

Estudo fitoquímico e potencial antibacteriano do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel

Eloiza Maria do Nascimento¹
 Pedro Everson Alexandre de Aquino²
 Nara Luana Ferreira Pereira³
 Jacqueline Cosmo Andrade⁴
 Cícera Datiane Moraes de Oliveira⁵
 Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes⁶
 Dárcio Luiz de Sousa Júnior⁷
 Henrique Douglas de Melo Coutinho⁸
 Irwin Rose Alencar de Menezes⁹
 Helenicy Nogueira Holanda Veras¹⁰

1. Biomédica e Especialista em Citologia Clínica (Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil).
 2. Biomédico (Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil). Doutorando em Farmacologia (Universidade Federal do Ceará, Brasil).
 3. Biomédica (Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil). Mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (Universidade Estadual do Ceará, Brasil).
 4. Bióloga (Universidade Regional do Cariri). Doutoranda em Etnobiologia e Conservação da Natureza (Universidade Federal de Pernambuco). Professora da Universidade do Cariri, Brasil.
 5. Bióloga (Universidade Regional do Cariri). Doutoranda em Biotecnologia (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil).
 6. Biomédica (Centro Universitário Dr. Leão Sampaio). Mestre em Bioprospecção Molecular (Universidade Regional do Cariri, Brasil).
 7. Biomédico (Centro Universitário Dr. Leão Sampaio). Mestrando em Química Biológica (Universidade Regional do Cariri, Brasil).
 8. Biólogo e Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Universidade Federal da Paraíba). Professor da Universidade Regional do Cariri, Brasil.
 9. Farmacêutico (Universidade Federal de Pernambuco). Doutor em Química (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil).
 10. Farmacêutica (Universidade Federal do Ceará). Mestre em Bioprospecção Molecular (Universidade Regional do Cariri). Professora do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil.
- *Autor para correspondência: eloizanascimento@hotmail.com

RESUMO

Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel, conhecida popularmente como janaguba, é uma espécie medicinal produtora de látex bastante utilizado na região do Cariri (CE) e empregada como fonte alternativa para o tratamento de inúmeras enfermidades. O presente trabalho teve como principal objetivo testar o potencial antibacteriano e modulador do látex *in natura* (LIHD) e do extrato acetato de etila do látex de *H. drasticus* (EAEHD) isoladamente e em associação com antibióticos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), frente às cepas bacterianas padrão e multirresistentes, seguindo o método de microdiluição em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Na avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) foram obtidos resultados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ frente às cepas padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* tanto para LIHD, quanto para o EAEHD. Os produtos naturais apresentaram sinergismo na atividade dos aminoglicosídeos perante cepas de bactérias multirresistentes *Escherichia coli* (EC 27), *Staphylococcus aureus* (SA 358) e *Klebsiella pneumoniae* (KP 10031), entretanto apresentaram antagonismo perante *Pseudomonas aeruginosa* (PA 03). Na quantificação de fenóis o LIHD possui 62,6 mg/g e o EAEHD 51,8 mg/g de ácido gálico/g de extrato, e para flavanóides totais o LIHD apresentou 16,5 e o EAEHD 13,4 mg/g de flavanóides. Mais pesquisas são necessárias para uma possível utilização desses produtos naturais combinados aos antimicrobianos testados (aminoglicosídeos) frente às linhagens patogênicas. Através dos resultados concluiu-se que os produtos naturais representam fontes promissoras no combate à resistência bacteriana.

Palavras chave: Aminoglicosídeos, Atividade antimicrobiana, Concentração Inibitória Mínima, *Himatanthus drasticus*.

Phytochemical study and antibacterial latex potential of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel

ABSTRACT

Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel, popularly known as janaguba, is a latex medicinal plant widely used in the region of Cariri (CE) and used as an alternative source for the treatment of numerous diseases. The objective of the present work was to test the antibacterial and modulatory potential of the latex *in natura* (LIHD) and ethyl acetate extract of *H. drasticus* latex (EAEHD) alone and in combination with aminoglycoside antibiotics (amikacin and gentamicin) against standard and multiresistant strains, following the method of microdilution in *Brain Heart Infusion* (BHI) broth. In the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) results were obtained $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against the standard strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* for both LIHD and EAEHD. The natural products presented synergism in the activity of the aminoglycosides to strains of multiresistant bacteria *Escherichia coli* (EC 27), *Staphylococcus aureus* (SA 358) and *Klebsiella pneumoniae* (KP 10031), however they presented antagonism to *Pseudomonas aeruginosa* (PA 03). In the quantification of phenols, LIHD had 62.6 mg/g and EAEHD 51.8 mg/g gallic acid/g extract, and for total flavonoids, LIHD had 16.5 and EAEHD had 13.4 mg/g of flavonoids. Further research is needed for a possible use of these natural products combined with antimicrobials tested (aminoglycosides) against pathogenic strains. Through the results it was concluded that the natural products represent promising sources in the fight against bacterial resistance.

Keywords: Aminoglycosides; Antimicrobial activity; Inhibitory Minimum Concentration; *Himatanthus drasticus*.

Introdução

Desde os primórdios da humanidade, os recursos naturais vêm sendo explorados baseado apenas no conhecimento empírico das pessoas que fazem uso desses produtos como fonte de tratamento alternativo na tentativa de ter uma melhora na qualidade de vida (SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012).

Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel é popularmente conhecida como janaguba, tiborna, jasmin-manga, raivosa, pau-de-leite e sucúba. É uma planta pertencente à família Apocynaceae que inclui cerca de 400 gêneros e 4.300 espécies, que habita principalmente a América do Sul (BARATTO, 2010).

A espécie é caracterizada como árvore de porte médio, atingindo aproximadamente sete metros de altura, com presença de flores brancas aromáticas, suas folhas se desenvolvem na extremidade dos ramos apresentando aspecto denso e coloração verde escuro, seus frutos são foliculares com presença de cápsula, possuem sementes, sua casca apresenta aspecto grosseiro e seu tronco produz látex de aspecto leitoso (SPINA, 2004; GOMES, 2008).

Alguns estudos demonstram que o látex de *H. drasticus* é usado na medicina popular como antitumoral, antifúngica, vermífuga, antianêmico, gastrites e artrites e a infusão de sua cas-

ca é utilizada no tratamento de tumores, furúnculos e edemas (SOUSA et al., 2010; LINHARES et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo, evidenciar o possível efeito antibacteriano e modulador de antibióticos do extrato acetato de etila e do látex *in natura* de *H. drasticus* frente a cepas bacterianas, submetendo o extrato à prospecção fitoquímica identificando as classes de metabólitos secundários, com quantificação dos fenóis e flavanóides totais presentes no látex *in natura* e no extrato acetato de etila do látex.

Materiais e Métodos

Delineamento e local de execução dos testes

Trata-se de um estudo experimental, que foi realizado nos Laboratórios de Química e Microbiologia da Faculdade Leão Sampaio – FALS, localizado na cidade de Juazeiro do Norte – CE, e no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais – LPPN da Universidade Regional do Cariri – URCA, localizado na cidade de Crato - CE.

Material vegetal

O látex de *H. drasticus* foi coletado por fornecedor especializado na Floresta Nacional do Araripe (FLONA), Região Sul do Ceará, Brasil, conforme orientação do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), obtido através de inserções longitudinais no caule e acondicionado em um recipiente de vidro com água destilada. O material vegetal foi identificado e uma exsiccata foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob o número 31.685.

Obtenção do extrato

O látex foi submetido à extração por partição líquido-líquido à temperatura ambiente, com acetato de etila, na proporção 1:1. Após esse período, a fase orgânica (com solvente) foi coletada em um erlenmeyer através de um funil de separação. O extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida com um auxílio de rotaevaporador (FERRI, 1996).

Prospecção fitoquímica

O extrato obtido foi submetido a uma série de testes utilizando reagentes específicos seguindo o método descrito por Matos (2009), com o intuito de elucidar as classes de metabólitos secundários como flavanóides, alcalóides, taninos e esteróides. Esse método baseia-se na observação visual de variação e/ou intensificação colorimétrica ou presença de precipitado após a adição dos reagentes nas soluções.

Determinação de fenóis totais

As concentrações para a determinação de fenóis totais foram determinadas a partir da adição de 125 µL de cada uma das soluções que foram inicialmente preparadas, obedecendo a uma ordem decrescente de concentrações (400, 300, 200, 100 e 50 µg/mL), sendo posteriormente adicionados 125 µL do reagente

Folin - *Ciocalteau* a 10% e 1,25 mL de carbonato de sódio completando 2 mL com água destilada. Posteriormente, as soluções permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e 30 minutos sem a presença de luminosidade, em seguida foi realizada a leitura dos testes, as absorbâncias foram mensuradas através do espectrofotômetro com filtro em 765 nm. Como padrão para o teste foi utilizado o ácido gálico (AG) a fim de que seus valores sirvam de comparação para a determinação dos compostos fenólicos presentes nas soluções, expressas a partir da quantidade de AG presentes em cada miligrama do extrato em estudo (SINGLETON et al., 1999). A média das leituras dos testes foi utilizada através dos resultados expressos em microgramas de AG por miligrama de extrato.

Determinação de flavanóides totais

Para estabelecer a curva de calibração o flavanóide utilizado foi a quercetina diluída em etanol a 80%, em concentrações de 100 a 10 µg/mL. Os padrões foram preparados em volumes variados, de modo que as concentrações variassem entre 100 e 10 µg/mL. Posteriormente, foi adicionado nas amostras e nos padrões 600 µL de etanol a 80%, 40 µL de cloreto de alumínio a 10%, 40 µL de acetato de sódio (1 M) e 2 mL de água destilada q.s.q. Para o preparo do branco, foi adicionado o mesmo volume das amostras e do etanol, entretanto, o cloreto de alumínio e o acetato de sódio não foram adicionados sendo utilizado como substituinte água destilada.

Após o preparo das soluções, as mesmas permaneceram incubadas em temperatura ambiente por um período de 45 minutos sem a presença de luminosidade, em seguida a absorbância das soluções foram medidas em espectrofotômetro em filtro de 415 nm, obedecendo a uma ordem decrescente de concentrações (500, 400, 300, 200 e 150 µg/mL). A média dos resultados mensurados foram estabelecidos de acordo com o teor de flavanóides totais e expresso como microgramas de acordo com a equivalência de quercetina/miligramas da amostra (KOSALEC et al., 2004).

Atividade antibacteriana

Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas nos testes foram obtidas através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Sendo utilizadas quatro linhagens padrão de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Escherichia coli* ATCC 10536; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Para avaliar a atividade moduladora de antibióticos foram usados os seguintes isolados bacterianos multirresistentes: SA 358, PA 03, EC 27 com perfil de resistência testado (Tabela 1).

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 horas a 35°C, e posteriormente mantidas em meio de cultura.

Tabela 1. Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos. / **Table 1.** Bacterial origin and antibiotic resistance profile.

Bacteria	Origem	Resistência a antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA 03)	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Ca, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<i>Escherichia coli</i> (EC 27)	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA 31)	Catéter	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	

Ast-Azitimicina; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefalexina; Cfc- cefaclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazimidina; Cip-Ciprofloxacino; Clo -Clorafenicol; Im-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametoxazol, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo- Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosina; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina.

Drogas utilizadas

Os antibióticos utilizados nos testes foram os aminoglicosídeos: amicacina e gentamicina (Sigma Co[®]). Para o preparo das soluções, foi utilizada água estéril, conforme orientações do fabricante.

Preparo dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas previamente padronizadas foram diluídas na proporção 1:10 em Caldo BHI a 10% obtendo uma concentração final de 10⁵ células bacterianas para cada mL (CLSI, 2003).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços de fundo redondo de acordo com a Norma M7-A6 (CLSI, 2003). O EAEHD foi dissolvido usando Dimetilsulfóxido (DMSO) e ao LIHD foi adicionado o DMSO e posteriormente, diluídos para 1024 µg/mL usando água estéril. Na realização deste método, foram utilizados pequenos volumes de meio e de amostra, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. As soluções utilizadas no teste foram preparadas na concentração de 1024 µg/mL. A concentração inicial foi obtida em volumes de 100 µL e posteriormente diluídas em uma proporção de 1:2 em caldo BHI a 10%. Em cada cavidade contendo 100 µL do meio de cultura, foi inoculado uma amostra da suspensão bacteriana de modo a ser diluída em proporção de 1:2. Utilizou-se como controle negativo apenas o meio de cultura, e nos controles positivos o meio e acrescentado a ele o inoculo, no controle de inibição foram utilizados os extratos em concentração de 1024 µg/mL a 0,8 µg/mL incluídos nos testes. As placas preenchidas foram posteriormente incubadas em estufa a 35°C por 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996).

Para que fosse evidenciada a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma®) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foi adicionado em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa é devido à redução da resazurina que indica o crescimento bacteriano (MANN; MARKHAN, 1998; PALOMINO et al., 2002), auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, evidenciado pela cor azul inalterada. De cada cavidade na placa, foram retiradas alíquotas e espalhadas em placas com meio BHI. Estas placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24h, e posteriormente analisadas macroscopicamente.

Atividade moduladora

Para avaliar a ação antibiótica e moduladora dos extratos, a CIM dos antibióticos aminoglicosídeos foi verificada quanto à presença e a ausência dos extratos, após serem inoculados em microplacas estéreis, conforme está descrito em Coutinho et al. (2009) e Matias et al. (2010). O EAEHD e o LIHD foram testados em concentração subinibitória (CIM/8 = 128 µg/mL). Foram distribuídos 100 µL da solução contendo BHI com o inóculo de microrganismo e o extrato em cada poço. Após isso, 100 µL do antimicrobiano foram misturados com a solução do primeiro poço, após diluição de 1:2, variando as concentrações dos aminoglicosídeos entre 2.500 a 2,44 µg/mL.

Análise Estatística

Os resultados dos ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como a média geométrica. Para a análise estatística foi aplicada two-way ANOVA, seguindo a significância de $p < 0.001$, utilizando o software *GraphPad Prism 5.0*.

Resultados e Discussão

O EAEHD obteve um rendimento final após ser rotaevaporado de 0,4%. Na prospecção fitoquímica do foi evidenciada a presença de algumas classes de metabólitos secundários como taninos condensados, catequinas, flavonas, flavanóis, xantonas, flavanônios e flavanonas, semelhante ao trabalho de Luz et al. (2014), que realizou técnicas cromatográficas em busca de metabólitos secundários nesta mesma espécie, mas utilizando um extrato hidroalcoólico das cascas e algumas frações (Hexânico, Acetato de etila, Butanólico e Aquoso), o qual comprovou a presença de compostos da classe dos flavonoides em todas as suas frações,

mas não no extrato hidroalcoólico, taninos não foi encontrado apenas na fração hexânica e alcaloides permaneceu presente apenas no extrato bruto hidroalcoólico. O presente estudo, tendo utilizado uma técnica simples de identificação, sendo a nível qualitativo, a presença de outras classes de metabólitos presentes na amostra pode apresentar interferências e mascarar os resultados, assim como a mudança na polaridade dos solventes utilizados (MATOS, 2009).

A quantidade de fenóis totais no EAEHD foi de 59,78 mg/g e 74,46 mg/g para o LINHD expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato bruto e do látex, isto é encontrado também na pesquisa de Wong et al. (2011), este que avaliou dez espécies da família Apocynaceae, quanto a atividade antiproliferativa de células cancerosas, atividade sequestradora de radicais livres (ASRL) e seus constituintes químicos, em busca de metabólitos como alcaloides e compostos fenólicos totais a partir da técnica de Folin – Ciocalteu, onde encontrou em todas as espécies analisadas altos teores destes dois compostos demonstrando a relação entre compostos fenólicos e a ASRL. Compostos estes que são metabólitos secundários, sintetizados por diversas plantas e sua principal função é promover proteção as plantas contra os fatores externos (SIMÕES et al., 2003).

Na determinação de flavanóides totais, a curva de calibração para a realização do método foi obtida após a leitura das soluções de quercetina com concentração de (50,40,30,20 e 15). O extrato do látex de *Himatanthus drasticus* possui uma quantidade de 16,4 mg/g e o látex *in natura* apresentou 22,05 mg/g de flavonóides.

Diversas funções terapêuticas são atribuídas à presença desses compostos, como por exemplo, para os flavanóides, que apresentam atividades antioxidantes e antibacterianas (ZUANAZZI; MONTHANHA, 2003). Tais compostos estão sendo constantemente encontrados em plantas utilizadas em pesquisa, baseando a sua aplicação terapêutica com o conhecimento popular e a presença desses metabólitos, que desempenham atividades antioxidante, anticancerígenas, anti-inflamatória e antibacteriana (CARVALHO et al., 2012).

Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis que possuem a capacidade de inibir o crescimento de fungos, insetos e bactérias (FERNANDES, 2002). As xantonas também apresentam atividade antibacteriana, e antioxidante assim como os heterosídeos flavônicos (SANTOS et al., 2003). Na tentativa de elucidar a atividade anti-inflamatória de *H. drasticus*, foi isolado o acetato de lupeol, composto pertencente à classe dos triterpenos, que teve a sua ação atribuída à presença deste composto comprovada (LUCETTI et al., 2010).

Após realização do teste de CIM frente às cepas padrão e multiresistentes encontrou-se resultados de CIM ≥ 1024 µg/mL tanto para o látex *in natura* quanto para o extrato acetato de etila (Tabela 2). Resultados que são divergentes de Almeida e colaboradores (2012) que observaram atividade antimicrobiana ao testar o extrato acetato de etila do látex contra a cepa de *S. aureus* através do método de difusão em ágar em concentração de 100 mg/mL, assim como nos estudos de Figueiredo et al. (2017), que testou o extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie e frações, o qual demonstrou uma CIM de >50 µg/mL para *P. aeruginosa* quando avaliado a fração hexânica, mas não obteve resultados quando utilizado o mesmo solvente do presente estudo, e apenas a fração butanólica teve ação com *S. aureus* com uma CIM de >50.000 µg/mL, salientando que o tipo de solvente utilizado pode interferir nos resultados. Esses resultados se dão possivelmente pelo fato do látex ter sido colhido em regiões diferentes e o uso de diferentes metodologias e concentrações, já que para esse método não se pode precisar a quantidade do produto natural que se difunde pelo ágar (GREGER; HADACEK, 2000).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL) do extrato acetato de etila e do látex *in natura* de *Himatanthus drasticus*. / **Table 2.** Minimal inhibitory concentration (MIC) (µg/mL) of the ethyl acetate and latex extract of *Himatanthus drasticus*.

Extratos	EC 27	EC- ATCC 10536	SA 358	SA- ATCC 25923	PA 03	PA- ATCC 15442	KP- ATCC 10031
EAEHD	=1024	=1024	=1024	=1024	=1024	=1024	=1024
LINHD	=1024	=1024	=1024	=1024	=1024	=1024	=1024

EAEHD – Extrato Acetato de Etila de *Himatanthus drasticus*; LINHD – Látex *in natura* de *Himatanthus drasticus*; EC – *Escherichia coli*, SA – *Staphylococcus aureus*, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, KP – *Klebsiella pneumoniae*.

O extrato acetato de etila apresentou grau de modulação na atividade de aminoglicosídeos perante cepas de bactérias multirresistentes EC 27, SA 358 e KP 10031 tanto estando em associação com a amicacina quanto para a gentamicina. Em relação a PA 03, o EAEHD mostrou antagonismo quando combinado com amicacina e gentamicina (Figura 1).

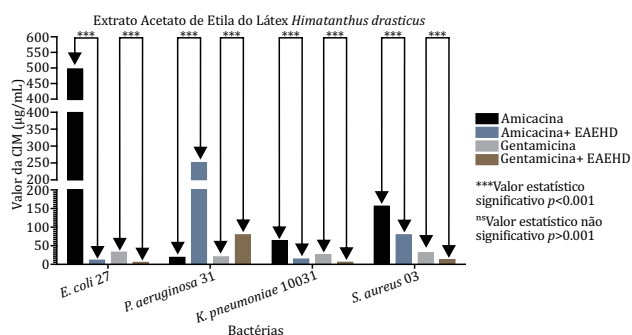


Figura 1. Resultado do teste para modulação da resistência bacteriana para o extrato acetato de etila do látex de *Himatanthus drasticus* combinados com drogas da classe dos aminoglicosídeos. / **Figure 1.** Test result for modulation of bacterial resistance to ethyl acetate extract of *Himatanthus drasticus* latex combined with aminoglycoside class drugs.

O látex *in natura* mostrou atividade sinérgica para EC 27, SA 358 e KP 10031 quando combinado com amicacina e gentamicina, para PA 03 quando combinado com amicacina e gentamicina apresentou antagonismo (Figura 2).

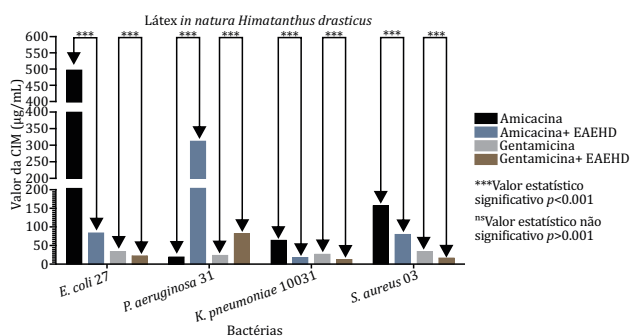


Figura 2. Resultado do teste para modulação da resistência bacteriana para o látex *in natura* de *Himatanthus drasticus* combinados com drogas da classe dos aminoglicosídeos. / **Figure 2.** Test result for modulation of bacterial resistance to the latex *in natura* of *Himatanthus drasticus* combined with drugs of the class of aminoglycosides.

Estudos já realizados com o látex de *H. drasticus* demonstram que possui em sua composição química triterpenos como o acetato de lupeol que dentre suas ações farmacológicas, apresentam ação bactericida (PATOCKA, 2003). O mesmo ocorre em diversas pesquisas que utilizam extratos e óleos essenciais de plantas, que apresentam resultados positivos frente o controle do crescimento bacteriano, tornando-os fontes valiosas para o desenvolvimento de novos medicamentos mais potentes e menos tóxicos, devido à variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários (COWAN, 1999).

Compostos fenólicos como os flavanóides sintetizados por plantas, apresentam a capacidade de se ligar às proteínas formando complexos. A atuação positiva dos produtos naturais em associação com antimicrobianos provoca um efeito sinérgico, entretanto pode ocorrer antagonismo ou até mesmo inativação da ação do fármaco estando associado ao produto natural, tal efeito pode ser justificado também pela presença desses metabólitos que podem promover a quelação dos componentes químicos potencializando a resistência bacteriana e assim reduzindo a estabilidade ou a disponibilidade dos compostos farmacológicos ativos, promovendo a redução da ação do fármaco (GRANOWITZ; BROWN 2008). A ação antioxidante que estes compostos possuem é justamente devido à capacidade que os flavanóides têm de quelar certas propriedades químicas (BEHLING et al., 2004). O que possivelmente explica os resultados dos testes em que houve antagonismo frente à atividade dos aminoglicosídeos.

No teste de modulação observou-se efeito sinérgico clinicamente relevante contra as cepas EC 27, SA 358 e KP 10031 ao ter o EAEHD e o LIHD associado a amicacina e gentamicina, bem como no estudo de Ruttoh et al. (2009) que utilizando extratos e frações de *Tabernaemontana stapfiana*, planta da

família Apocynaceae, obteve uma CIM diferente quando comparado a antibióticos como amicacina e gentamicina, testados contra bactérias ATCC e multirresistentes com a técnica de difusão em disco, mas não associados em uma modulação. Tais resultados é provavelmente proveniente da presença dos metabólitos secundários presentes nesta espécie em estudo (COUTINHO et al. 2009).

Efeitos sinérgicos podem ser evidenciados com antibacterianos estando em associação com extratos de plantas ao apresentarem redução clinicamente relevante perante a diminuição das doses dos antibacterianos, como demonstrado em relação a *P. aeruginosa* e *S. aureus* ao testar o extrato metanólico e hexânico de *Sideroxylon obtusifolium* em associação com a neomicina, gentamicina e amicacina (LEANDRO et al., 2013).

Pesquisas com extratos e óleos essenciais tem demonstrado que as plantas podem interferir na atividade de bactericidas, potencializando a ação do fármaco, diminuindo a concentração minimizando os riscos de toxicidade. O que vem sendo constatado nos estudos das plantas como *Turner aumifolia*, *Cordia verbenaceae* e *Mentha arvensis*, que possuem metabólitos secundários, os quais apresentam efeito sinérgico, devido a capacidade de eliminar os plasmídios e de inibir a bomba de efluxo das cepas bacterianas, interferindo nos mecanismos de resistência adquiridas pelas bactérias através da troca do de material genético que ocorre entre os microrganismos (COUTINHO et al., 2010; MATIAS et al., 2010).

Conclusão

O estudo demonstrou que o extrato acetato de etila e o látex *in natura* de *Himatanthus drasticus* não apresentaram atividade antibacteriana relevante frente às cepas bacterianas testadas. Entretanto, reduziram a CIM das cepas bacterianas multirresistentes *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae* utilizadas, diferentemente do extrato acetato de etila e do látex *in natura* que apresentou antagonismo nos resultados contra as cepas de *P. aeruginosa*.

É necessário que sejam realizadas pesquisas mais aprofundadas sobre seus metabólitos secundários que possam ajudar a elucidar quais são responsáveis por tais efeitos, para que se tenha uma possível utilização desse produto natural associados aos antimicrobianos testados (aminoglicosídeos) frente às linhagens patogênicas com a finalidade de potencializar a ação do antibacteriano com redução de sua toxicidade. Através dos resultados, conclui-se que o látex de *H. drasticus* é fonte promissora da atividade antibacteriana, podendo incentivar futuras pesquisas sobre os aspectos farmacológicos, contribuindo para que sua utilização seja de maneira racional atuando no combate à resistência bacteriana.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, V. A.; BANDEIRA, M. A. M.; MOURA P. P.; MONTEIRO, R. M.; SOARES, F. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana do látex da janaguba *Himatanthus drasticus***. XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2012.
- BARATTO, L. C.; HOHLEMWERGER, S. V. A.; GUEDES, M. L. S.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M. *Himatanthus lancifolius* (Mull. Arg.) Woodson *Apocynaceae*: estudo farmacobotânico de uma planta medicinal da Farmacopeia brasileira 1ª edição. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p.651-658, 2010.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavanoid quercetin: general aspect and biological actions. **Alimentary Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- CARVALHO, M. L.; SILVA, B. R.; SILVA, M. M.; CARCARÁ, K. A. V.; AMORIM, R. R. Estudo comparativo entre a quantidade de fenólicos totais presentes em folhas e cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. **VII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**. Palmas/Tocantins, 2012.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7- A6, 2003.
- COUTINHO, H. D. M.; VASCONCELOS, A.; LIMA, M. A.; ALMEIDA F. G. G.; ALVES, R. R. Uso de cupins associados com a terapia antibiótica: enhancement de antibióticos aminoglicosídeos. **BMC Complementare and Alternative Medicine**, v. 17, n. 9, p. 35, 2009.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA, J. P. JR. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology Microbiology e Infectious Diseases**, v. 33, p. 467-471, 2010.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.

- FERNANDES, A. T. Atividade farmacológica dos extratos obtidos da *Plathymenia reticulata* Benth (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). **Universidade de Campinas**, São Paulo, 2002.
- FERRI, P. H. Química de produtos naturais: Métodos Gerais. In: Di Stasi, L C (org) **Plantas Medicinais Arte e Ciências. Um guia Interdisciplinar**. Editora Universidade Estadual Paulista, vol. 20, n.2, p. 129-156. São Paulo 1996.
- FIGUEIREDO, C. S. S.; BRANCO SANTOS, J. C.; CASTRO JUNIOR, J. A. D. A.; WAKUI, V. G.; RODRIGUES, J. F.; ARRUDA, M. O.; MONTEIRO, A. S.; MONTEIRO-NETO, V.; BOMFIM, M. R. Q.; KATO, L.; SILVA, L. C. M.; GRISOTTO, M. A. G. *Himatanthus drasticus* leaves: chemical characterization and evaluation of their antimicrobial, antibiofilm, antiproliferative activities. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 910, 2017.
- GOMES, S. M. Morfo-anatomia de frutos secos em espécies de Apocynaceae: significado ecológico e evolutivo. **Acta Botanica Brasílica**, v. 22, n. 2, p. 521-534, 2008.
- GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, n. 2, p. 421-422, 2008.
- GREGGER, H.; HADACEK, F. Testing of antifungal natural products: methodologies, maparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.
- JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, S. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.
- KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; PEPELINJAK, S.; VLADIMIR-KNEZEVIC. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from borthern Croatia. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, p. 65-72, 2004.
- LEANDRO, L. M. G.; AQUINO, P. E. A.; MACEDO, R. O.; RODRIGUES, F. F. G.; GUEDES, T. T. A. M.; FRUTUOSO, A. D.; COUTINHO, H. D. M.; BRAGA, J. M. A.; RIBEIRO, T. R. G. MATIAS. Avaliação da atividade antibacteriana e modulatório de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. Faculdade de Juazeiro do Norte. **e-ciência**, v. 1, n. 1, 2013.
- LINHARES, J. F. P.; PINHEIRO, C. U. B.; MING, L. C.; RODRIGUES, M. I. A.; FERREIRA, A. B; Ambientes de ocorrência e flora acompanhante do gênero *Himatanthus* em Alcântara, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 550-558, 2011.
- LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C.; BANDEIRA, M. A.; VERAS, H. N.; SILVA, L. L. K.; ALVES, V. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. G.; Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of inflammation (Lond)**, v. 17, n. 7, p. 60, 2010.
- LUZ, H. S.; SANTOS, A. C. G.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. a00101s1, p. 657-662, 2014.
- MANN, C. M.; MARKHAN, J. L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.
- MATIAS, E. E. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenácea*. **D.C. Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.6, p. 1049-1052, 2010.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3ª Ed. Fortaleza: UFC, 2009.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method fordetection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobiol agents and chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.
- PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7-12, 2003.
- RUTTOH, E.; TARUS, P.; BII, C.; MACHOCHO, A.; KARIMI, L.; OKEMO, P. Antibacterial activity of *Tabernaemontana stapfiana* Britten (Apocynaceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 2, 2009.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Levothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Faramacognosia**, v. 13, n. 2, p. 67-74, 2003.
- SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D.; Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 327-334, 2012.
- SOUSA, E. L.; GRANGEIRO, A. R. S.; BASTOS, I. V. G. A.; RODRIGUES, G. C. R.; SILVA, M. J.; ANJOS, F. B. R.; SOUZA, I. A.; SOUZA, C. L.; Atividade anti-tumor de folhas de *Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) no tratamento de tumor Sarcoma 180. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.
- SPINA, A. P. **Estudos taxonômicos, micro-morfológico e filogenético do gênero Himatanthus Wild. Ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis. Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v. 299, p.152-178, 1999.
- WONG, S. K.; LIM, Y. Y.; ABDULLAH, N. R.; NORDIN, F. J. Antiproliferative and phytochemical analyses of leaf extracts of ten Apocynaceae species. **Pharmacognosy research**, v. 3, n. 2, p. 100, 2011.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTHANHA, J. A. Flavanóides In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRG, 5 ed, p. 577 – 614, 2003.