

LUIZ EDUARDO OLIVEIRA TEOTÔNIO

Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Estácio FMJ, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

ÍTALO MYKAELL DA SILVA BENJAMIM

Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Estácio FMJ, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

CLEBERTON TORRES SANTOS

Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Estácio FMJ, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

ANA PAULA LEITE NASCIMENTO

Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Estácio FMJ, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

DÁRCIO LUIZ DE SOUSA JÚNIOR

Universidade Federal do Cariri, UFCA, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

NADGHIA FIGUEIREDO LEITE SAMPAIO

Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Estácio FMJ, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

*Recebido em janeiro de 2022.
Aprovado em março de 2022.*

TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E MODULADORA DA EUGENIA INSÍPIDA MART

RESUMO

A busca por novos compostos com atividade antibacteriana é urgente, devido ao aparecimento acentuado da resistência às quimioterapias antimicrobianas. O estudo objetivou determinar a composição química e a atividade antibacteriana e moduladora do extrato etanólico de folhas de *Eugenia insípida*. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo para verificar a atividade contra linhagens padrão e multirresistentes de três cepas bacterianas. Todos os testes foram realizados em triplicata, onde os resultados foram expressos como média geométrica. Para análise estatística foi aplicada a two-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni. A Concentração Inibitória Mínima do extrato foi ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ frente todas as cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa*, não tendo sido demonstrada atividade clinicamente relevante. Frente à linhagem *Escherichia coli*, houve uma inibição na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$. Em associação com antibióticos o extrato potencializou a ação dos mesmos, reduzindo a concentração de antibiótico utilizado frente todas as linhagens bacterianas testadas reafirmando sua atividade moduladora. Diante dos resultados preliminares, o extrato se mostra como uma alternativa terapêutica para potencializar a ação dos antibióticos utilizados na prática clínica, já que contém metabólitos secundários com atividade biológica reconhecida, destacando os flavonoides e taninos.

Palavras-Chave: atividade antibacteriana; *eugenia sp*; extrato etanólico; modulação.

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ANTIBACTERIAL AND MODULATORY EVALUATION OF EUGENIA INSIPIDA MART

ABSTRACT

The search for new compounds with antibacterial activity is urgent due to the marked emergence of resistance to antimicrobial chemotherapies. The study aimed to determine the chemical composition and the antibacterial and modulatory activity of the ethanolic extract of *Eugenia insípida* leaves. The broth microdilution method was used to verify the activity against standard and multidrug-resistant strains of three bacterial strains. All tests were performed in triplicate, where results were expressed as geometric mean. For statistical analysis, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was applied. The Minimum Inhibitory Concentration of the extract was ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ against all *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains, and no clinically relevant activity was demonstrated. Against the *Escherichia coli* strain, there was an inhibition at the concentration of 512 $\mu\text{g/mL}$. In association with antibiotics, the extract potentiated their action, reducing the concentration of antibiotics used against all bacterial strains tested, reaffirming its modulating activity. Given the preliminary results, the extract is shown as a therapeutic alternative to enhance the action of antibiotics used in clinical practice, since it contains secondary metabolites with recognized biological activity, especially flavonoids and tannins.

Keywords: antibacterial activity; *eugenia sp*; ethanolic extract.

INTRODUÇÃO

A civilização humana faz uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas (Silva et al. 2015 Apud Rates, 2001) com a finalidade de tratar, curar e prevenir diversas doenças visando melhorar suas próprias condições de vida e aumentar suas chances de sobrevivência e condições de existência. Tal prática ainda hoje utilizada por diversas populações de países em desenvolvimento, configura como uma das mais antigas da humanidade, do qual é utilizado como uma forma alternativa ou complementar a terapia medicamentosa com fármacos sintéticos (Who, 2006).

A utilização inadequada de antibióticos vem originando o surgimento de bactérias resistente aos diversos fármacos antimicrobianos existente no mercado, contribuindo para o aumento no número de infecções, na qual, tem como agente etiológico bactérias multirresistentes. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde, 25% das mortes no mundo são decorrentes de doenças infecciosas (Tintino et al. 2015; Silva et al. 2018). No entanto a descoberta de novas moléculas, na qual possuam como objetivo primordial a inibição da resistência ou impedimento do seu crescimento microbiano torna-se imprescindível; vindo as plantas medicinais como uma ótima escolha, devido serem detentores de metabolitos secundários com variadas propriedades terapêuticas e resultados relevantes em tratamentos terapêuticos (Albuquerque & Hanazaki, 2006).

Da família Myrtaceae, destaca-se várias espécies do gênero *Eugenia*, devido a presença de ácidos triterpênicos amplo espectro de atividades biológicas, onde se destacam as atividades: anti-inflamatória, antineoplásica, antivirótica, antimicrobiana, antiparasitária, hepatoprotetora, e também a presença de outros constituintes relevantes responsáveis por efeitos biológicos, são eles os flavonóides, taninos e terpenoides (Oliveira et al. 2006; Galeno et al. 2014; Frighetto, 2005).

Tratando-se dos efeitos terapêuticos, os extratos brutos, evidenciam a realização de funções antiinflamatórias, analgésicas, antifúngicas, hipotensivas, antidiabéticas e antioxidantes (Donepudi et al. 2012; Oliveira et al. 2006).

Eugenia insipida é mais conhecida popularmente como Cereja-do-cerrado ou Goiabinha-do-mato, onde é caracterizada por possuir arbusto que medem 1,50 m, folhas simples com 1,3 a 4,3 cm de comprimento e 2,4 a 2,2 cm de largura, com base cuneada, ápice agudo, margem inteira, nervura primária e secundária proeminente em ambas as faces, face abaxial e adaxial com endurecimento do tipo piloso. Sua distribuição geográfica compreende o norte, nordeste, centro-oeste, sul e sudeste, com destaque para os biomas caatinga, cerrado e mata atlântica (Morais et al. 2014).

Notando a falta de estudos de cunho microbiológico e modulador, para a espécie *Eugenia insipida*, e evidenciando várias pesquisas deste tipo para as espécies uniflora (Mendonça, 2016), anômala (Batista et al. 2014) e *caryophyllus* (Simonettie et al. 2016) do mesmo gênero, na qual, mensurava suas atividades antibacteriana e antifúngica, resolveu se testar a atividade microbiológica e moduladora, bem como qualificar sua composição química.

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo realizar uma triagem fitoquímica qualitativa e testar *in vitro* o extrato etanólico das folhas de *Eugenia Insípida* quanto a sua atividade antibacteriana e como agente modificador da resistência a antibiótico, mais precisamente; Gentamicina, Amicacina e Clindamicina, contra as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de estudo, Obtenção do material vegetal e identificação botânica

Trata-se de uma pesquisa experimental de caráter quantitativa e quantitativa, onde, realizou-se pesquisas nas seguintes bases de dados: Lilacs, Pubmed, Medline, Doaj



e Periódicos Capes, com o intuito de identificar estudos microbiológicos com a planta em estudo.

A coleta do material vegetal foi proveniente da chapada do Araripe na cidade de Barbalha-Ceará, Brasil, coletada no mês de Junho de 2017. Foi gerada uma exsicata da planta e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA), obtendo um o seguinte registro 2174.

Obtenção dos extratos

As folhas foram coletadas às 08:30hrs, no dia 6 de dezembro de 2015, na Chapada do Araripe. Depois foram selecionadas e trituradas para aumentar a superfície de contato, sendo em seguida pesadas em uma balança analítica obtendo-se o peso de 110 g, foram então imersas em 1000 ml de etanol P.A para extração prolongada a frio por 72 horas. Após esse período o extrato foi filtrado com o auxílio de gases e um funil de vidro, onde logo em seguida foi submetido à destilação simples do solvente no rota evaporador (Quimis, modelo 034482 e N° 15020722).

O extrato foi levado ao banho-maria (Quimis, modelo 0334M-28 e N° 14020869) numa temperatura de 50°C dentro de frasco de vidro âmbar, onde permaneceu por 8 dias, para que todo o etanol evaporasse e restasse apenas o extrato puro, obtendo assim um rendimento de 16,01%

Análise fitoquímica dos extratos etanólico

As análises químicas dos extratos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia aplicada da Faculdade Estácio - FMJ, onde foi submetido ao método de prospecção fitoquímica, proposto por Matos (1997) e revisado por Matos (2009), que consiste na determinação preliminar das classes de constituintes secundários. São testes baseados na análise qualitativa da mudança de coloração e formação de precipitados após adição de reagentes específicos, como descrito a seguir.

Testes para identificação de fenóis e taninos

Inicialmente foram preparadas as soluções com 300 mg dos extratos brutos, dissolvidos etanol a 70%, em seguida são separadas seis porções de 3 ml, numeradas de (1,2,3,4,5 e 6).

No tubo 1 adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl 10%. Os materiais foram homogeneizados observando variações quanto a cor e formação de precipitados. A solução foi comparada com um teste em branco, contendo apenas água e cloreto férrico, a interpretação dos resultados é dada da seguinte forma: quando for coloração variável de azul a vermelho é indicativa de fenóis; o precipitado escuro com tonalidade azul é a presença de taninos hidrolisáveis (pirrogálicos) e verde é a presença de taninos flabofênicos (condensados ou catéquicos).

Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Foram utilizados os tubos 2,3 e 4, sendo um deles acidificado com HCl 1% a pH 3,0, outro alcalinizado com NaOH 10% a pH 8,5 e o terceiro ao pH 11. Foram observadas mudanças de coloração do material.

Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Foram utilizados os tubos 5 e 6, sendo o primeiro acidificado por adição de HCl 1% ao pH de 1,0 a 3,0 e o segundo alcalinizado por NaOH 10% até pH 11. Os tubos foram aquecidos durante dois a três minutos, observando as modificações na coloração.

Atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima

As bactérias fazem parte do banco de microrganismos da Faculdade Leão Sampaio (FLS) e que foram inoculadas em BHI (Brain Heart Infusion Broth) e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C/24h.

Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, padrão e multirresistentes.

Tabela 1: Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.

Bactérias	Origem	Perfil de Resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-	-
<i>Escherichia coli</i> 27	Feridas cirúrgicas	Ast, Ax, Amp, Ami; Amox. Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Feridas cirúrgicas	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Cultura de urina	Com, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami

Legenda: Ast: Aztreonam; Ax: Amoxicillin; Amp: Ampicillin; Ami: Amikacin; Amox: Amoxicillin; Ca: Cefadroxil; Cfc: Cefaclor; Cf: Cefalotin; Caz: Ceftazidime; Cip: Ciprofloxacin; Chlo: Chloramphenicol; Im: Imipenem; Can: Kanamycin; Szt: Sulfametim; Tet: Tetracycline; Tob: Tobramycin; Oxa: Oxacillin; Gen: Gentamicin; Neo: Neomycin; Para: Paramomycin; But: Butirosin; Sis: Sisomicin; Net: Netilmicin; (-): sensitivity. ATCC: american type culture collection.

Fonte: Dados padrões isolados de bactérias, oriundas de antibiograma.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma suspensão de 10⁵ UFC/ml, as concentrações dos extratos variaram de 1024 - 0,5 µg/mL. Em seguida foi distribuído 100 µl desta solução em cada cavidade da placa de microdiluição e logo após adicionado 100 µl de extrato na primeira cavidade, passando para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade. A última cavidade foi reservada para controle. A placa foi introduzida na estufa numa temperatura de 36°C, por um período de 24 horas.

As placas contendo microrganismos, só foram possíveis evidenciar o crescimento ou não dos mesmos com a utilização de um corante específico, a rezasurina, um indicador colorimétrico de óxido-redução, preparada a uma concentração de 0,01%, utilizando-se um volume de 20 µl da solução em cada cavidade das placas e incubá-las por 1h em temperatura ambiente, onde, considerada como positiva para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (Salvat, Antonnacci e Fortunato, 2001).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração capaz de cessar o desenvolvimento bacteriano, nos poços da placa de microdiluição conforme detectado macroscopicamente (NCCLS, 2003).

O extrato foi solubilizado inicialmente em água destilada estéril e dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que foi obtido a solução estoque de 1024 mg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 h.



Avaliação da atividade modificadora dos antibióticos em associação com o extrato

A CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina) e das lincosamidas (Clindamicina) foi realizada na presença e na ausência dos extratos em microplacas estéreis. O extrato foi testado em concentração sub-inibitória (MIC/8). Foram distribuídos 1163 µL de uma solução contendo BHI 10%, 150 µl de inóculo e 187 µl do extrato em cada poço identificado como MIC. Nos poços identificados como controle foram distribuídos 1350 µL de BHI 10% e 150 µL de inóculo. Toda a distribuição foi feita no sentido alfabético da placa. Em seguida, 100 µL da droga Gentamicina, Amicacina e Clindamicina na concentração de 1024 µl/mL foram misturados ao primeiro poço, procedendo-se a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de antimicrobianos variaram gradualmente de 1,024 a 0,5 µg/mL (Coutinho, 2008).

Análise estatística dos dados

Para os ensaios com bactérias os resultados foram feitos em triplicata e expressos como média das repetições. Para análise estatística testes de modulação com os antibióticos e construção dos gráficos foram aplicados à análise de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni utilizando o software GraPhadPrism5.0. Foram considerados relevantes valores com o p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Realizando se um estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de Eugenia Insípida, notou se a presença diversificada de fitoconstituintes, apresentados na tabela 2, onde, são responsáveis por uma diversificada ação biológica ressaltando entre elas: atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral (Barreiros et al. 2006; O’Kennedy; Thomes 1997; Djipa et al. 2000; Esquenazi et al. 2002; Okuda et al. 1989)

TABELA 2: Triagem fitoquímica do extrato etanólico de folhas de Eugenia insípida.

	Metabólitos										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
EEEI	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

EEEI - Extrato Etanólico de Eugenia insípida. 1 - Tanino; 2 - Fenóis; 3 - Flavononas; 4 - Flavonóis; 5 - Xantonas; 6 - Flavanonas; 7 - Antocionidinas; 8 - Chauconas; 9 - Auronas; 10 - Catequinas; 11 - Leucoantocianidinas. (+) presença; (-) ausência.

Esses resultados obtidos podem ser gerados por razão dos fatores externos, ou seja, o clima, o local da colheita da planta, isso corroborando com Auricchio&Bachi (2003) Apud Adebajo et al.(1989), que apresentam os fatores quantitativos e qualitativos, podendo vim a influenciar nos resultados obtidos durante a análise de resultados, apresentam ainda que no momento da colheita, a estação do ano e o estado de maturidade da planta também influenciam. Assim também para Alves et al. (2008) o fato da colheita ter ocorrido na zona urbana ou na zona rural podem influenciar a potencialidade microbiano do extrato. Nesse estudo com a Eugenia Insípida a colheita ocorreu na Chapada do Araripe, zona rural de Arajara na cidade de Barbalha - CE, ou seja, corroborando com os estudos apontados anteriormente.

Dentre os constituintes oriundos dos metabólitos secundários vale destacar os compostos Fenóis, Taninos e Flavonoides, por serem detentores de propriedades medicinais, as quais conferiram ótimos resultados ao Extrato Etanólico das Folhas de Eugenia Insípida.

Alguns flavonoides podem ser lipofílicos podendo enterar com a membrana do microorganismo, além de criar complexos com proteínas, podem vim a elevar a permeabilidade da membrana e inibir os sistemas de efluxo dependentes da força motora do próton, levando a um acúmulo de antibiótico na célula bacteriana (Xiao, 2009; Schindler et al. 2013; H. Tsuchiya et al.1996).

A utilização e aplicação de drogas que contem taninos, estão relacionadas basicamente com suas propriedades adstringentes. Considerando que sua utilização por via interna exerce efeitos antidiarréico e anti-séptico. No que diz respeito a sua utilização por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (Monteiro et al. 2005 Apud Bruneton,1991.) Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (Monteiro et al. 2005).

A combinação dos aminoglicosídeos com substâncias naturais, podem ser utilizados como uma alternativa , considerando que a mesma mimetiza os seus efeitos toxicos, onde a associação consegue reduzir significativamente o CIM desses medicamentos, ou seja, apresentam uma diminuição da dose necessaria para o uso terapêutico (Figueredo et al. 2013).

O extrato apresentou em sua composição, fitoconstituintes, como taninos e favonóides, que são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções microbianas, e podem modificar a parede celular ou desenvolver ruptura da membrana celular bacteriana, vindo a torna as cepas Gram-negativas suscetíveis a associação entre os extratos e os antibióticos (gráfico 2 e 3) (Figueredo et al. 2013).

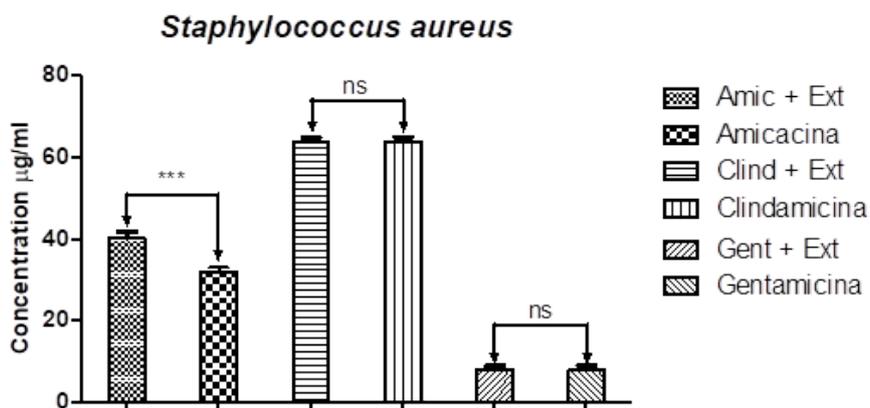
A concentração inibitória mínima do extrato etanólico das folhas de *Eugenia insipida* foi $\geq 1,024 \mu\text{g/mL}$ frente a *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *S. aureus* (ATCC 25923). A CIM para *Escherichia coli* (ATCC1053) foi de $512 \mu\text{g/mL}$, onde, segundo Houghton et al. 2007, são consideradas concentrações clinicamente relevantes, as que sé encontram a baixo de $256 \mu\text{g/mL}$, e com baixa atividade inibitória os extratos de plantas medicinais com CIM $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ (Dall'agnol. et al., 2003; Tanaka et al., 2005) .

Em um estudo semelhante utilizando a *Eugenia uniflora* L, (Mendonça et al. 2016) utilizaram ensaio de difusão em disco, demonstrando atividades antibacteriana frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Desta forma corrobora parcialmente com os dados apresentados nessa pesquisa.

Em outra pesquisa realizada por Bezerra (2012), utilizando *Eugenia uniflora* L. e os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentou resultados parecidos, tendo diferenciado no tamanho dos halos e seus formatos no antibiograma.

Quando associado o extrato com os antibióticos para o *Staphylococcus aureus* (Gráfico 1), houve um resultado signficante com a amicacina, apesar da modulação inibir em uma concentração maior que a droga na forma isolada. Corroborando com esse resultado, uma pesquisa análoga utilizando o óleo das sementes da *Myrcia multiflora*, espécie pertencente à família das Myrtaceae. Onde, segundo (Coutinho et al., 2013) aponta que não obteve resultados significantes frente aos antibióticos: Canamicina, Amicacina, Gentamicina e Neomicina, observando concentrações iguais, tanto na modulação quando no controle, para as linhagens padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, diferindo no gênero e espécie.

GRÁFICO 1: Efeito modulador do extrato etanólico das folhas de *Eugenia insipida* frente a *Staphylococcus aureus*.



Outros estudos realizados por Nascimento (2013) e Magina (2012) e colaboradores, utilizando o gênero *Eugenia* em suas pesquisas não obtiveram atividade microbianas frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, em dois de seus experimentos, onde o segundo autor, utilizou em sua metodologia o extrato bruto e suas frações, acetato de etila e diclorometano.

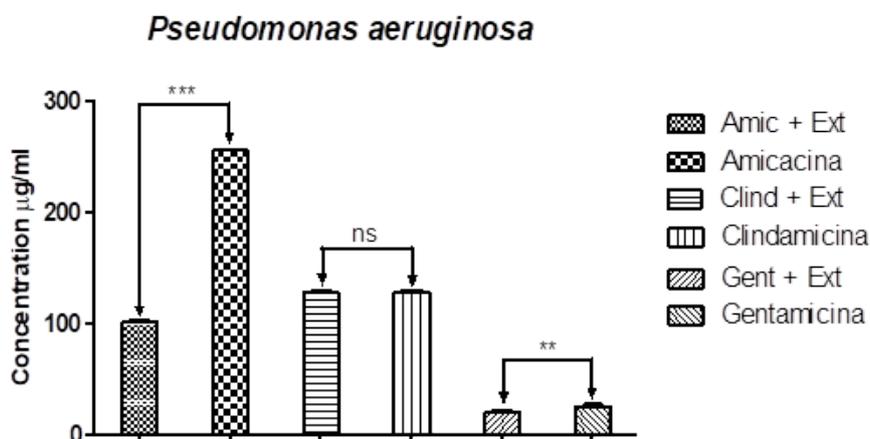
A ineficácia da associação ocorreu com a combinação do extrato com Gentamicina e Clindamicina contra a cepa Gram-positiva de *Staphylococcus aureus*, visto que nenhum efeito modulatório foi observado, com exceção da combinação com amicacina, que resultou em um antagonismo com o MIC aumentando de 35 para 40 µg / mL (grafico 1).

Para Amicacina nota-se um efeito, na associação foi necessária uma dose maior para eliminar a mesma proporção de bactérias usadas no controle.

Justifica-se os resultados com a *S. aureus* é o fato de que os aminoglicosídeos são antibióticos de largo espectro que apresentam extensa atividade sobre bactérias aeróbias de Gram negativo e são moderadamente ativos contra bactérias aeróbias Gram positivo e outra justificativa é possibilidade das plantas medicinais, vim a desencadear efeito antagônico, quando junto a antibióticos, sendo este resultado atribuído a uma ideia de que os metabolitos secundários encontrados neste estudo, atuam na remoção ou quelação do fármaco em associação (Coutinho, et al. 2008; Tintino, et al. 2013; Granowitz; Browv, 2008; Sousa, 2006)

Na associação com Clindamicina frente a *P. aeruginosa* (Gráfico 2) foi evidenciado uma semelhança ao resultado com *S. aureus*, uma vez que não houve modificação da ação do antimicrobiano.

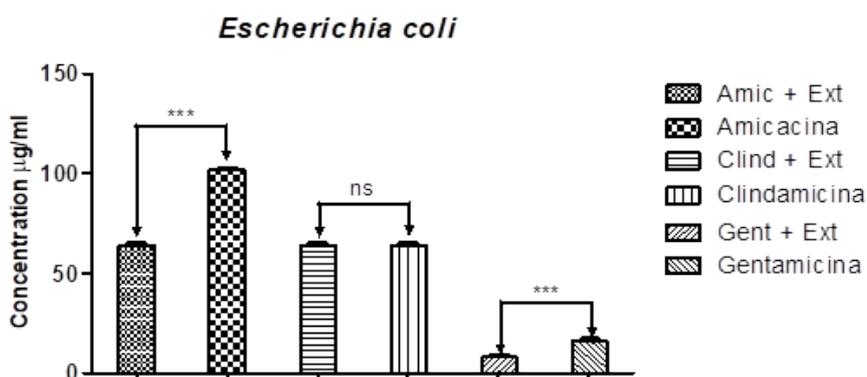
GRÁFICO 2: Efeito modulador do extrato etanólico das folhas de *Eugenia insipida* frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



A associação do extrato com os antibióticos Amicacina e Gentamicina, mostra que os dados foram satisfatórios, visto que houve inibição do crescimento em concentrações mais baixas, explicitando que a associação tem um potencial maior para inibição do que a droga isolada.

Segundo Mendonça (2016), em seus estudos com o gênero *Eugenia*, e espécie a *Eugenia uniflora*, os resultados mostraram se satisfatório para *Pseudomonas sp*, visto que, o autor utilizou dois extratos, sendo eles o alcoólico e o etanólico, diferindo desta pesquisa a metodologia. Outra investigação realizada por Batista et al. (2014), frente o biofilme de *Pseudomonas sp*, evidenciou-se os melhores resultados quanto a cepa foi exposta ao óleo essencial de *Eugenia caryophyllus*, vindo a apresentar atividade bactericida.

GRÁFICO 3: Efeito modulador de antibiótico do extrato etanólico das folhas de *Eugenia insipida* frente a *Escherichia coli*.



Comparando com o controle, a Clindamicina não demonstra redução na concentração inibitória quando associado ao extrato. No entanto, o extrato modulou a ação dos aminoglicosídeos utilizados, reduzindo a CIM dos antibióticos de 101,59 µg/mL para 64 µg/mL (Amicacina) e de 16 µg/mL para 8 µg/mL (Gentamicina). Os resultados da modulação são estatisticamente relevantes quando comparado ao grupo controle, demonstrando assim que a droga antimicrobiana associado ao extrato tem um potencial maior de inibição do que o da droga isolada.

Buscando na literatura científica, encontrou-se um ensaio realizado por Simonetti e et al. (2016), onde mostrou resultados quanto à atividade microbiana frete



a *E. coli*, utilizando extratos etanólico, hexânico, clorofórmico e acetato de etila da *Eugenia anomala*, dentre estes destacou-se o extrato etanólico exercendo atividade bacteriostática e bactericida.

Os antibióticos aminoglicosídeos são muito importantes para o tratamento e profilaxia de várias infecções, apesar do seu potencial de nefrotoxicidade, ototoxicidade, bloqueio neuromuscular e problemas associados a resistências (Vakulenko e Mobashery, 2003). Os dados obtidos podem diminuir a toxicidade do uso dos antibióticos, amicacina e gentamicina, uma vez que a associação resultou numa diminuição da concentração da droga na inibição bacteriana.

A modificação da membrana das bactérias também pode ser atribuída a presença de compostos fenólicos, Cushinie et al. (2007) e Puupponen-Pimiä et al. (2005) afirma que são vários os mecanismos que podem estar relacionados com atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos como a desestabilização da membrana citoplasmática e o aumento da permeabilidade. Outros fatores incluem: a aglomeração das células microbianas, a inibição de enzimas microbianas extracelulares, as ações diretas sobre o metabolismo microbiano e carência dos substratos essenciais, ou a privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano, especialmente minerais como ferro e zinco (através da quelatação).

Segundo Daglia (2012) compostos fenólicos são, na maioria, capazes de eliminar uma série de fatores de virulência microbianos como: inibição da formação de biofilme, redução de ligantes de adesão e a neutralização de toxinas bacterianas. Por isso, têm sido avaliados contra um grande número de microrganismos e ainda demonstram sinergismo com antibióticos.

Lopez et al. (2006), afirma que os flavonoides seus derivados têm a habilidade de formar complexos com proteínas extracelulares que se ligam a parede celular de bactérias acarretando o seu mecanismo de ação antibacteriano.

Os aminoglicosídeos possuem uma capacidade de desenvolver sinergismo quando em associação com agentes antimicrobianos que impedem a biossíntese da parede celular (Vakulenko e Mobashery, 2003). Eliopoulos e Moellering (1996) afirmam que o aumento na permeabilidade das bactérias após a associação com inibidores da síntese da parede celular ocasionará em uma maior concentração intracelular de aminoglicosídeos.

Assim, os resultados obtidos nesse trabalho podem estar relacionados com a presença dos metabólitos secundários revelados pela prospecção fitoquímica. Provavelmente, a ação moduladora da Amicacina e Gentamicina frente as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, seja devido a presença de metabólitos secundários presentes no extrato de *E. insipida* que possam ter modificado a parede celular aumentando a concentração do antibiótico no meio intracelular das bactérias.

CONCLUSÃO

Foi observado a presença de fitoconstituintes na composição química do extrato etanólico de *Eugenia insipida* como: tanino, fenóis, flavanonas, flavonóis, xantonas, flavanonas.

Na atividade antimicrobiana, o extrato foi eficaz no combate a *Escherichia coli* (ATCC 10536), e na modulação, quando associado a Amicacina e Gentamicina observou potencialização da ação do antibiótico, com uma diminuição do potencial tóxico, visto o uso das cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* multirresistentes.

A presente pesquisa observou que a *Eugenia insipida* não apresenta, ainda, estudos científicos publicados com o seu potencial antimicrobiano e modificador de resistência, necessitando-se de novos estudos como esse para subsidiar o uso de antimicrobianos em associação, uma vez que, o extrato apresenta metabólitos secundários com ações microbiológicas comprovadas cientificamente, tornando a planta em estudo como uma alternativa futura no combate das doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Revista Brasileira de Farmacognosia.v.16, suplementar, n. 11, p. 678-689, 2006.
- ALVES, E. S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E. L. Análise estrutural das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceas) coletada em ambiente rural e urbano, SP, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 22, n. 1, p. 241-248, 2008.
- AURICCHIO, M. T., E BACCHI, E. M. - *Eugenia uniflora* L. “ brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. Rev.Inst. Adolfo Lutz, p. 62(1): n. 6, 55 - 61 ,2003.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. Química Nova. v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BATISTA, N.N. CAMARGOS, N.G. OLIVEIRA, M.M.M. PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel in contact with milk and its control by essential oils. Alim Nutr. = Braz J Food Nutr., Araraquara 2014 Jan-Mar; 25(1): 19-24.
- BEZERRA, N. A. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. 2012. 31f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológica e da Saúde, 2012
- COUTINHO, H. D. M et al. Enhancement to the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy, v. 54, n. 3, p. 328-330, 2008.
- COUTINHO, H. D. M.; SILVA, I.; FREITAS, M. A.; GONDIM, C. N. F. L.; ANDRADE, J. C. Análise físico-química e avaliação antimicrobiana do fruto cambuí (*Myrcia multiflora*). Biofar, Rev. Biol. Farm. Campina Grande/PB, v. 9, n. 1, p. 96/103, março/maio, 2013
- CUSHNIE, T. P. T.; HAMILTON, V. E. S.; CHAPMAN, D. G.; TAYLOR, P. W.; LAMB, A. J. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonolgalangin. Journal of Applied Microbiology, v. 103, n. 5, p. 1562-1567, 2007.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.
- DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. Phytomedicine, v. 10, n. 15, p. 511-516, 2003.
- DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygiumjambos*(Myrtaceae). Journal of Ethnopharmacology. v. 71, n.1-2, p. 307-313, 2000.
- DONEPUDI, A.C.; ALEKSUNES, L.M.; DRISCOLL, M.V.; SEERAM, N.P.; SLITT, A.L.; 2012. The traditional ayurvedic medicine, *Eugenia jambolana* (jamun fruit), decreases liver inflammation, injury and fibrosis during cholestasis. LiverInternational, v. 32, n. 4, p. 560-573, 2012.
- ELIOPOULOS, G. M. e MOELLERING, R.C. Antimicrobial Activity of Quinupristin-Dalfopristin Combined with Other Antibiotics against Vancomycin-Resistant Enterococci. Antimicrob Agents Chemother.; 46(5): 1319-1324, 2002.
- ESQUENAZI, D.; WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S.; RODRIGUES, H.M.; TOSTES, J.B.F.; ROZENTAL, S.; DA SILVA A.J.; ALVIANO, C.S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. Research in microbiology, v. 153, n. 10, p. 647-652, 2002.

- FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; SILVA, J. M. F. L.; SANTOS, F. A. V.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M.; COLARES, A. V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, J. C. F.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 640682, 5 pages
- FRIGHETTO N, WELENDORF RM, SILVA AMP, NAKAMURA MJ, SIANI AC 2005. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasilensis* Lam. *Rev Bras Farmacogn* 15: 338-343.
- GALENO, D.M.L., CARVALHO, R.P., BOLETI, A.P., LIMA, A.S., OLIVEIRA DE ALMEIDA, P.D., PACHECO, C.C., PEREIRA DE SOUZA, T., LIMA, E.S. Extract from *Eugenia puniceifolia* in antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 172, n. 1, p. 311-324, 2014.
- GALLON, M.E.; BARROS, B.S.P.; SILVA, M.A.; DIAS, S.H.M.; ALVES-DA-SILVA, G. Determinação dos parâmetros anatômicos, físico-químico e fitoquímicos das folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.- Hill. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.17, n.4, supl. II, p.937-944, 2015.
- GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. *Critical Care Clinics*, v. 24, n. 21, p. 421-442, 2008.
- HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro test in ethnopharmacology: visualizing in elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, n. 9, p. 391-400, 2007.
- LOPEZ, R.A.; SANCHES, G.J.I.; HERNANDEZ, H.A.; SANCHEZ, Y.J.; LLANILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem Biol Interact* 161(1):79-91, 2006.
- MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; COLLA, GUILHERME; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. *Quím. Nova* vol.35 no.6 São Paulo 2012
- MATOS, F.J.A. *Introdução a fitoquímica experimental*. 2.ed. Fortaleza-CE. Editora:UFC, 1997. 150p.
- MATOS, F.J.A. *Introdução a fitoquímica experimental*. 3ª ed. Fortaleza, Edições UFC, 2009. 150p.
- MENDONÇA, A. T., CARVALHO, A. R., FERREIRA, M. C., & JÚNIOR, M. C. R. A utilização dos extratos hidroalcoólico e alcoólico de *Eugenia uniflora* L. como agente antibacteriano. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 14, n. 1, p. 826-833, 2016
- MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C.; Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.
- MORAIS, L.M.F.; CONCEIÇÃO, G.M.; NASCIMENTO, J.M. 2014. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. *Agrarian Academy*, Centro Científico Conhecer, v. 1, n. 01, p. 317, 2014.
- NASCIMENTO, A. L. D. R. Ação Antimicrobiana Do Extrato De *Eugenia Uniflora* L. (Pitanga) Sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. 2013. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia Generalista) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológica e da Saúde, 2013
- O'KENNEDY, R.; THOMES, R. D. *Coumarins: biology applications and mode of action*, Chichester, New York : John Wiley & Sons, 1997. 348p.

OKUDA, T.; YOSHIBA, T.; HATANO, T. Ellagitannins as active constituent of medicinal plants. *Plantamedica*, v. 55, n. 2, p. 117-122, 1989.

OLIVEIRA, A.M.; HUMBERTO, M.M.S.; DASILVA, J.M.; ROCHA, R.F.A.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n. Suplementar, p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *syzygium cumini* (myrtaceae) leaves extract. *Braz. J. Microbiol.* vol.38 no.2, p. 381-384, 2007.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; ALAKOMI, H. L.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Bioactive berry compounds - novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, n. 1, p. 8-18, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, n. 10, p. 603-613, 2001

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v. 13, n. 4, p. 486-91, 2011.

SCHINDLER, B.D.; JACINTO, P.; KAATZ, G.W. "Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics," *Future Microbiology*, vol. 8, n. 4, p. 491-507, 2013.

SILVA P.S.G.; LOPES R.F.; SILVA J.C.; SANTOS W.B.; VERÍSSIMO R.C.S.S.; BASTOS M.L.A. Atividade citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante do extrato da *Jatropha gossypifolia* L. *Journal of Nursing UFPE online*, v. 12, n. 2, p. 465-474, fev., 2018.

SILVA, A.C.O.; LIMA, R.A. Identificação das classes de metabolitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia unifolia* L. *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.

SILVA, L.E.; QUADROS, D.A.; NETO, A.J.M. Estudo etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas na região de Matinhos - PR. *Ciência e Natura*, v. 37, n. 2, p. 266-276, 2015.

SIMONETTI, E.; ETHUR, M.E.; CASTRO, L.C.; KAUFFMANN, C.; GIACOMIN, A.C.; LEDUR, A.; AROSSI, K.; PACHECO, L.A.; GOETTERT, M.I.; FALEIRO, D.; FREITAS, E.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.1, p.9-18, 2016.

SOUSA, J. C. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 2006.

TANAKA, J. C. A. et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TINTINO S.R.; NETO, A.A.C.; MENEZES, I.R.A.; OLIVEIRA, C.D.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto *Morinda citrifolia* L. *Acta Biológica Colombiana*, v. 20, n. 3, p. 193-200, 2015.

TINTINO, S. R. et al. Atividade extracts in modulating etanol and hexane root of Costus arabicus of antimicrobial drugs. Revista Brasileira de Biociências, v. 11, n. 6, p. 157-162, 2013.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; LINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of ethnopharmacology, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.

VAKULENKO, S. e MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. Clinical Microbiology Reviews, v.7, n. 20, p. 430-450. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets control of neglected tropical diseases who pesticide evaluation scheme. Geneva: World Health Organization, 2006.

XIAO, J.; CAO, H.; WANG, Y.; ZHAO, J.; WEI, X. Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. Journal of agricultural and food chemistry, v. 57, n. 15, p. 6642-6648, 2009.