

Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos brutos de especies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes

Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes

In vitro antibacterial activity of a crude extract of *Eugenia* species against mollicute strains

Camila Simões Benfatti
Curso de Farmácia, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau,
Santa Catarina, Brasil

Michele Debiasi Alberton Magina
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de
Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil

Samuel Mendes de Cordova
Curso de Farmácia, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau,
Santa Catarina, Brasil

Caio Mauricio Mendes de Cordova
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de
Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil

Alessandro Guedes
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de
Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil

RESUMEN

La necesidad de buscar nuevos antimicrobianos y el interés en las especies de mollicutes viene aumentando constantemente, principalmente por el hecho de que los mollicutes son responsables por el desarrollo de varias enfermedades importantes, como es el caso de *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. Estos dos últimos presentan comprometimiento en infecciones del trato urogenital que pueden llevar a la infertilidad y a complicaciones de la gestación. *M. arginini* es un importante patógeno animal aislado de ovejas, que causa una enfermedad respiratoria grave llamada de "síndrome de la tos", y, eventualmente, zoonosis en el hombre. El género *Eugenia* pertenece a la familia *Myrtaceae*, que comprende cerca de 500 especies de plantas con potencial terapéutico. En este trabajo se obtuvieron extractos brutos de las hojas de *Eugenia beaurepaireana*, *E. brasiliensis* y *E. umbelliflora*, que fueron analizados por el método de microdilución en caldo frente a las cepas de mollicutes. Con eso, se determinó la concentración inhibitoria mínima de los extractos de las plantas, siendo de 1,25 mg/mL para *E. beaurepaireana*, 2,5 mg/mL para *E. brasiliensis*, y de 5,0 mg/mL para *E. umbelliflora* contra las tres especies de mollicutes igualmente. Entre los resultados observados, se destaca principalmente la *E. beaurepaireana*, que presentó un buen potencial antimicrobiano. Debido a las patologías importantes que estas bacterias causan, y a la creciente resistencia a los antimicrobianos tradicionales utilizados en el tratamiento, es importante la búsqueda de nuevos tipos de antibióticos dentro de la biodiversidad brasileña. Existen pocos estudios sobre las propiedades farmacológicas de las plantas del género *Eugenia*, y nuestros resultados son los primeros relatos sobre su actividad antimicrobiana frente a especies de mollicutes.

Palabras clave: Mycoplasma; Ureaplasma; Pruebas de Sensibilidad Microbiana; Productos Biológicos.

INTRODUCCIÓN

Los mollicutes, o micoplasmas, hacen parte de la clase *Mollicutes*, un gran grupo de microorganismos peculiares, responsables por varias enfermedades en los animales, en las plantas y en el hombre, especialmente Enfermedades Sexualmente Transmisibles (ESTs), cuyas más importantes características son la ausencia de pared celular y el genoma reducido³⁷.

La incidencia de DSTs tuvo una declinación en la década de 1980 y al inicio de la década de 1990, reflejando los cambios en el comportamiento sexual como respuesta a la epidemia de infección por el HIV. Pero estas modificaciones no se mantuvieron, y a partir de 1994, se observó la reincidencia de las patologías de transmisión sexual. Embarazo, nacimiento a término y fertilidad son afectados por la presencia de DSTs, y se hace fundamental la investigación de microorganismos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida* sp, *Trichomonas vaginalis* y los mollicutes²⁶.

Dos especies de mollicutes merecen destaque en las infecciones del trato urogenital: *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, adquiridas principalmente por contacto sexual. Ambas han sido encontradas tanto en el hombre como en la mujer, en infecciones del trato urogenital inferior.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Caio Mauricio Mendes de Cordova
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de
Blumenau, Campus III
Rua São Paulo, 2171, Itoupava Seca Blumenau-Santa Catarina-Brasil
89030-000
E-mail: cmcordova@furb.br

Ureaplasma urealyticum es responsable por casos de uretritis no gonocócica y vaginosis bacteriana. Está asociado a la fiebre puerperal, a la corioamnionitis y bajo peso al nacer, y al parto prematuro, además de complicaciones en los recién nacidos. *U. urealyticum* era clásicamente dividido en 14 serotipos, y éstos, agrupados en dos serogrupos. Actualmente, se halla definida una nueva especie, *U. parvum*, que engloba los serotipos que pertenecían al serogrupo 1²⁰. *Mycoplasma hominis* es una de las causas de uretritis no gonocócica y vaginosis bacteriana, asociado a la fiebre post aborto y post parto, epididimitis e infertilidad. También es causa no común de bacteriemia, endocarditis, artritis y otras infecciones menos usuales¹⁴.

Varios estudios demostraron que las tasas de colonización por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en hombres, variaba de cero a 13% y de 3% a 56%, respectivamente⁶. Datos similares en mujeres demostraron que las tasas de colonización vaginal por *M. hominis* y *U. urealyticum* variaban de cero a 31% y de 8,5% a 77,5%, respectivamente, según la edad, raza, experiencia sexual y nivel socioeconómico⁴¹. Los resultados obtenidos por nuestro grupo corroboran estos estudios, demostrando una alta incidencia de infección en nuestra población²⁷.

El *M. arginini* (MA) es una especie que infecta animales, y ha sido normalmente aislado de ovejas, causando una enfermedad respiratoria llamada "síndrome de tos" en los ovinos. La manifestación está asociada a una tos paroxística severa, causando incluso prolapso rectal. La enfermedad es crónica y persiste por varias semanas en la mayoría de los animales infectados. Existen evidencias de que la persistencia de estos microorganismos en el trato respiratorio y la naturaleza crónica de la enfermedad pueden deberse a la falla del sistema inmune para generar una inmunidad protectora²⁹. Las razones para esta falla son desconocidas, pero se observa una marcada variabilidad de expresión antigénica en los microorganismos aislados de animales enfermos²⁸. Una característica metabólica singular de esta especie de mollicute es la producción de una enzima arginina deiminasa, y la utilización de la arginina como fuente de energía. La arginina deiminasa (ADI) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la arginina en dos compuestos: citrulina y amonio. Se expresa fuertemente en microorganismos que utilizan la arginina como fuente de energía no glicolítica⁹. La ADI derivada de *Mycoplasma* fue relatada como inductora de apoptosis en amplia variedad de células tumorales humanas *in vitro*, ejerciendo potente actividad antitumoral *in vivo*¹³. La actividad antiproliferativa o antitumoral de la ADI se debe, probablemente, a la privación de arginina como fuente nutricional de las células, porque la restitución exógena de arginina restaura el crecimiento celular²¹. La arginina también es un precursor de óxido nítrico (NO), un importante mensajero molecular involucrado en la vasodilatación, neurotransmisión y en actividades citotóxicas de las células del sistema inmune. A pesar de que el NO es benéfico y crítico en la función celular, su superproducción por iNOS en los casos de shock endotóxico causa vasodilatación e hipotensión, llevando al óbito⁴⁰.

En los últimos años, ha sido relatado un número creciente de casos de resistencia de los micoplasmas y ureaplasmas a los antibióticos utilizados en el tratamiento^{17,19}, incluso a los más efectivos³³. De este modo, la identificación de nuevos antimicrobianos a partir de plantas puede constituir una gran contribución en el combate a estas infecciones.

La familia *Myrtaceae* está compuesta por cerca de 100 géneros, con aproximadamente 3 mil especies, siendo la mayor familia de la orden, con dos centros de dispersión, en las Américas y en Australia, aunque ocurran en todo el mundo. Según Limberger y colaboradores²⁴, la familia está dividida en dos subfamilias: *Myrtoideae* y *Leptospermoideae*. Son todas plantas tropicales o subtropicales, pero sólo en Brasil hay cerca de mil especies. Aquí, todos los representantes nativos pertenecen a la subfamilia *Myrtoideae*, la que está constituida por apenas una tribu, *Myrteae*, subdividida en tres subtribus: *Eugeniinae*, *Myrciinae* y *Myrtinae*. En Brasil, los géneros más importantes son *Psidium* (guayabo), *Myrciaria* (arazá), *Martiera* (cambuca), *Campomanesia* (guabiroba), *Paivaea* (cambuci), *Syzigium* (clavo de olor) y *Eugenia*, al cual pertenecen las especies en estudio en este trabajo. En América del Sur, el género *Eugenia* se distribuye desde Brasil hasta el norte y nordeste de Argentina, Uruguay y Paraguay⁵. Muchas especies del género *Eugenia* son apreciadas por sus frutos y usadas como alimento¹², como por ejemplo *Eugenia uniflora*, una de las especies más conocidas del género, llamada popularmente de pitanga⁵.

Algunos trabajos demuestran el potencial terapéutico de especies del género *Eugenia*, como: efecto hipoglucemiante, antioxidante³⁶ y protector contra la hipertrofia renal causada por la diabetes¹⁵ en ratones tratados con extracto etanólico de la *Eugenia jambolana*, antitumoral en células HL-60 de taninos aislados a partir de la *Eugenia jambos* L.⁴², anticonvulsivante en ratones tratados con el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*³⁵.

La especie *Eugenia brasiliensis* Lamarck, se conoce popularmente como grumichama, grumichameira, grumichaba, itapoiroti³⁸ y cumbixaba³⁴. En la medicina popular, el uso de la especie en la forma de infusión de las hojas, fue relatado para el tratamiento de la artritis y el reumatismo, y como diurético. Los frutos maduros se usan como alimento y para preparar bebidas fermentadas³⁹. Debido a su alto tenor de taninos, lo que le confiere acción adstringente, las cáscaras eran usadas en la industria del cuero, como tanantes³¹. *Eugenia beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand, sinónimos *Myrtus beaurepaireana*, *Pilothecium ternatifolium*, se conoce como ingabaú y guamirim-ferro. De la misma manera que *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* posee poquísimos estudios en la literatura. *Eugenia umbelliflora* Berg., llamada popularmente de baguaçu, guapê y guamirim, nombres dados al árbol y a sus frutos, crece en las matas del Sudeste de Brasil, pero existen pocas referencias en la literatura a respecto de esta planta.

Todos son árboles pequeños o arbustos que crecen en la mata atlántica, desde los Estados del Nordeste hasta Santa Catarina³⁸. Debido a sus frutos, que son comestibles,

estos árboles son muchas veces, cultivados. En Santa Catarina se registró la presencia de estas especies en los municipios de Brusque, Ibirama, Itajaí, Joinville y en la región de Florianópolis.

Estudios anteriores ya ha mostrado que especies del género *Eugenia* presentan actividad antibacteriana, como, por ejemplo, *Eugenia caryophyllus*, que presentó inhibición del crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*³¹. La misma especie inhibe también el crecimiento de *Helicobacter pylori*, una bacteria responsable por el surgimiento de úlcera gástrica²³. El aceite esencial obtenido de las hojas de *Eugenia uniflora* demostró fuerte inhibición del crecimiento de cepas de *Bacillus cereus*³⁰. La actividad antibacteriana de la especie *Eugenia umbelliflora* también ha sido descrita en la literatura, cuando hojas y frutos de esa especie mostraron prometedora actividad contra microorganismos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*²⁵. Sin embargo, contra cepas de *Mycoplasma* sp y *Ureaplasma* sp no existen relatos de actividad de las especies de este género de plantas. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de estas especies de plantas nativas de la flora brasileña frente a cepas de mollicutes, capaces de infectar al hombre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los microorganismos utilizados fueron cepas de referencia de *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27618), *Mycoplasma arginini* (PG18, Instituto Pasteur), y *M. hominis* (PG21, Instituto Pasteur). La ureaplasma fue inoculada en medio de cultivo U10 y los micoplasmas en Medio Líquido de Arginina (MLA) fueron preparados en laboratorio e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h en microaerofilia (2-3% de CO_2)⁷.

El material vegetal – partes aéreas de *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* y *Eugenia umbelliflora* – se colectó en la ciudad de Santo Amaro da Imperatriz (SC) ($27^{\circ}41'18''\text{S}$; $48^{\circ}46'41''\text{O}$) y fue identificado por el profesor Daniel Falkenberg del Departamento de Botánica de la Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Las exsiccatas de las especies fueron depositadas en el Herbario del Departamento de Botánica de la UFSC bajo los números FLOR – 34675, 34674 y 17890, respectivamente. Las hojas fueron separadas de los ramos y sometidas a secado a 40°C . en estufa con circulación de aire. Luego del secado, el material fue molido en molino de cuchillas. Los extractos vegetales se obtuvieron por maceración con etanol a 70% durante siete días. Luego del filtrado, los extractos fueron concentrados en evaporador rotatorio al vacío y el procedimiento repetido dos veces¹⁸.

Los extractos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y fueron analizados usando el método de microdilución en concentraciones que variaron de 5 mg/mL a 0,0391 mg/mL, frente a cepas de mollicutes. Después de solubilizados, los extractos fueron filtrados con filtros Millex (Millipore) de 0,22 μm para esterilización, considerando la gran facilidad de contaminación del medio debido a su

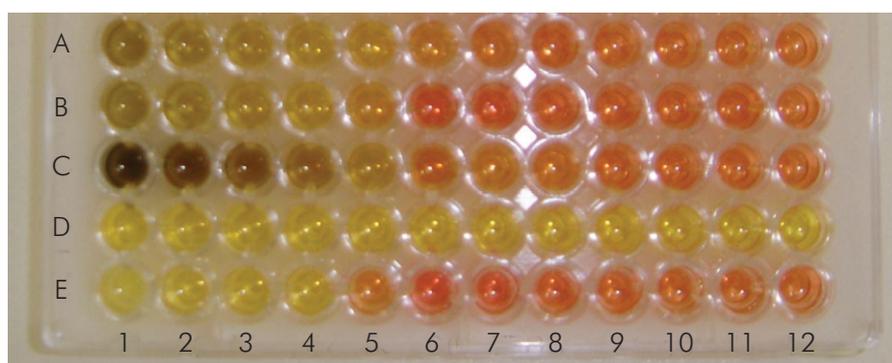
riqueza de nutrientes. Inicialmente, fue analizada la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas (100 mg) disueltos en 10 mL de DMSO, solvente considerado inerte para el crecimiento de bacterias. Sin embargo, distintamente a los test ya observados que señalan el DMSO como sustancia inerte en las culturas de bacterias como *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp y *Klebsiela* sp⁸, él solo no presenta inhibición de crecimiento sobre los micoplasmas hasta la dilución 1:8, y fue necesario realizar una solución a 10%.

Los análisis de concentración inhibitoria mínima (*minimal inhibitory concentration* – MIC) fueron realizados por la metodología estandarizada de microdilución en caldo, en microplacas de 96 cavidades⁴. En primer lugar, se realizó una dilución seriada de los extractos de la planta, en donde a 100 μL de medio de cultivo se le adicionaron 100 μL de extracto; de esta solución, 100 μL fueron retirados y homogeneizados con 100 μL de medio en la cavidad siguiente, y así sucesivamente, obteniéndose una gama de concentración de extracto de planta (inicialmente a 10 mg/mL) diluida a razón 2 (5 mg/mL en la segunda cavidad; 2,5 mg/mL en la tercera cavidad, y así sucesivamente). A esta gama de concentraciones de extractos de plantas, se le agregó 100 μL de un inóculo de cultivo de micoplasma o ureaplasma en fase log de crecimiento, conteniendo 10^3 microorganismos/mL (determinado por microtitulación). Como control, se hizo una dilución seriada del mismo solvente (DMSO), sin extracto de planta, y una dilución seriada del cultivo del microorganismo, sin el agregado de solvente o de extracto de planta. Por fin, fueron adicionadas, a todas las cavidades, 2 a 3 gotas de vaselina líquida estéril para aislar cada cavidad del medio externo y crear un ambiente de microaerofilia. Los análisis se realizaron una única vez por duplicado, ya que esta metodología está bien estandarizada y descrita en la literatura clásica da micoplasmología.

Las placas se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h, y el crecimiento pudo observarse a partir del cambio de color del medio de cultivo, debido a la presencia del indicador rojo de fenol. Las especies del género *Ureaplasma* degradan urea a amoníaco y alcalinizan el pH del medio, haciendo un cambio de color de amarillo para rojo, indicando el crecimiento. *M. arginini* y *M. hominis* promueven la alcalinización del medio en su crecimiento por desaminación de la arginina en amoníaco. Todos los procedimientos fueron realizados de modo estéril en cámara de flujo laminar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se iniciaron los cultivos de las cepas de referencia de *M. arginini*, *M. hominis* y *U. urealyticum* conservadas a -20°C en nuestro laboratorio. Una vez que no enturbian el medio de cultivo, por el tamaño reducido de sus células, su crecimiento queda evidenciado por la formación de amoníaco a partir de la desaminación de la arginina o de la urea, alcalinizando el pH del medio, cambiando la coloración del indicador rojo de fenol presente en la formulación, de amarillo para rojo en la franja de pH de 6,6 a 8,0 (Figura 1).



Línea A: dilución seriada de extracto de la planta *Eugenia brasiliensis* (Columna 1: extracto puro, Columna 2: extracto 1:2 en medio de cultivo, y así en adelante). Línea B: dilución seriada de extracto de la planta *Eugenia beaurepaireana* (Columna 1: extracto puro, Columna 2: extracto 1:2 en medio de cultivo, y así en adelante); Línea C: dilución seriada de extracto de la planta *Eugenia umbelliflora* (Columna 1: extracto puro, Columna 2: extracto 1:2 en medio de cultivo, y así en adelante); Línea D (1-12): solamente medio de cultivo, sin adición de microorganismo, solvente o extracto de planta; Línea E (1-12): dilución seriada a razón 2 (Columna 1: solvente puro - DMSO, Columna 2: solvente 1:2 en medio de cultivo, y así en adelante), sin adición de extracto de planta.

Figura 1 – Método de microdilución en caldo para evaluación de la actividad antimicrobiana (MIC) de los extractos brutos de plantas contra *M. arginine*

En los test de microdilución realizados frente a la cepa de *M. arginini*, apenas *E. beaurepaireana* y *E. brasiliensis* presentaron actividad antimicrobiana al menos hasta la concentración de 2,5 mg/mL, *E. umbelliflora* presentó actividad solamente hasta la concentración 5,0 mg/mL (Tabla 1).

Tabla 1 – Actividad antimicrobiana representada por la MIC de los extractos de las plantas contra las especies de mollicutes

Planta	MIC del Extracto Bruto (mg/mL)		
	<i>M. arginini</i>	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
<i>Eugenia beaurepaireana</i>	1,25	1,25	1,25
<i>Eugenia brasiliensis</i>	2,5	2,5	2,5
<i>Eugenia umbelliflora</i>	5,0	5,0	5,0

En los test realizados frente a la cepa de *U. urealyticum*, apenas *E. beaurepaireana* presentó actividad antimicrobiana hasta la concentración 1,25 mg/mL, *E. brasiliensis* presentó actividad hasta 2,5 mg/mL y *E. umbelliflora* presentó actividad solamente hasta la concentración 5,0 mg/mL (Tabla 1).

La misma actividad antimicrobiana fue observada frente a la *Mycoplasma hominis*, con un MIC de 1,25 mg/mL para *E. beaurepaireana*, 2,5 mg/mL para *E. brasiliensis*, y 5,0 mg/mL para *E. umbelliflora* (Tabla 1).

Como se puede observar, el DMSO ejerce cierto efecto tóxico sobre el crecimiento de mollicutes, al contrario de lo que sucede con especies de bacterias típicas, como *Pseudomonas* sp, *E. coli*, y *Staphylococcus* sp⁸. Este hecho, probablemente, se debe a la característica de los mollicutes de ser desprovistos de pared celular, lo que los vuelve más sensibles a alteraciones osmóticas y a otras agresiones a la membrana celular. Esta es una característica peculiar de esta clase, semejándose, en este sentido, a las células de los microorganismos eucarióticos.

Entretanto, fue posible verificar que todos los extractos de las plantas *Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia brasiliensis* y *Eugenia umbelliflora* poseen actividad antimicrobiana, aunque aparentemente pequeña, contra las cepas de los mollicutes estudiados. Las dificultades en el cultivo de estos microorganismos explican, en parte, la escasez de publicaciones, tanto internacionales como nacionales, relacionadas a la evaluación de la actividad antimicrobiana de productos naturales contra especies de mollicutes.

Se debe destacar que los test fueron realizados con los extractos brutos de las hojas de las plantas, solubles en DMSO a 10% en agua. Seguramente, compuestos aislados deben presentar una actividad antimicrobiana todavía mayor. Trabajos adicionales de nuestro grupo buscarán realizar estudios con subfracciones y compuestos aislados de las plantas para la investigación de nuevos antimicrobianos con potencial terapéutico.

Con relación a la *Eugenia brasiliensis*, se registran en la literatura pocos relatos sobre compuestos químicos y actividades farmacológicas. Ha sido realizado un estudio de los componentes del aceite esencial de dos ejemplares de esta especie, colectados en el estado de São Paulo. Los compuestos encontrados mayoritariamente fueron -selineno (17,3% y 12,6 %) y -selineno (13,3% y 14,8 %), -cariofileno (8,7% y 12,6 %) y -pineno (0,7% y 6,6 %) ¹². De la misma manera, raros estudios en la literatura presentan las propiedades farmacológicas de *Eugenia beaurepaireana* presentan raros estudios na literatura. Apenas un relato fue encontrado a respecto del estudio del aceite esencial. Los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de esta especie son el biciclo germacreno (14,3%), -cadineno (7,2%), T-cadinol (6,5%), -cadinol (6,1%) y -cariofileno (6,4%) ². De los frutos de *Eugenia umbelliflora* se relata la presencia de antocianinas ²². El aceite esencial también se estudió, mostrando un alto de tenor de -pineno (24,7%) y -pineno (23,5%) ¹. Existen poquísimas referencias en la literatura a respecto de esta planta.

CONSIDERACIONES FINALES

Nuestros hallazgos a respecto de la actividad de los extractos brutos de estas plantas, nativas de la mata atlántica brasileña, contra especies de ureaplasma y micoplasmas son importantes, ya que pueden constituir nuevas fronteras en las áreas de la micoplasmología y productos naturales de interés terapéutico. Como discutimos, cepas de *Mycoplasma hominis* resistentes a la tetraciclina, azitromicina, clindamicina y varias fluoroquinolonas han sido relatadas cada vez con mayor frecuencia^{33,10,3,16}. Así mismo, la resistencia de *Ureaplasma*

sp a las drogas utilizadas para su tratamiento, aumenta constantemente^{10,32,11}. El aislamiento y el estudio de los compuestos de estas plantas con actividad antimicrobiana tiene gran potencial para el desarrollo de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) del Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por el apoyo financiero a los becarios S. M. de C. y C. B. durante la realización de este proyecto.



Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes

RESUMO

A necessidade da busca de novos antimicrobianos e o interesse nas espécies de mollicutes vêm aumentando constantemente, principalmente pelo fato de serem os mollicutes responsáveis pelo desenvolvimento de várias doenças importantes, como é o caso de *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. Estes dois últimos apresentam envolvimento em infecções do trato urogenital que podem levar à infertilidade e a complicações da gestação. *M. arginini* é um importante patógeno animal isolado de ovelhas, que causa uma doença respiratória grave chamada de "síndrome da tosse", e, eventualmente, zoonoses no homem. O gênero *Eugenia* pertence à família *Myrtaceae*, que compreende cerca de 500 espécies de plantas com potencial terapêutico. Neste trabalho foram obtidos extratos brutos das folhas de *Eugenia beaurepaireana*, *E. brasiliensis* e *E. umbelliflora*, e estes foram testados pelo método de microdiluição em caldo frente às cepas de mollicutes. Com isso, foi determinada a concentração inibitória mínima dos extratos das plantas, sendo de 1,25 mg/mL para *E. beaurepaireana*, 2,5 mg/mL para *E. brasiliensis*, e 5,0 mg/mL para *E. umbelliflora* contra as três espécies de mollicutes igualmente. Dentre os resultados observados, destaca-se principalmente *E. beaurepaireana*, que apresentou um bom potencial antimicrobiano. Devido às patologias importantes que estas bactérias causam, e à crescente resistência aos antimicrobianos tradicionais utilizados no tratamento, torna-se importante a busca por novos tipos de antibióticos dentro da biodiversidade brasileira. Existem raros estudos sobre as propriedades farmacológicas das plantas do gênero *Eugenia*, e nossos resultados são os primeiros relatos sobre sua atividade antimicrobiana frente a espécies de mollicutes.

Palavras-chave: Mycoplasma; Ureaplasma; Testes de Sensibilidade Microbiana; Produtos Biológicos.

In vitro antibacterial activity of a crude extract of *Eugenia* species against mollicute strains

ABSTRACT

The need for new antimicrobials against mollicutes is constantly increasing, mainly because mollicutes are responsible for the development of several prominent diseases, including *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. The last two are involved in urogenital tract infections that can lead to infertility and gestational complications. Meanwhile, *M. arginini* is an animal pathogen, isolated from sheep, that causes a serious respiratory disease, known as "coughing syndrome", and possibly zoonoses. The *Eugenia* genus belongs to the *Myrtaceae* family, which includes around 500 plant species with therapeutic potential. In this study, crude extracts from the leaves of *E. beaurepaireana*, *E. brasiliensis* and *E. umbelliflora* were obtained and tested by broth microdilution against mollicute strains. The minimal inhibitory concentration determined for the plant extracts was 1.25 mg/mL for *E. beaurepaireana*, 2.5 mg/mL for *E. brasiliensis* and 5.0 mg/mL for *E. umbelliflora* against three species of mollicutes. *E. beaurepaireana* in particular stands out as having good antimicrobial potential. Due to the serious diseases caused by these pathogens, as well as growing antibiotic resistance to conventional treatment, it is important research new antibiotic candidates derived from the Brazilian ecosystem. There exist very few studies of the pharmacological properties of the *Eugenia* plant genus and our report is the first to describe its antimicrobial properties against mollicutes.

Keywords: Mycoplasma; Ureaplasma; Microbial Sensitivity Tests; Biological Products.



REFERENCIAS

- 1 Apel MA, Limberguer RP, Sobral M, Henriques AT, Ntalani H, Verin P, et al. Chemical composition of the essential oils from southern Brazilian *Eugenia* species. Part III. J Essent Oil Res. 2002;14(4):259-62.
- 2 Apel MA, Sobral M, Schapoval EES, Henriques AT. Chemical Composition of the Essential Oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section Dichotomae. J Essent Oil Res. 2004 May-Jun;16(3):191-2.
- 3 Austin MN, Beigi RH, Meyn LA, Hillier SL. Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. J Clin Microbiol. 2005 Sep;43(9):4492-7.
- 4 Bebear C, Robertson J. Determination of the minimal inhibitory concentration. In: Tully JG, Razin S. eds. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol. II. San Diego: Academic Press, p. 189-97, 1996.
- 5 Consolini AE, Baldini OAN, Amat AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. J Ethnopharmacol. 1999 Jul;66(1):33-9.
- 6 Cordova CM, Blanchard A, Cunha RA. Higher prevalence of urogenital mycoplasmas in human immunodeficiency virus-positive patients as compared to patients with other sexually transmitted diseases. J Clin Lab Anal. 2000;14(5):246-53.
- 7 Dalmarco EM, Blatt SL, Cordova CMM. Avaliação da taxa de isolamento de micoplasmas do trato urogenital por um método comercial em comparação com meios de cultura produzidos no próprio laboratório. Rev Bras Anal Clin. 2008;40(2):151-3.
- 8 Dalmarco EM, Guimarães CL, Guedes A, Calderari MT. Análise da atividade antibacteriana (in vitro) de plantas da flora brasileira utilizados pela medicina popular. Rev Cienc Saude. 2007;25:133-42.
- 9 Degnan BA, Palmer JM, Robson T, Jones CE, Kehoe MA, Goodacre JA. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. Infect Immun. 1998 Jul;66(7):3050-8.
- 10 Dégrange S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Tetracycline resistance in *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis*: prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and description of two tet(M)-positive isolates of *M. hominis* susceptible to tetracyclines. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):742-4.
- 11 Duffy L, Glass J, Hall G, Avery R, Rackley R, Peterson S, et al. Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United States. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1590-1.
- 12 Fischer DCH, Limberger RP, Henriques AT, Moreno PRH. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. J Essent Oil Res. 2005 Sep-Oct;17:499-500.
- 13 Gong H, Zolzer F, Recklinghausen GV, Rossler J, Breit S, Havers W, et al. Arginine deiminase inhibits cell proliferation by arresting cell cycle and inducing apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Jul;261(1):10-4.
- 14 Gonzalez-Jimenez MA, Villanueva-Diaz CA. Epididymal stereocilia in semen of infertile men: evidence of chronic epididymitis? Andrologia. 2006 Feb;38(1):26-30.
- 15 Grover JK, Vats V, Rathi SS, Dawar R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. J Ethnopharmacol. 2001 Aug;76(3):233-8.
- 16 Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(3):1190-3.
- 17 Gushchin AE, Ladygina VG, Govorun VM, Taraskina AM, Savicheva AM. Analysis of regions determining resistance to fluoroquinolones in genes *gyrA* and *parC* in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2000;4:33-5.
- 18 Houghton PJ, Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. London: Chapman & Hall, 1998. 212 p.
- 19 Huang C, Liu Z, Lin N, Tu Y, Li J, Zhang D. Susceptibility of mixed infection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* to seven antimicrobial agents and comparison with that of *Ureaplasma urealyticum* infection. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2003;23(2):203-5.
- 20 Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, et al. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. J Clin Microbiol. 2006 Jan;44(1):51-5.
- 21 Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Ido M, Azuma E. Apoptotic cell death of human T lymphoblastoid cells induced by arginine deiminase. Int J Hematol. 1997 Feb;65(2):129-41.
- 22 Kuskoski EM, Vega JM, Rios JJ, Fett R, Troncoso AM, Asuero AG. Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Bagaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). Journal of J Agric Food Chem. 2003 Aug;51(18):5450-4.
- 23 Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu J, Tan R. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. J Ethnopharmacol. 2005 Apr;98(3):329-33.

- 24 Limberger RP, Sobral M, Henriques AT, Menut C, Bessiere JM. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quim Nova*. 2004 nov-dez;27(6):916-9.
- 25 Machado KE, Cechinel Filho V, Tessarolo R, Mallmann C, Meyre-Silva C, Bella Cruz A. Potent Antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharm Biol*. 2005 Oct;43(7):636-9.
- 26 Mårdh PA. Aetiology, diagnosis and therapy of sexually transmitted and allied infections-reflections on novel observations and current trends. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2006 Sep;11(3):169-74.
- 27 Miranda Filho JC, Dalmarco EM, Cordova CMM. Infecções por micoplasmas e ureaplasmas em mulheres. *Dynamis*. 2004;12(48):79-87.
- 28 Niang M, Rosenbusch RF, Andrews JJ, Kaeberle ML. Demonstration of a capsule on *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Am J Vet Res*. 1998 May;59(5):557-62.
- 29 Niang M, Rosenbusch RF, Andrews JJ, Lopez-Virella J, Kaeberle ML. Occurrence of autoantibodies to cilia in lambs with a "coughing syndrome". *Vet Immunol Immunopathol*. 1998 Jul;64(3):191-205.
- 30 Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmidt JM, Setzer WN. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *Inter J Aromatherapy*. 2005;15(3):147-52.
- 31 Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007 May;18(5):414-20.
- 32 Pereyre S, Métifiot M, Cazanave C, Renaudin H, Charon A, Bébéar C, et al. Characterisation of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Feb;29(2):207-11.
- 33 Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(4):753-6.
- 34 Pio-Corrêa M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1926-1978. 4324 p.
- 35 Pourgholami MH, Kamalinejad M, Javadi M, Majzoob S, Sayyah M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *J Ethnopharmacol*. 1999 Feb;64(2):167-71.
- 36 Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci*. 2004 Oct;75(22):2717-31.
- 37 Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec;62(4):1094-156.
- 38 Reitz RD, Klein RM. Mirtáceas. In: Reitz PR, editor. *Flora Ilustrada Catarinense*. I parte. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues; 1969. p. 63.
- 39 Revilla J. *Plantas úteis da bacia amazônica*. Rio de Janeiro: Inpa; 2002. 44 p.
- 40 Schoonover LL, Stewart AS, Clifton GD. Hemodynamic and cardiovascular effects of nitric oxide modulation in the therapy of septic shock. *Pharmacotherapy*. 2000 Oct;20(10):1184-97.
- 41 Taylor-Robinson D. The role of mycoplasmas in pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007 Jun;21(3):425-38.
- 42 Yang LL, Lee CY, Yen KY. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Lett*. 2000 Aug;157(1):65-75.

Recibido en / Recebido em / Received: 3/6/2009
Aceito en / Aceito em / Accepted: 25/9/2009