 (84%)	Negativas (0%) Positivas 21 (84%)

Todos os tubos que continham *Luffa operculata* a 0,5%; 1% e 2% e caldo de bactérias com *Streptococcus pyogenes* não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, e não houve crescimento bacteriano nas semeaduras em 24 e 48 horas.

Dentre os 25 tubos que continham *Luffa operculata* na concentração de 0,5% e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC - 49619 e 24 amostras clínicas), a amostra ATCC e 11 amostras clínicas (48%) não apresentaram turvação após incubação de 24 horas ou crescimento bacteriano nas semeaduras de 24 e 48 horas. Seis outras amostras clínicas (24%) não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, porém apresentaram crescimento após semeaduras de 24 e 48 horas. Sete amostras clínicas (28%) apresentaram turvação após incubação de 24 horas e crescimento bacteriano nas semeaduras em 24 e 48 horas. Essas 25 semeaduras mostraram crescimento somente de *Streptococcus pneumoniae*, o que excluiu qualquer tipo de contaminação das amostras. A análise estatística mostrou Kapa = 0 e p < 0,528, indicando resultado moderadamente sugestivo de resposta antimicrobiana (tabela 4).

Os tubos que continham *Luffa operculata* a 1% e 2% e caldo de bactérias com *Streptococcus pneumoniae* não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, e não houve crescimento bacteriano nas semeaduras em 24 e 48 horas.

Dentre os 25 tubos que continham *Luffa operculata* na concentração de 1% e *Staphylococcus aureus* (ATCC - 25923 e 24 amostras clínicas), a amostra ATCC e três amostras clínicas (16%) não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, porém, todas apresentaram crescimento após semeaduras de 24 e 48 horas (tabela 4).

Os tubos que continham *Luffa operculata* a 2% e caldo de bactérias com *Staphylococcus aureus* não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, e não houve crescimento bacteriano nas semeaduras em 24 e 48 horas.

Discussão

Escolha do extrato

Uma das grandes dificuldades para a utilização de plantas em estudos controlados é a falta de padronização dos fitoterápicos. Nenhum dos trabalhos experimentais publicados entre 2001 e 2010 apresentou a mesma forma de obtenção do extrato de *Luffa operculata*.^{4,11-13}

Outra dificuldade para a utilização de plantas *in natura*, especialmente quando se pretende avaliar a ação antimicrobiana de um fitoterápico, é garantir a procedência desse material e a ausência de contaminação. Em artigo publicado em 2001, foi avaliada a qualidade dos frutos secos de *Luffa operculata* do Mercado Municipal de São Luiz do Maranhão, e ficou comprovada a contaminação de todas as amostras do fruto de *Luffa operculata* adquiridos nesse mercado; alguns por fungos, outros por bactérias, o que os tornava impróprios para o uso.¹⁵

Visando evitar a presença de frutos contaminados que pudessem contaminar as amostras do nosso estudo, assim como garantir que o mesmo extrato fosse utilizado em todo trabalho, optamos por utilizar um extrato alcoólico industrializado da *Luffa operculata*, cujo acesso estivesse disponível para replicação do estudo, caso fosse necessário.

É importante salientar que a reprodutibilidade da pesquisa fica restrita ao lote especificamente utilizado neste estudo. Dependendo das condições do solo, da incidência solar e do índice pluviométrico, não é possível garantir que outros lotes, produzidos em outras estações do ano ou em outras plantações, apresentem o mesmo resultado encontrado em nosso estudo. É necessário que outros trabalhos, com diferentes extratos de *Luffa operculata*, nas mesmas concentrações e com os mesmos agentes bacterianos, sejam realizados para garantir alguma comparação.

Concentrações utilizadas

Alguns artigos foram publicados desde a década de 60, na tentativa de avaliar os mecanismos de ação pelo qual a *Luffa operculata* age sobre o epitélio respiratório e comprovar sua eficácia terapêutica no tratamento clínico das rinossinusites.¹² Os autores não encontraram relevância, pertinência ou correta adequação em relação ao tema proposto, que estabelecessem critérios confiáveis para sua utilização com segurança.¹² O uso de forma inadequada, especialmente em altas concentrações de *Luffa operculata*, pode levar, inclusive, a uma piora dos quadros nasossinusais.^{4,6} Mesmo assim, alguns trabalhos clínicos e experimentais citam as concentrações de 0,5% e 1% para o tratamento das rinossinusites.^{13,16,17}

Como não encontramos referências sobre atividade antimicrobiana da *Luffa operculata* na literatura até 2008, quando em um único estudo foi realizado apenas um *screening* com diversas bactérias e fungos,¹⁸ optamos por iniciar a investigação com a concentração de 1%, a mesma presente no extrato comercial liberado pela ANVISA e testada em grande parte dos trabalhos citados na literatura.^{11,13,17} Testamos o dobro da concentração recomendada (2%), estabelecendo, assim, um limite para essa atividade antimicrobiana, sem que se aproximasse de sua DL₅₀^{7,16} ou levasse a um aumento de seus efeitos deletérios à mucosa. Por fim, foram avaliadas outras concentrações entre 0,2%; 0,3%; 0,4% e 0,5%, na tentativa de se estabelecer uma concentração mínima em que a *Luffa operculata* apresentasse efeito antimicrobiano, minimizando ao máximo os seus efeitos colaterais.

Agentes bacterianos

Todos os tubos que continham *Luffa operculata* nas concentrações a 0,2% e 0,3% e caldo de bactérias com *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* apresentaram turvação após incubação de 24 horas, denotando crescimento bacteriano nessas concentrações, e consequentemente, ausência de ação antimicrobiana para qualquer um dos agentes.

Todos os tubos que continham *Luffa operculata* na concentração de 0,4% e caldo de bactérias com *Streptococcus pyogenes*, não apresentaram turvação após incubação de 24 horas, o que denotou ação antimicrobiana para esse agente, nessa concentração. A ausência de turvação visual, isoladamente, fez-nos inferir que, em torno da concentração de 0,4%, foi possível encontrar a CIM para o *Streptococcus pyogenes*.

Como a ausência de turvação visual, confirmada pela ausência de crescimento nas sementeiras de 24 e 48 horas, somente ocorreu nos tubos com *Luffa operculata* em concentrações superiores a 0,5%, inferimos que, em torno dessa concentração, pode-se estabelecer a CBM para esses agentes.

Algumas amostras que continham *Luffa operculata* na concentração de 0,4%; 0,5% e caldo de bactérias com *Streptococcus pneumoniae* não apresentaram turvação do meio. Porém, o fato de algumas amostras apresentarem crescimento bacteriano nas sementeiras confirmou que, assim como para o *Streptococcus pyogenes*, em torno de 0,4% ou 0,5%, podemos estabelecer sua CIM para o *Streptococcus pneumoniae*.

Em concentrações de *Luffa operculata* superiores a 1%, não houve turvação nos tubos contendo *Streptococcus pneumoniae* ou crescimento bacteriano nas sementeiras de 24 e 48 horas; porém, pelo fato de não terem sido testadas concentrações intermediárias entre 0,5% e 1%, não podemos concluir que a CBM para o *Streptococcus pneumoniae* seja a 1%. É possível que em alguma concentração entre 0,5% e 1% ocorra a morte de todas as bactérias testadas, e, para isso, seriam necessários estudos clínicos com um escalonamento maior de concentrações de *Luffa operculata* para estabelecer sua CBM.

Alguns tubos contendo *Luffa operculata* a 1% e caldo de bactérias com *Staphylococcus aureus* não apresentaram turvação visual após a leitura de 24 horas, o que sugere que nessa concentração a *Luffa operculata* apresentou atividade antimicrobiana para esse agente, estabelecendo, assim, sua CIM. Somente na concentração de 2% houve ausência de turvação e ausência de crescimento bacteriano nas sementeiras de 24 e de 48 horas; porém, assim como ocorreu com os *Streptococcus pneumoniae*, não é possível garantir que essa concentração seja sua CBM. A falta de concentrações intermediárias entre 1% e 2% não garante que um valor maior do que 1% e menor que 2% também seja capaz de erradicar todos os *Staphylococcus aureus* (tabela 5).

Apesar de se tratar de cocos Gram-positivos, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* apresentaram perfis de susceptibilidade diferentes à *Luffa operculata*. Concentrações menores, em torno de 0,5%, foram capazes de erradicar todos os *Streptococcus pyogenes*, enquanto somente a 1% erradicaram os *Streptococcus pneumoniae* e a 2%, os *Staphylococcus aureus*. Essa resposta à *Luffa operculata* se deu da mesma forma que estes agentes respondem aos antibióticos convencionais. Muitos são os mecanismos pelos quais essas bactérias desenvolvem resistência ao uso de antimicrobianos.

Tabela 5 Presença ou ausência de crescimento bacteriano nas diferentes concentrações do extrato de *Luffa operculata*

Bactérias	Concentrações de <i>Luffa operculata</i>					
	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%	1%	2%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	–	–	–
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+	+	+	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	–

(+) Presença de bactérias (turvação ou sementeiras positivas).

(–) Ausência de bactérias (turvação e sementeiras negativas).

O *Streptococcus pneumoniae*, por exemplo, apresenta-se capsulado, o que dificulta a ação dos antimicrobianos em sua parede celular. Normalmente, ele apresenta maior resistência aos antibióticos que o *Streptococcus pyogenes*. Já o *Staphylococcus aureus*, apresenta, dentre outros motivos, maior capacidade de criar resistência bacteriana que os agentes anteriores, pelo fato de ser um alto indutor de betalactamase.

Limitações do estudo

A escassez de estudos sobre a atividade antimicrobiana da *Luffa operculata* trouxe grande dificuldade em encontrar referências para a discussão do nosso estudo. O único trabalho que realizou um *screening* sobre a atividade antimicrobiana de algumas cepas ATCC de diferentes bactérias também encontrou CIM para *Staphylococcus aureus* de 100 mg/mL.¹⁸ Em nossa pesquisa, assim como no estudo anterior, avaliamos a cepa ATCC-25923, que apresentou CIM na concentração de 1% junto com outras três amostras clínicas. As outras 21 amostras clínicas testadas apresentaram turvação visual após cultura de 24 horas e crescimento bacteriano após semeaduras de 24 e 48 horas, o que não repetiu os resultados da amostra ATCC. A falta de estudos com extratos em concentrações intermediárias entre 0,5% e 1% não nos permite afirmar que sua CIM é de 1%, mas nos permite inferir que pode estar entre 0,5% e 1%. Da mesma forma, a CBM para *Staphylococcus aureus* também não pode ser estabelecida, mas podemos afirmar que, para essas amostras utilizadas em nosso estudo, encontra-se entre concentrações de 1% e 2% de *Luffa operculata*.

Nenhum estudo anterior avaliou a atividade antimicrobiana da *Luffa operculata* em relação à *Streptococcus pyogenes* ou *Streptococcus pneumoniae*. Claramente, em nosso estudo, os *Streptococcus pyogenes* se mostraram mais susceptíveis à ação antimicrobiana da *Luffa operculata* do que os *Streptococcus pneumoniae*, e estes, por sua vez, em relação aos *Staphylococcus aureus*.

É importante salientar que diversas substâncias, como as cucurbitacinas B e D, glicosídeos, saponina, esteróis livres, ácidos orgânicos e fenóis, foram isoladas na análise fitoquímica da *Luffa operculata*.^{13,16,19} Apesar de uma série de substâncias apresentar efeito terapêutico, outras podem apresentar efeito tóxico e, inclusive, levar a uma piora dos quadros de infecções de vias aéreas superiores.⁴

Assim sendo, mesmo com o efeito antimicrobiano promissor desse fitoterápico,¹⁸ novos estudos devem ser realizados, visando estabelecer quais desses componentes apresentam efeito terapêutico e quais são as concentrações mais adequadas para que seu uso não cause mais prejuízos do que benefícios. Esses estudos devem tentar reconhecer e separar os componentes tóxicos e terapêuticos da *Luffa operculata*, para que se possa embasar ou rejeitar o seu uso no tratamento dos quadros inflamatórios e infecciosos das vias aéreas superiores.^{4,9,11-13}

Considerações para o futuro

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar as propriedades terapêuticas da *Luffa operculata*. Estabelecer a tênue relação de toxicidade e tratabilidade é o desafio a ser alcançado. Encontrar ação antimicrobiana neste fitoterápico pode ser de grande valia no arsenal de tratamento de

doenças das vias aéreas superiores, visto que, a cada dia, mecanismos de resistência bacteriana dificultam o tratamento dessas afecções.

O fato de os fitoterápicos apresentarem variações em suas características e em seus componentes, com alterações dos componentes do solo, índices pluviométricos e sazonalidade de sua coleta, faz com que sua composição seja sempre diferente, com características únicas, o que dificulta a indução de resistência bacteriana.

A partir do momento em que se estabeleça uma dose segura para o uso na cavidade oral, seu efeito antimicrobiano frente ao *Streptococcus pyogenes* poderia ser de grande importância na criação de um *spray* oral para profilaxia de febre reumática. Pacientes com teste rápido positivo e sem sinais e sintomas muito intensos poderiam fazer uso desse *spray* para erradicar o agente, sem o uso de antibióticos de forma sistêmica.

O mesmo pode ser dito para o tratamento de doenças nasossinusais, em que fica comprovada presença de biofilme. Seu efeito cáustico e detergente, por meio das cucurbitacinas e saponinas, se controlados os efeitos colaterais, podem, em baixas doses, ser úteis na destruição da estrutura de polissacarídeos e, conseqüentemente, facilitar a ação de algum antibiótico associado na cura dessas doenças.

É importante continuar buscando esclarecimentos sobre esse e outros fitoterápicos, na tentativa de encontrar soluções para problemas que surgem a cada dia, e nos quais, muitas vezes, não obtemos sucesso com os recursos que disponibilizamos no momento.

Conclusão

O extrato de *Luffa operculata* apresentou promissora atividade antimicrobiana *in vitro* contra os agentes bacterianos causadores de infecções de vias aéreas superiores testados nesse trabalho, tanto naqueles agentes com perfil e suscetibilidade conhecidos (ATCC), como os de origem clínica. Este pode ser um importante passo para criação de novos medicamentos no tratamento dessas afecções.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Anon JB, Jacobs MR, Poole MD, Ambrose PG, Benninger MS, Hadley JA, et al. Antimicrobial treatment guidelines for acute bacterial rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130:1-45.
2. Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial (Departamento de ORL da Associação Médica Brasileira). Diretrizes Brasileiras de Rinossinusites. *Rev Bras Otorrinolaringol (Supl)*. 2008;74:S1-59.
3. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinol Suppl*. 2007;20:1-136.
4. Menon-Miyake MA. Efeitos da infusão de *Luffa operculata* sobre o epitélio e a atividade mucociliar do palato isolado de rã [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

5. Niggemann B, Grüber C. Side-effects of complementary and alternative medicine. *Allergy*. 2003;58:707-16.
6. Menon-Miyake MA, Caniello M, Balbani APS, Butugan O. Inquérito sobre o uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital público terciário. *Caderno de Debates. Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;70:43-55.
7. Silva JB. Algumas pesquisas sobre saponinas da *Luffa operculata*. *Rev Farm Bioquím São Paulo*. 1964;2:153-60.
8. Champney R, Ferguson NM, Ferguson GG. Selected pharmacological studies of *Luffa operculata*. *J Pharm Sci*. 1974;63: 942-3.
9. Silva EA. Contribuição para o estudo farmacológico da *Luffa operculata* cogniaux [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 1983.
10. Glatthaar-Saalmüller B, Fallier-Becker P. Antiviral action of *Euphorbium compositum* and its components. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2001;8:207-12.
11. Roncada PRA. Estudo analítico das alterações estruturais e ultra-estruturais da superfície do epitélio da mucosa nasal (concha inferior e septo nasal) de coelhos após o uso tópico do extrato do fruto da *Luffa operculata* [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2001.
12. Sousa Neto PS. *Luffa operculata*: mecanismo de ação no epitélio respiratório e eficácia terapêutica no tratamento clínico das rinossinusites: revisão sistemática [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2006.
13. Campos CAC. Eficácia de solução tópica nasal de extrato de *Luffa operculata* para tratamento de rinossinusite bacteriana em coelhos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2008.
14. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada-6ª ed. M7-A6, 23; 2011. p. 1-81.
15. Amaral FMM, Coutinho DF, Ribeiro MNS. Controle de qualidade de frutos de *Luffa operculata* Cogn. Comercializados em Mercados de São Luiz/Maranhão, Brasil. *Rev Hosp Univ UFMA*. 2001;3:9-13.
16. Vasques CAV, Vasques NV, Arraes LA, Geller M. Revisão farmacognóstica da cabacinha (*Luffa operculata* Cogn.). *Folha Med*. 1986;93:185-7.
17. Salviano PA. Tratamento da sinusite com preparação contendo *Luffa operculata* e solução fisiológica. *Rev Bras Med*. 1992;49: 681-2.
18. Caribé RA. Abordagem da atividade biológica do extrato de *Luffa operculata* Cogn. (cucurbitaceae) [dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2008.
19. Matos FJA. Farmocognosia de *Luffa operculata* Cogn. *Rev Bras Farm*. 1979;60:69-76.