

Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* E *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

ALEIXO, A.A.^{*1}; CAMARGOS, V. N.¹; ANDRADE, A.C.dos S.P.¹; SANTOS, M.¹; CARVALHO, R. S.¹; MIRANDA, V.C.¹; HERRERA, K.M.S.¹; MAGALHÃES, J. T.¹; LIMA, L.A.R.S.²; FERREIRA, J. M.S.¹

RESUMO

Stryphnodendron adstringens e *Hymenaea courbaril* são duas espécies vegetais comuns na região do cerrado brasileiro, tradicionalmente empregadas na medicina popular). Neste estudo, foi demonstrada a atividade dos extratos hidroetanólicos brutos, obtidos das cascas destas plantas, contra o isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI) e a concentração inibitória fracional (CIF) pela técnica checkerboard test. A CIM observada para *S. adstringens* e *H. courbaril* foi de 250 e 500 µg/mL, respectivamente. O efeito combinado 1:1 das amostras vegetais demonstrou forte sinergismo (CIM de 31,25 µg/mL) entre os extratos. Assim, estes resultados mostraram importantes indícios de propriedades antibióticas de *S. adstringens* e *H. courbaril*, notadamente quando combinadas, e ainda, subsídios para pesquisas posteriores do uso de compostos isolados destas espécies como futuros agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por MRSA.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus* MRSA, *Stryphnodendron adstringens*, *Hymenaea courbaril*, antimicrobianos, extratos vegetais.

¹ Universidade Federal de São João Del Rei – Departamento de Microbiologia - CEP 35.501-296 - Divinópolis – Minas Gerais

² Universidade Federal de São João Del Rei – Departamento de Farmacognosia - CEP 35.501-296 - Divinópolis – Minas Gerais

* E-mail: obaldu@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *estafilococos* são colonizadoras ubíquas do epitélio humano e podem exibir um complexo arsenal de toxinas potencialmente fatais¹. A espécie meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) é comumente descrita como a maior causa de infecções hospitalares em todo mundo, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos. Dentre este grupo de risco podem ser incluídos aqueles com extensas áreas com corpo com queimaduras, os que fazem uso de catéteres e também os que se encontram em internação prolongada². Entretanto, nos últimos anos vem sendo relatados muitos casos de infecções com MRSA fora do ambiente hospitalar e com isso, não podem ser mais considerados como uma infecção exclusivamente nosocomial³.

A multirresistência bacteriana aos antibióticos é comumente adquirida através da conjugação de plasmídeos de DNA⁴. A resistência à meticilina de *S. aureus* deriva principalmente da aquisição do gene *mecA*, não nativo, nesta espécie, o qual codifica um proteína modificada de ligação à penicilina (PBP2a) com baixa afinidade para β-lactâmicos⁵.

Estudos epidemiológicos da distribuição mundial de MRSA em ambientes hospitalares apontam altos índices de prevalência. Os maiores índices são observados nas Américas do Norte e do Sul cuja taxa atinge mais que 50%. Na faixa intermediária (25-50%), encontram-se China, Austrália, África e alguns países da Europa tais como Portugal (49%), Grécia (40%), Itália (37%) e Romênia (34%). Países Baixos e Escandinávia apresentam baixos índices de prevalência⁶.

Frente a este cenário de altas taxas de resistência apresentado por bactérias Gram positivas como a *Staphylococcus*, extratos vegetais apresentam-se como uma excelente fonte para a busca de novas substâncias antimicrobianas, pois possuem uma diversidade molecular muito superior quando comparada aos produtos quimicamente sintetizados⁷. Assim, visto à ampla emergência de MRSA em todo mundo, e devido aos poucos estudos encontrados na literatura sobre o potencial antibacteriano de *S.*

adstringens e *H. courbaril*, este trabalho objetivou avaliar a atividade *in vitro* de extratos hidroetanólicos brutos obtidos das cascas destas espécies vegetais frente à amostra clínica MRSA.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra clínica

A amostra Gram positiva meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi selecionada para este estudo devido a sua importância médica em prevalência nas infecções causadas por bactérias. Essa bactéria foi isolada a partir de uma amostra de exsudato de lesão e foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital São João de Deus (HSJD) Divinópolis, Minas Gerais, Brasil, na forma de estrias compostas em placas de Petri, aprovado pelo Comitê de Ética do HSJD (CEP – HSJD), número 186/2011. No hospital, através do sistema automatizado de identificação e antibiograma VITEK2 compact, (BioMérieux, França), a cepa foi identificada quanto ao gênero *Staphylococcus* e pertencente a espécie *Staphylococcus aureus* portadora da enzima Extended Spectrum β -lactamase (ESBL). Esta amostra também mostrou o perfil de resistência aos seguintes antibióticos: Benzilpenicilina e Oxaciclina (Penicilinas), Ciprofloxacina, Moxifloxacina e Norfloxacina (Quinolonas), Eritromicina (Macrolídios) e Clindamicina (Lincosaminas).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012)⁸, com modificações. Os extratos vegetais obtidos das cascas das amostras vegetais por maceração hidroetanólica, foram diluídos em série em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, Brasil) 20% (v/v) nas concentrações que variaram de 1,25 a 0,0195mg/mL. Um inóculo de 125 μ L (5×10^5 UFC/mL) foi adicionado em 25 μ L dos extratos vegetais nas diferentes concentrações citadas em microplacas de 96 poços. DMSO (Vetec, Brasil) 2% (v/v) estéril foi usado como controle negativo e Penicilina

(10.000U/mL)/Estreptomicina (10mg/mL) (Cultilab, Brasil) como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Power Wave XS2, Biotec, EUA) a 490nm. A CIM foi considerada como a menor concentração da amostra capaz de inibir de 80% ou mais do crescimento do microrganismo.

Avaliação do efeito combinado de *S. adstringens* e *H. courbaril* pelo método checkerboard test

Amostras dos extratos brutos das espécies em estudo foram diluídas em série em DMSO (Vetec, Brasil) 20% v/v nas concentrações de 0,125 a 0,0039 mg/mL. Posteriormente, soluções de mesmas concentrações foram combinadas na proporção de 1:1 para avaliação do efeito antimicrobiano resultante da combinação de *S. adstringens* e *H. courbaril* pelo método checkerboard test. Os valores de CIM para cada uma das combinações foram determinados pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito anteriormente. A concentração inibitória fracional (CIF) foi determinado pela soma das razões entre a CIM da combinação e a CIM de cada amostra independente e o resultado interpretado como sinérgico ($\leq 0,5$), aditivo, (0,5-1,0) e/ou antagonista ($\geq 4,0$)⁹.

Análises estatísticas

Todos os testes foram feitos em triplicata e em três experimentos independentes. A análise de variância foi estabelecida por *one-way* ANOVA. Diferenças significativas entre os pares de grupos foram calculados utilizando o teste de comparação múltipla de Tukey com nível de significância de 5%. Os cálculos estatísticos foram realizados no software GrapPad Prism 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras vegetais em estudo mostraram atividade antimicrobiana promissora frente à MRSA. A espécie *S. adstringens* apresentou maior atividade (CIM 250 μ g/mL) quando comparada com os extratos de *H.*

courbaril, que mostraram CIM de 500µg/mL. MRSA mostrou-se sensível frente à combinação dos extratos com CIM de 31,25µg/mL. De acordo com o índice CIF obtido, a interação resultante foi considerada como sinérgica (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos testados individualmente e em combinação (µg/mL), e índice CIF calculado para *S. adstringens* e *H. courbaril* frente à meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Ensaio	Meticilina-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	<i>Hymenaea courbaril</i>
CIM*	250	500
CIM da combinação	31,25	
Índice CIF	0,18 < 0,5	
Interação	sinérgica	

*CIM Penicilina (U/mL) / Estreptomicina (mg/mL) = 31,22 / 0,031

O uso de produtos naturais como protótipos para descoberta de novos fármacos tem crescido em todo mundo e uma enorme diversidade de moléculas isoladas dessas fontes com atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, vem sendo descritas de maneira crescente desde o século passado¹⁰. A literatura considera que extratos brutos vegetais com CIM abaixo de 1000µg/mL são considerados como promissores para prospecção de novas substâncias com atividade antimicrobiana¹¹.

Tendo em vista a importância clínica da cepa MRSA, os resultados aqui apresentados oferecem subsídios para a pesquisa e descoberta de novos agentes antimicrobianos derivados de *S. adstringens* e *H. courbaril*. Sendo assim, este trabalho fornece os primeiros relatos da potente atividade antimicrobiana resultante da combinação das duas espécies vegetais em

estudo. Entretanto, a atividade antimicrobiana dessas combinações age por mecanismos ainda não esclarecidos e mais estudos nesta área tornam-se necessários, como o isolamento de substâncias e testes *in vivo*.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho revelaram, pela primeira vez, importantes indícios para a prospecção em *S. adstringens* e *H. courbaril* de novas moléculas com atividade antibiótica contra a bactéria meticilina-resistente *S. Aureus* (MRSA). Tal resultado possui relevância tendo em vista o grande número de mortes associadas a esta bactéria em todo mundo.

REFERÊNCIAS

- (1) KRAKER, M.E.; WOLKEWITZ, M.; DAVEY, P.G.; GRUNDMANN, H.; BURDEN, STUDY GROUP. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, p.1598–605, 2011.
- (2) CHAVEZ, T.T.; DECKER, C.F. Health care-associated MRSA versus community-associated MRSA. **Disease a Month**, v. 54, p. 763–768, 2008.
- (3) STEFANI, S.; CHUNG, D.R.; LINDSAY, J.A.; FRIEDRICH, A.W.; KEARNS, A.M.; WEST, H.; MACKENZIE, F.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 273– 282, 2012.
- (4) JONATHAN S. EDWARDS, LAURIE BETTS, MONICA L. FRAZIERA, REBECCA M. POLLETA, STEPHEN M. KWONG, WILLIAM G. WALTON, W. KEITH BALLENTINE; JULIANNE J. HUANG, SOHRA HABIBI, MARK DEL CAMPO, JORDAN L. MEIER, PETER. B. DERVANE, NEVILLE FIRTH, AND MATTHEW R. REDINBO. Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 2804-2809, 2013.
- (5) PINHO, M.G.; DE LENCASTRE, H.; TOMAS, Z.A. An acquired and a native penicillinbinding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 10886–91, 2001.
- (6) GRUNDMANN, H.; AANENSEN, D.M.; VAN DEN WIJNGAARD, C.C.; SPRATT, B.G.; HARMSSEN D, FRIEDRICH, A.W. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. **PLoS Medicine**, v. 7 ed. 1000215, 2010.
- (7) NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O., DAVID, J. M. *et al.* Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p.5-8. 2003.
- (8) CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6**, Wayne, Pa, 2012.
- (9) SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 279-285, 2006.

- (10) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- (11) ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOUE, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.