



**AÇÃO MODULADORA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE
PLANTAS MEDICINAIS SOBRE ANTIBIÓTICOS EM CEPA DE
Staphylococcus aureus METICILINA-RESISTENTE**

*Franklyn Relli Nunes da Silva*¹, *Renan Diêgo Vieira Nogueira*¹, *Edvaldo Balbino Junior*¹,
*Denise Nascimento Pereira*¹, *Willian Charles da Silva Moura*¹, *Cayque de Sousa Farias*²,
*Laís Santos da Silva*², *Rita de Cássia Ramos Vieira*², *Sávio Benvindo Ferreira*³, *Harley da
Silva Alves*⁴, *Ana Claudia Dantas de Medeiros*⁴, *Zilka Nanes Lima*^{4*}

¹Bacharel em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB, Brasil;
e-mails: franklynrelli@hotmail.com; renandiego.1@hotmail.com; edvaldojunioralves@hotmail.com;
dennysepereira@hotmail.com; williancsmoura@gmail.com.

²Acadêmicos do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil;
e-mails: cayque.farias@gmail.com; lssantos95@gmail.com; itsritavieira@gmail.com;

³Professor da Universidade Federal da Campina Grande, Cajazeiras – PB, Brasil;
e-mail: saviobenvindo@gmail.com ;

⁴Professor(a) da Universidade Estadual da Paraíba Campina Grande – PB, Brasil;
e-mails: harley.alves@hotmail.com; anacmedeiros@yahoo.com.br.; zilkananeslima@gmail.com

*Corresponding author. E-mail address: zilkananeslima@gmail.com

RESUMO

É crescente o aumento de casos de micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos, principalmente bactérias, o que tem sensibilizado pesquisadores do mundo inteiro a buscar nas plantas, recursos que possam mitigar as consequências causadas por estes micro-organismos. Uma das estratégias atuais tem sido associar plantas com antimicrobianos já licenciados e utilizados na terapêutica, na tentativa de encontrar ações sinérgicas que possam driblar os mecanismos de resistência bacteriana. O presente trabalho buscou avaliar o efeito modulador de plantas medicinais sobre a atividade de dois antibióticos betalactâmicos, ampicilina e ceftriaxona, e um aminoglicosídeo, a gentamicina; através da técnica da microdiluição em placas, utilizando-se uma cepa de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente - MRSA. Os resultados apontam para um provável sinergismo entre *Schinus terebinthifolius* e *Punica granatum* com o aminoglicosídeo gentamicina, o que oferece novas oportunidades para futuros estudos em busca do composto ativo destas plantas e assim melhorar a atividade e eficácia de tratamentos terapêuticos envolvendo os aminoglicosídeos em infecções causadas por micro-organismos multirresistentes.

Palavras-chave: Aroeira; Romã; Resistência bacteriana; MRSA.

**MODULATORY ACTION OF ETHANOLIC EXTRACTS OF MEDICINAL
PLANTS ON ANTIBIOTICS IN CEPA OF METICILLIN-RESISTANT
*Staphylococcus aureus***



ABSTRACT

There has been an increase in cases of resistant microorganisms to multiple drugs, mainly bacteria, which has sensitized researchers around the world to seek resources in plants, that can mitigate the consequences caused by these microorganisms. One of the current strategies has been associate plants with antimicrobials, in attempt to find synergistic actions that could reverse bacterial resistance mechanisms. This study aimed to evaluate the modulatory effect of medicinal plants on the activity of two beta-lactam antibiotics, ampicillin and ceftriaxone, and an aminoglycoside, gentamicin; by microdilution technique, using a strain of methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA. The results point to a possible synergism between *Schinus terebinthifolius* and *Punica granatum* with the aminoglycoside gentamicin, which offers new opportunities for future studies in search of the active compound of these plants, would improve the activity and efficacy of treatments involving aminoglycosides in infections caused by multiresistant microorganisms.

Key words: Aroeira; Pomegranate; Bacterial resistance; MRSA.

INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos tem aumentado rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando a necessidade crescente do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais frequentemente causam infecções e do modo de disseminação da resistência. (MEYER; PICOLI, 2011). Dessa forma, a rápida propagação de patógenos multirresistentes representa uma séria ameaça, aliada aos fatores já existentes, como as altas taxas de mortalidade e a escassez de opções terapêuticas para o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias resistentes (ZANOL et al., 2010).

Dentre os principais micro-organismos que causam infecções em humanos, tem-se destacado cepas de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes (MRSA, do inglês *Methicilin-resistant S. aureus*), as quais desenvolveram por mutações genéticas mecanismos de defesa aos antimicrobianos usuais, e posteriormente por recombinações genéticas (aquisição do gene *mecA* que codifica uma proteína ligadora de penicilina de baixa afinidade aos betalactâmicos, a PBP2A), tornando-se resistentes a substâncias como penicilinas e cefalosporinas. (EUMKEB et al., 2010; TAYLOR, 2013).

Deparando-se com tais problemáticas, tornam-se necessárias pesquisas voltadas ao estudo e avaliação de produtos naturais com propriedades antimicrobianas, como fonte para o desenvolvimento de novos compostos relacionados à produção de medicamentos inovadores para prática clínica. (OLIVEIRA et al., 2008; RETTA et al., 2012). A necessidade de se utilizar plantas como alternativa para o controle microbiológico se dá pelo fato de drogas naturais possuírem uma maior diversidade molecular quando comparadas a produtos isolados sintéticos, o que pode promover a diminuição da indução de microrganismos resistentes. (SANTOS, 2011).

A existência da preocupação com o avanço da resistência microbiana motivou os pesquisadores a iniciarem estudos envolvendo sinergismo de plantas com antimicrobianos



sintéticos. (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Assim, pesquisas atuais têm avaliado as plantas medicinais não somente através da sua atividade antimicrobiana, mas também como meios onde possam ser encontradas moléculas ativas capazes de agirem como modificadoras da atividade de antibióticos, modulando-os ou mesmo revertendo à resistência bacteriana. (COSTA et al., 2008; RIOS et al., 2005).

O sinergismo ocorre quando dois ou mais compostos interagem de maneira que há aumento, potenciação ou amplificação do efeito esperado. (NCUBE; FINNIE; VAN STADEN, 2012). O objetivo de estudos com esta atividade sinérgica é comparar, por meio de provas científicas, os efeitos observados com os extratos isolados e associados a outras substâncias. (VERAS et al., 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar comparativamente, o efeito dos extratos de plantas, tradicionalmente utilizadas popularmente no nordeste brasileiro, testados isoladamente e após associação com antimicrobianos, licenciados e usados clinicamente, sobre linhagem de MRSA, buscando assim novas ferramentas no estudo das plantas medicinais como modificadoras de mecanismos de resistência bacteriana ou moduladoras de atividade antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados os extratos etanólicos das plantas medicinais *Schinus terebinthifolius*, *Stryphnodendron barbatiman*, *Anacardium occidentale* e *Punica granatum*, preparadas seguindo metodologia de Perianayagam et al. (2012), com algumas modificações, onde os materiais vegetais foram submergidos em álcool etílico 99,3°GL, deixados em repouso e após 72h foram obtidas as soluções extrativas, as quais foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura de 48°C, para a obtenção do extrato bruto. (SARAIVA et al., 2013).

Neste estudo, foi usada uma cepa multirresistente de *Staphylococcus aureus* MRSA A420, um isolado hospitalar de cultura de sangue. Ajustou-se a turbidez da cultura em caldo Mueller Hinton, após 24 horas de incubação e com crescimento ativo, com solução salina estéril, de modo a obter turbidez comparável à da solução padrão de McFarland de 0,5. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL de *Escherichia coli* ATCC® 25922. Para realizar essa operação corretamente, empregou-se um espectrômetro, seguindo instruções do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. (NCCLS, 2003).

Pela técnica da microdiluição determinaram-se as concentrações inibitórias mínimas (CIM), dos seguintes antimicrobianos: ampicilina, ceftriaxona e gentamicina em concentrações que variaram de 0,5 µg/ml a 1.024 µg/ml. A concentração inibitória mínima foi definida como sendo a menor concentração onde não se detectou visivelmente crescimento bacteriano. (MABONA et al., 2013).

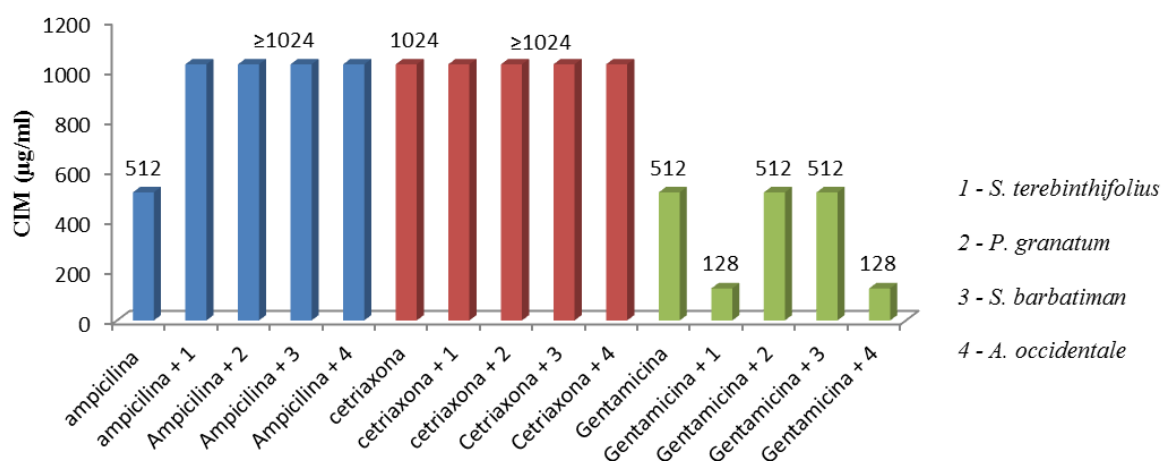
A fim de determinar o efeito modulador, foi empregado uma concentração sub-inibitória do extrato, 32 µg/ml, como proposto por Coutinho et al. (2010). As microplacas foram preparadas, com a realização de diluições seriadas dos antibióticos, em seguida acrescentou-se 50 µl do extrato, e por fim adicionados 10 µl do inóculo. Incubaram-se as placas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, sendo a leitura destas realizadas com a adição de 20 µl de uma solução de 2,3,5 de cloreto de trifeniltetrazólio a 0,5%. (VOGEL et al., 2011). O

efeito modulador dos extratos foi percebido com a modificação da CIM em associação extrato-antimicrobiano, em relação da CIM isolada do antibiótico. (Coutinho et al., 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos envolvendo efeitos sinérgicos entre extratos de plantas e antibióticos vêm sendo realizados por inúmeros pesquisadores (AHMED et al., 2010). Tais estudos decorrem da necessidade de se buscar novas opções de tratamento e controle de micro-organismos multirresistentes. Os resultados dos testes de atividade antibacteriana frente a *S.aureus* MRSA A420 estão apresentados na figura 1.

Figura 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos licenciados testados isoladamente, e em associação com extratos de plantas medicinais frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA A420



Concentrações testadas dos antibióticos licenciados variaram de 0,5 µg/ml a 1.024 µg/ml. Concentração dos extratos de plantas medicinais foi 32 µg/ml (sub-inibitória). [1.*Schinus terebinthifolius*, 2. *Punica granatum*, 3.*Stryphnodendron barbatiman* e 4.*Anacardium occidentale*]

Staphylococcus aureus possui cinco tipos de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada **PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos**. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos MRSA a todos os antibióticos beta-lactâmicos. (CHAMBERS, 1988).

Esse estudo buscou verificar se o comportamento de antibióticos licenciados quando testados “*in vitro*” junto com extratos de plantas medicinais é modificado. Os resultados apontaram inicialmente para a presença de forte antagonismo entre extratos com os antibióticos betalactâmicos (ampicilina e ceftriaxona). Antibióticos desse grupo são naturalmente ineficazes frente a cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes (MENDES,



2010), já explicado anteriormente; percebendo-se também que a associação entre as plantas aqui testadas acentuou ainda mais a ineficiência destes. Resultados semelhantes foram obtido por Cavalcante (2010), também testando antibióticos betalactâmicos com as mesmas plantas. Ainda, Aqil et al. (2005) também verificaram a ineficácia do extrato de *P. granatum* em melhorar a atividade do antibiótico ampicilina.

Em relação aos testes realizados com o aminoglicosídeo gentamicina, observou-se uma discreta redução dos valores de CIM para as associações com os extratos de *S. terebinthifolius* e *P. granatum*. Os demais extratos mostraram-se indiferentes a ação do antibiótico.

Os micro-organismos são capazes de elaborar diferentes mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, e o principal deles, constitui-se na produção de enzimas que degradam estes antibióticos e, portanto, mesmo que o isolado clínico pertença à mesma espécie, este pode apresentar resposta de resistência diferenciada a essa classe devido à variedade de enzimas modificadoras. (HARDMAN; LIMBIRD, 2006). *S. aureus* é passível ao desenvolvimento de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. (LIMA, 2002; PATERSON, 2006). De modo que, a atuação da *S. terebinthifolius* e *P. granatum* sobre os antibióticos aminoglicosídeos, pode ser justificada pelo fato que os extratos possivelmente proporcionaram a inibição das enzimas que degradam estas drogas.

Aminoglicosídeos são bactericidas potentes, que basicamente inibem a síntese proteica ligando-se a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, e mecanismos de resistência já são observados nesta classe. (VIDAL et al., 2012). A redução da CIM da gentamicina quando associada aos extratos de *S. terebinthifolius* e *P. granatum* é relevante, visto que antibióticos desta classe possuem ação dose-dependente; além de terem capacidade de provocar nefrotoxicidade e alterações auditivas. (DURANTE-MANGONI et al., 2009). Dessa maneira, a associação do extrato da planta com aminoglicosídeo reduz a concentração necessária ao efeito bactericida, possivelmente permitindo que a gentamicina tenha chance de ser terapêuticamente ativa em cepas com fenótipo de resistência ao aminoglicosídeo citado, além de ser mais difícil a bactéria desenvolver resistência a associação do extrato da planta com o aminoglicosídeo.

Segundo Figueiredo et al. (2011), o efeito significativo da ação moduladora dos metabólitos secundários de plantas medicinais sobre os aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para minimizar as reações adversas causadas por estes antimicrobianos, visto a interação entre extrato da planta-aminoglicosídeo ser capaz de diminuir a CIM destas droga e conseqüentemente reduzir a dose necessária para o uso terapêutico.

CONCLUSÃO

As combinações testadas entre os antibióticos betalactâmicos e os extratos apresentaram forte antagonismo, com elevação de suas concentrações inibitórias mínimas. No entanto, a associação feita entre a *S. terebinthifolius* e *P. granatum* junto ao aminoglicosídeo proporcionaram uma discreta redução de sua CIM, sendo necessários estudos mais aprofundados para descobrir qual(is) molécula(s) foi(foram) capazes de induzir tal efeito.

A atividade em diminuir a CIM do antibiótico detectou-se associando extrato da planta e antibiótico, sendo relevante para as combinações: *S. terebinthifolius* + gentamicina



e *P. granatum* + gentamicina. A CIM do antibiótico isolado foi 512 µg/ml, já para as associações com ambos os extratos, a CIM diminuiu para 128 µg/ml. É importante ressaltar que os resultados encontrados nesse estudo, mesmo sendo relevantes, refletem apenas o comportamento frente a uma cepa metilicilino-resistente de *S. aureus* isolada clinicamente de hemocultura hospitalar.

Desta forma, este estudo instiga futuras pesquisas em que se possa identificar nos extratos etanólicos de *S. terebinthifolius* e *P. granatum* moléculas que possam agir sinergicamente quando em combinação com aminoglicosídeos e, conseqüentemente ser uma alternativa ao combate de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

REFERÊNCIAS

AHMED, Z. et al. Synergistic Effect of *Salvadora persica* Extracts, Tetracycline and Penicillin against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 2, n. 1-2, p. 25-29, 2010.

AQIL, F. et al. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, n.2, p.106-14, 2005.

CAVALCANTE, A. L. F. A. **Plantas medicinais e saúde bucal: Estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa**. João Pessoa-PB, 210p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, 2010.

CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. **Rev. Clin Microbiol**, v.1, p. 173-186, 1988.

COSTA, V. C. O. et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 467-471, 2010.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGASB, M. E. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p.201–205, 2009.

EUMKEB, G.; SAKDARAT, S.; SIRIWONG, S. Reversing β-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. **Phytomedicine**, v.18, p.40-45, 2010.



HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed., Rio de Janeiro, 2006.

LIMA, Z. N. **Resistotipagem de amostras humanas comunitárias de *Staphylococcus aureus* isoladas no estado da Paraíba**. João Pessoa-PB. 77p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, 2002.

MABONA, U.; VILJOEN, A.; SHIKANGA, E.; MARSTON, A.; VAN VUUREN, S. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 45–55, 2013.

MENDES, J. J. Resistência Antibiótica no *Staphylococcus aureus*; da Investigação Básica à Prática Clínica. **Revista Portuguesa de Medicina Intensiva**, v. 17, n. 1, 2010.

MEYER, G.; PICOLI, S. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 25-31, 2011.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 81– 89, 2012.

OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 587-593, 2008.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, v.119, p.S20-S28, 2006.

PERIANAYAGAM, J. B.; SHARMA, S. K.; PILLAI, K. K.; PANDURANGAN, A.; KESAVAN, D. Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract and compounds isolated from *Trichodesmaindicum* (Linn.) R .Br.root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142: p. 283–286, 2012.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 27–38, 2012.



RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80–84, 2005.

SANTOS, F. O. (2011). **Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn)**. Patos-PB, 57p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, 2011.

SARAIVA, A. M.; SARAIVA, C. L.; CORDEIRO, R. P.; SOARES, R. R.; XAVIER, H. S.; CAETANO, N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 199-207, 2013.

TAYLOR, P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 195-201, 2013.

VERAS, H. N.; RODRIGUES, F. F.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R.; COUTINHO, H. D.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippiasidoidea* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p. 508–512, 2012.

VIDAL, C. A. S. et al. Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *Octoblepharum albidum* Hedw (Calymperaceae). **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n.2, p.465-470, 2012.

VOGEL, N. W.; TASCHETTO, A. P.; DALL'AGNOL, R.; WEIDLICH, L.; ETHUR, E. M. Assessment of the antimicrobial effect of three plants used for therapy of community-acquired urinary tract infection in Rio Grande do Sul (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1334-1336, 2011.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-110, 2009.

ZANOL, M. F.; PICOLI, S. U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 4, p. 309-314, 2010.

Received: 16 August 2018

Accepted: 10 September 2018

Published: 30 October 2018