

Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*

SARAIVA, A.M.^{1*}; SARAIVA, C.L.¹; CORDEIRO, R.P.²; SOARES, R.R.¹; XAVIER, H.S.¹; CAETANO, N.¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, CEP: 50.740-521, Recife-PE, Brasil; ²Associação Caruaruense de Ensino Superior, CEP: 55.016-400, Caruaru-PE, Brasil. *e-mail: saraivas2@yahoo.com.br

RESUMO: No presente estudo objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana e sinérgica de 4 frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl (F1', F2', F1" e F2") frente às cepas *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes. Os métodos utilizados foram poços de difusão em ágar, concentração mínima inibitória (CMI) - diluição em ágar, e bioautografia. Nos resultados bioautográficos observou-se três halos de inibição relacionados, no mínimo, à quatro constituintes ativos; sendo dois deles isolados das folhas (galato de metila e ácido gálico). A F2" (200µg/mL) apresentou halos de inibição de 16 e 19mm frente as cepas de *S. aureus* multirresistente e *Klebsiella pneumoniae*, e CMI 100µg/mL, respectivamente. Quanto as análises das associações das frações F1" ou F2" (25 e 50µg/mL) com a tetraciclina e oxacilina, mostraram ações aditiva e sinérgica para a F2" (50µg/mL), embora não suficiente para que a CMI atingisse valores inferiores a 2 e 4µg/mL, necessário para serem classificadas como cepas sensíveis a oxacilina e tetraciclina, respectivamente. "Assim, conclui-se que a F2" das folhas de *S. brasiliensis* apresentou potencial antimicrobiano frente às cepas de *S. aureus* MRSA multirresistentes e que as associações das frações com os antibióticos testados não apresentaram benefícios não justificando o uso concomitante.

Palavras-chave: *Schinopsis brasiliensis*, *Staphylococcus aureus*, Atividade antimicrobiana, Multidroga-Resistente.

ABSTRACT: Antimicrobial and synergic activity of fractions from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engl. against *Staphylococcus aureus* multiresistant clones. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and synergic activity of 4 leaf fractions of *Schinopsis brasiliensis* Engl (F1', F2', F1" and F2") against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. The used methods were agar well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) - agar dilution, and bioautography. The bioautographic results showed three inhibition zones that corresponded to at least four active compounds, two of which (methyl gallate and gallic acid) have already been isolated from leaves. The F2" (200µg/mL) fraction showed inhibition zones of 16 mm and 19 mm against *S. aureus* multidrug-resistant and *Klebsiella pneumoniae* strains and a MIC value of 100µg/mL, respectively. The analyses of associations of fraction F1" or F2" (25 and 50µg/mL) with tetracycline and oxacillin showed additive and synergistic action for F2" (50µg/mL), although it was not enough to decrease the MIC values to less than 2 and 4µg/mL, necessary to classify the strains as susceptible to oxacillin and tetracycline, respectively. Thus, it was concluded that F2" from the leaves of *S. brasiliensis* showed antimicrobial potential against multidrug-resistant MRSA strains, and the associations of the fractions with the tested antibiotics showed no benefits, not justifying their concomitant use.

Key words: *Schinopsis brasiliensis*, *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial activity, Multidrug-resistant strains.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são as principais causas de mortes prematuras no mundo, sendo estimado 15 milhões de óbitos por ano. O crescimento

da resistência bacteriana é um fator importante na ocorrência deste quantitativo de mortes, além de que, esta ameaça também dificulta a cura e eleva os

Recebido para publicação em 27/07/2011

Aceito para publicação em 26/04/2012

gastos com a assistência a saúde (WHO, 2008). Na procura de novas alternativas para tratar as infecções por bactérias multidrogas resistentes (MDR), interessa a descoberta de novos produtos de origem vegetal ou de síntese. O gênero *Schinopsis* pertence à família Anacardiaceae, classe *Dicotyledoneae*, subclasse das *Rosidae* e ordem *Sapindales* (Prado et al. 1995), que crescem na América do Sul, particularmente *Schinopsis lorentzii* e *Schinopsis balansae*, no norte da Argentina e no Paraguai, e *Schinopsis brasiliensis* árvore endêmica brasileira encontrada na caatinga e pantanal Mato-grossense, popularmente conhecida por “braúna”, “baraúna”, “braúna-do-sertão”, “braúna-parda”, “quebracho”, “chamacoco” e “chamucoco” (Carvalho, 2011; Cardoso et al. 2005; Prado et al. 1995). Na medicina popular as folhas, casca, caule, entrecasca, resina e frutos de *S. brasiliensis* são usados como antiinflamatório em geral, na gripe, febre, tosse, diarreia, disenteria, fraturas (Albuquerque, 2006; Almeida et al. 2005; Albuquerque et al. 2007) e antimicrobiano (Saraiva, 2007).

O estudo das associações de extratos e frações de plantas de uso medicinal com os medicamentos utilizados se faz necessário, em particular, as interações com os antimicrobianos utilizados na clínica, que podem causar interferência na ação farmacológica do antibacteriano, ocasionando recidiva da doença infecciosa, acompanhado de seleção de microrganismos resistentes.

Por tudo isso, justifica-se, inicialmente, o estudo *in vitro* para determinar-se o grau de sinergismo/antagonismo dos extratos e frações com alguns antibióticos utilizados na terapêutica clínica, frente a microorganismos que tenham seu perfil de sensibilidade e resistência determinados (Wang et al. 2003; Stermitz et al. 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da planta

A planta, *Schinopsis brasiliensis* Engl., foi coletada na cidade de Carnaubeira da Penha, Sertão de Pernambuco, nas coordenadas geográficas de 08°19'09" de latitude sul, 38°44'41" de longitude oeste e altitude aproximada de 446 metros (MME, 2005), entre os meses de março e julho de 2004. A excisada da planta foi identificada pela responsável técnica do Instituto Agrônomo de Pernambuco e depositada no Herbário, recebendo o número de registro 70.007.

Preparação do Extrato

As folhas de *Schinopsis brasiliensis* foram secas, trituradas, pesadas e feitas três extrações

sucessivas, pelo processo de decocção utilizando três solventes de polaridades diferentes (n-hexano, acetato de etila e metanol) e deixados em repouso pelo período de 72 horas para cada solvente. O extrato assim obtido foi evaporado (Marconi MA-120) sob pressão reduzida (45°C), sendo então pesados e calculados seus rendimentos (Saraiva, 2007).

Fracionamento do Extrato

A partir de 5 g do extrato metanólico das folhas (BFM) foi realizado fracionamento em coluna de sílica-gel, tendo como fase móvel o solvente acetato de etila, onde se obteve onze frações (100 mL), juntando-se as duas primeiras (F1' - 3120 mg) e a terceira com a quarta (F2' - 627 mg). A partir de F1' realizou-se uma nova coluna cromatográfica, tendo como fase estacionária a Sephadex LH-20 e o metanol como fase móvel, obtendo-se 103 frações (10 mL), das quais juntaram-se as frações da 14ª à 28ª (F1'' - 1290 mg) e da 50ª à 70ª (F2''' - 386 mg), após visualização em cromatografia em camada delgada.

Atividade Antimicrobiana

Linhagens Microbianas

Nos estudos foram utilizadas vinte cepas de *Staphylococcus aureus*, das quais dezenove isolados clínicos e uma cepa padrão. Dos dezenove isolados de *S. aureus*, dezesseis são cepas multirresistentes (nove clones epidêmico brasileiro - A cinco clones pediátricos - B e dois clones esporádicos - G, I) e três cepas de *S. aureus* sensíveis a metilicina (MSSA) (Tabela 1) (Miranda et al. 2007).

Também foram estudadas outras bactérias Gram negativas e Gram positiva, todas cepas padrão ATCC (Tabela 2).

A fim de avaliar a atividade antifúngica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* foi realizado testes frente a três isolados clínicos leveduriformes (Tabela 3).

Preparo dos Inóculos microbianos

Os inóculos bacterianos e fúngicos, 10⁸ e 10⁶ UFC/mL respectivamente, foram padronizados conforme as normas da Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003; 2004).

Halos de inibição – Poços difusão em ágar

Os produtos testes foram preparados: tetraciclina (Tet) 300µg/mL (bactérias), cetoconazol (Cet) 500µg/mL (Leveduras) e as frações (F1', F2', F1'' e F2''') 2000 µg/mL.

Os inóculos (Bactérias ou leveduras) foram semeados (swab estéril) na superfície das placas de ágar Mueller Hinton (MH) (CLSI, 2003) ou ágar

TABELA 1. Linhagens de *Staphylococcus aureus*

Cepas	Perfil	Clone	Origem
AM594	MRSA	A ₁₃	Ponta de cateter
AM599	MRSA	B ₃	Secreção de úlcera
AM642	MRSA	B ₅	Secreção
AM771	MRSA	B ₃	Secreção de cateter
AM791	MRSA	A ₉	Secreção de saída tenckoff
AM793	MRSA	A ₁	Secreção traqueal
AM799	MRSA	A ₁	Ponta de sonda vesical
AM837	MRSA	A ₈	Ponta de cateter
AM858	MRSA	A ₇	Ponta de cateter
AM860	MRSA	B ₂	Hemocultura
AM872	MRSA	G	Urina
AM876	MRSA	I	Hemocultura
AM895	MRSA	A ₅	Hemocultura
AM902	MRSA	A ₃	Secreção de orifício
AM922	MRSA	B ₄	Ferida perna esq.
AM948	MRSA	A ₁₀	Ponta de cateter
AM532	MSSA	-	Secreção Ferida operatória
AM632	MSSA	-	Ferida operatória
AM672	MSSA	-	Secreção de cateter
AM103	-	-	ATCC 6538

AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; **ATCC:** American Type Culture Collection; **Clone A:** Clone Epidêmico Brasileiro (CEB); **Clone I, G:** Clone Esporádico; **Clone B:** Clone Pediátrico; **MRSA:** *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente; **MSSA:** *Staphylococcus aureus* Meticilina Sensível.

TABELA 2. Linhagens bacterianas de interesse clínico.

Cepas	Origem
AM31 <i>Escherichia coli</i> A	TCC 9723
AM50 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
AM128 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 33186
AM149 <i>Salmonella</i> spp	ATCC 8387
AM206 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14502

AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; **ATCC:** American Type Culture Collection

TABELA 3. Linhagens Leveduriformes de interesse clínico.

Cepas	Origem
AM1158 <i>Candida albicans</i>	Urina
AM1181 <i>Candida tropicalis</i>	Swab retal
AM1168 <i>Candida krusei</i>	Sangue

AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE.

Sabouraud (CLSI, 2004), respectivamente, feito poços de 6mm e aplicados 100µl dos produtos testes nos poços, sendo as placas incubadas a 37° C por 24h. A classificação do potencial antimicrobiano, por essa técnica, se deu pelos diâmetros dos halos de inibição observados: < 9mm, inativo; 9 - 12mm, pouco ativo; 13 - 18mm, ativo; > 18mm, muito ativo. Halos com diâmetro < 9mm, inativo; 9-12mm, pouco ativo; 13-18mm, ativo; > 18mm, muito ativo (Alves et al. 2000).

Concentração Mínima Inibitória - Diluição em ágar

Na técnica para determinação da concentração mínima inibitória (CMI)/diluição em ágar das frações (F1^o e F2^o) e os antibióticos (Tet e oxacilina - Oxa) foram incorporados ao ágar Mueller Hinton (MH), obtendo as respectivas concentrações finais de 1,56µg/mL à 100µg/mL (1:10) e 0,25µg/mL à 64µg/mL (1:10). Os inóculos bacterianos (10⁸ UFC_{µg/mL}) foram depositados na superfície utilizando o multiinoculador de Stears, e então incubou-se a 37°C por 24h. Foi realizado controle do DMSO a 30% e controle positivo. Para a determinação da CMI da Oxa, foi adicionado + 2% NaCl ao meio ágar MH e incubado a 35°C por 24h (CLSI, 2003). O potencial antimicrobiano foi determinado pela medida das CMI das frações dos extratos vegetais, sendo consideradas muito ativas, aquelas que apresentam CMI ≤ 50µg/mL; ativos com CMI entre >50 - 100µg/mL; moderadamente ativos com CMI de >100 - 200µg/mL; baixa atividade com CMI de >200 - 500µg/mL; inativos com CMI > 500µg/mL.

Teste sinérgismo-antagonismo - Concentração Mínima Inibitória - Diluição em ágar

Seguindo os mesmos procedimentos para determinação da CMI dos antibióticos (Tet e Oxa), fez-se quatro novas séries do ensaio com a adição das frações (F1^o ou F2^o) nas concentrações de 50µg/mL ou 25µg/mL, aproximadamente 50% e 25% da CMI destas, respectivamente. Fórmula de obtenção do índice da concentração inibitória da fração (Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI). **A:** Antibiótico; **B:** fração; FICI = CMI(A+B)/CMI(A) + Concentração de (B) na associação/CMI(B); Parâmetros de avaliação: FICI > 2 - Antagonismo; FICI > 1 e < 2 - Indiferente; FICI > 0,5 e ≤ 1 - Aditivo; FICI ≤ 0,5 - Sinérgismo.

Bioautografia

As placas desenvolvidas em duplicata no sistema (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água - 100:3:3:3 v/v), sendo uma utilizada como referência e revelada com 2-Aminoetilfenil

borinato e a outra para bioautografia, a qual ficou sob corrente de ar por 6h, para retirada do resíduo ácido. As placas cromatográficas foram instaladas, numa placa de Petri e recobertas com 20mL meio fundido de ágar MH ($56 \pm 1^\circ\text{C}$) inoculada com uma suspensão salina de *S. aureus* ATCC 6538 (18mL de meio ágar MH + 2 mL da suspensão bacteriana a 10^8 UFC/mL). Após solidificação do meio de cultivo, houve um tempo de pré-difusão de 30 minutos à temperatura ambiente e então incubada por 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período a bioautografia foi revelada com uma solução de 2,3,5-trifeniltetrazólio à 2,5mg/mL e novamente incubada por mais 4 horas.

A presença de zona de inibição, indica a existência de composto ativo (Pessini et al. 2003).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Para confirmação do perfil de sensibilidade e resistência das bactérias e fungos ensaiados, utilizamos como antimicrobianos de referencia à tetraciclina e o cetoconazol, respectivamente. Também, foram utilizadas bactérias e leveduras de diferentes gêneros e/ou espécies para realizar-se uma triagem da atividade antimicrobiana das frações do extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis*.

No estudo bioautográfico observou-se halo de inibição no ponto de aplicação (molécula 4), o que justificaria a atividade antimicrobiana da F2" e dois halos acima, que podem ser resultado de até três moléculas (1, 2 e 3), o que justificaria a atividade

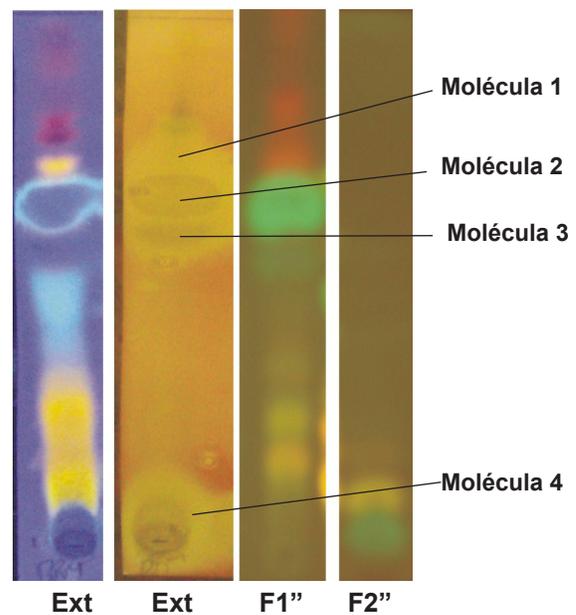


FIGURA 1. Bioautografia do extrato metanólico (Ext) das folhas de *Schinopsis brasiliensis*

F1" e F2": Frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20

antimicrobiana da F1" (Figura 1).

Na técnica poços difusão em ágar (Gráfico 1), observou-se os maiores halos de inibição, sendo da ordem de 20, 19, 19, 19 e 18mm de diâmetro frente as cepas de *Candida albicans*, *Candida*

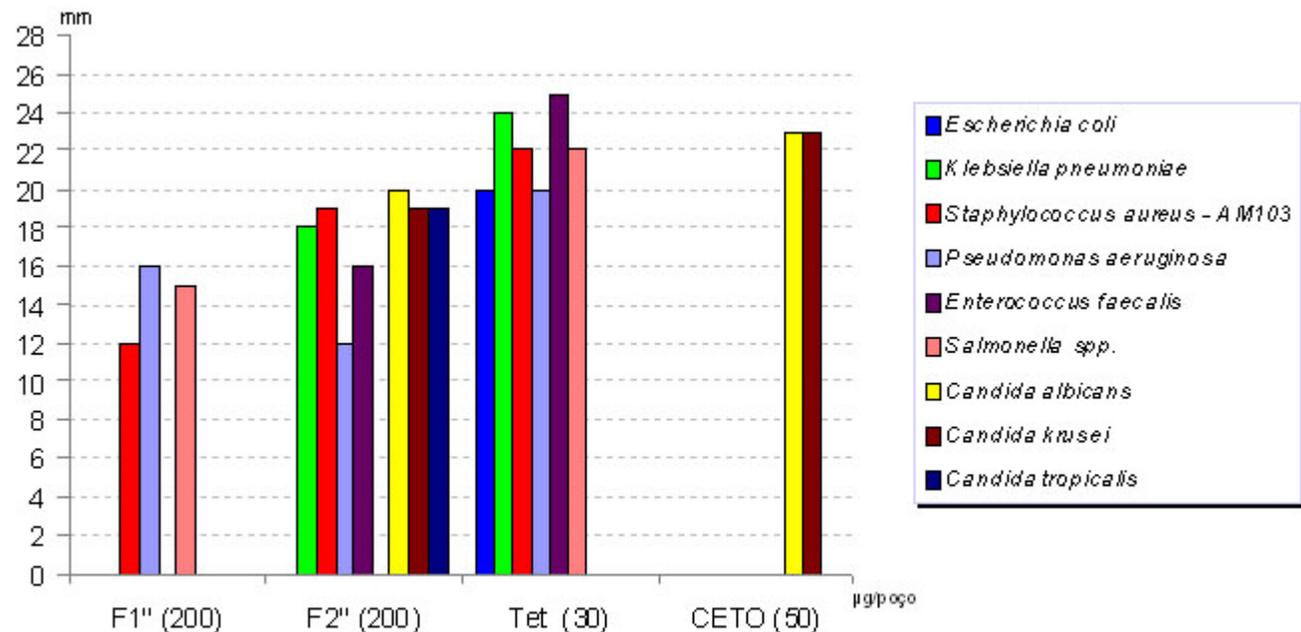


GRÁFICO 1. Atividade antimicrobiana das frações de *Schinopsis brasiliensis* frente bactérias e leveduras de interesse clínico

F1" e F2": Frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20; **AM**: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE;

krusei, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente, referente a fração F2" (200 µg/poço), classificados como muito ativos, e ativo frente a cepa se *K. pneumoniae*. Para a fração F1" (200µg/poço) obteve-se halos da ordem de 15 e 16 mm frente as cepas de *Salmonella* serotipo Montevidéu e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo classificados como ativos (Alves, 2000).

As CMI das frações das folhas de *S. brasiliensis* frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentaram-se como muito ativo e ativo, em particular, frente às cepas de *E. coli* e *S. aureus* para F1" exibindo CMI de 100 e 50µg/mL e F2" CMI de 50 e 25µg/mL, respectivamente (Tabela 4). As CMI confirmaram a atividade antimicrobiana das F1" e F2" para a cepa de *S. aureus* ATCC 6538, que foi evidenciada também pela técnica de poços difusão em ágar.

No estudo antimicrobiano das frações (F1', F2', F1" e F2") das folhas de *S. brasiliensis* frente às cepas de *S. aureus* MRSA multirresistentes, observou-se que a fração F2" resultou nos maiores halos de inibição, sendo classificados como ativos, pelos parâmetros de Alves et al. (2000) e com media de halos de inibição de 16 mm. Enquanto que as frações F1' e F2' apresentaram média de halos de inibição de 15 e 14 mm, respectivamente, sendo ambas classificadas também como ativas. Para a F1", não observou-se halos de inibição na concentração de 200µg/poço frente as cepas de *S. aureus* multirresistentes (Gráfico 2).

Na determinação das CMI das frações (F1', F2', F1" e F2") das folhas de *S. brasiliensis* frente às cepas de *S. aureus* MRSA multirresistentes, a F2" apresentou-se com as menores CMI, igual ou menor que 100 µg/mL, sendo classificadas como

TABELA 4. Concentração Mínima inibitória (CMI) das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis*

Cepas	CMI (µg/mL)				
	F1'	F2'	F1"	F2"	Tet
AM31 <i>E. coli</i>	>100	>100	100	50	4,00
AM50 <i>K. pneumoniae</i>	>100	>100	>100	100	0,50
AM103 <i>S. aureus</i>	>100	100	50,0	25,0	0,25
AM128 <i>E. faecalis</i>	>100	>100	>100	>100	1,00
AM149 <i>Salmonella spp.</i>	>100	>100	>100	>100	1,00

F1', F2': frações obtidas da coluna de sílica; F1" e F2": Frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20; Tet: Tetraciclina; AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE;

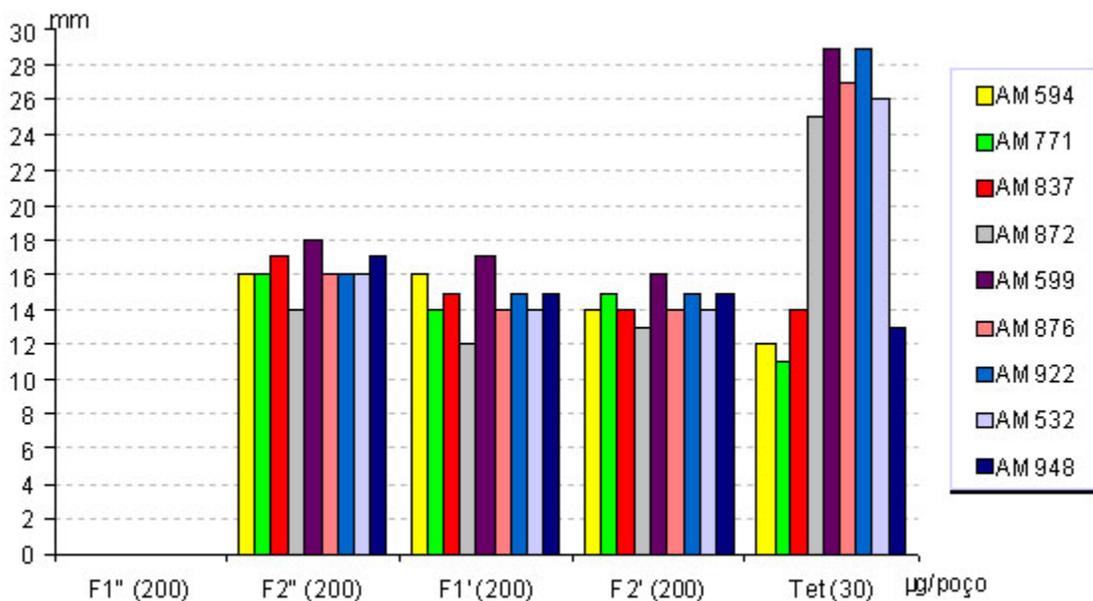


GRÁFICO 2. Atividade antimicrobiana das frações de *Schinopsis brasiliensis* frente às cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes

F1', F2': frações obtidas da coluna de sílica; F1" e F2": Frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20; Tet: Tetraciclina; AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE

TABELA 5. Concentração mínima inibitória das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis*

Código	Concentração Mínima Inibitória						Perfil de Sensibilidade/Resistência	
	F1'	F2'	F1''	F2''	Oxa	Tet	Sensível	Resistente
S. aureus Metecilina Sensível								
AM 532	100	>100	>100	50	<0,25	0,50	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	-
AM 632	>100	>100	>100	100	0,50	1,00	1, 3, 4, 5, 6, 7	8, 2
AM 672	>100	>100	>100	100	<0,25	1,00	1, 2, 3, 4, 5, 6	7, 8
S. aureus MRSA - Clone Epidêmico Brasileiro								
AM 594	100	>100	>100	100	256	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 771	>100	>100	100	100	32,0	0,50	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 791	>100	>100	100	100	256	16,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 793	>100	>100	>100	100	256	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 799	>100	>100	100	100	128	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 837	100	>100	50,0	25,0	64,0	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 858	100	>100	100	100	128	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 860	100	>100	100	50,0	64,0	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 895	>100	>100	>100	100	256	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 902	100	>100	>100	100	16,0	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
AM 948	100	>100	>100	100	258	32,0	1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
S. aureus MRSA - Clone Esporádico								
AM 872	>100	>100	>100	100	256	16,0	1, 5, 2, 7, 6	3, 4, 8
AM 876	>100	>100	>100	100	32,0	2,00	1, 5, 2, 3, 6, 7	4, 8
S. aureus MRSA - Clone Pediátrico								
AM 642	>100	>100	>100	100	32,0	0,50	1, 6, 7, 3	2, 5, 4, 8
AM 599	>100	>100	>100	100	16,0	<0,50	1, 5, 3, 6, 7	2, 4, 8
AM 922	>100	>100	>100	100	16,0	1,00	1, 5, 2, 3, 6	4, 8, 7

F1', F2': frações obtidas da coluna de sílica; F1'' e F2'': Frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20; 1: Vancomicina; 2: Eritromicina; 3: (Tet) Tetraciclina; 4: (Oxa) Oxacilina; 5: Ciprofloxacina; 6: Sulfametoxazol+Trimetoprima; 7: Gentamicina; 8: Penicilina; **MRSA**: *Staphylococcus aureus* Metecilina Resistente; **AM**: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE.

muito ativas e ativas (CMI \leq 50 e CMI $>$ 50 e d¹⁰⁰, respectivamente). Para aquelas frações com CMI $>$ 100 μ g/mL, classificadas como moderadamente ativas, visualizou-se para as F1', F2' e F1'' frente as várias cepas de *S. aureus* multirresistentes. Os antimicrobianos de referência confirmaram o perfil de sensibilidade e resistência dos microorganismos testados (Tabela 5).

Devido a atividade antimicrobiana exibida pelas frações (F1'' e F2'') das folhas de *S. brasiliensis* foi estudada a interação sinérgica/antagônica, por meio do FICI (índice da concentração inibitória da fração), contra a oxacilina (família das Penicilinas) e tetraciclina (dá nome a família) antibióticos amplamente utilizados na determinação do perfil de sensibilidade e resistência para as cepas de *S. aureus*.

A F2'' (50 μ g/mL), aproximadamente à

50% da CMI, em associação a tetraciclina (D) apresentou frente a grande maioria das cepas uma ação aditiva. As associações contendo a F1'' (50 μ g/mL (C) e 25 μ g/mL(A)) apresentaram uma variação do FICI, sendo na concentração de 25 μ g/mL(A), aproximadamente à 25% da CMI, frente a maioria das cepas, classificadas como indiferente (Tabela 6).

A F2'' (50 μ g/mL (d) e 25 μ g/mL(b)) em associação a oxacilina apresentou ação aditiva e sinérgica e a F1'' (50 μ g/mL (c)) foi observada também uma ação sinérgica frente a quatro e ação aditiva a duas, dentre as sete cepas testadas. Na F1'' (25 μ g/mL (a)) houve uma variação do FICI dentre as cepas testadas (Tabela 7).

As F1'' e F2'' (50 μ g/mL – c e d) interagiram de maneira positiva (ação aditiva ou sinérgica), na redução da CMI para oxacilina frente às cepas de *S. aureus* MRSA multirresistentes, embora

TABELA 6. Estudo sinérgico-antagônico das frações de *Schinopsis brasiliensis* contra tetraciclina frente às cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes

AM	CMI							FICI				Resposta			
	Tet	F1"	F2"	A	C	B	D	A	C	B	D	A	C	B	D
594	16,0	>100	100	16,0	16,0	1,00	2,00	1,13	1,25	0,31	0,63	IN	IN	SI	SI
599	1,00	>100	100	1,00	4,00	0,50	2,00	1,13	4,25	0,75	2,50	IN	AN	AD	AN
791	16,0	100	100	16,0	16,0	2,00	8,00	1,25	1,50	0,38	1,00	IN	IN	SI	AD
858	32,0	100	100	16,0	16,0	8,00	16,0	0,75	1,00	0,50	1,00	AD	AD	SI	AD
872	32,0	>100	100	16,0	16,0	32,0	8,00	0,63	0,75	1,25	0,75	AD	AD	IN	AD
902	32,0	>100	100	32,0	64,0	32,0	16,0	1,13	2,25	1,25	1,00	IN	AN	IN	AD
922	1,00	>100	100	1,00	1,00	0,25	0,25	1,13	1,25	0,50	0,75	IN	IN	SI	AD

AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; A: Tet + F1" 25µg/mL; B: Tet + F2" 25µg/mL; C: Tet + F1" 50 µg/mL; D: Tet + F2" 50µg/mL; CMI: Concentração Mínima Inibitória; Tet: Tetraciclina; FICI: Índice da Concentração Inibitória da Fração; AN: Antagonismo; IN: Indiferente; AD: Aditivo; SI: Sinergismo.

TABELA 7. Estudo sinérgico-antagônico das frações de *Schinopsis brasiliensis* contra oxacilina frente às cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes

AM	CMI							FICI				Resposta			
	Oxa	F1"	F2"	a	c	b	d	a	c	b	d	a	c	b	d
594	256	>100	100	64,0	64,0	64,0	16,0	0,38	0,50	0,50	0,56	SI	SI	SI	AD
599	16,0	>100	100	32,0	2,00	64,0	4,00	2,13	0,38	4,25	0,75	AN	SI	AN	AD
791	64,0	100	100	256	32,0	128	8,00	4,25	1,00	2,25	0,63	AN	AD	AN	AD
858	256	100	100	64,0	64,0	256	16,0	0,50	0,75	1,25	0,56	SI	AD	IN	AD
872	256	>100	100	>256	256	128	64,0	2,13	1,25	0,75	0,75	AN	IN	AD	AD
902	64,0	>100	100	128	8,00	16,0	8,00	2,13	0,38	0,5	0,63	AN	SI	SI	AD
922	32,0	>100	100	1,00	0,25	4,00	0,13	0,16	0,26	0,38	0,504	SI	SI	SI	AD

AM: Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; a: Oxa + F1" 25µg/mL; b: Oxa + F2" 25µg/mL; c: Oxa + F1" 50 µg/mL; d: Oxa + F2" 50µg/mL; CMI: Concentração Mínima Inibitória; Oxa: Oxacilina; FICI: Índice da Concentração Inibitória da Fração; AN: Antagonismo; IN: Indiferente; AD: Aditivo; SI: Sinergismo.

na maioria dos casos estas reduções não foram o suficiente para que obtivessem valores das CMI $\leq 2\mu\text{g/mL}$, o qual classificaria as cepas de *S. aureus* como meticilina (Oxacilina) sensível (MSSA ou OSSA), sendo que aqueles com CMI $\geq 4\mu\text{g/mL}$ são classificados como resistentes ou seja, *Staphylococcus aureus* meticilina (oxacilina) resistente (MRSA ou ORSA) (CLSI, 2005).

Em relação às associações das frações das folhas de *S. brasiliensis* com o antibiótico tetraciclina, mostraram-se por meio dos FICI como indiferentes, frente à maioria das cepas testadas, na concentração de 25µg/mL (A e B), visto que não houve alteração nos valores das CMI. Na concentração de 50µg/mL das frações (C e D), em particular frente a F1", foi observada importante ação aditiva e sinérgica, embora as CMI frente às cepas de *S. aureus* multirresistentes não foram a valores classificados como sensíveis (CMI $\leq 4\mu\text{g/mL}$) (CLSI, 2005), exceto na associação da

tetraciclina com a F2" (25 e 50µg/mL – B e D) frente a AM594, uma cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistente (Clone Epidêmico Brasileiro), só sensível a vancomicina, obtendo as CMI de 1 e 2µg/mL, respectivamente.

As frações (F1" e F2") em ambas as concentrações (25 e 50µg/mL) em associação com os antibióticos (tetraciclina e oxacilina) apresentaram frente a cada cepas multirresistente de *S. aureus* uma variação quanto aos resultados, sendo que algumas frações apresentaram ações sinérgicas e aditivas, correspondentes a uma redução dos valores das CMI frente às cepas de *S. aureus* multirresistentes, embora também mostraram-se as vezes indiferentes ou mesmo com ação antagônica, não modificando ou elevando as CMI, respectivamente. Estas variações observadas podem ser devidas às características de resistência intrínseca de cada cepa (Souza et al. 2005), visto que os antibióticos foram utilizados como

agentes principais e as frações (F1^o e F2^o) com agentes secundários, tendo suas concentrações aproximadamente a 25 e 50% da CMI.

O FICI das frações (F2^o e F1^o) + antibióticos (Tetraciclina e Oxacilina), não demonstraram benefícios quanto a redução da CMI frente as cepas de *S. aureus* MRSA testadas, visto que, quando houve redução das CMI, esta não foram a um valor menor que o estipulado pela CLSI (2005) para que a bactéria fosse classificada como sensível ao antibiótico. Sendo assim, o uso concomitante das frações das folhas de *S. brasiliensis* associados aos antibióticos, tetraciclina e oxacilina *in vitro*, embora obtendo em alguns casos aumento da ação antimicrobiana dos antibióticos por reduzir as CMI destes, fato importante, no geral não trouxeram benefícios, já que também reduziu o efeito dos antibióticos, frente a algumas cepas multirresistentes de *S. aureus* (ação antagonica).

Nos três halos de inibição observados na bioautografia, e em referência a correspondente cromatografia em camada delgada (CCD) revelada (2-Aminoetilfenil borinato), observou-se que, no mínimo, quatro moléculas ativas foram relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas (Saraiva et al. 2011), sendo o galato de metila (2) e ácido gálico (3), moléculas já isoladas das folhas de *S. brasiliensis* (Souza, 1990; Moreira, 2009) e de reconhecida atividade antimicrobiana (Nijveltdt et al. 2001; Zaidi-Yahiaoui et al. 2008). A F2^o apresentou melhor atividade antimicrobiana que a F1^o, embora esta ultima haveria de comportar, no mínimo, duas das quatro moléculas ativas (galato de metila e ácido gálico), visualizados no estudo fitoquímico e na bioautografia, enquanto que a F2^o observou-se apenas a molécula 4.

Quanto aos resultados da atividade antimicrobiana das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* foram promissores e fornece dados suficientes para continuar as pesquisas, objetivando o isolamento e elucidção estrutural dos compostos com potencial antimicrobiano guiado por bioautografia.

AGRADECIMENTOS

UFPE; - Grupo Internacional de Pesquisa de Doenças Infecciosas e Resistência Antimicrobiana – GIPDIRA – UFPE

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil, **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.2, n. 30, p.1-10, 2006.

ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the

caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n.3, p.325–54, 2007.

ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**. v.62, n. 1, p.127-42, 2005.

ALVES, T.M.A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.367-73, 2000.

Cardoso, M.P.; David, J.M.; David, J.P. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural Products Research**, v.19, n.5, p.431-433, 2005.

Carvalho, P.E.R. Braúna-do-sertão – *Schinopsis brasiliensis*. **Embrapa - Comunicado Técnico 222**. p.1-9, 2009. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/> acesso em: 15 out. 2011.

CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**, NCCLS. 2003. 49p.

CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15^o Suplemento Informativo**. NCCLS. 2005. 176p.

CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute. **Method for antifungal disk diffusion testing of yeast**. NCCLS. 2004. 23p.

Ministério de Minas e Energia (MME). **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea - diagnóstico do Município de Carnaubeira da Penha**, 2005, 14p.

MIRANDA, O.P. et al. Emergency in Brazil of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC_{meclV} that related genetically to the USA800 clone. **Clinical Microbiology Infection**, v.13, n.12, p.1165-72, 2007.

MOREIRA, B.O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânicos e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardeaceae)**. 2009. 103p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

NIJEVELDT, R. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.4, p.418-425, 2001.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, Supl. 1, p.21-4, 2003.

PRADO, M.C.G.; BARBOSA, D.C.A.; ALVES, J.L.H. Aspecto Morfo-Estruturais da Unidade de Dispersão de *Schinopsis brasiliensis* Engl. “Baraúna” (Anacardiaceae). **Boletim da Sociedade Broteriana de Coimbra**, v.67, n.2, p.187-97, 1995.

SARAIVAA.M. **Estudo Farmacognóstico e Determinação da Atividade Biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA Multirresistentes**. 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Farmácia) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de

- Pernambuco, Recife.
- SARAIVA, A.M. et al. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.14, p.1724-31, 2011.
- STERMITZ, F.R. et al. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydroripin, a multidrug pump inhibitor. **Applied Biological Sciences**, v.97, n. 4, p.1433-1437, 2000.
- SOUZA, M.V.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n.1, p.27-36, 2005.
- SOUZA, O.N. **Chemical Constituents of the Leaves of *Schinopsis brasiliensis***. 1990. 207p. PhD Thesis (Doctor of Philosophy). The Polytechnic of North London, London.
- WANG, Z.Y. et al. An approach for the evolution of synergy between antimicrobials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.3, p.274-278, 2003.
- WHO (World Health Organization). **The Global Burden of Disease- 2004 UPDATE**. WHO Press, 2008. 146p.
- ZAIDI-YAHIAOUI, R.; ZAIDI, F.; BESSAI, A.A. Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*). **African Journal Biotechnology**, v.7, n.4, p.482-6, 2008.