

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO HABITAT NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) E SINERGISMO DESSES EXTRATOS COM FÁRMACOS COMERCIAIS

Thais Soares da Silva; Isabella Macário Ferro Cavalcanti²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas - CAV – UFPE; E-mail:thais.soares1994@gmail.com, ²Docente da disciplina de Microbiologia e Imunologia do CAV – UFPE/pesquisadora do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA – UFPE. E-mail: bel_macario@yahoo.com.br.

Sumário: A disseminação de bactérias multirresistentes é um importante problema de saúde pública. Portanto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) frente a bactérias resistentes, assim como avaliar a interação destes extratos com fármacos comerciais. Inicialmente, as cascas de *S. tuberosa* foram obtidas de diferentes habitats e os extratos foram preparados pelo método de maceração. Posteriormente, a atividade antibacteriana destes extratos foi avaliada frente a isolados clínicos com perfil de resistência do Hospital das Clínicas de Pernambuco pelo método de microdiluição segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A interação antimicrobiana foi realizada através do método Checkerboard. Os extratos apresentaram atividade antibacteriana frente aos isolados clínicos de MRSA (CIM= 250 µg/mL), porém não apresentaram atividade frente a KPC e ESBL (CIM> 250 µg/mL). Adicionalmente, não houve diferença entre a atividade dos extratos obtidos a partir de diferentes habitats. No presente estudo foi observada interação positiva entre extratos de *S. tuberosa* e fármacos comerciais frente ao MRSA (FICI= 0,19 a 0,37). Assim, os extratos de *S. tuberosa* Arruda apresentaram atividade antibacteriana frente ao MRSA e pode ser uma espécie promissora para o desenvolvimento de novos fitoterápicos para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae); Extratos; Atividade antimicrobiana; Interação; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais na terapia de muitas doenças está associada à medicina popular de diferentes partes do mundo (Fabri et al., 2011). Diferentes culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidos ou não, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento das doenças (Coutinho et al., 2006). O aumento da prevalência dos micro-organismos multirresistentes tem estimulado os pesquisadores a buscar novos agentes antimicrobianos como uma estratégia importante para o estabelecimento de terapias alternativas no tratamento destas infecções.

Os extratos vegetais podem apresentar várias atividades biológicas, dentre elas antioxidantes e antimicrobianas (Silva et al., 2012). A atividade antimicrobiana é uma propriedade interessante, uma vez que as infecções microbianas, principalmente as que apresentam como agentes etiológicos os microrganismos multirresistentes e oportunistas têm sido descritos nas últimas décadas como causa frequente de morte entre os pacientes imunodeprimidos (Lourenço et al., 2011; Silva et al., 2012).

Desta forma, a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de diferentes habitats é uma investigação interessante. Portanto o presente trabalho tem por objetivo

avaliar a influência do habitat na atividade antibacteriana de extratos de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), assim como a interação desses extratos com fármacos comerciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras da casca e caule de plantas da área de serra (US), base da serra (UM), pasto (UP), cultivo (UC) e quintal (UR) de uma comunidade rural conhecida como sítio Carão pertencente ao município de Altinho – PE, Nordeste do Brasil. Os extratos foram preparados pelo método de maceração. Após a obtenção dos extratos *Spondias tuberosa* Arruda a atividade antibacteriana desses extratos foi avaliada frente a 12 isolados clínicos com perfil de resistência do Hospital das Clínicas de Pernambuco, 5 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (LMB 15, 16, 30, 35 e 48), 2 bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (LMB 20 e 27), 2 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (LMB 21 e 38) foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) pelo método de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Inicialmente foi adicionado caldo Müeller-Hinton em cada poço das placas. Em seguida foram adicionados os extratos e realizada diluição seriada obtendo uma variação de concentração de 0,5 a 250 µg/mL. Posteriormente as suspensões bacterianas foram adicionadas na concentração de $2-5 \times 10^5$ CFU/mL e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. A CBM foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota dos micro-organismos dos poços em que não houve crescimento bacteriano foi inoculada em ágar Müeller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após este período a CBM foi determinada como a menor concentração que não houve crescimento microbiano (CLSI, 2014). O experimento foi realizado em triplicata. A interação antimicrobiana entre os fármacos levofloxacina (LEV), ciprofloxacina (CIP) e cloranfenicol (CLO) e os extratos foi realizada através do método Checkerboard (An et al., 2011). Inicialmente foram adicionados 100µL de cada mistura em placas de 96 poços obtendo uma concentração final igual ao MIC ou menor que o MIC dos extratos e dos fármacos comerciais. Cada poço recebeu a suspensão microbiana e as placas foram incubadas. O cálculo do valor de FICI (índice da concentração inibitória fracionada) foi realizado pela fórmula: (MIC do extrato em combinação com fármaco comercial/MIC do extrato) + (MIC fármaco comercial em combinação com o extrato/MIC do fármaco comercial). A combinação foi considerada sinérgica quando o FICI for $\leq 0,5$; aditiva quando for 0,5 a ≤ 1 ; indiferente quando for $1 \leq \text{FICI} \leq 2-4$ e antagônica quando o FICI $\geq 2-4$ (An et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de *Spondias tuberosa* Arruda apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos Gram positivos com e sem perfil de resistência, ou seja, os MRSA e MSSA, respectivamente, com CIM que variou de 125 a 250 µg/mL. Com relação às bactérias Gram negativas com perfil de resistência, KPC e ESBL, os extratos não se mostraram eficientes na concentração utilizada, ou seja, a CIM foi maior que 250 µg/mL (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por Rocha e colaboradores (2013), onde a *Spondias tuberosa* Arruda também apresentou eficiência frente aos seguintes micro-organismo, *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) com CIM de 100 µg/mL., *S. salivarius* (ATCC 7073) com CIM de 0,78 µg/mL, *S. oralis* (ATCC 10557) com CIM de 50 µg/mL e *S. parasanguis* (ATCC 903) com CIM de 25 µg/mL. Com relação a CBM foram encontrados os seguintes resultados: 100,00 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Silva (2012) ao estudar a *Spondias mombinaff tuberosa*, uma planta que pertence a família *Anacardiaceae*, também constatou que a mesma possui atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* visto que o extrato aquoso apresentou CIM de 500 µg/mL. Ao comparar com os nossos resultados podemos constatar que a *Spondias tuberosa* Arruda é mais eficiente, pois a CIM apresentada para MRSA e MSSA variou de 125 a 250 µg/mL.

Tabela1: Atividade antibacteriana dos extratos de *Spondias tuberosa* Arruda frente a bactérias com perfil de resistência.

	UR		US		UM		UP		UC	
	CIM µg/mL	CBM	CIM µg/mL	CBM	CIM µg/mL	CBM	CIM µg/mL	CBM	CIM µg/mL	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
MRSA ATCC 33591	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
MRSA										
LMB 15	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
LMB 16	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
LMB 30	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
LMB 35	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
LMB 48	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250	125	>250
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250	>250	250	>250	250	>250	250	>250	250	>250
ESBL										
LMB 20	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
LMB 27	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
KPC										
LMB 21	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
LMB 38	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; LMB: Laboratório de Microbiologia e Imunologia; MRSA; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; ESBL: bactérias produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido; KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase.

No presente estudo foi observada interação positiva (efeito aditivo ou sinérgico) entre extratos de *S. tuberosae* CLO, LEV ou CIP frente ao MRSA. A interação de CLO ou LEV com os extratos UR ou UC foi aditiva na maioria dos isolados clínicos (FICI = 0,50), exceto para o isolado LMB 15 que apresentou efeito sinérgico (FICI = 0,31 ou 0,37). Todas as combinações de CIP com UR ou UC para todos os isolados foi sinérgica (FICI = 0,19 ou 0,25) (Tabela 2). Outros estudos também avaliaram a interação de extratos de plantas e fármacos comerciais. Saraiva e colaboradores (2013) ao avaliarem a interação de oxacilina ou tetraciclina com extratos das folhas *Schinopsis brasiliensis* frente a cepas de MRSA puderam observar interações aditivas (FICI=0,56) e indiferentes (FICI=0,75). Estes resultados ressaltam a importância do aprofundamento em pesquisas nessa área, com o intuito propor novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções provocadas por bactérias com resistência.

Aleixo e colaboradores (2013) ao utilizar extratos das espécies *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea courbaril* em associação com fármacos comerciais, tais como ciprofloxacina e eritromicina, frente á MRSA, também constatou uma relação sinérgica (FICI= 0,18 e FICI=0,5, respectivamente). Estes resultados ressaltam a importância do aprofundamento em pesquisas nessa área, com o intuito propor novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções provocadas por bactérias com resistência.

Tabela 2: Avaliação da interação *in vitro* entre fármacos comerciais e extratos de *Spondias tuberosa* Arruda frente a isolados clínicos de MRSA.

Combinação	MRSA	FICI	Interação	Combinação	MRSA	FICI	Interação	Combinação	MRSA	FICI	Interação
CLO/UR	LMB	0,37	Sinérgica	LEV/UR	LMB	0,19	Sinérgica	CIP/UR	LMB	0,31	Sinérgica
	15				15				15		
	LMB	0,50	Aditiva		LMB	0,25	Sinérgica		LMB	0,50	Aditiva
	30				30				30		
CLO/UC	LMB	0,37	Sinérgica	LEV/UC	LMB	0,19	Sinérgica	CIP/UC	LMB	0,31	Sinérgica
	15				15				15		
	LMB	0,50	Aditiva		LMB	0,25	Sinérgica		LMB	0,50	Aditiva
	30				30				30		
CLO/UR	LMB	0,50	Aditiva	LEV/UR	LMB	0,25	Sinérgica	CIP/UR	LMB	0,50	Aditiva
	48				48				48		
	LMB	0,50	Aditiva		LMB	0,25	Sinérgica		LMB	0,50	Aditiva
	48				48				48		

FICI: Índice da concentração inibitória fracionada; CLO: Cloranfenicol; LEV: Levofloxacina; CIP: Ciprofloxacina; UC: Extratos de plantas da área de cultivo; UR: Extratos de plantas da área de quintal; LMB: Laboratório de Microbiologia e Imunologia; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

CONCLUSÕES

Visto que os extratos de *S. tuberosa* apresentaram atividade antimicrobiana sozinhos ou em associação com fármacos comerciais frente ao MRSA, esta espécie promissora constitui um importante recurso terapêutico para o desenvolvimento de novos fitoterápicos para a indústria farmacêutica, em especial para o tratamento de infecções provocadas por micro-organismos resistente como, por exemplo, o MRSA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **CAPES** pela concessão da bolsa de Iniciação Científica – PIBIC.

REFERÊNCIAS

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement (M100-S24); 2014 (Wayne, PA).
- Coutinho, D. F., Agra, M. F., Filho, J. M. B. & Básilio I. J. L. D. 2006. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (*Lauraceae-Lauroideae*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 178-84.
- Fabri, R. L., Nogueira, M.S., Moreira, J. dos R., Bouzada, M.L. & Scio, E. 2011. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *Journal of Medical Food*, 14: 840-846.
- Rocha, E.A.L.S.S., Carvalho, A.V.O.R., Andrade, S.R.A., Medeiros, A.C.D., Trovão, D.M.B.M. & Costa, E.M.M.B. 2013. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34: 351-355.
- Saraiva, A.M., Saraiva, C.L., Cordeiro, R.P., Soares, R.R., Xavier, H.S. & Caetano, N. 2013. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15: 199-207.