ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL -
PNQM08

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO EXTRATO METANÓLICO DA FOLHA DE *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.

J. S. CRISTO¹, P. E. A. AQUINO¹, P. S. PEREIRA², S. M. A. LIMA², S. R. TINTINO¹, C. D. M. OLIVEIRA¹, T. G. SILVA², H. D. M. COUTINHO¹

¹ Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos

E-mail para contato: sandrinearruda@gmail.com

RESUMO – *O surgimento de linhagens bacterianas resistentes e os efeitos adversos provenientes dos farmacos antibacterianos fazem a necessidade de pesquisas por novos princípios ativos. Myracrodruon urundeuva Fr. All. é conhecida popularmente por suas propriedades medicinais: antibióticas, cicatrizantes e anti-inflamatórias. Infecções por bactérias multirresistentes envolvem várias doenças superficiais e invasivas, inclusive oportunistas, comprometendo pacientes que estão expostos a fatores de risco. A resistência adquirida por espécies como Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli e Staphylococcus aureus ocorre por processo de mutação gênica associada com a disseminação entre as espécies. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano e modulador do extrato metanólico das folhas de M. urundeuva Fr. All. em bactérias multirresistentes.. O extrato metanólico foi testado quanto ao seu efeito antibacteriano e em combinação com amicacina e gentamicina, contra P. aeruginosa, E. coli e S. aureus pelo método de microdiluição em caldo. Foi observado que, a associação entre o antibiótico amicacina e o extrato de M. urundeuva apresentaram antagonismo frente P. aeruginosa e S. aureus, e sinergismo frente E. coli. Mas quando o extrato de M. urundeuva é associado ao antibiótico gentamicina apresenta sinergismo frente todas as linhagens testadas. Sendo assim esse trabalho apresenta relevância clínica diante dos testes com P. aeruginosa, E. coli e S. aureus, obtendo ação moduladora contra os microrganismos.*

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli e Staphylococcus aureus*

ABSTRAT – *The emergence of resistant bacterial strains and the adverse effects from antibacterial drugs, increase the need for research by new active principles. Myracrodruon urundeuva Fr. All. Is popularly known for its medicinal properties: antibiotics, healing and anti-inflammatory. Multiresistant bacterial infections*

involve several superficial and invasive diseases, including opportunistic infections, compromising patients who are exposed to risk factors. The resistance acquired by species such as Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Staphylococcus aureus occurs by the process of gene mutation associated with the spread among the species. In this context, the objective was to evaluate the antibacterial and modulatory potential of the methanolic extract of the leaves of M. urundeuva Fr. All. In multiresistant bacteria. The methanolic extract was tested for its antibacterial effect and in combination with amikacin and gentamicin against P. aeruginosa, E. coli and S. aureus by broth microdilution method. It was observed that the association between the antibiotic amikacin and the M. urundeuva extract presents antagonism against P. aeruginosa and S. aureus, and synergism with E. coli. But when the M. urundeuva extract is associated with the antibiotic gentamicin it presents synergism in front of all tested strains. Therefore, this work presents clinical relevance in the tests with P. aeruginosa, E. coli and S. aureus, obtaining a modulating action against the microorganisms.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli e Staphylococcus aureus

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para fins de prevenção e cura de enfermidades apresenta aplicações já comprovadas, aos quais levou ao desenvolvimento de diversos medicamentos, conhecido como fitoterápicos (VEIGA; PINTO, 2005). Os medicamentos fitoterápicos são formados por uma ampla mistura de substâncias presentes na planta, preparados seguindo critérios rigorosos que obedecem à legislação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (DI STASI, 2007). Geralmente, as combinações fitoterápicas podem ser usadas em diversas formulações como cápsula, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões, estas duas últimas são conhecidas popularmente por chás (FRANCISCO, 2010). Portanto a busca de novas plantas medicinais é uma alternativa promissora.

Myracrodruon urundeuva Fr. All. é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como, urundeuva, aroeira, aroeira do sertão, aroeira do campo, aroeira da serra urindeúva e arindeúva. Apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada no México, Argentina, Bolívia e Paraguai. No Brasil, essa espécie ocorre principalmente na região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (GUEDES et al., 2012; LORENZI, 2002). Devido às excelentes propriedades biológicas como, anti-inflamatória, cicatrizante, antiulcerogênica, anti-histamínica, antibradicinina e analgésica, *M. urundeuva* é muito explorada, tornando-se escassa, sendo encontrada na lista do IBMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) das espécies brasileiras ameaçadas de extinção (GUEDES et al., 2012).

A busca por novas substâncias que possuam atividade antimicrobiana sobre determinado microrganismo, vem recebendo atenção especial da comunidade científica. Estudos são realizados a fim de encontrar novos fármacos provenientes de plantas medicinais que exerçam ação antimicrobiana, principalmente contra microrganismos multirresistentes ou isolados clínicos (OLIVEIRA et al., 2006).

Pseudomonas aeruginosa, bactéria Gram-negativa, é um patógeno hospitalar frequente, do tipo oportunista que se manifesta em qualquer órgão do corpo humano,

principalmente em pacientes imunocomprometidos resultando numa infecção generalizada, capaz de persistir por muitos períodos em ambientes variados e desencadear resistência a agentes antimicrobianos (GALES et al., 2001). Outro exemplo de bactéria Gram-negativa é *Escherichia coli* que pertencente à flora normal do intestino humano podendo contaminar e causar infecções extra intestinais, sendo um dos principais agentes etiológicos de infecção do trato urinário. Esse microrganismo é um dos agentes que apresenta alta capacidade para ampliar resistência, principalmente o sorotipo *E. coli* (ETEC), principal agente etiológico da diarreia neonatal (KAZMIRCZAK et al., 2005). As bactérias Gram-positivas, dentre elas espécies de *Staphylococcus*, são consideradas da flora normal da pele. *Staphylococcus aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de infecção alimentar (SILVA et al., 2004).

Diante do exposto, esse estudo teve como propósito avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana das folhas de *M. urundeuva* Fr. All. na inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

As folhas de *M. urundeuva* Fr. All. foram coletadas no Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil, em um sítio na serra conhecido como Caras do Mari. O material vegetal foi identificado e uma exsicata foi depositada no herbário RB (A.C. de João Marcelo A. Braga), sob número de identificação nº RB 592409.

2.2. Preparação do Extrato Metanólico

Para preparação do extrato metanólico de *M. urundeuva* foram coletadas folhas, e após a coleta foram submersas em metanol por 72 h. Após esse período, o efluente foi filtrado e concentrado em condensador rotativo a vácuo e banho Maria (BRASILEIRO et al., 2006), obtendo assim o extrato metanólico bruto. Para os ensaios microbiológicos foi pesado de 10 mg do extrato e dissolvido em 1 mL dimetilsulfóxido (DMSO 99,9%) ficando uma solução de 10mg/mL, em seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

2.2. Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos do laboratório de microbiologia e biologia molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA. Foram utilizadas três linhagens padrões de bactérias: *P. aeruginosa* ATCC (*American Type Culture Collection*) 15442, *E. coli* ATCC 10536 e *S. aureus* ATCC 25923. Para avaliar a atividade modulatória dos produtos naturais foram usados os seguintes isolados bacterianos multirresistentes: *P. aeruginosa* PA03; *E. coli* EC27 e *S. aureus* SA358. As cepas utilizadas foram mantidas em meio de cultura Heart Infusion Agar - HIA (Difco Ltda.) e antes dos testes as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C em meio *Brain Heart Infusion* BHI (Difco laboratories Ltda.).

2.4. Drogas Utilizadas

As drogas antibacterianas utilizadas nos testes da CMI e modulação foram da classe dos

aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) que atuam diretamente no ribossomo bacteriano.

2.5. Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O método utilizado foi microdiluição em caldo. O inóculo bacteriano foi diluído usando BHI 10% para uma concentração final de 10^5 UFC/mL. Foi distribuído 100 μ L dos inóculos em eppendorf e depois completado com meio de cultura BHI 10% formando um solução de 1 mL. Depois 100 μ L do conteúdo de cada eppendorf foram transferidos para cada poço de uma placa de microdiluição com 96 poços e, em seguida, submetidos a uma diluição 1:1 em série usando 100 μ L do extrato, variando as concentrações entre 512 a 8 μ g/mL (JAVADPOUR et al., 1996). A placa foi incubada durante 24h a 37°C. E pós esse período, foi feito à leitura visual por adição de rezasurina, com mudança de coloração do meio. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento do microbiano (CLSI, 2000).

2.6. Teste de Modulação com Antibióticos

Para verificar se o produto natural poderia alterar a ação de drogas antibacterianas contra as cepas testadas, foi usado o método proposto por Coutinho e colaboradores (2008). O extrato metanólico das folhas de *M. urundeuva* Fr. All. foi testado em concentração subinibitória (CIM/8=128 μ g/mL). Sendo que foi preparada a solução contendo: BHI 10% com o inóculo de microrganismo com 10^5 UFC/mL; extrato em cada poço em eppendorfs e completado com meio de BHI 10%. Em seguida 100 μ L dessa solução forma transferidos para os poços de uma placa de 96 poços. E realizada a microdiluição (1:1) com 100 μ L dos antibióticos (1024 a 0,5 μ g/mL). Os controles utilizados foram a CIM dos antibióticos sozinhos, nas mesmas concentrações sem as substâncias associadas. As placas preenchidas foram incubadas a 37 °C por 24h e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina como no teste de determinação da CIM. Todo o experimento foi realizado em triplicata

2.7. Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como média geométrica. A análise estatística aplicada foi a two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni com o software GraphPadPrism 5.0

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana do extrato metanólico da folha de *M. urundeuva* (EMMU) apresentou CMI ≥ 1024 μ g/mL frente às bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*. Não clinicamente relevante.

Quando uma substância é combinada com um antibiótico e ocorre aumento da atividade do antibiótico, geralmente pela redução do CIM, classifica esse fenômeno como efeito sinérgico. Mas quando há efeito contrário da ação do antibiótico, ou seja aumento do CIM, indica-se que aconteceu um efeito antagônico (CANTON; ONOFRE, 2010). Na associação do extrato em combinação com a amicacina frente a *P. aeruginosa* e a *S. aureus* foi observado antagonismo (aumento da concentração do antibiótico reduzindo o potencial antibacteriano, quando comparado com o efeito da amicacina isolada). Para a combinação amicacina+EMMU frente a *E. coli* e combinação

gentamicina+EMMU para todas as linhagens bacterianas foi observado sinergismo (redução da concentração do antibiótico aumentando o potencial antibacteriano, quando comparado com o efeito da amicacina e gentamicina isolada), conforme a Figura 1.

Figura 1 - Representação do efeito modulador de *Myracrodruon urundeuva*.

* EMMU (extrato metanólico da folha de *M. urundeuva*)

Vários estudos evidenciaram que extratos e óleos essenciais de plantas podem transformar a atividade dos antimicrobianos e assim reformar seu desempenho, reduzindo a concentração necessária afim de inibir o crescimento dos microrganismos (MATIAS et al, 2010).

Estudos de atividades antimicrobianas de *M. urundeuva* já foram descritos anteriormente por Figueredo e colaboradores (2014), que demonstraram a atividade do óleo essencial contra as cepas bacterianas patogênicas utilizando o método de modulação com antibióticos. Também pode ser vista a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico através do teste de difusão em ágar por Pinho e colaboradores (2012).

A combinação de produtos naturais com aminoglicosídeos pode ser uma das formas de diminuir os efeitos indesejáveis dos antibióticos, quando submetido ao tratamento de infecções ocasionadas por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Essa combinação pode conduzir a um efeito sinérgico permitindo, assim, utilização de doses mais baixas para o sucesso terapêutico (FIGUEREDO et al., 2014). Os produtos de origem vegetal podem modificar o efeito dos antibióticos, aumentando ou diminuindo a sua atividade, portanto sendo chamados de modificadores de atividade antibiótica (COUTINHO et al., 2008).

Vários componentes de extratos podem aumentar a permeabilidade da membrana

celular, aumentando a penetração de antibióticos (HELANDER et al., 1998). A interferência com os sistemas enzimáticos das bactérias também pode ser um potencial mecanismo de ação (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995). Estes mecanismos de ação podem ser obtidos pela combinação de antibiótico com extrato em concentração subinibitória, aplicado diretamente ao meio de cultura (COUTINHO et al., 2010). Esta estratégia refere-se à utilização de plantas e drogas em uma abordagem usando mono ou multi-combinações de extrato, que podem afetar não somente um único alvo, mas vários alvos, onde os diferentes componentes terapêuticos colaboram de uma forma sinérgica agonista.

4. CONCLUSÃO

O extrato metanólico da folha de *M. urundeuva* apresentou atividade antibacteriana, principalmente quando submetido ao teste de modulação da atividade antibiótica. Houve interferência na ação antibacteriana dos aminoglicosídeos, mostrando sinergismos em algumas situações e antagonismos em outras. Sugeriu-se que novos testes, como ensaios *in vivo* sejam realizados para melhor a elucidação do real potencial antibacteriano, que poderá resultar em produtos de baixo custo e fácil acesso para a comunidade. Esforços para isolar os compostos responsáveis por essas atividades estão em andamento.

5. REFERÊNCIAS

- BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, p. 195-202, 2006.
- CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 20, p. 348-354, 2010.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5ª ed. Villanova, PA: CLSI approved standard M7-A5, v. 20, 2000.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA-JR, J. P. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian J. Med. Res.**, v. 131, p. 106-108, 2010.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA, J. J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, p. 670-675, 2008.
- DI STASI, L. C. 2007. **Plantas medicinais verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: Ed. UNESP, 2007.
- FIGUEREDO, F. G.; LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S. R.; MATIAS, E. F. F.; LEITE, N. F.; ANDRADE, J. C.; NOGUEIRA, L. F. B.; MORAIS, E. C.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D.; RODRIGUES, F. F. G. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. **Pharm. Biol.**, v. 52, p. 560–565, 2014.

FRANCISCO, K. S., F. 2010. Fitoterapy: on option in odontological treatment. **Rev. Saúde**, v. 36, p. 18-24, 2010.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 183-190, 2001.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; GONÇALVES, E. P.; COSTA, E. G.; MEDEIROS, M. S. Armazenamento de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. em diferentes embalagens e ambientes. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 14, p. 68-75, 2012.

HELANDER, I. M., ALAKOM, I. H. L., LATVA, K. K., MATTILA, S. T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M.; VON, W. A. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

KAZMIRCZAK, A.; GIOVELLI, F. H.; GOULART, L. S. Caracterização das infecções do trato Urinário Diagnosticadas no Município de Guarani das Missões – RS. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 37, p. 205-207, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas**. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MATIAS, E. E. F.; COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (erva-baleeira)**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri, 2010.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz. J. Cardiovasc. Surg.**, v. 21, p. 444-452, 2006.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólico das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Cienc Rural**, v. 42, p. 326-331, 2012.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. À. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 18, p. 32-40, 2004.

VEIGA, J. R.; PINTO, A. C. **Plantas medicinais: cura segura?** Quim Nova, v. 28, p. 519-528,

2005.

WENDAKOON, C.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid de carboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **J. Food Products**, 58: 280-283, 1995.

6. AGRADECIMENTOS

A URCA, UFPE, CNPq e Facepe.