

Potencial antibacteriano e modulador de antibióticos das folhas de *Allamanda puberula* A.DC. (quatro-patacas)

Potencial antibacteriano y modulador de antibióticos de las hojas de *Allamanda puberula* A.DC. (cuatro-patacas)

Antibacterial and modulatory potential of antibiotics from leaves of *Allamanda puberula* A.DC. (quatro-patacas)

Ana Paula Leite Nascimento^{1*} <http://orcid.org/0000-0003-2006-5816>

Ítalo Mykaell da Silva Benjamim¹ <https://orcid.org/0000-0002-5415-7666>

Nadghia Figueiredo Leite Sampaio¹ <https://orcid.org/0000-0003-2378-2570>

Luiz Eduardo Oliveira Teotônio¹ <https://orcid.org/0000-0001-6785-8982>

Cleberton Torres Santos¹ <https://orcid.org/0000-0001-6723-5929>

Dárcio Luiz de Souza Júnior¹ <https://orcid.org/0000-0002-1539-9267>

Fernando Gomes Figueredo^{1,2} <https://orcid.org/0000-0002-7918-4601>

¹Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Juazeiro do Norte - CE, Brasil.

²Departamento de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal do Ceará - UFC- CEP 60.430-370 - Fortaleza - CE, Brasil.

*Autor para la correspondência: paulaleite.16@hotmail.com

RESUMO

Introdução: Extratos de plantas têm sido testados com o intuito de descobrir novos compostos com atividade antibacteriana reconhecida.

Objetivos: Explorar o extrato etanólico das folhas de *A. puberula*, quanto à presença de compostos químicos, atividade antibacteriana e como um agente modificador da resistência aos antibióticos das classes dos aminoglicosídeos e lincosamidas.

Métodos: O extrato etanólico foi obtido a partir das folhas frescas de *A. puberula* e submetido à análise fitoquímica, pelo método colorimétrico. A atividade antibacteriana *in vitro* frente cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foi avaliada pela microdiluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima. A modulação da atividade antibiótica foi testada em concentração subinibitória.

Resultados: O produto natural apresentou em sua constituição, metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica, no entanto, não foi constatada atividade antibacteriana clinicamente relevante do extrato isolado frente às linhagens trabalhadas. Houve melhora na resposta quando associado o produto natural com aminoglicosídeos, tendo a atividade da amicacina concomitante ao extrato frente à *S. aureus* e *E. Coli*, uma redução significativa da CIM de 182,29 µg/ml para 32,55 µg/ml e de 42,315 µg/ml para 26,04 µg/ml, respectivamente. A gentamicina associada ao extrato frente à *P. aeruginosa* obteve redução da CIM de 104,17 µg/ml para 15,46 µg/ml.

Conclusões: A associação do antibiótico com o produto natural diminuiu a dose terapêutica, esta atividade pode ser justificada pela presença de metabolitos secundários no extrato que possui reconhecida atividade antibacteriana.

Palavras chave: *Allamanda puberula*; metabolitos secundários; atividade antibacteriana; modulação.

RESUMEN

Introducción: Extractos de plantas han sido probados con la intención de descubrir nuevos compuestos con actividad antibacteriana reconocida.

Objetivos: Explorar el extracto etanólico de las hojas de *Allamanda puberula*, en cuanto a la presencia de compuestos químicos, actividad antibacteriana y como agente modificador de la resistencia a los antibióticos de las clases de aminoglucósidos y lincosamidas.

Métodos: El extracto etanólico fue obtenido a partir de las hojas frescas de *Allamanda puberula* y sometido al análisis fitoquímico, por el método colorimétrico. La actividad antibacteriana in vitro frente a cepas patrones de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* fue evaluada por la microdilución en caldo, determinando la Concentración Inhibitoria Mínima. La modulación de la actividad antibiótica fue probada en concentración subinhibitoria.

Resultados: El producto natural presentó, en su constitución, metabolitos secundarios con reconocida actividad biológica, sin embargo, no fue constatada actividad antibacteriana clínicamente relevante del extracto aislado frente a los linajes trabajados. Se observó una mejoría en la respuesta cuando se asoció el producto natural con aminoglucósidos, teniendo la actividad de la amicacina concomitante al extracto a *S. aureus* y *E. Coli*, una reducción significativa de la CIM de 182,29 µg/ml a 32,55 µg/ml y de 42,315 µg/ml a 26,04 µg/ml, respectivamente. La gentamicina asociada al extracto frente a la *P. aeruginosa* obtuvo una reducción de la CIM de 104,17 µg/ml a 15,46 µg/ml.

Conclusiones: La asociación del antibiótico con el producto natural disminuyó la dosis terapéutica, esta actividad puede estar justificada por la presencia de metabolitos secundarios en el extracto que posee reconocida actividad antibacteriana.

Palabras clave: *Allamanda puberula*; metabolitos secundarios; actividad antibacteriana; modulación.

ABSTRACT

Introduction: Some plant extracts have been tested for new compounds with recognized antibacterial activity.

Objectives: Explore the ethanolic extract of *A. puberula* leaves for the presence of chemical compounds, antibacterial activity and as modifier of resistance to antibiotics in classes of aminoglycosides and lincosamides.

Methods: The ethanolic extract was obtained from fresh leaves of *Allamanda puberula* and subjected to phytochemical analysis by the colorimetric method. *In vitro* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* pattern strains was evaluated by broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration. Modulation of antibiotic activity was tested at a subinhibitory concentration.

Results: The natural product analyzed was found to contain secondary metabolites of recognized biological activity. However, clinically relevant

antibacterial activity of the isolated extract against the lineages studied was not observed. The response was found to improve when the natural product was associated to aminoglycosides. The activity of the amikacin concomitant to the extract against *S. aureus* and *E. Coli* causes a significant minimum inhibitory concentration reduction of 182.29 µg/ml to 32.55 µg/ml and 42.315 µg/ml to 26.04 µg/ml, respectively. Association of gentamicin to the extract against *P. aeruginosa* caused a minimum inhibitory concentration reduction of 104.17 µg/ml to 15.46 µg/ml.

Conclusions: Association of the antibiotic to the natural product reduced the therapeutic dose. This activity may be due to the presence of secondary metabolites in the extract with recognized antibacterial activity.

Keywords: *Allamanda puberula*; secondary metabolites; antibacterial activity; modulation.

Recibido: 11/04/2018

Aceptado: 12/02/2019

Introdução

A resistência bacteriana a antibióticos utilizados na clínica é recentemente uma das questões mais preocupantes, visto que inúmeras bactérias deixaram de responder à antibioticoterapia que eram vulneráveis, causando assim morbidade e mortalidade na população e intimidando a medicina moderna.^(1,2,3)

A droga está perdendo a capacidade de inibir efetivamente, em doses terapêuticas, o crescimento de cepas bacterianas e estas continuam se multiplicando, necessitando de uma concentração mais elevada do que a usual, para que o fármaco surta o efeito esperado.^(4,5,6)

Embora o desenvolvimento dessa resistência seja algo natural ocasionado pela pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, têm-se ampliado de forma acelerada em consequência do uso inadequado destes fármacos. Com isso, é imprescindível buscar novas substâncias que sejam eficazes neste controle.^(7,8,9,10,11)

Os produtos naturais como os de origem vegetal, têm se evidenciado na literatura por apresentar atividade antibacteriana clinicamente relevante e pela capacidade de potencializar a atividade antibiótica. Nesta perspectiva, utilizar extratos de plantas como agente antimicrobiano, demonstra ser uma alternativa promissora, uma vez que, devido sua diversidade química, podem inibir ou ativar caminhos moleculares diferentes dos conduzidos pelas drogas tradicionais.^(12,13,14,15)

Dentre estas plantas com potencial antimicrobiano, aponta-se a *Allamanda puberula* A.DC, uma espécie do gênero *Allamanda* na família Apocynaceae, nativa do Brasil, tipicamente na vegetação de Caatinga e Cerrado. É um tipo de arbusto, pertencente ao grupo das Angiospermas.⁽¹⁶⁾

Na literatura são evidenciadas inúmeras espécies pertencentes a esta família e que possuem atividade antimicrobiana, dentre elas: *Gymnema sylvestre*,⁽¹⁷⁾ *Holarrhena antidysenterica*,⁽¹⁸⁾ *Calotropis procera*,^(19,20) *Aspidosperma olivaceum* Müll. Arg,⁽²¹⁾ *Adenium obesum*,⁽²²⁾ *Alstonia yunnanensis* Diels,⁽²³⁾ *Himatanthus drasticus*,⁽¹⁴⁾ *Ceropegia candelabrum* L⁽²⁴⁾ e *Funtumia africana*.⁽²⁵⁾ Tal atividade

comprova-se pela presença de alguns metabólitos secundários, compostos que são sintetizados por plantas em resposta a infecção microbiana.⁽¹³⁾

Esta pesquisa mostra-se de cunho relevante, uma vez que despertará o interesse científico para investigações químicas e farmacológicas mais aprofundadas sobre as propriedades biológicas da *Allamanda puberula*, podendo assim, ao comprovar tais atividades, utilizar este produto natural para desenvolver novos antibióticos ou para potencializar os que já existem na clínica, ajudando assim a minimizar a resistência bacteriana.

Neste contexto, este estudo foi desenvolvido com o intuito de explorar o extrato etanólico das folhas de *A. puberula*, quanto à presença de compostos químicos, atividade antibacteriana e como um agente modificador da resistência aos antibióticos das classes dos aminoglicosídeos e lincosamidas.

Métodos

Obtenção do extrato

O material vegetal fresco (folhas) de *A. puberula*, foi coletado no município de Crato, Ceará, Brasil, em novembro de 2015, e encontra-se catalogada sob número de registro #3355 no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Para preparação do extrato, as folhas foram picadas e depois submersas por 72 h em etanol PA, em volume suficiente para submergir todo material vegetal, para extração prolongada à frio em temperatura ambiente. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro, para separação dos resíduos sólidos, e concentrado em condensador rotativo à vácuo 220V (*modelQ344B2*, Quimis®, Brasil) e banho maria de bocas microprocessado^(12,26) (*modelQ334M-24*, Quimis®, Brasil), obtendo-se o rendimento demonstrado na (Tabela 1).

Tabela 1 - Massa seca e rendimento do extrato etanólico bruto (g) das folhas de *A. puberula*

Espécie Biológica	Solvente	Folhas (Massa)	Extrato Bruto (Rendimento)
<i>Allamanda puberula</i> A.DC	Etanol (EEAP)	460g	85%

EEAP - Extrato Etanólico de *Allamanda puberula*

Na realização dos testes utilizou-se soluções preparadas a partir do extrato sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO), em seguida, diluídos com água destilada para uma concentração de 1.024 µg / mL.

Drogas

Os antibióticos utilizados foram gentamicina e amicacina, da classe dos aminoglicosídeos, e clindamicina, da classe das lincosamidas, todos obtidos do Laboratório Sigma®.

Microrganismos

Os microrganismos usados nos testes foram obtidos por meio do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão de *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), bactérias gram-negativas, e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), gram-positiva. Antes dos ensaios, foram

inoculadas em Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories LTDA) e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica, aproximadamente, durante 24 horas.⁽²⁷⁾

Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories LTDA) e Brain Heart Infusion - BHI (Sigma®) na concentração indicada pelo fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

Prospecção Fitoquímica

Os testes fitoquímicos para detectar a presença de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavanonóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavanonas e alcalóides, fundamentam-se na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.^(28,29)

Preparou-se uma solução de 20 mL utilizando 300 mg do extrato bruto dissolvido em solvente hidrofílico, etanol, com 30% de água destilada. Em seguida, foram separadas seis porções de 3 mL em tubos de ensaios numerados de 1 a 6, de acordo com a descrição a seguir:⁽²⁹⁾

Teste para identificação de fenóis e taninos

No tubo 1 adicionou-se três gotas de solução alcoólica de Cloreto Férrico (FeCl_3) 10%. Após homogeneização, foi observado se havia variação de cor ou formação de algum tipo de precipitado, comparando-se com um teste em branco, contendo somente água e FeCl_3 . A coloração variável de azul a vermelho é indicativo de fenóis; o precipitado escuro de tonalidade azul é indicio da presença de taninos hidrolisáveis (pirogálicos) e verde, de taninos flobabênicos (condensados ou catéquicos).

Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Para a realização do teste, foram utilizados os tubos 2, 3 e 4. O tubo 2 foi acidificado com Ácido Clorídrico (HCl) 1% até pH 3,0, o 3 foi alcalinizado com Hidróxido de Sódio (NaOH) 10% até pH 8,5 e o 4 a pH 11. Foram observadas mudanças de coloração do material.

Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

O tubo 5 foi acidificado até pH 2,0 por adição do HCl 1%, e o 6 alcalinizado por NaOH 10% a pH 11. Os tubos foram aquecidos durante três minutos, sempre observando as modificações na coloração.

Teste para alcalóides

Para o investigar a presença ou ausência de alcalóides no extrato, foi preparada uma solução contendo 300 mg do extrato bruto diluído em 30 mL de Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) 5%. A solução foi aquecida por alguns minutos até modo de fervura, sendo posteriormente transferido 10 mL para um funil de separação, onde foi alcalinizada com Hidróxido de amônio (NH_4OH) 10%, e verificado a variação de pH, com auxílio do papel indicador. Cerca de 15 mL de clorofórmio (CHCl_3) foram adicionados à solução e após completa homogeneização, foi deixada em repouso. Havendo presença de alcalóides, esses migrariam para a fase clorofórmica, também denominada de “fração alcalóidica”, por isso, com auxílio de um béquer, foi coletado a fase clorofórmica. Em seguida, gotas de HCl 1% foram adicionadas na solução e após homogeneização, foi aplicada uma gota dessa solução

clorídrica, numa lâmina de vidro, ao lado de uma gota do reagente Draggendorff. Após misturar as duas gotas, foi observado se havia formação de um precipitado floculoso, caracterizando a presença de alcalóides.

Atividade antibacteriana (CIM) e Modulação da atividade antibiótica

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinada em um ensaio de microdiluição em caldo, utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo Brain Heart Infusion - BHI até uma concentração final de 10⁵ UFC/mL, em placas de microdiluição com 96 poços. Em cada poço adicionou-se 100 µL de solução do extrato. A concentração do produto natural variou de 1.024 - 8 µg/mL (diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade).^(30,31,32)

Para os controles, utilizou-se os antibióticos padrões amicacina, gentamicina e clindamicina, cujas concentrações finais variaram entre 5.000 - 2,44 µg/mL.

As placas foram incubadas à 37 °C por 24 h e após esse período, a leitura evidenciou-se pelo uso de Resazurina Sódica (Sigma®), um indicador colorimétrico de oxidorredução, preparado em água destilada na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente.^(10,30)

A Resazurina, quando oxidada por microorganismos, transforma-se na resofurina, que possui coloração rosa. Dessa forma, a manutenção da cor azul entende-se como ausência do crescimento bacteriano e a mudança de coloração para rosa, indica crescimento bacteriano positivo. Isso favorece a visualização da CIM, registrada como a menor concentração que impede o crescimento microbiano.^(30,31,32,33,34)

Para avaliar as amostras como moduladores da ação antibiótica, a CIM dos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e lincosaminas foram avaliadas na ausência e na presença de concentrações subinibitórias do produto natural em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 5.000 - 2,44 µg/mL. Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para o extrato foram utilizados durante a modulação.^(31,32,35)

As placas foram incubadas à 37 °C por 24 h, sendo a leitura evidenciada pelo uso de Resazurina Sódica (Sigma®), conforme relatado anteriormente no teste de determinação da CIM.^(33,34)

Os ensaios antibacterianos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média das repetições.^(31,32,35)

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi aplicada à variância de duas vias, através do software v4.0 Prisma™, utilizando o programa ANOVA two-way, seguido de Bonferroni pós-teste de comparação múltipla, sendo considerado significativo quando $p < 0,0001$.⁽³²⁾

Resultados

Através da prospecção fitoquímica do extrato, ilustrado na (Tabela 2), foi possível identificar a presença de diversas classes de metabólitos secundários que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas.

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Allamanda puberula*

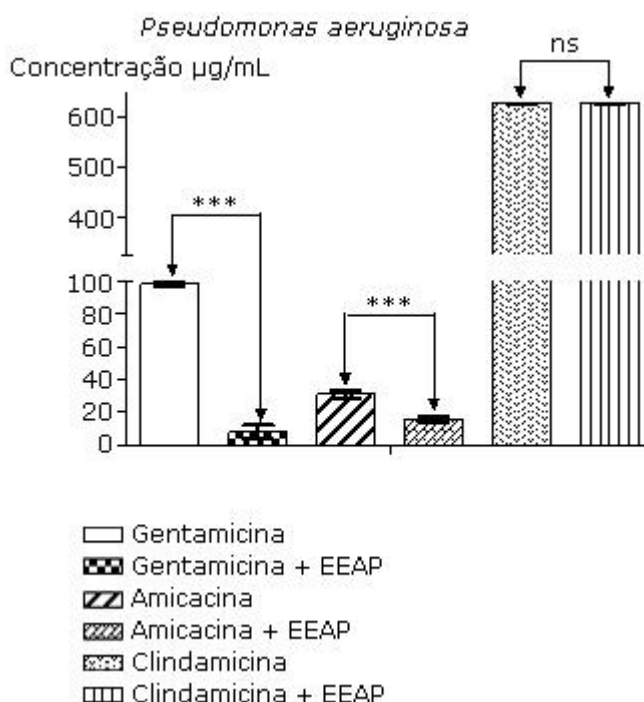
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS															
EEAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1 - Fenóis; 2 - Taninos Pirogálicos; 3 - Taninos Flobabênicos; 4 - Antocianinas; 5 - Antocianidinas; 6 -Flavonas; 7 - Flavonóis; 8 - Xantonas; 9 - Chalconas; 10 - Auronas; 11 - Flavanonóis; 12 -Leucoantocianidinas; 13 - Catequinas; 14 - Flavanonas; 15 - Alcalóides; (+) presença; (-) ausência; EEAP - Extrato Etanólico de *Allamanda puberula*.

Apesar do extrato apresentar em sua constituição metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica, não foi constatada atividade antibacteriana clinicamente relevante do extrato isolado frente às linhagens trabalhadas, obtendo uma CIM de $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$.

Na modulação, perante as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, houve modificação da atividade antibiótica, com redução da CIM dos aminoglicosídeos na presença do produto natural, comparado ao controle com apenas o antibiótico, apresentando um valor de significância com $p < 0,0001$.

A (Fig. 1) mostra a ação do extrato sobre a atividade de aminoglicosídeos e a clindamicina, da classe das lincosamidas, contra a *P. aeruginosa*, demonstrando uma interferência na atividade dos antibióticos, com redução das CIMs. O efeito mais representativo foi na associação do produto natural com a gentamicina, reduzindo a CIM de $104,17 \mu\text{g/mL}$ para $15,46 \mu\text{g/mL}$. Seguido da associação do extrato com a amicacina, com redução de $42,32 \mu\text{g/mL}$ para $19,53 \mu\text{g/mL}$.

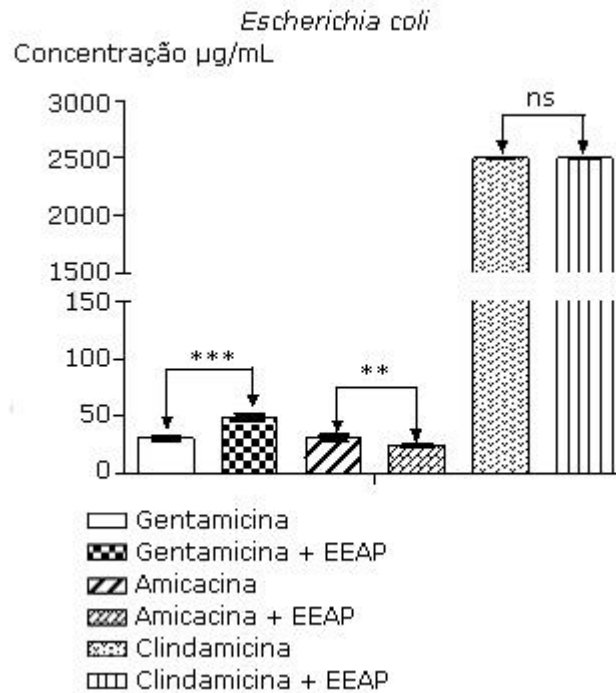


EEAP - Extrato Etanólico de *Allamanda puberula*. *** valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$; ns - não estatisticamente significativo.

Fig. 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença e ausência do extrato etanólico frente *P. aeruginosa*.

Observa-se na (Fig. 2) que houve uma diminuição da ação da gentamicina quando associada com o extrato. Em relação ao efeito sobre a amicacina, percebe-se uma

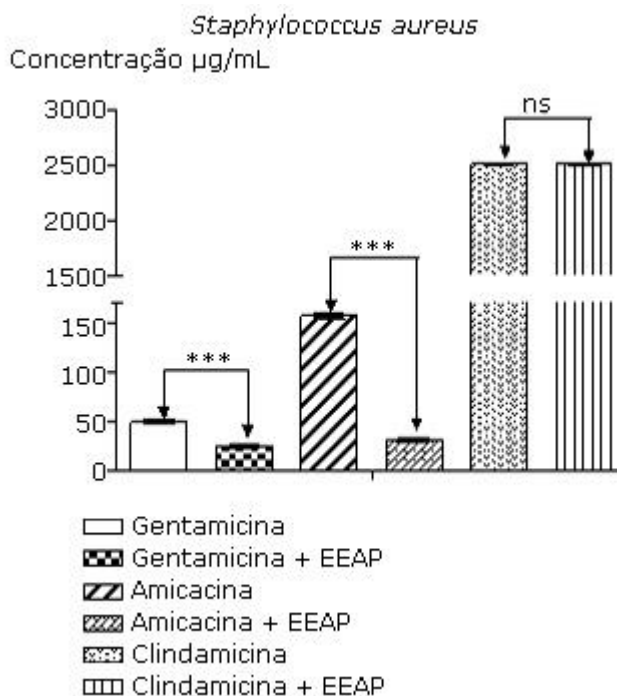
elevação da potência deste fármaco, havendo uma redução da CIM de 42,315 µg/mL para 26,04 µg/mL.



EEAP - Extrato Etanólico de *Allamanda puberula*. *** valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$; ns - não estatisticamente significativo.

Fig. 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença e ausência do extrato etanólico frente *E. coli*.

Tanto a amicacina quanto a gentamicina associada ao produto natural, frente à *S. aureus* (Fig. 3), tiveram sua ação potencializada, principalmente a da amicacina que teve sua CIM reduzida significativamente de 182,29 µg/mL para 32,55 µg/mL.



EEAP - Extrato Etanólico de *Allamanda puberula*. *** valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$; ns - não estatisticamente significativo.

Fig. 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos na presença e ausência do extrato etanólico frente *S. aureus*.

Não foi observada modulação estatisticamente significativa da atividade antibiótica do produto natural sobre a clindamicina.

Discussão

Há um grande interesse do meio científico em investigações químicas e farmacológicas sobre as propriedades biológicas de plantas medicinais. Isso pode ser justificado pelo fato de que utilizar extratos como agentes antimicrobianos demonstra ser um risco reduzido de aumento da resistência, uma vez que são misturas complexas, e isso faz com que haja dificuldades maiores para adaptabilidade microbiana e, por conseguinte, menor probabilidade de geração de linhagens resistentes.^(13,36)

Além da atividade antibacteriana isolada, os produtos naturais têm sido estudados também em relação a capacidade de potencializar antibióticos utilizados na clínica.⁽³⁴⁾

A prospecção fitoquímica demonstrou a presença de vários metabólitos que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e antiinflamatória.^(4,12,37) Estudos semelhantes evidenciaram a presença de diversos compostos químicos em plantas pertencentes a família Apocynaceae.^(14,17,18,19,20,21) Esses fitoconstituintes são afetados pela variação sazonal, horário da colheita, manejo, acondicionamento, entre outros fatores. Isso justifica a ausência ou presença desses constituintes nos testes fitoquímicos.^(27,37)

Neste estudo, o extrato etanólico de *A. puberula* de forma isolada, não demonstrou atividade antibacteriana de relevância clínica, entretanto, na modulação com os aminoglicosídeos apresentou atividade frente *P. aeruginosa*,

E. coli e *S. aureus*, ao reduzir de forma significativa a CIM dos antibióticos, através do método de microdiluição em caldo. Estudos com plantas pertencentes a família Apocynaceae evidenciaram ação contra as cepas testadas,^(22,23,24,25) porém esta diferença de resultados pode estar relacionada com o método utilizado, concentração testada, a variabilidade genética das espécies vegetais e a sazonalidade, que afeta a presença e a porcentagem de constituintes que apresentam efeito antibacteriano.^(27,36,37)

A potencialização do efeito da amicacina e gentamicina pode ser devido a presença dos metabólitos secundários, como os taninos e flavonoides, que são sintetizados por plantas para combater as infecções microbianas. Tais compostos são capazes de inibir enzimas, alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática bacteriana, facilitando assim o influxo do fármaco.^(4,13,34)

A atividade observada frente *S. aureus* provavelmente advém da presença de flavonoides, por conta da sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular ou ainda pela sua lipofilicidade, que é responsável pela ruptura da membrana celular dos microrganismos. Isto também pode estar relacionado à ação dos taninos, já que *S. aureus* apresenta sensibilidade a este composto.^(12,34,36)

Em relação a diminuição da ação da gentamicina quando associada ao extrato frente a *E. coli*, possivelmente está relacionada ao efeito antioxidante dos flavonoides, que é atribuído à sua propriedade quelante.⁽³⁴⁾ Ao ocorrer a quelação dos constituintes do antibiótico pelo produto natural ou a ligação destes em locais específicos dos fármacos, pode haver uma diminuição do efeito do antibiótico, isso caracteriza uma resposta contrária a esperada.⁽³⁸⁾

Não foi observada modulação estatisticamente significativa da atividade antibiótica do produto natural sobre a clindamicina, no entanto na literatura não foi encontrado justificativa para a ação investigada.

Os mecanismos pelos quais os produtos naturais conseguem inibir o crescimento microbiano são inúmeros, podendo ser em parte por consequência da natureza hidrofóbica de alguns componentes. Tais compostos podem agir aumentando a permeabilidade celular aos antibióticos ou ainda interferindo nos sistemas enzimáticos das bactérias, sejam eles mecanismos de produção de energia (fosforilação oxidativa) ou sistemas de efluxo.^(36,39)

As concentrações séricas observadas com as doses terapêuticas dos aminoglicosídeos estão próximas às doses tóxicas. A toxicidade celular, com exceção da Estreptomina, é comum a essa classe, devido a absorção para o meio intracelular. Os seus efeitos tóxicos mais significativos são nefrotoxicidade, ototoxicidade e o bloqueio neuromuscular.⁽¹³⁾

A combinação do produto natural com os aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos colaterais desta classe de antibióticos, já que essa associação reduz significativamente a CIM destas drogas, com isso, a dose necessária para que haja sucesso terapêutico seria menor.⁽²⁷⁾

Os dados obtidos neste estudo são pioneiros e promissores no incentivo à futuras pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos da *A. puberula*, demonstrando que o extrato pode ser uma alternativa terapêutica à resistência bacteriana, por possuir compostos com reconhecida atividade biológica, além de indicar a possibilidade do seu uso combinado aos aminoglicosídeos, no intuito de aumentar o potencial dessas drogas, podendo dessa forma, reduzir a toxicidade presente nestes fármacos, já que uma dose menor irá produzir o mesmo efeito que a dose usual. Todavia, novos estudos são

necessários para melhor definir as atividades biológicas do extrato etanólico das folhas de *A. puberula*.

Referências bibliográficas

1. World health organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. 7p. 2017 [acceso: 02/09/2017]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
2. Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira EO. Uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre sua evolução. Rev Port Saúde Pública. 2016;34(1):77-84.
3. Wernli D, Jorgensen PS, Harbarth S, Carroll SP, Laxminarayan R, Levrat N, et al. Antimicrobial resistance: The complex challenge of measurement to inform policy and the public. PLoS Med. 2017;14(8):1-9.
4. Sousa LAT de, Andreza de SR, Alves EF, Cruz FAJ, Leandro GLM, Guedes de AMTT, et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*. Rev Cienc Salud. 2016;14(2):201-10.
5. Bush LM. Overview of Bacteria. 2017 [acceso: 10/08/2017] Disponible en: <http://www.merckmanuals.com/home/infections/bacterial-infections/overview-of-bacteria>
6. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus. 2017;9(6):1-9.
7. Salcido NMF, Prieto JMV, León MAD, Pérez APG. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. Rev Mex Cienc Farm. 2015;46(2):7-16.
8. Dantas TS, Duarte DB, Freitas AFS, Dantas TS, Barbosa AHD. O uso indiscriminado de antibióticos e resistência bacteriana. II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde (II CONBRACIS); Paraíba, Brasil; 2017
9. Teh CH, Nazni WA, Nurulhusna AH, Norazah A, Lee HL. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. BMC Microbiology. 2017;17(36):1-8.
10. Lacerda GM, Monteiro AB, Tintino SR, Delmondes GA, Fernandes CN, Lemos ICS, et al. Atividade moduladora sobre antibióticos pelo extrato aquoso das folhas de *Bauhinia unguolata* L. Rev Cubana Plant Med. 2016;21(3):309-17.
11. de Sousa RRF, da Silva MR, Siliano PR. Análise da eficácia antimicrobiana de extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Coriandrum sativum* L. UNISANTA Bioscience. 2017 [acesso: 10/09/2017];6(3):207-14. Disponible en: <http://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/view/930/876>
12. Cruz AJF, Brito IP, Sobral MAF, Sousa ATL, Alves EF, Andreza RS, et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. Rev Cienc Salud. 2016;14(2):191-200.
13. Ferreira JVA, Lima LF, Figueredo FG, Matias EFF, Souza ES, Andrade JC, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. Rev Cubana Plant Med. 2016;21(1):71-82.

14. Figueiredo CSS, Santos JCB, Junior JAAC, Wakui VG, Rodrigues JFS, Arruda MOA, *et al.* *Himatanthus drasticus* Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities. *Molecules*. 2017;22(6):1-17.
15. Santos BS, Silva LC, Silva TD, Rodrigues JF, Grisotto MA, Correia MT, *et al.* Application of omics technologies for evaluation of antibacterial mechanisms of action of plant-derived products. *Front Microbiol*. 2016;7:1466.
16. Koch I, Rapini A, Simões AO, Kinoshita LS, Spina AP, Castello, ACD. Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 [acesso: 20/08/2017]. Disponible en: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB4846>
17. Arora DS, Sood H. In vitro antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R.Br. leaves and their biosafety evaluation. *AMB Express*. 2017;7:115.
18. Siriyong T, Srimanote P, Chusri S, Yingyongnarongkul B, Suaisom C, Tipmanee V, *et al.* Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement Altern Med*. 2017;14:17(1):405.
19. Quazi S, Mathur K, Arora S. *Calotropis procera*: an overview of its phytochemistry and pharmacology. *Indian Journal of Drugs*. 2013;1(2):63-69.
20. Khan S, Taning CNT, Bonneure E, Mangelinckx S, Smaghe G, Shah MM. Insecticidal activity of plant-derived extracts against different economically important pest insects. *Phytoparasitica*. 2017;45:113.
21. Santos ACB, Silva MAP, Santos MAF, Leite TR. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med*. 2013;15(3):442-58.
22. Akhtar MS, Hossain MA, Said SA. Isolation and characterization of antimicrobial compound from the stem-bark of the traditionally used medicinal plant *Adenium obesum*. *J Tradit Complement Med*. 2017;7(3):296-300.
23. Li CJ, Chen S, Sun S, Zhang L, Shi X, Wu SJ. Cytotoxic monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia yunnanensis* Diels. *Fitoterapia*. 2017;117:79-83.
24. Murali M, Mahendra C, Nagabhushan, Rajashekar N. Sudrashana MS, Raveesha KA, *et al.* Antibacterial and antioxidant properties of biosynthesized zinc oxide nanoparticles from *Ceropegia acandelabrum* L. - Na endemic species. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2017;15:179:104-09.
25. Ramadwa TE, Elgorashi EE, MCGAW LJ, Ahmed AS, Eloff JN. Antimicrobial, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Funtumia africana* leaf extractus, fractions and the isolated methyl ursolate. *South African Journal of Botany*. 2017;108:126-31.
26. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev. Bras. Cienc. Farm*. 2006;42(2):195-202.
27. Santana PS, Andreza RS, Leite VI, Sousa PCV, Alves AA, Tinino SR, *et al.* Efeito antibacteriano e antifúngico de extratos etanólico, hexânico e metanólico a partir de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Malva corama) contra cepas multi-resistentes a drogas. *Biota Amazônia*. 2016;6(1):64-69.
28. Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 2ª.ed. Fortaleza-CE. Editora: UFC; 1997.
29. Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 3ª ed. Fortaleza Editora: UFC; 2009.

30. Coutinho HDM, Kerntopf MR, Menezes IRA, Costa JGM, Felipe CFB, Valterlucio SS, *et al.* Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. Rev Cub de Plant Med. 2017;22(1):2-11.
31. Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti EC, *et al.* Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. Biomed Res Int. 2013;2013:1-5.
32. Matias EFF, Alves EF, Santos BS, Souza CES, Ferreira JVA, Lavor AKLS, *et al.* Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:1-7.
33. Javadpour MM, Juban MM, LO WCJ, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. J. Med. Chem. 1996;39(16):3107-13.
34. Leite LH, Tintino SR, Figueredo FG, Oliveira CDM, Siebra ALA, Sampaio RS, *et al.* Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia Virgilioides Kunth* (Sucupira) - *Fabaceae Papilionoidae*. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2014;13(5):477-87.
35. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy. 2008;54(4):328-30.
36. Souza CES, Leite NF, Alencar LB, Brito DIV, Lavor AK, Matias EFF, *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato hexânico de *Costus cf. arabicus* L. Rev Cub de Plant Med. 2014;19(2):151-9.
37. Colacite, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan. Revista saúde e pesquisa. 2015;8(3):509-16.
38. Pereira NLF, Aquino PEA, Silva MR, Nascimento EM, Grangeiro ARS, Oliveira CDM, *et al.* Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. Revista Fitos. 2015;9(2):73-159.
39. Lucena BFF, Tintino SR, Figueredo FG, Oliveira CDM, Aguiar JJS, Cardoso EN, *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *cymbopogon citratus* (dc.) stapf. Acta biol. Colomb. 2015;20(1):39-45.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Ana Paula Leite Nascimento: Realizou os testes microbiológicos.

Ítalo Mykaell da Silva Benjamim: Realizou os testes microbiológicos.

Luiz Eduardo Oliveira Teotônio: Realizou os testes microbiológicos.

Cleberton Torres Santos: Realizou os testes fitoquímicos.

Dárcio Luiz de Souza Júnior: Realizou os testes fitoquímicos.

Nadghia Figueiredo Leite Sampaio: Realizou a análise estatística.

Fernando Gomes Figueredo: Supervisão e coordenação de projetos.

Todos os autores participaram da elaboração y aprobación de la versión final do manuscrito.