

ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* e do 6,7-DEHIDROROILEANONA EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS E O EFEITO *IN VITRO* DA COMBINAÇÃO COM FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE

Andressa Miyuki Takeshiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vanessa Pietrowski Baldin, Andressa Lorena Ieque, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Wanessa de Campos Bortolucci, Zilda Cristiane Gazim, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: *Mycobacterium* spp., *Tetradenia riparia*, checkerboard

Resumo:

A tuberculose, causada principalmente por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), é uma patologia infecciosa e transmissível, considerada um grave problema de saúde pública e que afeta principalmente os pulmões. Outro grupo de micobactérias capazes de atingir este órgão são as micobactérias não tuberculosas. Com o avanço desses micro-organismos em resistir aos mecanismos de ação dos fármacos, é de significativa importância a descoberta de substâncias com atividade antimicobacteriana. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atuação do óleo essencial de *Tetradenia riparia*, bem como da substância isolada 6,7-dehidroroileanona contra micobactérias não tuberculosas através do método *resazurin broth microdilution assay*, além disso, verificar a ação sinérgica do 6,7-dehidroroileanona com fármacos utilizados no tratamento da tuberculose frente *Mtb* H₃₇Rv pelo método *checkerboard*. Os resultados demonstraram que o óleo essencial e o diterpeno possuem ação frente aos agentes etiológicos avaliados. Adicionalmente, o efeito sinérgico entre 6,7-dehidroroileanona e pirazinamida contra a cepa padrão H₃₇Rv sugere esta substância como um potente candidato a novos estudos na busca por fármacos antituberculose.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que tem como o principal agente etiológico o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e afeta principalmente os pulmões. É uma doença que tem cura se o paciente aderir e colaborar com o tratamento, caso contrário, pode levar a seleção de bacilos resistentes aos fármacos do esquema terapêutico e até o óbito (BRASIL, 2019). Além disso, espécies de micobactérias não tuberculosas (MNTs), conhecidas como micobactérias ambientais, são responsáveis por ocasionar doença pulmonar semelhante ao da TB. Ambas possuem em comum a dificuldade por parte dos pacientes quanto à adesão ao tratamento, seja por duração longa de esquema terapêutico, os custos ou efeitos adversos. Devido a essa dificuldade encontrada pelos pacientes e o conhecimento

de atividades antibacterianas promissoras provenientes dos componentes de plantas (GAZIM et al., 2014), este trabalho tem como finalidade verificar a ação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO), bem como da substância 6,7-dehidrooleanona (6,7-D) contra MNT; e avaliar a interação da substância pura com fármacos utilizados na terapia anti-TB em *Mtb*.

Materiais e métodos

Determinação da atividade do óleo essencial extraído das folhas de *Tetradenia riparia* e do 6,7-dehidrooleanona em micobactérias não tuberculosas

A extração do TrEO e da substância isolada (6,7-D) foi realizada de acordo com Gazim et al. (2014). 6,7-D foi avaliado frente MNTs de crescimento rápido (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium bolletti*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium smegmatis*) e de crescimento lento (*Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*). A determinação das atividades das substâncias contra as MNTs foi realizada pelo método *resazurin broth microdilution assay* (REBMA), como descrito por CASTILHO et al. (2015). Primeiramente, as substâncias, previamente preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), foram diluídas seriadamente em meio MHB com CaCl_2 e MgCl_2 , nas concentrações de 250 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$. Para as MNTs de crescimento lento, o meio foi enriquecido com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC). As espécies de MNTs de crescimento rápido e lento foram padronizadas por comparação visual da turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), diluídas na proporção 1:300 em meio MHB e acrescidos nos orifícios das respectivas placas. Em seguida, as placas foram seladas e incubadas a 30 °C por 3-4 dias para as MNTs de crescimento rápido e a 35°C por 7 dias para as MNTs de crescimento lento. Após esse período, as placas foram reveladas com solução de resazurina 0,02%, reincubadas e realizada leitura visual após 24 horas.

Determinação da atividade in vitro da combinação do diterpeno 6,7-dehidrooleanona com fármacos utilizados na terapia da tuberculose frente a cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*

Para avaliar a atividade da combinação do 6,7-D com fármacos anti-*M. tuberculosis* frente a cepa padrão *Mtb H37Rv*, foi utilizado o método *checkerboard*, conforme descrito por Eliopoulos & Moellering (1996). Inicialmente, tanto o 6,7D quanto os fármacos previamente preparados foram diluídas em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Na combinação da substância com a PZA o meio foi acidificado para o pH 6,1 e realizada diluição seriada. A cepa padrão foi semeada no meio Middlebrook 7H9 com OADC por 15-21 dias a 35 °C. Em seguida, o inóculo bacteriano foi padronizado de acordo com o tubo da escala 1 de McFarland e diluído na proporção de 1:20 em 7H9-OADC ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) e acrescidos nos respectivos orifícios da microplaca. Após, as placas foram seladas e incubadas por 7 dias a 35 °C e reveladas com solução de resazurina 0,02 % para leitura visual após 24 horas de reincubação. O efeito sinérgico foi avaliado calculando o Índice da

Fração Inibitória (FICI), sendo que os efeitos das combinações dos agentes antimicrobianos foram classificados em: sinérgico ($FICI \leq 0,5$), aditivo ou indiferente ($FICI >0,5$ e < 4) e antagônico ($FICI >4$).

Resultados e Discussão

TrEO e 6,7-D foram avaliados frente a 11 espécies de MNTs (Tabela 1), apresentando atividade tanto para as MNTs de crescimento lento quanto para as de crescimento rápido. Os valores de CIM variaram entre 31,25 a $>250 \mu\text{g/mL}$ para o TrEO e entre 15,62 e $>250 \mu\text{g/mL}$ para o 6,7-D, destacando a atividade promissora do TrEO contra *M. abscessus*, com CIM 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e do 6,7-D contra *M. chelonae*, com CIM 15,62 $\mu\text{g/mL}$. Sendo valores promissores, sabendo que algumas MNTs estão largamente associadas com infecções humanas, em especial micobactérias de crescimento rápido e predominantemente *M. abscessus*, visto que causa infecções graves e de difícil tratamento.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) do 6,7-dehidroroileanona e do óleo essencial de *Tetradenia riparia* frente a micobactérias não tuberculosas (MNT)

	MNT	CIM $\mu\text{g/mL}$	
		TrEO	6,7-D
MNT de crescimento rápido	<i>Mycobacterium abscessus</i>	31,25	NR
	<i>Mycobacterium bolletii</i>	62,5	NR
	<i>Mycobacterium chelonae</i>	NR	15,62
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	62,5	>250
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	125	62,5
	<i>Mycobacterium massiliense</i>	62,5	NR
MNT decrescimento lento	<i>Mycobacterium gordonae</i>	>250	NR
	<i>Mycobacterium kansasii</i>	125	62,5
	<i>Mycobacterium szulgai</i>	62,5	NR

TrEO: óleo essencial de *Tetradenia riparia*; 6,7-D: 6,7-dehidroroileanona; NR: não realizado.

Recentemente, Baldin et al. (2018) reportou 6,7-D com potencial atividade anti-*Mtb* em pH neutro, o que nos encorajou a seguir com os ensaios de associação de fármacos. Neste estudo, avaliou-se a atividade do diterpeno associado com os fármacos anti-TB de primeira linha em pH normal e pH ácido, frente a cepa *Mtb* H₃₇Rv (Tabela 2). Nossos resultados mostraram que o 6,7-D foi ativo em pH ácido, além de apresentar sinergismo quando associado a PZA (FICI 0.28). Para as demais combinações analisadas, 6,7-D foi aditivo ou indiferente.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do 6,7-dehidroroileanona e dos fármacos isolados e combinados, além da interação sinérgica da substância com os fármacos.

CIM µg/mL				CIM da combinação µg/mL				FICI			
pH 6.8		pH 6.1		pH 6.8		pH 6.1		pH 6.8		pH 6.1	
6,7D	H E R	6,7D	Z	6,7D+H	6,7D+E	6,7D+R	6,7D+Z	6,7D+H	6,7D+E	6,7D+R	6,7D+Z
31,3	0,06 1 0,02	31,3	100	31,25/ 0,06	31,25/ 1	15,625/ 0,003	31,25/ 3,125	2	2	0,75	0,28

FICI: Índice de Fração Inibitória; 6,7D: 6,7-dehidroroileanona; H: isoniazida; E: etambutol; R: rifampicina; Z: pirazinamida.

Conclusões

Nossos resultados mostraram atividade antimicobacteriana do TrEO e da substância pura 6,7-D, sendo mais ativos em *M. abscessus* e *M. chelonae*, respectivamente. Adicionalmente, o 6,7-D apresentou efeito sinérgico com pirazinamida frente à cepa padrão H₃₇Rv, e aditivo ou indiferente com os demais fármacos de primeira linha utilizados na terapia da doença. Com isso, expande-se a possibilidade no desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos para *Mycobacterium spp.*, sendo necessário mais estudo a fim de elucidar melhor a ação dessas moléculas nos bacilos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, a Professora Dra. Regiane Bertin de Lima Scodro pela orientação do projeto, a Doutoranda Vanessa Baldin pelo auxílio durante a realização deste trabalho e a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização do projeto de pesquisa.

Referências

BALDIN et al. *Anti-Mycobacterium tuberculosis* activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae). **Phytomedicine**, 47, 34-39, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**, 2º Edição, 2019.

CASTILHO et al. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 119-121, 2015.

ELIOPOULUS et al. **Antimicrobial Combinations** In: Lorian, V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore, MD; Williams & Wilkins, 330-396, 1996;

GAZIM et al. New Natural Diterpene-Type Abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant Activities. **Molecules**, 19, 514-524, 2014.