



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS EDVALDO DE SOUZA DO Ó
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

RENAN DIÊGO VIEIRA NOGUEIRA

Potencial Modulador *in vitro* do Extrato Etanólico de *Punica granatum* L. sobre a Atividade de Antibióticos

CAMPINA GRANDE – PB
2014

RENAN DIÊGO VIEIRA NOGUEIRA

Potencial Modulador *in vitro* do Extrato Etanólico de *Punica granatum* L. sobre a Atividade de Antibióticos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Zilka Nanes Lima.

CAMPINA GRANDE – PB
2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

N778p Nogueira, Renan Diêgo Vieira.

Potencial modulador in vitro do extrato etanólico de *Punica Granatum L.* sobre atividade de antibióticos [manuscrito] / Renan Diêgo Vieira Nogueira. - 2014.

21 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Ma. Zilka Nanes Lima, Departamento de Farmácia".

1. Farmacologia. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Bioquímica. 4. Modulação in vitro. I. Título.


21. ed. CDD 615


RENAN DIÉGO VIEIRA NOGUEIRA

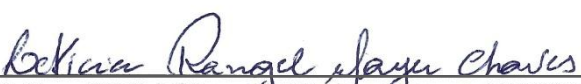
Potencial Modulador *in vitro* do Extrato Etanólico de *Punica granatum* L. sobre a Atividade de Antibióticos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 25 de Fevereiro de 2014.


Profª Msc. Zilka Nanes Lima / UEPB
Orientadora


Profª. Msc. Patrícia Maria Freitas e Silva / UEPB
Examinadora


Prof. Esp. Letícia Rangel Mayer Chaves / UEPB
Examinadora

Potencial Modulador *in vitro* do Extrato Etanólico de *Punica granatum* L. sobre a Atividade de Antibióticos

Renan D.V. Nogueira¹
Zilka Nanes Lima²

O evento da multirresistência bacteriana tem levado pesquisadores a estudar as características que algumas plantas medicinais têm em interagir com compostos antimicrobianos sintéticos, na tentativa de reverter mecanismos de resistência bacterianos. Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do extrato etanólico de *P. granatum* L. (EEPG) em modular a atividade de antibióticos rotineiramente utilizados na clínica. Duas cepas multirresistentes, *Staphylococcus aureus* A420 e *Escherichia coli* C507 foram utilizadas nos experimentos, realizados através da técnica da microdiluição em placas. O EEPG e os antibióticos oxacilina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cloranfenicol, amicacina e gentamicina tiveram suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) avaliadas, realizando-se em seguida os testes de modulação, onde se promoveu a associação do EEPG, a uma concentração subinibitória de 32 µg/mL, com cada antibiótico. As respectivas CIMs obtidas após a associação foram comparadas com as CIMs dos antibióticos quando isolados. O extrato apresentou fraca atividade antibacteriana, com CIM de 512 µg/mL para ambas as cepas. Como modulador da atividade de antibióticos, o extrato mostrou-se eficaz principalmente com a classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina). Assim, observa-se que o extrato etanólico de *P. granatum* aparece como recurso promissor para auxiliar a terapia envolvendo antimicrobianos, particularmente aminoglicosídeos, trazendo a oportunidade de diminuir os efeitos colaterais observados com estes medicamentos e principalmente auxiliando no tratamento de bactérias que apresentam múltiplas resistências aos antimicrobianos atuais.

PALAVRAS-CHAVE: Aminoglicosídeos. *S. aureus* meticilina-resistente MRSA. Beta-lactamase de espectro ampliado ESBL.

¹Graduando em Farmácia. renandiego.1@hotmail.com

² Orientadora. zilkananeslima@gmail.com

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 METODOLOGIA	8
2.1 Material vegetal	8
2.2 Preparo do extrato etanólico e das soluções-teste	8
2.3 Micro-organismos	9
2.4 Antimicrobianos	9
2.5 Análises da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Modulação da atividade de antibióticos	9
3 RESULTADOS	10
4 DISCUSSÃO	11
5 CONCLUSÃO	14
ABSTRACT	
REFERENCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O surgimento de variados mecanismos de resistência bacteriana aliado ao aumento dos casos de infecções por micro-organismos multirresistentes tem gerado grande interesse na busca de recursos que possibilitem meios de reverter esses fenômenos. Plantas medicinais constituem um recurso promissor nestes aspectos; a presença de misturas complexas de fitocompostos dificultaria a aquisição de resistência por parte dos micro-organismos (CUNHA et al., 2011; NEGI, 2012; ZAGO et al., 2009). Ainda, algumas plantas também tem sido objeto de estudo não somente por serem antimicrobianas, mas também por promoverem a reversão de mecanismos de resistência, modulando a atividade de compostos antimicrobianos (COUTINHO et al., 2010).

Punica granatum L., conhecida no Brasil como Romanzeira, é uma árvore de pequeno porte pertencente à família Punicaceae, esta composta apenas por mais uma espécie, a *Punica protopunica*, restrita a ilha de Socotra, no Iêmen (HUANG et al., 2005; LANSKY; NEWMAN, 2007). *P. granatum* cresce em várias partes do mundo, sendo amplamente utilizada em cosméticos, formulações terapêuticas e produtos alimentícios (AL-ZOREKY, 2009; LEE et al., 2010). Centenas de compostos presentes em seu fruto, a romã, já foram elucidados, como elagitaninos, antocianinas, antocianidinas, flavonas e flavonoides (JURENKA, 2008), alguns destes com reconhecido potencial antibacteriano e modulador da atividade de antibióticos (DEY et al., 2012).

Seu uso terapêutico é milenar, bem como sua associação a aspectos físicos e espirituais. Culturas antepassadas associavam o fruto de *P. granatum* a divindades relacionadas à criação do universo; os antigos egípcios já a utilizavam no combate a infecções; no sistema de medicina *Ayurvedica*, a romã é considerada como sendo “uma farmácia dentro de si mesma” (HOWELL; D’SOUZA, 2013; LANSKY; NEWMAN, 2007). No Brasil, a romã é bastante conhecida e utilizada, principalmente na região Nordeste, onde muitos trabalhos relatam seu uso na medicina popular, sendo bastante indicada por raizeiros desta região (ALBUQUERQUE et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; PAULINO et al., 2012). A romã foi a planta mais indicada pelos raizeiros da cidade de João Pessoa – Paraíba - Brasil - para o tratamento de problemas bucais (SANTOS et al., 2009), enquanto que esta também foi a planta mais citada por usuários do Serviço Público de Saúde de Campina Grande – Paraíba - Brasil - quando questionados ao uso de plantas medicinais antimicrobianas em processos infecciosos (SOUZA et al., 2013).

Atualmente, pesquisas corroboram tais eventos, onde diversos estudos demonstram suas ações antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, anticancerígena, antidiabética, anti-helmíntica e antiviral, além de também ser útil no tratamento de diarreia, disenteria, feridas uterinas, dores de estômago, úlceras, febre, aftas, malária, cálculos renais, patologias respiratórias e prevenção de disfunções tireoidianas (AL-ZOREKY, 2009; DELL'AGLI et al., 2009; LEE et al., 2010; MACHADO et al., 2002; RATHOD et al., 2012; SÁNCHEZ-LAMAR et al., 2008; SESTILI et al., 2007; WANG et al., 2006; ZAHIM et al. 2010).

O uso indiscriminado de antimicrobianos fez com que diversas bactérias desenvolvessem meios de sobreviver frente a estes compostos, o que ocasionou o surgimento da resistência bacteriana (SILVEIRA et al, 2006). Devido a esse fenômeno, tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas multirresistentes foram selecionadas, tornando-se um risco a saúde pública (DUBEY; PADHY, 2012).

Considerado por alguns autores como um dos principais patógenos humanos, o *Staphylococcus aureus* destaca-se por estar associado a um elevado número de infecções, rápida disseminação e facilidade de aquisição de resistência a antimicrobianos (MENEGOTTO; PICOLI, 2007). Cepas MRSA (do inglês *Methicilin-resistant S. aureus*) aparecem como um sério problema, principalmente em pacientes hospitalizados (EUMKEB et al., 2010), embora existam relatos de cepas adquiridas na comunidade, o que preocupa ainda mais devido ao sério risco de infecções e complicações no tratamento (KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006). Estas cepas são assim classificadas pelo fato de possuírem o gene *mecA* que determina a codificação de um novo tipo de proteína ligadora de penicilina (PBP), a PBP2A, gerando baixa afinidade aos betalactâmicos em geral (TAYLOR, 2013). Alterações em outros tipos de PBPs também desencadeiam resistência a betalactâmicos em outros Gram-positivos, como *Enterococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (LAMBERT, 2005).

Betalactamases de espectro ampliado, ESBLs (do inglês *Extended-spectrum beta lactamases*), um grupo heterogêneo de enzimas “remodeladas e expandidas”, conferem ao micro-organismo resistência a atividade de quase todas as penicilinas, cefalosporinas e outros monobactâmicos (DENTON, 2006; PEREZ et al., 2007). Vários membros da família Enterobacteriaceae apresentam estas enzimas, principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, embora também possa ser encontrada em bastonetes Gram-negativos não fermentadores de glicose, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Ríos e Recio (2005) afirmaram que os estudos envolvendo plantas antimicrobianas deveriam, além de outros fatores, se consolidarem na pesquisa de interações positivas ou negativas entre estas e antimicrobianos sintéticos. Assim, considerando a existência de micro-organismos multirresistentes, além da ação antibacteriana de *P. granatum* devidamente comprovada por inúmeras pesquisas, justifica-se avaliar o potencial modulador que o extrato etanólico desta planta poderia exercer em antibióticos rotineiramente utilizados na clínica, no intuito de buscar uma combinação eficaz frente a micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos, possibilitando um novo caminho na pesquisa de interações antimicrobianas e tratamento da resistência bacteriana.

2 METODOLOGIA

2.1 Material vegetal

As cascas do fruto de *P. granatum* foram adquiridas em um estabelecimento especializado em produtos vegetais sob a forma de pó seco, acompanhado de seu respectivo laudo de identificação, semelhante ao realizado por Lins et al., (2013) e Michelin et al., (2005).

2.2 Preparo do extrato etanólico e das soluções-teste

O extrato etanólico foi obtido pelo processo de maceração, misturando-se 200 gramas do pó da planta em 1 litro de etanol puro e deixado em repouso à temperatura ambiente por 72 h. A solução extrativa foi filtrada e concentrada a vácuo em evaporador rotativo acoplado a banho-maria (TE 211 Tecnal) a uma temperatura constante de 48°C. O extrato bruto obtido foi mantido refrigerado até o momento da realização dos testes.

A solução inicial do extrato (100 mg/mL) foi preparada diluindo-se este em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, Brasil) a 10%, e as demais soluções preparadas a partir desta diluídas em caldo Mueller-Hinton (Difco, EUA), variando à concentrações de 1024 a 0,5 µg/mL.

2.3 Micro-organismos

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se as cepas *S. aureus* A420 e *E. coli* C507, ambas de origem clínica obtidas do Laboratório de Análises Clínicas da UEPB, com seus respectivos perfis de resistência a antibióticos apresentados no **Quadro 1**. Os micro-organismos foram mantidos em estoques de *Brain Heart Infusion* ágar (Himedia, Índia) cobertos em óleo mineral estéril, e anteriormente aos experimentos, reativados em *Brain Heart Infusion* caldo (Himedia, Índia) a 37°C por 24 horas.

Micro-organismo	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> A420	Amc; Amp; Cfo; Cli; Cip; Eri; Gen; Oxa; Pen;.
<i>Escherichia coli</i> C507	Amc; Amp; Cfl; Cfz; Cip; Cro; Nor; Ofx; Tet;.

QUADRO 1: Perfil de resistência dos micro-organismos multirresistente aos antibióticos usados na clínica. Legenda: Amc (amoxicilina + ácido clavulânico); Amp (ampicilina); Cfo (cefotaxima); Cfl (cefalotina); Cfz (cefazolina); Cli (clindamicina); Cip (ciprorfloxacino); Cro (ceftriaxona); Eri (eritromicina); Gen (gentamicina); Nor (norfloxacina); Ofx (ofloxacina); Oxa (oxacilina); Pen (penicilina); Tet (tetraciclina).

2.4 Antimicrobianos

Amicacina, ampicilina e oxacilina (Novafarma, Brasil), cefalotina (Aspenfarma, Brasil), ceftriaxona (Cellofarm Farmacêutica, Brasil), gentamicina (Santisa, Brasil) e cloranfenicol (Ariston, Brasil) foram utilizados na pesquisa. A oxacilina foi utilizada apenas frente a cepa *S. aureus* A420, considerando este antimicrobiano como marcador da resistência do *S. aureus* a meticilina (NOVY et al., 2013). Todos foram diluídos segundo normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), e as soluções para os testes preparadas em concentrações que variavam de 1.024 a 0,5 µg do antibiótico por mililitro de solução.

2.5 Análises da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Modulação da atividade de antibióticos

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços. Para a determinação da CIM, 100 µL da solução do extrato de *P. granatum* e das soluções dos antibióticos foram

adicionados aos poços da microplaca e realizada a diluição seriada destes compostos, alcançando concentrações que variaram entre 1.024 a 0,5 µg/mL, tanto para a planta quanto para os antibióticos. Por fim, foram adicionados 10 µL do inoculo bacteriano preparado em caldo Mueller-Hinton (Difco, EUA) a uma concentração de 10⁵ unidades formadoras de colônia/mL. Controles de crescimento (somente o inoculo) e controles negativos (somente DMSO e somente o caldo Mueller-Hinton) foram realizados simultaneamente. A CIM foi definida como sendo a menor concentração onde não se detectou visivelmente crescimento bacteriano (MABONA et al., 2013).

Para a avaliação da ação moduladora do extrato de *P. granatum*, a CIM dos antibióticos foi avaliada na presença do extrato a uma concentração subinibitória de 32 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata, e as placas incubadas por 24 h a 35±2°C. Passado o período de incubação, foi adicionado às placas o corante cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5%, e as placas reincubadas por mais três horas até sua leitura (AYRES et al., 2008). Este corante é incolor em sua forma oxidada, passando a vermelho quando reduzido. Células de micro-organismos vivos reduzem o corante, que por ação enzimática origina o composto chamado formazan, o qual se granula dentro das células, corando-as de vermelho enquanto que a ausência da coloração pressupõe a inatividade ou morte celular bacteriana. (RAMOS *et al*, 2006).

A CIM obtida com a combinação extrato-antibiótico foi verificada e comparada com a CIM do antibiótico quando isolado, observando-se a presença de aumento ou diminuição do valor da CIM original.

3 RESULTADOS

A **Figura 1** apresenta os valores da CIM do extrato e das CIMs dos antibióticos isolados e quando combinados com o EEPG.

	<i>S. aureus</i> A420		<i>E. coli</i> C507	
	A	B	A	B
EEPG	512	*	512	*
Oxacilina	512 (R)*	512	*	*
Ampicilina	64 (R)	≥ 1024	≥ 1024 (R)	≥ 1024
Cefalotina	32 (R)	≥ 1024	256 (R)	≥ 1024
Ceftriaxona	1.024 (R)	≥ 1024	64 (R)	64
Cloranfenicol	512 (R)	512	256 (R)	256
Amicacina	64 (R)	32 (I)	16 (S)	4
Gentamicina	256 (R)	128	≤ 0,5 (S)	2

FIGURA 1: Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), em µg/mL, obtidas com a realização dos testes. *Legenda:* **EEPG** (extrato etanólico de *Punica granatum* L.); **A** (CIM do extrato e antibióticos quando isolados); **B** (CIM da associação dos antibióticos com o extrato a 32 µg/mL); *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*); *E. coli* (*Escherichia coli*). * (R) = Resistente; (I) = Resistência intermediária; (S) = Sensível (CLSI, 2012).

O extrato de *P. granatum* não apresentou atividade antibacteriana significativa, com CIM de 512 µg/mL para ambos os micro-organismos testados. Quanto à realização dos testes de modulação de atividade, o possível efeito modulador sinérgico do extrato foi observado com a classe dos aminoglicosídeos, evidenciado a partir da redução da CIM dos antimicrobianos testados.

4 DISCUSSÃO

P. granatum é conhecida a centenas de anos por suas propriedades medicinais. A presença de compostos como taninos e flavonoides, entre muitos outros, podem ser os responsáveis por suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo a antibacteriana, onde vários estudos já reportaram tal atividade, tanto frente a micro-organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (AL-ZOREKI, 2009; HOLETZ et al., 2002; KADI et al., 2011; NEGI, 2012).

Com relação às linhagens multirresistentes aqui testadas, o extrato de romã apresentou fraco potencial antibacteriano, classificação esta baseada em conclusões propostas por Ríos e Recio (2005), onde estes afirmam que a presença de atividade é mais bem caracterizada quando se conseguem concentrações do extrato iguais ou inferiores a 100 µg/mL. Ayres et al. (2008) trazem também uma classificação, onde consideram como fraca atividade valores de CIM entre 500-1000 µg/mL.

Em trabalho realizado por Nascimento et al. (2000) utilizando também o extrato etanólico de *P. granatum* porém através da técnica da disco-difusão, observou-se que este foi inativo frente as cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli* por eles utilizadas. Também por

esta técnica, Michelin et al. (2005) relataram a inatividade do extrato em cepas de *S. aureus* oxacilina-resistentes, embora cepas resistentes de *E. coli* foram susceptíveis a este. Diferentemente destes, Oskay et al. (2009) afirmaram que entre 19 plantas testadas em cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*, a romã esteve entre as cinco melhores em inibir o crescimento destes micro-organismos. Catão et al. (2006), trabalhando com isolados clínicos resistentes de *S. aureus* concluíram que o extrato etanólico de romã na concentração de 10% foi eficaz frente a 100% das cepas por eles testadas. Vale ressaltar que estas apresentavam sensibilidade a oxacilina, diferente da cepa utilizada neste trabalho.

A dificuldade em estabelecer padrões uniformes em estudos envolvendo plantas medicinais é um problema recorrente (RÍOS; RECIO, 2005). No caso dos testes aqui realizados, as diferenças entre os diversos estudos podem ser explicadas, em linhas gerais, pela variação nas concentrações de fitocompostos presentes no extrato de *P. granatum*, variações decorrentes do clima e solos onde a planta é cultivada, horários de coleta da planta, perfis de sensibilidade das cepas empregadas nos testes (existência de diferentes níveis de tolerância a compostos antimicrobianos de acordo com o isolado clínico) ou mesmo a metodologia adotada para a realização dos testes de atividade antimicrobiana (AHMAD; AQIL, 2007; AL-ZOREKY, 2009).

A interação entre extratos de plantas com antibióticos é uma das mais recentes vias de estudo que vem buscando reverter mecanismos de resistência bacteriana (FADLI et al., 2012). Nesse contexto, foram realizados os testes de modulação. A partir destes, observou-se que houve forte antagonismo entre *P. granatum* e os betalactâmicos aqui testados (oxacilina, ampicilina, cefalotina e ceftriaxona), principalmente na cepa *S. aureus* A420. Na cepa de *E. coli* C507, houve manutenção das CIMs originais, com elevação da CIM de cefalotina para $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$, quando isoladamente era $256 \mu\text{g/mL}$. Para os protótipos Gram-positivo e Gram-negativo testados infere-se que a associação extrato-betalactâmico pode repercutir em provável diminuição da atividade do antibiótico.

Testando a interação entre *P. granatum* e o antibiótico ampicilina, Aqil et al. (2005), trabalhando com cepas MRSA, e Cavalcante (2010), trabalhando com cepas *S. aureus* ATCC e cepas de *Streptococcus* sp., observaram que o antimicrobiano combinado com o EEPG foi indiferente, demonstrando não haver sinergismo entre a associação. Quanto a oxacilina, Braga et al. (2005) afirmaram que o extrato metanólico de *P. granatum* reduziu a CIM deste antibiótico em cepas MRSA, o que nos faz sugerir que a fração metanólica desta planta apresenta maior probabilidade de promover interações sinérgicas com betalactâmicos como a

oxacilina, visto a fração etanólica testada em nosso estudo não alterar a CIM deste antimicrobiano.

Para o cloranfenicol, não houve alteração da CIM original quando associado ao EEFG, tanto para a cepa *S. aureus* A420 quanto para *E. coli* C507, semelhante ao obtido por Ahmad e Aqil (2007) que relataram a ineficiência do EEFG em modular a atividade do cloranfenicol em cepas de *E. coli* produtoras de ESBL. Diferentemente, a fração metanólica de *P. granatum* estudada por Braga et al. (2005) mostrou-se sinérgica à ação do cloranfenicol em cepas MRSA. Os mesmos pesquisadores ainda concluíram que o extrato metanólico desta planta pode atuar inibindo bombas de efluxo ou até mesmo favorecendo o influxo do antimicrobiano para o interior celular, reduzindo a CIM necessária para a morte bacteriana.

Em relação aos aminoglicosídeos testados (amicacina e gentamicina), a redução da CIM foi observada em ambos os micro-organismos. É interessante notar que os dois antimicrobianos tiveram suas CIMs diminuídas na cepa de *S. aureus*, enquanto que na cepa de *E. coli* a CIM diminuiu somente para a amicacina, havendo o aumento da CIM da gentamicina.

Já foi constatado que micro-organismos Gram-positivos (como o *S. aureus*) são mais susceptíveis a ação de diversos compostos, comparados aos Gram-negativos (AL-ZOREKY, 2009). Estes últimos apresentam uma membrana externa constituída principalmente por lipopolissacarídeos, o que pode impedir a entrada de diferentes compostos para o interior da célula bacteriana (PESSINI et al., 2003). A diminuição da CIM para dois antibióticos no *S. aureus*, diferente da *E. coli*, pode ser justificada também pelo fato de compostos como flavonoides, presentes no extrato de romã, possuírem a tendência de permear membranas, favorecendo a modificação das propriedades celulares principalmente de micro-organismos Gram-positivos (BERNAL et al., 2010; TAYLOR, 2013), o que pode ter levado a cepa *S. aureus* a ser mais permeável a associação extrato-aminoglicosídeos.

Do ponto de vista químico-estrutural, essa diferença dentro do grupo dos aminoglicosídeos, obtida na cepa de *E. coli*, nos faz sugerir que o efeito modulador do extrato influi em estruturas químicas particulares. Sobre isso, Durante-Mangoni et al. (2009) afirmam que a resistência a aminoglicosídeos se dá de maneira muito individualizada, podendo não haver necessariamente resistência ao grupo completo de antibióticos.

A gentamicina e a amicacina (**Figura 3**) constituem “subgrupos” distintos dentro da classe dos aminoglicosídeos, separados com base na presença de aminoácidos diferentes em cada um destes subgrupos (HARDMAN; LIMBIRD, 2006). Essa distinção intraclasses pode corroborar a diferença de interação havida entre o extrato de *P. granatum*, a amicacina e a gentamicina. Outro fator é que, também devido a essa diferença estrutural, a amicacina não é

inativada pelas enzimas comuns que inativam a gentamicina (PINSETTA, 2010). Dessa forma, a cepa de *E. coli* aqui testada supostamente apresentava enzimas que degradavam a gentamicina, mas não a amicacina.

O uso de aminoglicosídeos torna-se interessante em alguns quadros infecciosos; porém, sua ototoxicidade e nefrotoxicidade, além de seus efeitos serem dose-dependentes, ainda são problemas comuns a esta classe, o que muitas vezes impede seu uso rotineiro (DURANTE-MANGONI et al., 2009). A combinação de aminoglicosídeos com produtos naturais pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos colaterais desta classe devido a redução da dose necessária para o tratamento (FIGUEREDO et al., 2013), além de principalmente reverter mecanismos determinantes de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos.

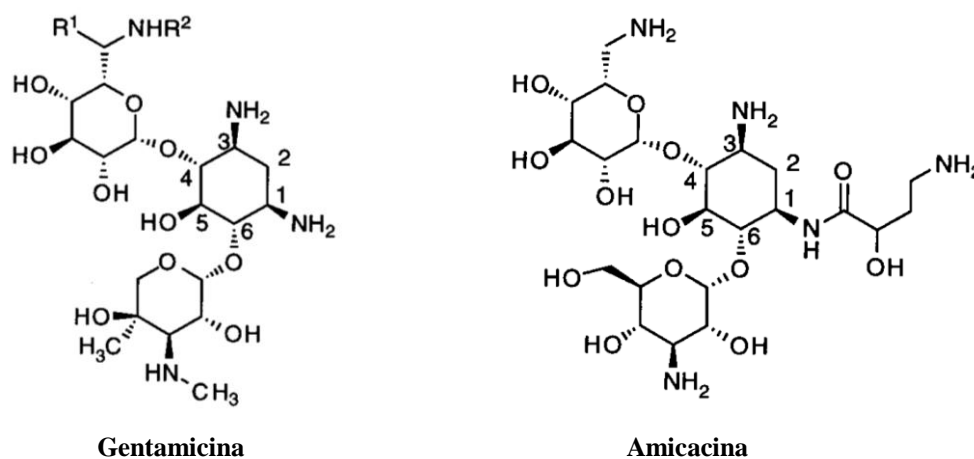


Figura 3: Representação estrutural dos antibióticos aminoglicosídeos gentamicina e amicacina. Em ambas as estruturas notam-se o aminociclitol (o anel central com os carbonos numerados de 1 a 6) e diferentes aminoaçúcares ligados a este, que variam de acordo com o composto. Adaptado de Zembower et al., 1998.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo apontam para o efeito promissor de *P. granatum* principalmente como modulador da atividade de aminoglicosídeos, o que representa um recurso adicional na busca de tratamentos mais eficazes frente a infecções ocasionadas por micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos, bem como também auxiliando na diminuição dos efeitos tóxicos desta classe de antimicrobianos. O estudo também vem a contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas na área, favorecendo a descoberta futura de um composto sinérgico a antibióticos obtido a partir de *P. granatum*, tornando esta

planta uma forte aliada no combate aos processos infecciosos ocasionados por micro-organismos multirresistentes.

ABSTRACT

The event of bacterial multidrug resistance has led researchers to study the characteristics that some medicinal plants have in interacting with synthetic antimicrobial compounds in an attempt to reverse bacterial resistance mechanisms. Therefore, this study aimed to evaluate the potential of ethanol extract of *P. granatum* L. (EEPG) to modulate the activity of antibiotics routinely used in the clinic. Two multidrug-resistant strains, *Staphylococcus aureus* A420 and *Escherichia coli* C507 were used in the experiments, performed using the technique of microdilution plates. The EEPG and antibiotics oxacillin, ampicillin, cephalothin, ceftriaxone, chloramphenicol, amikacin and gentamicin had their minimum inhibitory concentrations (MICs) evaluated, after carrying out tests of modulation, which was promoted the association of EEPG, at a sub-inhibitory concentration of 32 µg/mL, with each antibiotic. The MIC obtained after the respective combination were compared with the MICs of antibiotics when isolated. The extract showed weak antibacterial activity with MIC of 512 µg/mL for both strains. As an antibiotic-activity modulator, the extract was effective mainly with the class of aminoglycosides (gentamicin and amikacin). Thus, it is observed that the ethanol extract of *P. granatum* appears as a promising resource for assisting therapy involving antibiotics, particularly aminoglycosides, bringing the opportunity to reduce the side effects seen with these medications and especially aiding the treatment of bacteria that exhibit multiple resistance to current antibiotics.

KEYWORDS: Aminoglycosides. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Extended-spectrum beta-lactamases ESBL.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; AQIL, F. *In vitro* efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. **Microbiological Research**, 162: 264-275; 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114: 325–354; 2007.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 127: 674–684; 2010.
- AL-ZOREKI, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, 134: 244–248; 2009.
- 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**, 45(2):106-14; 2005.
- AYRES, M.C.C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(1): 90-97; 2008.
- BERNAL, P. et al. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated β -lactam resistance by delocalizing PBP₂. **The Journal of Biological Chemistry**, 285: 24055–24065; 2010.
- BRAGA, L.C. et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, 51: 541-547; 2005.
- CATÃO, R.M.R. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico de *Punica granatum* L. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 38(2): 111-114; 2006.
- CAVALCANTE, A.L.F.A. **Plantas medicinais e saúde bucal: estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, PB, Brasil.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-second Informational Supplement M100-S22 Vol. 32 No. 3. Wayne, PA. USA; 2012.

COUTINHO, H.D.M. et al. Potentiation of Antibiotic Activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **Journal of Medicinal Food**, 13(4): 1024-1026; 2010.

CUNHA, F.A.B. et al. *In vitro* Antibacterial, Phototoxic, and Synergistic Activity of Ethanol Extracts from *Costus cf. arabicus* L. **Journal of Medicinal Food**, 14(9): 964-968; 2011.

DELL'AGLI, M. et al. Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. **Journal of Ethnopharmacology**, 125: 279–285; 2009.

DENTON, M. Enterobacteriaceae. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 29 suppl. 3: S9-S22; 2007.

DEY, D. et al. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. **Food and Chemical Toxicology**, 50: 4302-4309; 2012.

DUBEY, D.; PADHY, R. N. Surveillance of multidrug resistance of two Gram-positive pathogenic bacteria in a teaching hospital and in vitro efficacy of 30 ethnomedicinal plants used by an aborigine of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 273-281; 2012.

DURANTE-MANGONI, E. et al. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, 33: 201–205; 2009.

EUMKEB, G. et al. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. **Phytomedicine**, 18: 40-45; 2010.

FADLI, M. et al. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, 19: 464– 471; 2012.

FALAGAS, M.E.; KARAGEORGOPOULOS, D.E. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. **Journal of Hospital Infection**, 73: 345-354; 2009.

FIGUEREDO, F.G. et al. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearenses* A.C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, vol. 2013, article ID 640682, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/640682>.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. McGraw Hill, 11^a ed. 2006.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** Vol. 97(7): 1027-1031; 2002.

HOWELL, A.B.; D'SOUZA, D.H. The pomegranate: Effects on bacteria and viruses that influence human health. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** volume 2013, article ID 606212, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/606212>.

HUANG, T.H. et al. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 207: 160– 169; 2005.

JURENKA, J. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. **Alternative Medicine Review**, 13: 128-144; 2008.

KADI, H. et al. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Punica granatum* L. bark. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 01(10): 180-182; 2011.

KOZIOL-MONTEWKA M. et al. The investigation of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci nasal carriage among patients undergoing haemodialysis. **Microbiological Research**; 161: 281—287; 2006.

LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57: 1471-1485; 2005.

LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, 109: 177–206; 2007.

LEE, C.J. et al. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, 118: 315-322; 2010.

LINS, R. et al. Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Camomila (*Matricaria recutita* L.) sobre a placa bacteriana e a gengivite. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, 15(1): 112-120; 2013.

MABONA, U. et al. 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**, 148: 45–55; 2013.

MACHADO, T.B. et al. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 13: 606 -610; 2002

MENEGOTTO, F.R.; PICOLI, S.U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39(2): 147-150; 2007.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(4): 316-320; 2005.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31: 247-256; 2000.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, 156: 7–17; 2012.

NOVY, P. et al. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro. **Phytomedicine**, 20: 432-435; 2013.

OKSAY, M.; OKSAY, D.; KALYONCU, F. Activity of Some Plant Extracts Against Multi-Drug Resistant Human Pathogens. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 8 (4): 293-300; 2009.

PAULINO, R.C. et al. Medicinal plants at the Sítio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte State, Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22(1): 29-39; 2012.

PEREZ, F. et al. The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion in Pharmacology**, 7: 459-469; 2007.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13: 21-24; 2003.

PINSETTA, F.R. **Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP. São Paulo, 2010.

RAMOS, T.Z. *et al.* Uso do teste com cloridrato de trifetil tetrazolio para detecção de bacteriúria sintomática e assintomática. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, n.3, 2006.

RATHOD, N.R. et al. Anti-urolithiatic effects of *Punica granatum* in male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 140: 234– 238; 2012.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 80-84; 2005.

SÁNCHEZ-LAMAR, A. et al. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 115: 416–422; 2008.

SANTOS, E.B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(1B): 321-324; 2009.

SESTILI, P. et al. Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems. **Pharmacological Research**, 56: 18-26; 2007.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, 29: 844-855; 2006.

SOUZA, C.M.P. et al. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 1(2): 188-193; 2013.

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

WANG, R. et al. Constituents of the flowers of *Punica granatum*. **Fitoterapia**, 77: 534–537; 2006.

ZAGO, J.A.A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(4): 828-833; 2009.

ZAHIM, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. **Mutation Research**, 703: 99–107; 2010.

ZEMBOWER, T.R. et al. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 10: 95–105; 1998.