

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

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

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

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 patogenias 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.

INTRODUÇÃO

Os mollicutes, ou micoplasmas, fazem parte da classe *Mollicutes*, um grande grupo de microrganismos peculiares, responsáveis por várias doenças nos animais, nas plantas e no homem, notadamente Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs), das quais as mais importantes características são a ausência de parede celular e o genoma reduzido³⁷.

A incidência de DSTs teve um declínio na década de 1980 e no início da década de 1990, refletindo as mudanças no comportamento sexual em resposta à epidemia da infecção pelo HIV. Mas estas modificações não foram mantidas, e, a partir de 1994, observou-se a reincidência das patologias de transmissão sexual. Gravidez, nascimento a termo e fertilidade são afetados pela presença de DSTs, tornando-se fundamental a investigação de microrganismos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida* sp, *Trichomonas vaginalis* e os mollicutes²⁶.

Duas espécies de mollicutes merecem destaque nas infecções do trato urogenital: *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, adquiridas principalmente por contato sexual. Ambas têm sido encontradas tanto no homem quanto na mulher em infecções do 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 é responsável por casos de uretrite não gonocócica e vaginose bacteriana. Está associado à febre pós-parto, corioamnionite e baixo peso ao nascimento, e parto prematuro, além de complicações nos recém-nascidos. *U. urealyticum* era classicamente dividido em 14 sorotipos, e estes agrupados em dois sorogrupos. Atualmente, encontra-se definida uma nova espécie, *U. parvum*, que engloba os sorotipos que pertenciam ao sorogrupo 1²⁰. *Mycoplasma hominis* é uma das causas de uretrite não gonocócica e vaginose bacteriana, associado à febre pós-aborto e pós-parto, epididimite e infertilidade. Também é uma causa incomum de bacteremia, endocardite, artrite e outras infecções menos usuais¹⁴.

Vários estudos demonstraram que as taxas de colonização por *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* em homens variava de zero a 13% e de 3% a 56%, respectivamente⁶. Dados similares em mulheres demonstraram que as taxas de colonização vaginal por *M. hominis* e *U. urealyticum* variavam de zero a 31% e de 8,5% a 77,5%, respectivamente, segundo a idade, raça, experiência sexual e nível socioeconômico⁴¹. Os resultados obtidos por nosso grupo corroboram estes estudos, demonstrando uma alta incidência de infecção em nossa população²⁷.

M. arginini (MA) é uma espécie que infecta animais, tendo sido rotineiramente isolado de ovelhas, causando uma doença respiratória chamada "síndrome da tosse" nos ovinos. A manifestação é associada a uma tosse paroxística severa, causando inclusive prolapso retal. A doença é crônica e persiste por várias semanas na maioria dos animais infectados. Existem evidências de que a persistência destes microrganismos no trato respiratório e a natureza crônica da doença possam ser devidas à falha do sistema imune em gerar uma imunidade protetora²⁹. As razões para esta falha são desconhecidas, mas se observa uma marcante variabilidade de expressão antigênica nos microrganismos isolados de animais doentes²⁸. Uma característica metabólica singular desta espécie de mollicute é a produção de uma enzima arginina deaminase, e a utilização da arginina como fonte de energia. A arginina deaminase (ADI) é uma enzima que catalisa a hidrólise da arginina em dois compostos: citrulina e amônia. É altamente expressada em microrganismos que utilizam a arginina como fonte de energia não glicolítica⁹. A ADI derivada de *Mycoplasma* foi relatada como indutora de apoptose em ampla variedade de células tumorais humanas *in vitro*, exercendo potente atividade antitumoral *in vivo*¹³. A atividade antiproliferativa ou antitumoral da ADI provavelmente é devida à privação de arginina como fonte nutricional das células, porque a restituição exógena de arginina restaura o crescimento celular²¹. A arginina é também um precursor de óxido nítrico (NO), um importante mensageiro molecular envolvido na vasodilatação, neurotransmissão e em atividades citotóxicas das células do sistema imune. Apesar de o NO ser benéfico e crítico na função celular normal, sua superprodução pela iNOS nos casos de choque endotóxico causa vasodilatação e hipotensão, levando à morte⁴⁰.

Nos últimos anos, tem sido relatado um número crescente de casos de resistência dos micoplasmas e ureaplasmas aos antibióticos utilizados no tratamento^{17,19}, inclusive aos mais efetivos³³. Deste modo, a identificação de novos antimicrobianos a partir de plantas pode constituir uma grande contribuição no combate a estas infecções.

A família *Myrtaceae* é composta de cerca de 100 gêneros, com aproximadamente 3 mil espécies, sendo a maior família da ordem, com dois centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo. Segundo Limberger e colaboradores²⁴, a família é dividida em duas subfamílias: *Myrtoideae* e *Leptospermoideae*. São todas plantas tropicais ou subtropicais, mas no Brasil há somente cerca de mil espécies. Aqui, todos os representantes nativos pertencem à subfamília *Myrtoideae*, a qual é constituída de apenas uma tribo, *Myrteae*, subdividida em três subtribos: *Eugeniinae*, *Myrciinae* e *Myrtinae*. No Brasil, os gêneros mais importantes são *Psidium* (goiabeira), *Myrciaria* (araçá), *Martiera* (cambucá), *Campomanesia* (guabiroba), *Paivaea* (cambuci), *Syzygium* (cravo-da-india) e *Eugenia*, ao qual pertencem as espécies em estudo neste trabalho. Na América do Sul, o gênero *Eugenia* distribui-se desde o Brasil até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai⁵. Muitas espécies do gênero *Eugenia* são apreciadas por seus frutos e usadas como alimento¹², a exemplo de *Eugenia uniflora*, uma das espécies mais conhecidas do gênero, chamada popularmente de pitangueira⁵.

Alguns trabalhos demonstram o potencial terapêutico de espécies do gênero *Eugenia*, como: efeito hipoglicemiante, antioxidante³⁶ e protetor contra a hipertrofia renal causada pelo diabetes¹⁵ em ratos tratados com extrato etanólico da *Eugenia jambolana*, antitumoral em células HL-60 de taninos isolados a partir da *Eugenia jambos* L.⁴², anticonvulsivante em camundongos tratados com o óleo essencial da *Eugenia caryophyllata*³⁵.

A espécie *Eugenia brasiliensis* Lamarck, é conhecida popularmente como grumixama, grumixameira, grumixaba, itapoioti³⁸ e cumbixaba³⁴. Na medicina popular, o uso da espécie na forma de infusão das folhas, foi relatado para o tratamento de artrite e reumatismo, e como diurético. Os frutos maduros são usados como alimento e para a preparação de bebidas fermentadas³⁹. Devido ao seu alto teor de taninos, o que lhe confere ação adstringente, as cascas eram usadas na indústria de couro, como tanantes³¹. *Eugenia beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand, sinônimo *Myrtus beaurepaireana*, *Pilothecium ternatifolium*, é conhecida como ingabaú e guamirim-ferro. Da mesma maneira que *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* possui pouquíssimos estudos na literatura. *Eugenia umbelliflora* Berg., tem como nomes populares baguaçu, guapê e guamirim, dados à árvore e a seus frutos, a qual cresce nas matas do Sudeste do Brasil. Existem poucas referências na literatura a respeito desta planta.

São todas árvores pequenas ou arbustos que ocorrem na mata atlântica, desde os Estados do Nordeste até Santa

Catarina³⁸. Devido aos seus frutos, que são comestíveis, estas árvores são frequentemente cultivadas. Em Santa Catarina foi registrada a presença destas espécies nos municípios de Brusque, Ibirama, Itajaí, Joinville e região de Florianópolis.

Estudos anteriores já mostraram que espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade antibacteriana, como, por exemplo, *Eugenia caryophyllus*, que apresentou inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*³¹. A mesma espécie inibiu também o crescimento de *Helicobacter pylori*, uma bactéria responsável pelo aparecimento de úlcera gástrica²³. O óleo essencial obtido das folhas de *Eugenia uniflora* demonstrou forte inibição do crescimento de cepas de *Bacillus cereus*³⁰. A atividade antibacteriana da espécie *Eugenia umbelliflora* também já foi descrita na literatura, quando folhas e frutos destas espécies mostraram promissora atividade contra micro-organismos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*²⁵. Porém, contra cepas de *Mycoplasma* sp e *Ureaplasma* sp não existem quaisquer relatos de atividade das espécies deste gênero de plantas. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos destas espécies de plantas nativas da flora brasileira frente a cepas de mollicutes capazes de infectar o homem.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os micro-organismos utilizados foram cepas de referência de *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27618), *Mycoplasma arginini* (PG18, Instituto Pasteur), e *M. hominis* (PG21, Instituto Pasteur). O ureaplasma foi inoculado em meio de cultura U10 e os micoplasmas em meio líquido de arginina (MLA); foram preparados no laboratório e incubados 37° C ± 1° C por 48 h em microaerofilia (2-3% de CO₂)⁷.

O material vegetal – partes aéreas de *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbelliflora* – foi coletado na cidade de Santo Amaro da Imperatriz (SC) (27°41'18" S; 48°46'41" O) e identificado pelo professor Daniel Falkenberg do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As exsiccatas das espécies foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSC sob os números FLOR – 34675, 34674 e 17890, respectivamente. As folhas foram separadas dos galhos e submetidas à secagem a 40° C em estufa com circulação de ar. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas. Os extratos vegetais foram obtidos por maceração com etanol a 70% durante sete dias. Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a vácuo e o procedimento repetido duas vezes¹⁸.

Os extratos foram dissolvidos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e testados, usando-se o método de microdiluição em concentrações variando de 5 mg/mL a 0,0391 mg/mL, frente a cepas de mollicutes. Depois de solubilizados, os extratos foram filtrados com filtros Millex (Millipore) de 0,22 µm para esterilização, tendo em vista a grande facilidade de contaminação do meio devido a sua riqueza

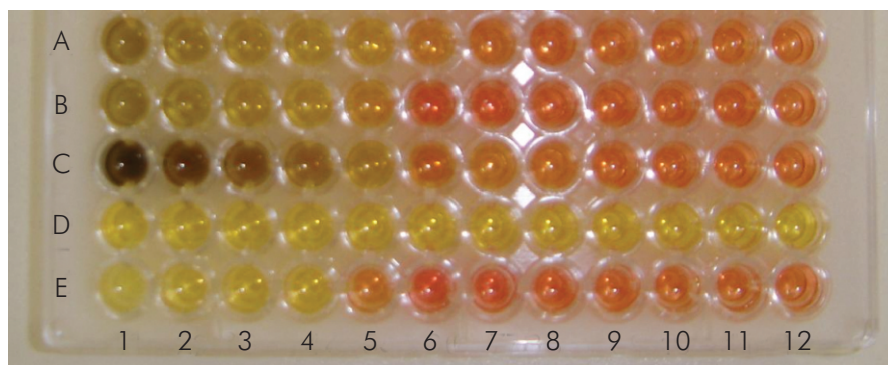
em nutrientes. Inicialmente, foi testada a atividade antimicrobiana dos extratos de plantas (100 mg) dissolvidos em 10 mL de DMSO, solvente considerado inerte no crescimento de bactérias. Porém, diferentemente de testes já observados que apontam o DMSO como substância inerte nas culturas de bactérias como *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Klebsiela* sp⁸, ele por si só apresentou inibição ao crescimento sobre os micoplasmas até diluição 1:8, e fez-se necessário realizar uma solução a 10%.

Os testes de concentração inibitória mínima (*minimal inhibitory concentration* – MIC) foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades⁴. Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos extratos de planta, onde a 100 µL de meio de cultura foram adicionados 100 µL de extrato; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se assim uma gama de concentração de extrato de planta (inicialmente a 10 mg/mL) diluída em razão 2 (5 mg/mL na segunda cavidade; 2,5 mg/mL na terceira cavidade, e assim sucessivamente). A esta gama de concentrações de extratos de plantas, foram adicionados 100 µL de um inóculo de uma cultura de micoplasma ou ureaplasma em fase log de crescimento, contendo 10³ micro-organismos/mL (determinado por microtitulação). Como controle, foi feita uma diluição seriada do próprio solvente (DMSO), sem extrato de planta, e uma diluição seriada da cultura do micro-organismo, sem a adição de solvente ou de extrato de planta. Por fim, adicionou-se em todas as cavidades duas a três gotas de vaselina líquida estéril para isolar cada cavidade do meio externo, e criar um ambiente de microaerofilia. Os testes foram realizados uma única vez em duplicata, uma vez que esta metodologia já está bem padronizada e descrita na literatura clássica da micoplasmologia.

As placas foram incubadas a 37° C ± 1° C por 48 h, e o crescimento foi observado a partir da mudança de cor do meio de cultura, devido à presença do indicador vermelho de fenol. As espécies do gênero *Ureaplasma* degradam uréia em amônia e alcalinizam o pH do meio, fazendo com que haja uma mudança de cor do amarelo para o vermelho, indicando o crescimento. *M. arginini* e *M. hominis* promovem a alcalinização do meio em seu crescimento por deaminação da arginina em amônia. Todos os procedimentos foram realizados de maneira estéril em capela de fluxo laminar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram iniciadas as culturas das cepas de referência de *M. arginini*, *M. hominis* e *U. urealyticum* conservadas a -20° C em nosso laboratório. Uma vez que não turvam o meio de cultura, pelo tamanho reduzido de suas células, seu crescimento é evidenciado pela formação de amônia a partir da deaminação da arginina ou da uréia, alcalinizando o pH do meio, mudando a coloração do indicador vermelho de fenol presente na formulação, de amarelo para vermelho na faixa de pH de 6,6 a 8,0 (Figura 1).



Linha A: diluição seriada de extrato da planta *Eugenia brasiliensis* (Coluna 1: extrato puro, Coluna 2: extrato 1:2 em meio de cultura, e assim por diante); Linha B: diluição seriada de extrato da planta *Eugenia beaurepaireana* (Coluna 1: extrato puro, Coluna 2: extrato 1:2 em meio de cultura, e assim por diante); Linha C: diluição seriada de extrato da planta *Eugenia umbelliflora* (Coluna 1: extrato puro, Coluna 2: extrato 1:2 em meio de cultura, e assim por diante); Linha D (1-12): somente meio de cultura, sem adição de micro-organismo, solvente ou extrato de planta; Linha E (1-12): diluição seriada de razão 2 (Coluna 1: solvente puro - DMSO, Coluna 2: solvente 1:2 em meio de cultura, e assim por diante), sem adição de extrato de planta.

Figura 1 – Método de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antimicrobiana (MIC) dos extratos brutos de plantas contra *M. arginine*

Nos testes de microdiluição realizados frente à cepa de *M. arginini*, apenas *E. beaurepaireana* e *E. brasiliensis* apresentaram atividade antimicrobiana ao menos até a concentração 2,5 mg/mL, *E. umbelliflora* apresentou atividade somente até a concentração 5,0 mg/mL (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana representada pela MIC dos extratos das plantas contra as espécies de mollicutes

Planta	MIC do Extrato 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

Nos testes realizados frente à cepa de *U. urealyticum*, apenas *E. beaurepaireana* apresentou atividade antimicrobiana até a concentração 1,25 mg/mL, *E. brasiliensis* apresentou atividade até 2,5 mg/mL e *E. umbelliflora* apresentou atividade somente até a concentração 5,0 mg/mL (Tabela 1).

A mesma atividade antimicrobiana foi observada frente à *Mycoplasma hominis*, com um MIC de 1,25 mg/mL para *E. beaurepaireana*, 2,5 mg/mL para *E. brasiliensis*, e 5,0 mg/mL para *E. umbelliflora* (Tabela 1).

Como se pode observar, o DMSO exerce certo efeito tóxico sobre o crescimento de mollicutes, ao contrário do que ocorre com espécies de bactérias típicas, como *Pseudomonas* sp, *E. coli*, e *Staphylococcus* sp⁸. Este fato provavelmente se deve à característica dos mollicutes de serem desprovidos de parede celular, tornando-os mais sensíveis a alterações osmóticas e outras agressões à membrana celular. Esta é uma característica peculiar desta classe, assemelhando-se, neste sentido, às células dos micro-organismos eucariotos.

Entretanto, foi possível verificar que todos os extratos das plantas *Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia umbelliflora* possuem atividade antimicrobiana, mesmo que aparentemente pequena, contra as cepas dos mollicutes estudados. As dificuldades no cultivo destes micro-organismos explicam, em parte, a escassez de publicações, tanto internacionais como nacionais, relacionadas à avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais contra espécies de mollicutes.

Deve-se ressaltar que os testes foram realizados com os extratos brutos das folhas das plantas, solúveis em DMSO a 10% em água. Certamente compostos isolados devem apresentar uma atividade antimicrobiana ainda maior. Trabalhos adicionais de nosso grupo buscarão realizar testes com subfrações e compostos isolados das plantas para a busca de novos antimicrobianos com potencial terapêutico.

Com relação à *Eugenia brasiliensis*, poucos relatos sobre compostos químicos e atividades farmacológicas foram registrados na literatura. Foi realizado um estudo dos componentes do óleo essencial de dois exemplares desta espécie, coletados no estado de São Paulo. Os compostos majoritários encontrados foram -selineno (17,3 e 12,6 %) e -selineno (13,3 e 14,8 %), -cariofileno (8,7 e 12,6 %) e -pineno (0,7 e 6,6 %) ¹². Da mesma forma, as propriedades farmacológicas de *Eugenia beaurepaireana* apresentam raros estudos na literatura. Apenas um relato a respeito do estudo do óleo essencial foi encontrado. Os compostos majoritários presentes no óleo essencial desta espécie são biciclogermacreno (14,3%), -cadineno (7,2%), T-cadinol (6,5%), -cadinol (6,1%) e -cariofileno (6,4%) ²². Dos frutos de *Eugenia umbelliflora* foi relatada a presença de antocianinas ²². O óleo essencial também foi estudado, mostrando um alto teor de -pineno (24,7%) e -pineno (23,5%) ¹. Existem pouquíssimas referências na literatura a respeito desta planta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados a respeito da atividade dos extratos brutos destas plantas, nativas da mata atlântica brasileira, contra espécies de ureaplasma e micoplasmas são importantes, pois podem constituir novas fronteiras nas áreas da micoplasmologia e dos produtos naturais de interesse terapêutico. Como discutimos, cepas de *Mycoplasma hominis* resistentes a tetraciclina, azitromicina, clindamicina e várias fluoroquinolonas têm sido relatadas com frequência cada vez maior^{33,10,3,16}. Da mesma forma, a resistência de *Ureaplasma* sp às drogas utilizadas no seu

tratamento aumenta constantemente^{10,32,11}. O isolamento e o estudo dos compostos destas plantas com atividade antimicrobiana têm grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro aos bolsistas S. M. de C. e C. B. durante a realização deste projeto.



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.

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

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.



REFERÊNCIAS

- 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.

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

