

ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE A *Mycobacterium fortuitum* E *Mycobacterium malmoense*

TESIÊ LEOPOLDO FONSECA[†]
ANDREA VON GROLL^{**}
GILDA GUIMARÃES LEITÃO^{***}
CARLOS JAMES SCAINI^{****}
DANIELA FERNANDES RAMOS^{*****}
PEDRO EDUARDO ALMEIDA DA SILVA^{*****}

RESUMO

As micobactérias não-tuberculosas são espécies ambientais com crescente relevância clínica, por sua relação com diversos tipos de infecções. Geralmente, apresentam maior resistência intrínseca aos antimicobacterianos convencionais, impulsionando assim a busca de novas alternativas farmacológicas, como as obtidas de fontes naturais. Este estudo avaliou a atividade de clássicos antituberculosos, como estreptomicina (SMR), etambutol (EMB), isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), bem como extratos vegetais oriundos da Mata Atlântica (Brasil) frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoense*. Foram observadas as seguintes concentrações mínimas inibitórias (CMI) para o *M. fortuitum*: EMB = 16µg/mL; SMR = 4µg/mL; INH e RIF 1µg/mL; extrato bruto *Plathymenia foliolosa* = 200µg/mL. Já para o *M. malmoense*, as CMI encontradas foram: SMR = 4µg/mL; INH = 1µg/mL e RIF = 0,25µg/mL. O EMB não inibiu o crescimento bacteriano desta espécie. Os compostos naturais ativos contra o *M. malmoense* foram os extratos *Siparuna arianae*, *Cedrela fissilis* e *Peschiera affinis*, que apresentaram CMI de 200µg/mL, enquanto a CMI de *Ficus gomelleria* foi de 100µg/mL.

PALAVRAS-CHAVES: atividade antimicobacteriana, extratos vegetais, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium malmoense*

[†] Farmacêutica-bioquímica; mestre em Ciências da Saúde – FURG

^{**} Médica veterinária; mestre em Ciências Veterinárias – UFRGS

^{***} Farmacêutica; doutora em Química de Produtos Naturais – UFRJ

^{****} Professor da Faculdade de Medicina – FURG; Médico veterinário; doutor em Biotecnologia – UFPel

^{*****} Bióloga; mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FURG

^{*****} Professor do Faculdade de Medicina – FURG; doutor em Microbiologia – Univ. Zaragoza; pedrefurg@gmail.com

ABSTRACT

Natural extracts with anti-mycobacterium activity on *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium malmoense*

Non-tuberculous mycobacteria are environmental species of increasing clinical importance in the last years and have been reported as etiologic agent in various types of infections. Generally, they have great intrinsic resistance to ordinary antimicrobials conventional, which motivates to search new pharmacological alternatives, such as those obtained from natural sources. This study evaluated the activity of classic anti-tuberculosis drugs such as streptomycin (SMR), ethambutol (EMB), isoniazid (INH), rifampin (RIF) and crude extracts of plant from the Atlantic Forest (Brazil) against *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium malmoense*. It was observed the minimum inhibitory concentration (MIC) for *M. fortuitum*: EMB = 16µg/mL; SMR = 4µg/mL; INH and RIF 1µg/mL; crude extract *Plathymeria foliolosa* = 200µg/mL. For *M. malmoense*, MIC were: SMR = 4µg/mL; INH = 1µg/mL and RIF = 0.25µg/mL. EMB did not inhibit bacterial growth of this species. Active crude extracts against *M. malmoense* were *Siparuna arianaeae*, *Cedrela fissilis* and *Peschiera affinis* that showed MIC = 200µg/mL, while *Ficus gomelleria* showed 100µg/mL.

KEY-WORDS: antimycobacterial activity, vegetable extracts, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium malmoense*

1 – INTRODUÇÃO

As micobactérias não-tuberculosas (MNT) são microorganismos de *habitat* ambiental, cujo potencial patogênico para humanos e animais varia de colonização inócua até doença⁽¹⁾. A presença das MNT em patologias humanas foi pela primeira vez descrita em 1893, não muito distante da descoberta do *Mycobacterium tuberculosis* por Robert Koch. Subseqüentemente, numerosos relatos corroboraram o papel de patógeno humano dessas espécies⁽²⁾.

Algumas infecções causadas por MNT parecem ser adquiridas pela inalação de aerossóis infectados ou ingestão; mais rara é a aquisição nosocomial ou iatrogênica. Em contraste com o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, essas micobactérias normalmente não são contagiosas, e seu isolamento não está necessariamente associado à doença⁽³⁾.

As MNT, por seu potencial patogênico variável, constituem um contínuo desafio ao sistema imunológico humano, tornando-se aparentes em indivíduos com a imunidade prejudicada, devido ao uso de medicamentos imunossupressores, na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), deficiência genética na ativação dos macrófagos, fibrose cística, etc.⁽⁴⁾

Atualmente, são conhecidas mais de 90 espécies de

micobactérias. Destas, aproximadamente um terço têm sido associadas com doenças em humanos⁽⁵⁾. As espécies de MNT potencialmente patogênicas ao homem incluem: *Mycobacterium avium complex* (MAC), *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum complex*⁽⁶⁾. Com o advento da biologia molecular, novas espécies de micobactérias têm sido descritas. A partir de 1990, foram descobertas 20 espécies de MNT com atividade patogênica, como *Mycobacterium intermedium*, *M. interjectum*, *M. genavense*, *M. mucogenicum*, entre outras⁽⁷⁾.

Essas micobactérias, embora possam, em geral, ser menos virulentas que patógenos clássicos como o *M. tuberculosis*, ao estabelecerem um quadro infeccioso são de difícil erradicação, na medida em que, sendo microorganismos ambientais, apresentam maior resistência aos antimicrobianos⁽⁸⁾.

A química dos produtos naturais é uma área de investigação com vasto potencial, principalmente nos países com grande biodiversidade, como é o caso do Brasil e de outros países sul-americanos. Recentes estudos mostram atividade antimicobacteriana de certas espécies de plantas. Newton et al.⁽⁹⁾ estudaram extratos de 138 espécies de plantas e encontraram 112 metabólitos puros com moderada a alta atividade antimicobacteriana. Cantrell et al.⁽¹⁰⁾ também encontraram atividade antimicobacteriana em terpenóides de plantas. Seidel e Taylor⁽¹¹⁾ demonstraram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e constituintes de *Pelagonium reniforme* e *Pelagonium sidoides* contra as micobactérias de rápido crescimento. Já Okunade et al.⁽¹²⁾ fizeram extensa revisão enfatizando a diversidade estrutural de compostos naturais com propriedades antimicobacterianas, como os alcalóides, terpenóides, cumarinas/cromonas, peptídeos e fenóis obtidos de plantas, organismos marinhos e fungos. Justifica-se, portanto, a renovação de esforços na pesquisa de extratos de plantas e seus metabólitos ativos com ação contra MNT.

O presente estudo objetivou a determinação da atividade antimicobacteriana de clássicos antituberculosos e de extratos vegetais da Mata Atlântica frente a cepas de *M. fortuitum* e *M. malmoense*. O *M. malmoense*, MNT de crescimento lento, pode causar linfadenite cervical em crianças e doenças pulmonares crônicas em adultos⁽²⁾. Já o *M. fortuitum*, MNT de crescimento rápido pertencente ao *M. fortuitum complex*, formado por *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus*⁽³⁾, causa diferentes tipos de infecções esporádicas, incluindo osteomielite, celulite, infecção em ferida operatória e pós-traumática, otite média e doenças pulmonares crônicas⁽⁸⁾.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas e condições de cultivo – Cepas de *M. fortuitum* (ATCC 6891) e *M. malmoense* (ATCC 29571), fornecidas em meio Lowenstein-Jensen (LJ) pelo Instituto Adolf Lutz (IAL) foram cultivadas, para isolamento e manutenção, em meio sólido Ogawa-Kudoh a 37°C por sete a dez dias. Após esse período, as cepas cultivadas foram repicadas para meio líquido Middlebrook 7H9, enriquecido com 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) e incubadas a 37°C por até quatro dias.

Preparação dos inóculos – Foram preparadas suspensões bacterianas em 7H9 e 10% de OADC, com o auxílio de pérolas de vidro e vigorosa agitação no vórtex, cuja turbidez foi ajustada ao tubo um da Escala de MacFarland. A seguir, as suspensões foram diluídas 1:25, em meio 7H9, para a utilização nas microplacas⁽¹³⁾.

Extratos vegetais – Foram avaliados 37 extratos vegetais na forma bruta (Tabela 1), de duas regiões da Mata Atlântica brasileira (floresta Bela Fama, na cidade de Santana do Deserto – MG, e floresta Boa Vista, na cidade de Levy Gasparian – RJ): *Malouetia arborea*, *Cabralea canjerana*, *Mabea fistulifera*, *Siparuna arianeae*, *Psychotria vellosiana*, *Cedrela fissilis*, *Siparuna reginae*, *Bathysa australis*, *Pera heteranthera*, *Aparisthium cordatum*, *Croton floribundus*, *Virola aleifera*, *Sorocea bonplandii*, *Sparattosperma leucanthum*, *Guapira opposita*, *Melanoxylon brauna*, *Piptadenia gonoacantha*, *Astronium fraxinifolium*, *Cesearia sylvestris*, *Apuleia leiocarpa*, *Bombacopsis stenopetala*, *Brosimum guanense*, *Pouteria filipes*, *Ficus gomelleria*, *Dalbergia nigra*, *Anadenanthera colubrina*, *Plathymenia foliolosa*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Senifildera multiflora*, *Luehia grandiflora*, *Guettarda virburnoides*, *Simira sampaioana*, *Peschiera affinis*, *Carpotroche brasiliensis*, *Simira glaziovii*, *Pera leandri* e *Cariniana estrellensis*.

Antituberculosos clássicos – Foram usados quatro antituberculosos clássicos: estreptomicina (SMR), etambutol (EMB), isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), todos da marca Sigma.

Determinação da atividade antimicobacteriana – Foi empregado o método REMA⁽¹⁴⁾ para a avaliação da atividade antimicobacteriana, utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular. Resumidamente, em microplacas distintas com 96 poços, foram colocados os cultivos (*M. fortuitum* e *M. malmoense*) em contato com os extratos a serem avaliados, na forma bruta e partições. Incubou-se a 37°C e, passadas 48 horas, para *M. malmoense*, e quatro dias, para *M. fortuitum*, adicionou-se a resazurina. Inicialmente foi realizado o *screening* de suscetibilidade, para a determinação da

atividade dos extratos e partições de extratos vegetais em concentrações fixas de 100 µg/mL. A partir dos resultados do *screening*, para aqueles extratos que foram efetivos contra as micobactérias em estudo nessa concentração, foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI), utilizando concentrações iniciais de 200µg/mL.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 37 extratos vegetais avaliados, cinco apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *M. malmoense*: *Siparuna arianaeae*, *Cedrela fissilis*, *Ficus gomelleria*, *Plathymenia foliolosa* e *Peschiera affinis*. O extrato de *Plathymenia foliolosa* foi o único que apresentou atividade frente ao *M. fortuitum*, tendo, portanto, atividade frente às duas micobactérias avaliadas neste estudo (Tabela 1). Além disso, esse extrato apresentou atividade frente ao *M. tuberculosis*, embora em uma CMI mais baixa do que as observadas frente a *M. fortuitum* e *M. malmoense* (dados não-mostrados). O fato de que um mesmo extrato tenha sido ativo a distintas espécies pode indicar tanto uma inespecificidade quanto ao alvo ou, ao contrário, que o alvo seja de natureza tão essencial que seja conservado apesar da diversidade filogenética.

As CMI maiores para as MNT provavelmente se devam ao fato de que estes microorganismos são ambientais, o que, em geral, lhes confere maior resistência aos antimicrobianos e desinfetantes⁽⁵⁾.

TABELA 1 – Determinação das CMI dos extratos vegetais, na forma bruta, frente a *M. fortuitum* e *M. malmoense*

Extratos vegetais na forma bruta	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. malmoense</i>
<i>Siparuna arianaeae</i>	Resistente	200µg/mL
<i>Cedrela fissilis</i>	Resistente	200µg/mL
<i>Ficus gomelleria</i>	Resistente	100µg/mL
<i>Plathymenia foliolosa</i>	200µg/ml	100µg/mL
<i>Peschiera affinis</i>	Resistente	200µg/mL

A estreptomicina inibiu o crescimento das duas micobactérias com uma concentração de 4 µg/mL. O etambutol foi ativo frente ao *M. fortuitum* na concentração 16 µg/mL e não mostrou atividade frente ao *M. malmoense*. A isoniazida inibiu o crescimento de ambas as espécies na concentração de 1µg/mL, enquanto a rifampicina foi ativa nas concentrações de 1µg/mL e 0,25µg/mL para *M. fortuitum* e *M. malmoense* respectivamente.

Vários estudos têm mostrado que o perfil de sensibilidade às

drogas observadas nas MNT é bastante distinto daquele observado no *M. tuberculosis*. Em geral, mecanismos como mudanças na permeabilidade da parede celular, presença de β -lactamases, aminoglicosídeo acetiltransferases e bombas de efluxo parecem ser bem mais relevantes que mutações como ocorre no *M. tuberculosis*⁽⁵⁾.

Dentre os extratos que inibiram o crescimento dos microorganismos em questão, há possibilidade de se encontrar princípios ativos mais potentes, apresentando, quando purificados, uma CMI menor. É possível que alguns compostos ativos tenham tido a sua ação minimizada pela interação anatômica com outras moléculas presentes nos extratos, ou, ainda, que a concentração do princípio ativo na mistura possa estar reduzida. A determinação da CMI de um extrato, em sua forma bruta, pode ou não ser um confiável indicador das chances de sucesso no isolamento de um agente antimicobacteriano potente. Há a possibilidade de determinado extrato com alta atividade (CMI relativamente baixa) conter grandes quantidades de compostos com moderada atividade antimicobacteriana. Em contrapartida, extratos com CMI moderadas podem ter, dentre seus componentes, quantidades pequenas de compostos com alta atividade antimicobacteriana⁽¹⁵⁾. A inibição do crescimento bacteriano por alguns extratos avaliados neste estudo permite inferir que essas plantas podem apresentar potencial como fonte para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Outros estudos que busquem identificar princípio(s) ativo(s), mecanismos de ação, determinação da citotoxicidade, avaliação de sinergismos e antagonismo são necessários para o encaminhamento dos ensaios *in vivo*.

Neste estudo, demonstramos os altos níveis de resistência do *M. malmoense* e *M. fortuitum* frente aos clássicos anti-TB, bem como a atividade frente a essas micobactérias, de extratos de plantas da Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

1. Leão SC. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of *Mycobacteria*. Berlin: Vanden Broele, Brugge; 2004.
2. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of Human Pulmonary Infection with *Nontuberculous Mycobacteria*. Clin. Chest. Med.; 2002; 23(3): 553-567.
3. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology. 10. ed. St. Louis: Mosby; 1998.
4. Haverkamp MH, Arend SM, Lindeboom JA, Hartwig NG, Van Dissel JT. Nontuberculous mycobacterial Infection in Children: a 2-year prospective surveillance study in the Netherlands. Clin. Infect. Disease; 2004; 39: 450-457.

5. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J. Med. Res.*; 2004; 120: 290-304.
6. Falkinham JO 3rd. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin. Chest. Med.*; 2002; 23(3): 529-551.
7. Casal M. Cómo denominar a las micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* y a *M. Leprae*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*; 2003; 21(6): 296-298.
8. Metchock BG, Nolte FS, Wallace Jr. RJ. Mycobacterium. In: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology*. 7.ed. Washington: American Society for Microbiology (ASM); 1999; p. 399-437.
9. Newton SM, Lau C, Wright CW. A review of antimycobacterial natural products. *Phytother. Res.*; 2000; 14: 303-322.
10. Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.*; 2001; 67: 685-694.
11. Seidel V, Taylor PW. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 2004; 23: 613-619.
12. Okunade AL, Elvin-Lewis MPF, Lewis WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*; 2004; 65: 1017-1032.
13. Leitão SG, Castro O, Fonseca EN, Julião LS, Tavares ES, Leo RRRT, et al. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2006; 16: 6-11.
14. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Rezasurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 2002; 46(8): 2720-2722.
15. Pauli GF, Case RJ, Inui T, Wang Y, Cho S, Fischer NH, Franzblau SG. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences*; 2005; 78: 485-494.

