



Ministério da Educação
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM
Minas Gerais – Brasil
Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas
Reg.: 120.2.095–2011 – PROEXC/UFVJM
Nº 01 – Ano I – 05/2012
www.ufvjm.edu.br/vozes

Ensaio comparativo da avaliação “in vitro” da ação de Gentamicina, Solução Dióxido de Cloro e Nosódio homeopático na inibição do crescimento de bactéria *Escherichia coli*.

Prof^a. Dr^a. Vanda B. dos Reis Toth
Prof^a. Dr^a. Associado I do Departamento de Farmácia e Bioquímica da
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM
E-mail: vanda_reis@hotmail.com

Marina Barra Rodrigues
Discente do Curso de Farmácia da UFVJM
E-mail: marina_r@hotmail.com

Resumo: O estudo comparou a ação de três substâncias (Gentamicina 10mg, antibiótico impregnado em discos, solução de dióxido de cloro nas concentrações de 5%, 10% e 20%, Nosódio homeopático nas potências de 3CH, 6CH e 30CH), na inibição “in vitro” do crescimento da *Escherichia coli*. As análises dos resultados do tamanho dos Halos encontrados e as concentrações mostraram que o antibiótico gentamicina inibiu as cepas de forma eficaz, conforme literatura e por isso utilizado como controle comparativo aos demais. As concentrações de ClO₂ foram mais eficazes comparados a gentamicina, entretanto, o medicamento homeopático preparado a partir da bactéria *Escherichia coli* não mostrou a mesma eficácia, nas potências testadas.

Palavras-chave: Dióxido de cloro. Nosódio homeopático. *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma ampla variedade de microorganismos patogênicos, principalmente em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), onde o uso de antimicrobianos potentes e de largo espectro é a regra e os procedimentos invasivos e rotina (MOURA, 2007), o que geralmente resulta da interação entre microrganismos, meio ambiente e deficiência dos fatores de defesa dos pacientes.

As infecções hospitalares são hoje grande problema epidemiológico, tanto na Saúde Pública como na assistência hospitalar, por elevarem as taxas de morbimortalidade, multiplicar o tempo de permanência dos pacientes nos hospitais e, conseqüentemente por aumentar os custos do tratamento. Aproximadamente 5% dos 30 milhões de pacientes hospitalizados anualmente nos Estados Unidos terão infecção hospitalar (LARSEN, 1996), sendo que os custos destas infecções podem chegar às cifras de quatro bilhões de dólares por ano (STEIN & TREVINO, 1994).

No Brasil, os dados sobre infecção hospitalar são pouco divulgados. Além disso, esses dados não são consolidados por muitos hospitais, o que dificulta o conhecimento da dimensão do problema no país. Como os pacientes que falecem após 48 horas de internação freqüentemente apresentam infecção hospitalar associada, as causas de morte mencionadas no atestado médico da declaração de óbito se constituem em importante fonte de dados para o dimensionamento do problema.

A infecção hospitalar, institucional ou nosocomial, é definida, no Brasil, como toda aquela infecção adquirida após a admissão do paciente em um hospital, e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares, conforme a Portaria n.º 2616 de 12 de maio de 1998(8).

Abramczyk et al., 2003 e De Brito et al., 2003, observaram que as bactérias Gram negativas são os patógenos mais comumente identificados em infecções hospitalares (54,8%), seguidas por bactérias Gram positivas (23,8%), e leveduras

(21,4%). Segundo Levin et al., 1997, bactérias Gram negativas encontram-se amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no solo, no esgoto, em vegetais e principalmente como constituintes da microbiota intestinal de humanos e animais. No ambiente hospitalar pode proliferar em equipamentos, soluções de limpeza, lavatórios, panos-de-chão, medicamentos, desinfetantes e plantas. As superfícies inanimadas de um hospital podem servir como reservatório e fonte de bactérias potencialmente patogênicas. Vários tipos de antibióticos têm sido utilizados e o que se verifica é a resistência de microrganismos a essa classe de medicamentos. Com isso aumenta a dificuldade de controlar as infecções hospitalares.

As soluções de dióxido de cloro (ClO_2) possuem inúmeras vantagens tendo propriedades bactericida, fungicida, algicida, viricida e desodorizante, rápido, econômica, não corrosiva, não forma contaminantes indesejáveis como cancerígenos (THM's), não reage com amônia e assim não forma gosto desagradável ou odor e tem poder biodegradável, solubilizando rapidamente na água o que o torna sustentável para natureza.

Os bioterápicos ou nosódios são produtos não definidos quimicamente que são utilizados como matéria-prima para as preparações dinamizadas. Esses produtos podem ser: secreções, excreções patológicas ou não, produtos de origem microbiana entre como bactérias, fungos e vírus, que segundo a Homeopatia devem seguir a Lei de similitude, estabelecida por Samuel Hahnemann e Farmacopeia Homeopática (2011). Segundo Rossi et al., (2004), esta técnica de utilização dos preparados dinamizados é conhecida como Isopatia (iso = igual, e pathos = sofrimento, doença).

Diante do exposto, o trabalho teve objetivo principal avaliar a eficiência de novos produtos, medicamentos, que possam ser eficientes, ter baixo custo, baixo ou nenhum teor toxidez e não provocar resistência aos microrganismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Gentamicina → Foram utilizados discos impregnados com Gentamicina a 10mg – controle
- Dióxido de Cloro (ClO₂) → A solução de dióxido de cloro foi preparada a partir do ácido cítrico a 20% com água destilada, para então diluir até chegar às concentrações de 10% e 5%. Em seguida acrescentou 75 gotas de do ácido a concentração de 20% e misturou a 15 gotas da solução de dióxido de cloro, agitou-se vigorosamente. Para as outras duas concentrações (10% e 5%) foi realizado o mesmo procedimento.
- Nosódio Homeopático → Foi utilizado o medicamento homeopático produzido a partir da própria bactéria *Escherichia coli*, preparado seguindo os padrões da 3ª. Edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011), em álcool cereal a 70%, preparado nas dinamizações 3CH, 6CH e 30CH,

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas para cada ensaio e dez repetições de discos por placa de Petri.

Esterilização dos materiais

Todos os materiais utilizados no trabalho foram autoclavadas, a uma temperatura de 121°C por um tempo de 15 minutos, utilizando fita adesiva para autoclave, que quando submetida a altas temperaturas ela muda de coloração.

Microorganismo:

Foi utilizada cepa de bactéria *Escherichia coli* cedida pelo Laboratório Emilio Avelar, de Diamantina - MG. Foi realizado o teste bioquímico Rugai Modificado Pessoa e Silva, para autenticar a eficiência de crescimento da bactéria.

Meios de cultura:

No experimento, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura líquido para bactéria Agar MacConkey, composto de Peptona bacteriológica 18,5g/L; hidrolizado enzimático de caseína 1,5g/L; sorbitol 10,0g/L; sais biliares 1,5g/L; cloreto de sódio 5,0g/L; vermelho neutro 0,03g/L; cristal violeta 0,001g/L; agar 13,5g/L; Para o preparo do meio de cultura, foram pesados 37,0g do pó e misturados em um litro de água destilada. A mistura foi levada ao fogo por cerca de 20 minutos, até a dissolução completa do pó. O pH da solução obtida foi de $7,4 \pm 0,2$. e o meio ser auto clavado a 121°C por 15', para esterilização. A seguir o caldo foi distribuído em alíquota num volume de 50 ml para cada placa de Petri. O mesmo procedimento foi utilizado para o meio de cultivo com Agar Mueller Hinton, composto de Extrato de Carne Bovina: 3.00g/L, Caseína Ácida Hidrolisada: 17.50 g/L e Amido: 1.50 g/L, para a realização do antibiograma.

Cultivo da Bactéria Escherichia coli

Uma alíquota da bactéria foi semeada em meio de cultura Agar MacConkey e mantida em estufa a 37°C . Após esta primeira semeadura, a bactéria foi repicada em meio Agar Mueller Hinton para a realização do antibiograma.

Protocolo Experimental:

O procedimento experimental foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade e Microbiologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. O trabalho seguiu rigorosamente o protocolo descrito abaixo, com todos os cuidados técnicos necessários no manuseio das bacterianas viáveis. Este protocolo experimental seguiu a metodologia do teste de concentração inibitória mínima (CIM), método de difusão que permite estimar a influência de medicamentos sobre o crescimento bacteriano.

Inicialmente as bactérias foram inoculadas em soro fisiológico 0,9% e em seguida agitadas utilizando um vortex. A solução fisiológica foi sendo adicionada ao tubo de ensaio até que atingisse uma turvação semelhante a de solução 0,5% McFarland. Após o preparo o tubo de ensaio foi armazenado em estufa a uma temperatura de 37°C por um período de 3 horas.

A preparação dos discos de antibiograma (contendo a solução de dióxido de cloro (ClO₂) e a solução de Nosódio homeopático) foram distribuídas em uma placa de petri em quantidade suficiente para mergulhar os discos. Com auxílio de um swab estéril foi realizada a inoculação em uma placa de petri, contendo o meio Mueller Hinton, das bactérias que cresceram no meio fisiológico, todo esse procedimento foi realizado atrás do bico de Bunsen previamente ligado.

Em um período menor que 10 minutos foram colocados 10 discos com as soluções de dióxido de cloro (nas concentrações de 5%, 10% e 20%) e solução homeopática do nosódio (nas potências de 3CH, 6CH e 9CH), em todas as placas. O mesmo procedimento foi utilizado para o teste com a Gentamicina 10mg não houve necessidade de preparação dos discos, já que foi adquirido os discos já inoculados. Foram realizados testes controle para que no final os resultados pudessem ser comparados com os ensaios e utilizados nos testes estatísticos.

- **Controle positivo:** o controle positivo foi feito com a bactéria no meio Mueller Hinton nas mesmas condições em que foram submetidos os medicamentos.

- **Controle do meio:** para o meio Mueller Hinton, foi feito teste de esterilidade, colocando-se em placa de petri e submetido ao mesmo tempo e condições de incubação.

RESULTADOS

Foram testados duas substancias diferentes, a solução de ClO₂ nas três diferentes (5%, 10% e 20%) e a solução homeopática nas potências de 3CH, 6CH e 30CH, sendo a gentamicina utilizada como controle. Para cada uma dessas substancias foram realizadas quatro placas de petri contendo cada uma 10 discos de cada substancia para cada concentração, sendo assim apresentava uma amostragem de 40 resultados.

A Gentamicina 10mg é o antibiótico padrão preconizado para inibição do crescimento de *E. coli* para comparar os resultados encontrados para os demais discos inseridos com ClO₂ e nosódio homeopático. O halo de cada disco foi medido em centímetro e anotado após 24h de incubação, fotografado e plotado no Excel para elaboração dos gráficos.

Tabela 1. Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de *Escherichia coli* pela gentamicina 10mg.

Gentamicina 10mg					
Descrição	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Médias ^(*)
Disco 01	2,40	2,10	2,50	2,30	2,32
Disco 02	2,00	2,30	2,20	2,20	2,17
Disco 03	2,40	2,50	2,30	2,10	2,32
Disco 04	2,40	2,30	2,20	2,10	2,25
Disco 05	2,30	2,40	2,30	2,20	2,27
Disco 06	2,30	2,40	2,20	2,20	2,28
Disco 07	2,30	2,40	2,30	2,00	2,25
Disco 08	2,20	2,30	2,20	2,20	2,23
Disco 09	2,20	2,40	2,20	2,30	2,27
Disco 10	2,10	2,50	2,20	2,10	2,23

(*) Desvio padrão das m dias dos 40 discos: 0,0445 CV=0,0196 CV%=1,96%

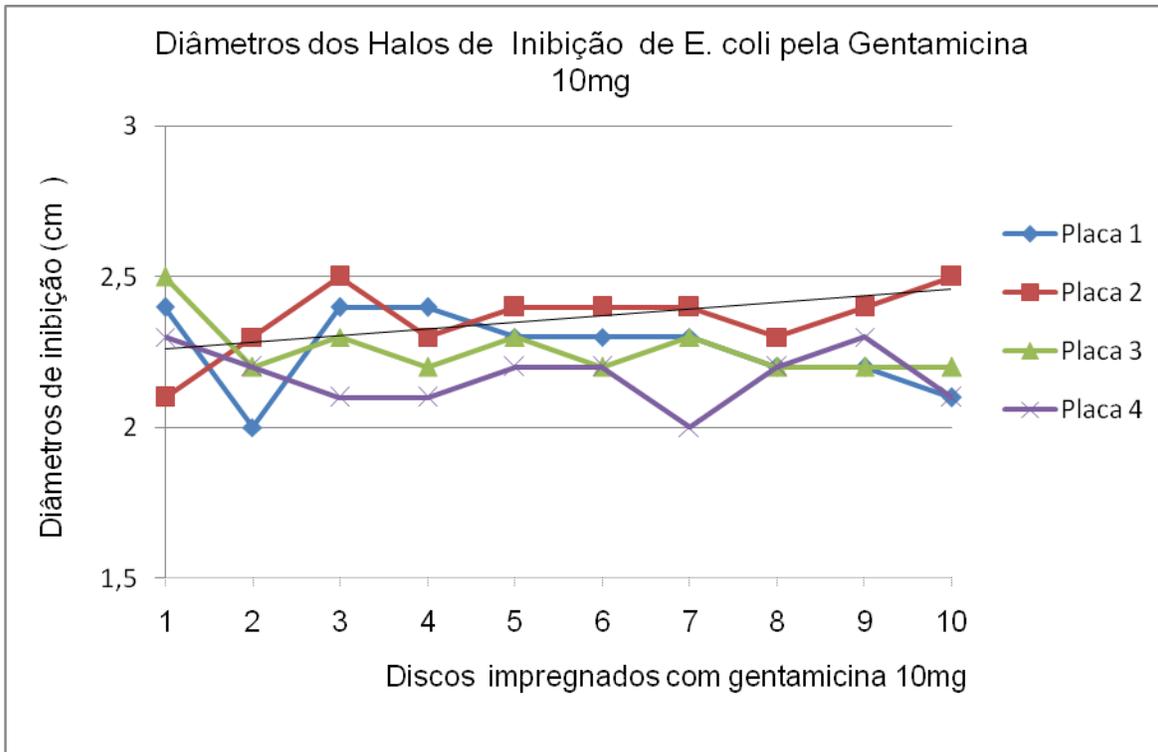


Gráfico 1. Halos de inibição de *Escherichia coli* pela gentamicina 10mg



Figura 1. Placa de Petri com discos do antibiograma-controle (gentamicina 10mg)

Os ensaios realizados com a solução de dióxido de cloro apresentaram resultados cloro 5%.satisfatórios, conforme indicam a Tabela 2 e Grafico 2.

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de *E. coli* com dióxido de

Concentração 5% de dióxido de cloro					
Descrição	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Médias ^(*)
Disco 01	1,30	2,70	2,00	2,60	2,50
Disco 02	2,20	3,40	1,70	2,20	2,40
Disco 03	3,40	4,10	2,90	4,00	3,60
Disco 04	2,60	2,70	3,50	4,20	3,20
Disco 05	2,80	2,40	3,60	3,70	3,10
Disco 06	3,50	3,20	2,90	3,80	3,40
Disco 07	2,80	3,20	3,00	4,10	3,30
Disco 08	2,90	3,00	3,30	3,80	3,30
Disco 09	3,10	3,50	3,60	3,70	3,50
Disco 10	2,50	3,50	3,30	2,10	2,90

(*) Desvio-padrão das médias dos 40 discos: 0,4049 CV=0,1297 CV%=12,97%

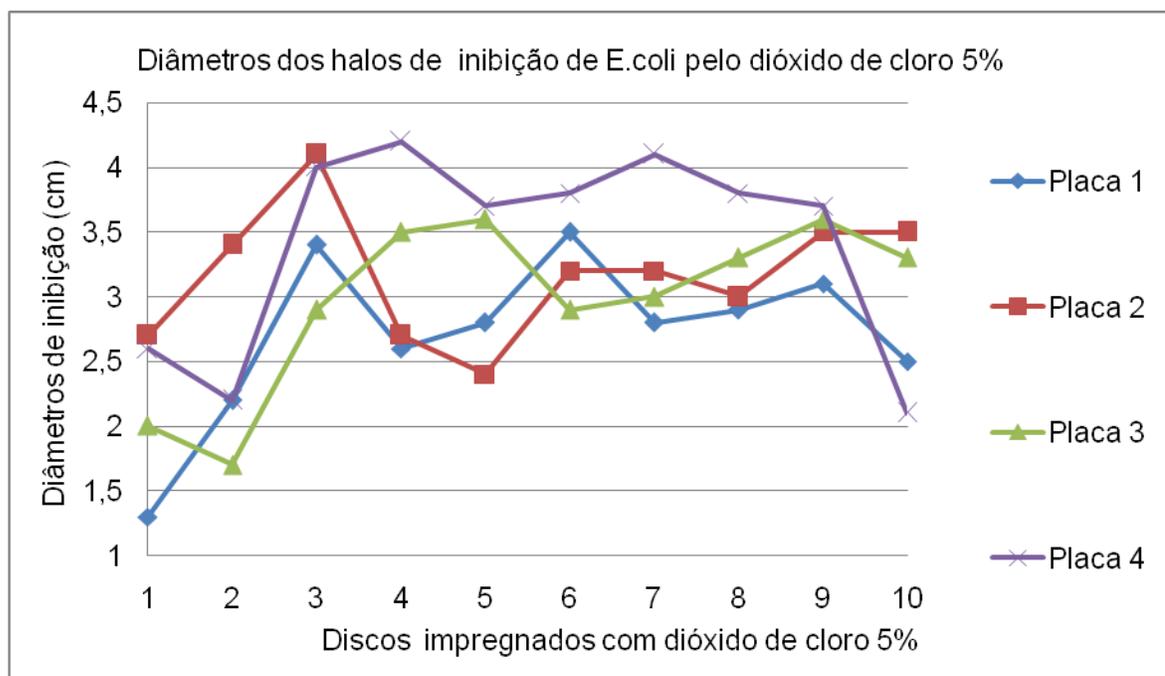


Gráfico 2. Halos de inibição de *Escherichia coli* pelo dióxido de cloro 5%

Tabela 3. Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de *E. coli* com dióxido de cloro 10%.

Concentração 10% de dióxido de cloro					
Descrição	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Médias ^(*)
Disco 01	3,70	2,20	2,80	2,60	3,07
Disco 02	3,60	2,00	2,30	2,20	2,52
Disco 03	4,20	1,60	3,10	4,00	3,22
Disco 04	4,40	2,60	2,50	4,20	3,42
Disco 05	4,30	1,70	1,00	3,70	2,60
Disco 06	4,20	1,40	1,40	3,80	2,70
Disco 07	5,00	1,80	2,90	4,20	3,48
Disco 08	5,60	3,30	3,10	3,80	3,95
Disco 09	5,20	2,70	2,20	3,70	3,45
Disco 10	5,10	1,90	1,40	2,00	2,63

(*) Desvio-padrão das médias dos 40 discos: 0,4713 CV=0,1518 CV%=15,18%

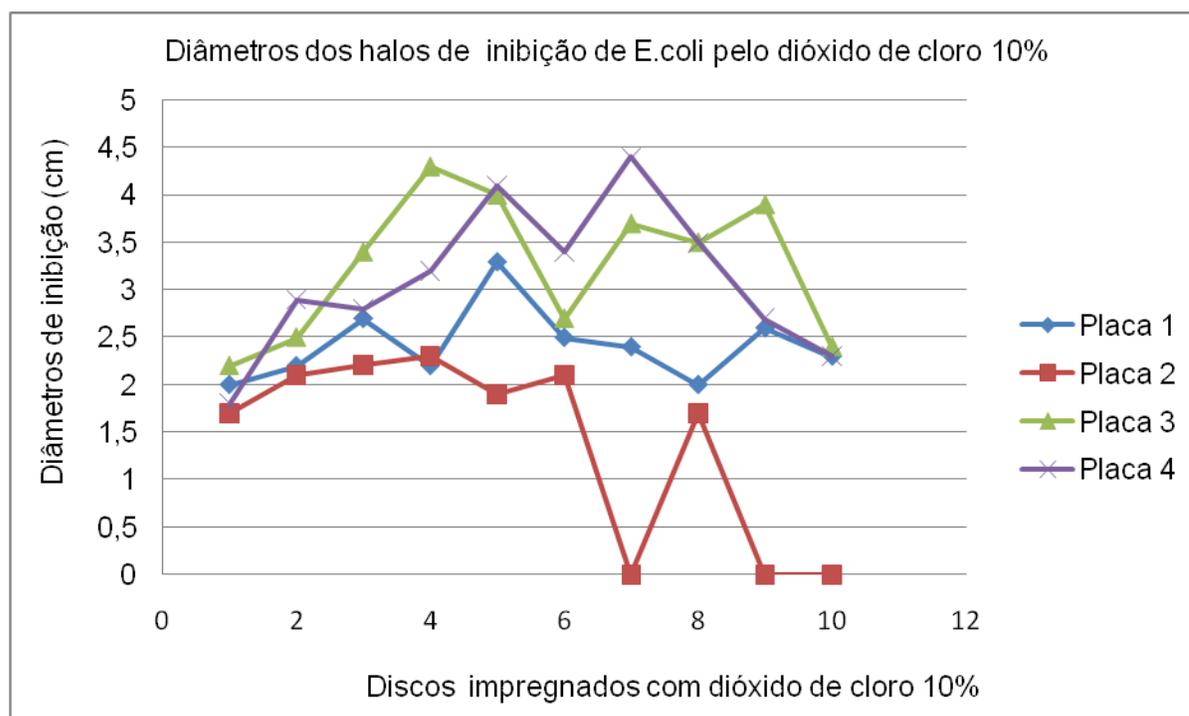


Gráfico 3. Halos de inibição de *Escherichia coli* pelo dióxido de cloro 10%

Tabela 4. Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de *E. coli* pelo dióxido de cloro 20%

Concentração de 20% de dióxido de cloro					
Descrição	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Médias ^(*)
Disco 01	2,00	1,70	2,20	1,80	2,07
Disco 02	2,20	2,10	2,50	2,90	2,52
Disco 03	2,70	2,20	3,40	2,90	3,22
Disco 04	2,20	2,30	4,30	3,20	3,42
Disco 05	3,30	1,90	4,00	4,10	2,68
Disco 06	2,50	2,10	2,70	3,40	2,70
Disco 07	2,40	0,00	3,70	4,40	3,48
Disco 08	2,00	1,70	3,50	3,50	3,95
Disco 09	2,60	0,00	3,90	2,70	3,45
Disco 10	2,30	0,00	2,40	2,30	2,63

(*) Desvio-padrão das médias dos 40 discos: 0,5752 CV=0,1909 CV%=19,09%

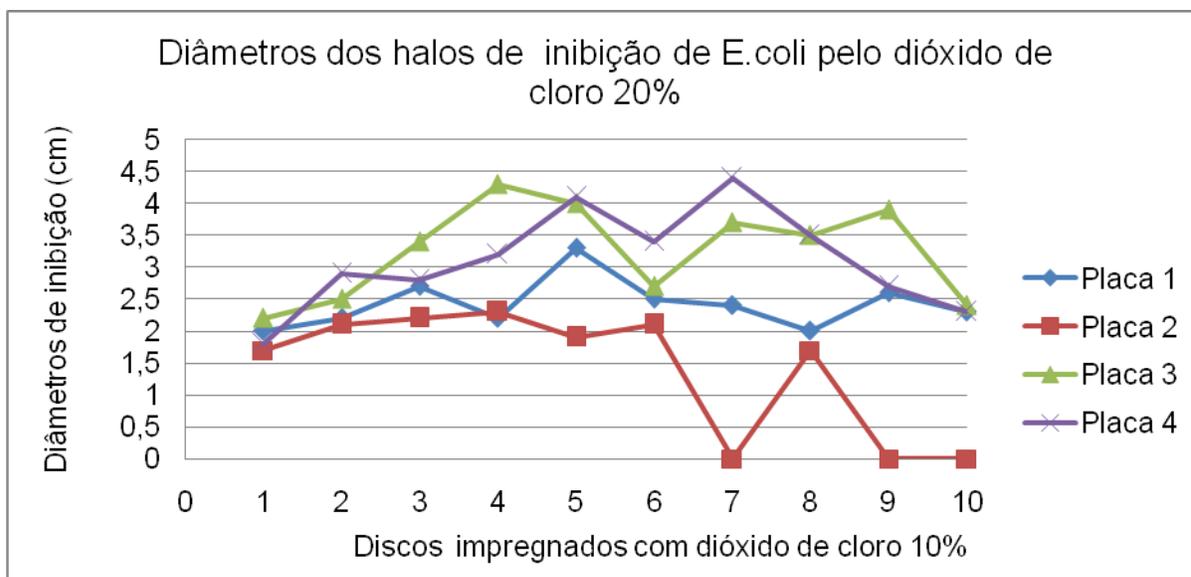


Gráfico 4. Halos de inibição de *Escherichia coli* pelo dióxido de cloro 20%

A segunda e última substância testada foi à solução homeopática de nosódio nas potências 3CH, 6CH e 30CH. A figura 6 representa a placas (A): discos de antibiograma contendo solução homeopática com potência CH3; (B): discos de antibiograma contendo solução homeopática com potência CH6 e (C): discos de antibiograma contendo solução homeopática com potência CH30. Pela observação da figura pode-se inferir que não houve o espalhamento homogêneo da solução homeopática, tornando-se necessário a realização de novos experimentos.

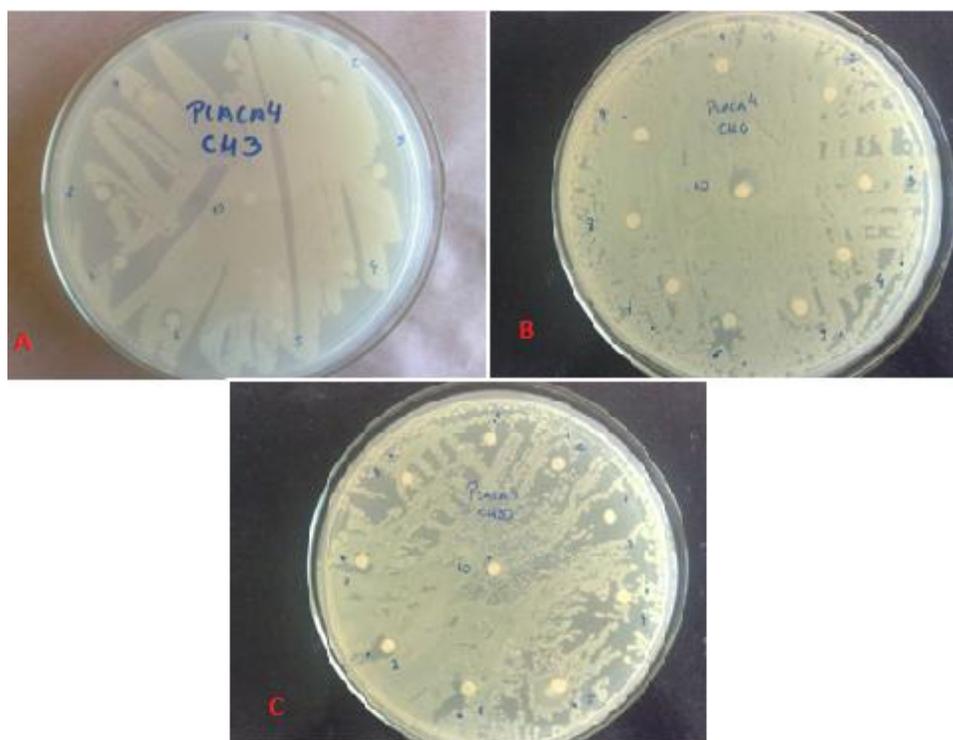


Figura 2. Halos de inibição de *Escherichia coli* pelo pela solução homeopática.

DISCUSSÃO

Em relação à avaliação estatística do sistema-controle e do uso de dióxido de cloro e nosódio homeopático de *E. coli*, as Tabelas 1 a 4 mostram os resultados das médias, desvios-padrão e coeficientes de variação (CV) para as medidas dos diâmetros dos halos de inibição causados por ambas as substâncias.

No sistema-controle, Tabela 1, inibição por gentamicina 10mg, os resultados foram estatisticamente satisfatórios, apresentando um desvio-padrão da média das quarentas leituras de 0,0445 e um coeficiente de variação percentual de 1,96%, indicando variabilidade não significativa em relação a média geral, mostrando assim se tratar de um bom sistema inibitório para o crescimento do microrganismo *Escherichia coli*.

As Tabelas 2 a 4, similarmente, mostram respectivamente os resultados para a aplicação das soluções de dióxido de cloro nas concentrações 5, 10 e 20% (m/v) diluído em ácido cítrico a 20%. Para ambos os ensaios, os desvios-padrão foram respectivamente 0,4049, 0,4713 e 0,5752 com coeficientes de variação percentual iguais a 12,97%, 15,18% e 19,09%.

O coeficiente de variação indica a variabilidade dos dados em relação a média geral e quanto menor o CV mais homogêneo é o conjunto de dados. Um CV é considerado baixo (indicando um conjunto de dados razoavelmente homogêneo) quando for menor ou igual a 25%, entretanto, esse padrão varia de acordo com a aplicação. Desta forma pode-se inferir que embora os resultados para o dióxido de cloro tenham apresentado diferença significativa quando comparado ao padrão gentamicina, são resultados interessantes, uma vez que o percentual de variação dos desvios-padrão foram menores que 25%, situando-se entre 13 e 19%.

A análise dos halos formados, dá uma indicação visual de que possivelmente uma homogeneização mais uniforme das substâncias nos meios de cultura,

provavelmente teria produzido resultados mais satisfatórios. Desta forma sugere-se que novos ensaios sejam realizados com maior rigor técnico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os processos de desinfecção têm como objetivo a destruição ou inativação de organismos patogênicos, capazes de produzir doenças, ou de outros organismos indesejáveis. A primeira a solução testada, foi o dióxido de cloro que proporcionou resultados mais satisfatórios que o controle, embora, tenha sido verificado erros operacionais em relação a secagem da solução de ClO_2 que foram impregnadas nos discos antecedendo a inoculação nas placas de Petri, o que provavelmente tenha ocasionado o derramamento da solução prejudicando as medições dos respectivos halos.

Em relação ao nosódio, não se chegou a resultados esperados, embora não haja na literatura especializada parâmetros de potências usuais para avaliação “in vitro”. Resultados clínicos mostram-se eficazes nessas concentrações para microrganismos, no entanto, não existe na literatura validação desses achados.

A ciência homeopática baseia-se lei dos semelhantes (*Similia similibus curentur* – semelhante cura semelhante), usada empiricamente pelo médico naturalista, Hipócrates (460 a.C) e pelo médico e alquimista, Paracelso (1493 à 1541) e comprovada, experimentalmente, por Samuel Hahnemann, o descobridor da Homeopatia.

De acordo com KOSSAK-ROMANACH (1993), medicamentos homeopáticos são soluções hidro alcoólicas dinamizadas, preparadas a partir de substâncias minerais, vegetais, animais ou de produtos sintetizados, capazes de provocar no homem sadio, sintomas ou um quadro artificial da doença, denominada patogenesia. Assim,

determinada substancia se converterá em medicamento homeopático quando dispuser de patogenesia.

Abstract: The study compared the action of Two substances (10mg gentamicin, an antibiotic-impregnated discs and used as control; solution of chlorine dioxide at concentrations of 5%, 10% and 20% and nosed in homeopathic potencies of 3CH, 6CH and 30CH), for to inhibition "in vitro "in the growth of Escherichia coli. Analysis of the results of the size of the halos and found concentrations showed that the antibiotic gentamicin inhibited strains effectively, according to the literature and was used as a control for to comparison to others products. The concentrations of the CLO2 were more effective when compared with control; however, the homeopathic nosody prepared from the bacterium Escherichia coli did not show the same efficacy in these concentrations.

Keywords: Chlorine dioxide. Nosed homeopathic; Escherichia coli.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos a FAPEMIG, pela contribuição de fomento e assim pelo estímulo à pesquisa e desenvolvimento em Minas Gerais e a UFVJM (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri), bem como pelo incentivo aos acadêmicos que participam desta jornada.

REFERENCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2616, Diário Oficial da União, Brasília, 12 de maio de 1998.

Abramczyk ML, Carvalho WB, Carvalho ES, Medeiros EAS. **Nosocomial Infection in a Pediatric Intensive Care Unit in a Developing Country.** *Braz J Infect Dis* 7(6):375-380. 2003.

De BRITO DVD, OLIVEIRA EJ, DARINI ALC, ABDALLAH VOS, FILHO PPG. **Nosocomial outbreaks due to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit (NICU) of the Uberlândia Federal University Hospital.** *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (Suppl.1):27-28. 2003.

GIORGI, M. S.; CARVALHO, J. C. T.; PASSETI, T. A.; VALENTINE, C. **Avaliação in vitro da ação do medicamento homeopático *Sanguinaria canadensis* sobre *Streptococcus mutans*.** *Cultura Homeopática*, n. 15, p. 11 - 14, abr/jun. 2006.

JUNIOR R. C. **Lei da Semelhança, Dessemelhança e Fisiologia – Os Princípios para a Compreensão das Doenças Crônicas e seu Tratamento Homeopático.** *Associação Brasileira de Reciclagem e Assistência em Homeopatia Unidade de Homeopatia do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo. São Paulo, SP. 2002*

Kossak-Romanach A. **Homeopatia em mil conceitos.** 2ª ed. São Paulo: Elcid,1993. 623p.

Levin ASS, Marinho IS, Arruda EAG. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Filho MBA, Grinbaum RS, Richtmann R. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle.** Editora Sarvier, São Paulo, p. 614-624. 1997.

MEYER, Sheila T.. **O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública.** *Cad. Saúde Pública*, vol.10, n.1, pp. 99-110. 1994.

MOURA, Maria Eliete Batista et al. **Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino.** *Rev. bras. enferm.*, vol.60, n.4, pp. 416-421. 2007.

Rossi, F.; Ambrosano, E. J.; Melo, P.C.T.; Guirado, N.; Mendes, P. C. D.; Bréfere, F. A. T. Emprego da homeopatia no controle de doenças de plantas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.30, n.1, p.156-158, 2004.

Turrini R.N.T., Santo A.H. **Infecção hospitalar e causas múltiplas de morte.** *Jornal de Pediatria*, Vol. 78, Nº6. 2002.

Zibetti A. P. et. al. **EFEITO DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS SOBRE A BACTERIA *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae***. Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Centro Universitário de Maringá. Maringá, Paraná, 2009.

Texto acadêmico publicado em 10 de maio de 2012, na
Revista Vozes dos Vales da UFVJM: Publicações Acadêmicas – MG –
Brasil – Nº 01 – Ano I – 05/2012
Reg.: 120.2.095–2011 – PROEXC/UFVJM –
www.ufvjm.edu.br/vozes