ENEPEX
ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

Avaliação da atividad anti-*Mycobacterium tuberculosis* da *Annona sylvatica*

Lucas Lopes e Silva[1], Julio Henrique Rosa Croda[2], Rafaele Carla Pivetta de Araujo[2], Flora Martinez Figueira Moreira[2]

[1] Bolsista de iniciação científica PIBITI-CNPQ

[2] Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (FCS/UFGD)

RESUMO

O Brasil está entre os 22 países que possuem concentração de 80% da carga mundial de tuberculose, tornando-se indispensável à busca por novos fármacos para tratamento, principalmente devido a existência de cepas resistentes as drogas disponíveis, consequência do abandono do tratamento, como também do uso inadequado das drogas, gerando situação desfavorável por requerer drogas de elevado custo e toxidade, evidenciando a grande importância na busca de novos fármacos. As plantas medicinais estão possibilitando importante avançado ao controle de doenças, principalmente as infecciosas. O país detém uma das maiores biodiversidades em escala mundial, possuindo a *Annona sylvatica* planta nativa brasileira encontrada no sul e em alguns estados do sudeste do país, sendo utilizada na medicina popular como antipirético, mas com grande potencial na atividade anti- *M. tuberculosis*, tendo seus extratos determinados seguindo o método de ensaio de microplaca com resazurina (REMA), descrita por PALOMINO, *et al*, 2002. Foram adicionadas 100 µL do inoculo contendo as cepas em cada poço de uma placa de 96 poços de microtitulação com os extratos. Os testes foram realizadas em duplicata. As placas foram incubadas durante sete dias, à 37° C, e após este período, 30 µl de 0,1 mg/mL de resazurina foi adicionado. As placas foram lidas após 24h, me fluorescência, medida em SPECTRAfluor Plus

(TECAN) microfluorimetro (filtros de excitação/emissão de 530/590nm, respectivamente). Das frações de *Annona sylvatica* (CIM: 117,1µg/mL), utilizada na avaliação da atividade antimicobacteriana, dois apresentaram potencial, sendo a Luteolina e Almunequina.

Palavras-chave: *Annona sylvatica,* atividade anti- *M. tuberculosi,* planta medicinal.

INTRODUÇÃO

Com a maior biodiversidade do mundo o Brasil apresenta cerca de 20% do total de espécies do planeta, tendo um grande patrimônio genético, e é no desenvolvimento de novos medicamentos obtidos diretamente ou indiretamente de produtos naturais que se tem maior potencial de crescimento (CALIXTO, 2003).

A utilização de plantas medicinais para o combate a vários tipos de doenças é algo relativamente comum na sociedade brasileira, principalmente nas comunidades indígenas onde este conhecimento é largamente difundido e utilizado ha décadas, conhecimento este, que pesquisadores vêm a campo buscar, com a finalidade de identificar plantas que possam levar à candidatos a novos medicamentos (NEWMAN, 2003).

A biodiversidade tem grande importância na produção de fitomedicamentos constituídos de extratos padronizados de uma ou mais plantas. De acordo com a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os fitomedicamentos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado. Suas propriedades ativas, em geral, são pouco conhecidas e acredita-se que a ação farmacológica desses produtos envolva a interação de inúmeras moléculas presentes no extrato. (CALIXTO, 2003).

Annona sylvatica é uma planta nativa brasileira, sendo encontrada em Minas Gerais, e de São Paulo ao Rio Grande do Sul, suas folhas são usadas principalmente como antipirético na medicina popular, não havendo relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana desta espécie, mas com relatos de atividade anti-inflamatória e propriedades anticancerígenas (FORMAGIO, 2013).

O Brasil faz parte dos 22 países priorizados pela OMS para combate a tuberculose, por juntos apresentarem concentração de 80% da carga mundial de

tuberculose, onde em 2007 foram notificados 72.000 casos novos, tendo um coeficiente de incidência de 38/100.000 habitantes. Assim sendo o Brasil classificado em 19ª posição em relação ao número de casos e na 104º posição em relação ao coeficiente de incidência (OMS, 2009).

A tuberculose é mais comum em homens em idade produtiva (OMS – TB Global Report, 2012), tendo um período base de seis meses de tratamento com a utilização de quatro drogas no esquema primário, podendo ocorrer o surgimento de cepas multidroga-resistentes (MDR), consequência do abandono do tratamento, como também o uso inadequado das drogas, gerando situação que favorece a manutenção da doença, pois o tratamento da tuberculose MDR é mais longo e requer drogas de elevados custo e toxidade (SANTOS, 2009 e FERGUSIN,2009).

A prevalência de cepas MDR também está relacionada às interações resultantes da co-infecção TB e HIV (DHEDA *et al*., 2004). Onde as drogas utilizadas para o tratamento de cepas MDR são menos efetivas, prologando o tempo do tratamento, e aumentando o risco de ocorrência de efeitos indesejáveis, ocasionando a diminuição da adesão, e aumentando as taxas de falha do tratamento (ARBEX, 2010 e AFFOLABI, 2008).

Este contexto evidencia a necessidade de medidas alternativas para o tratamento da tuberculose, onde novas drogas podem surgir da identificação de extratos ativos de plantas medicinais, podendo acarretar a redução do tempo e da complexidade do tratamento contra cepas resistentes. Apresentando nossa região condições para desenvolver tal pesquisa por sua grande biodiversidade, com uma metodologia eficaz pode se analisar os extratos ativos antimicobacterianos das plantas para que possam contribuir no combate à tuberculose.

OBJETIVOS

Caracterizar a ação antimicobacteriana *in vitro* de extratos de plantas através do método de redução da resazurina (REMA).

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos farmacológicos

Foi realizado o fracionamento do extrato de Annona sylvatica, resultando em três frações: Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Hidrometanólica (FHM), para serem posteriormente avaliados referente à sua atividade antimicobacteriana. Pesquisou-se as CIMs (concentrações inibitórias mínimas) do extrato bruto, das frações (CF, FAE, HMF) e dos compostos isolados (quercetina, luteolina e almunequina). Foram utilizadas como controle para o teste, as drogas padrão recomendadas para o tratamento da tuberculose: Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina e Etambutol. Os extratos testados foram submetidos à solubilização em solução aquosa com 0,1% de DMSO, nas concentrações a serem testadas (até 250µg/mL)

A atividade anti-*M. tuberculosis* dos extratos foi determinada seguindo o método de ensaio de microplaca com resazurina (REMA), descrita por PALOMINO, *et al*, 2002.

M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 foi cultivada durante 15 dias, em caldo Middlebrook 7H9, suplementado com OADC (BBL / Becton-Dickinson), contendo ácido oleico, albumina, dextrose e catalase, 0,5% de glicerol como fonte de carbono, e 0,5% de Tween 80, para evitar grumos. As suspensões foram preparadas e a turbidez foi ajustada para McFarland nº 1.

As soluções-mãe dos extratos testados foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO) e as diluições param obtenção das concentrações finais que variaram de 0,98 a 250µg/mL, foram preparadas em caldo Middlebrook 7H9, suplementado com OADC. Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina e Etambutol foram dissolvidas de acordo com a recomendação do fabricante, e utilizadas como drogas padrão.

Para atingir a concentração final de suspensão bacteriana, foi adicionado 100µL do inóculo a cada poço de uma placa de 96 poços de microtitulação com os extratos. Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas durante sete dias, à 37° C, e após este período, 30 µl de 0,1 mg/mL de resazurina foi adicionado. As placas foram lidas após 24h, me fluorescência, medida em SPECTRAfluor Plus (TECAN) microfluorimetro (filtros de excitação/emissão de 530/590nm, respectivamente). A CIM (concentração inibidora mínima) foi definida como a menor concentração que resulta em 90% de inibição do crescimento de *M. tuberculosis*. Os valores de MIC da isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol foram determinados numa única placa, como ensaios padrões (COLLINS, 1997).

Amostras com valor de CIM < 125µg/mL foram definidas como ativas contra *M. tuberculosis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações de *Annona sylvatica* (CIM: 117,1µg/mL), utilizada na avaliação da atividade antimicobacteriana apenas o EAF apresentou atividade (115.2µg/mL), sendo isolados três compostos: Luteolin, Quercetin e Almunequin com resultados de CIM de 286.8, >250 e 209.9, respectivamente (Tabela 1). Dos três compostos testados, dois apresentaram potencial atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*, sendo eles Luteolina e Almunequina.

O resultado da CIM de medicamentos padronizados, utilizados como controle para os testes de atividade antimicobacteriana está de acordo com o relatado pela literatura: isoniazida (0.06µg/mL), rifampicina (0,03 - 0.06µg/mL), estreptomicina (0.25µg/mL) e etambutol (2,0 - 4.0µg/mL) (COLLINS, 1997).

Tabela 1. CIM da *A. sylvatica*, frações e compostos isolados frente à *M. tuberculosis* (REMA)

Fração	CIM (µg/mL)	CIM (µM)
A. sylvatica	117,1	-
FC	> 250	-
EAF	115,2	-
FHM	> 250	-
Luteolina	236,8	827,28
Quercetina	> 250	-
Almunequina	209,9	328,48
Isoniazida	0,05	-
Rifampicina	0,1	-
Estreptomicina	0,28	-
Etambutol	1,88	-

Os valores apresentados são médias das duplicatas.

CONCLUSÃO

Pela primeira vez realizou-se avaliação da atividade antimicobacteriana do extrato metanólico de *A. sylvatica*, demonstrando também que sua fração acetato de etila e seus compostos isolados possuem potencial atividade antimicobacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALIXTO, J.B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, Sept. 2003.

COLLINS L, FRANZBLAU S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Vol. 41, No. 5. p.1004-1009, 1997.

DHEDA, K., LAMPE, F.C., JOHNSON, M.A., LIPMAN, M.C. Outcome of HIV-associated tuberculosis in the era of highly active antiretroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v.190, n.9, Nov 1, p.1670-6. 2004.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F.; Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Vol. 46, No. 8, p.2720-2722, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Control-Suerveillance**, Planning, Financing: WHO Report. Geneva: WHO; 2009

COLLINS L, FRANZBLAU S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Vol. 41, No. 5. p.1004-1009, 1997.

NEWMAN, D. J., G. M. CRAGG, SNADES, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, Jul, p.1022-37. 2003.

FORMAGIO, A.S. VIEIRA M. do C. DOS SANTOS, L.A. CARDOSO C.A. FOGLIO M.A. DE CARVALHO, J.E. ANDRADE-SILVA, M. KASSUYA, C.A. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from Annona sylvatica A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, v.16, 2013.

SANTOS, J.L., et al., Synthesis and in vitro anti Mycobacterium tuberculosis activity of a series of phthalimide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, Nov, p.3795-9, 2009.

FERGUSIN, L.A. and J. RHOADS. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: The new face of an old disease. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v.21, Nov, p. 603-9, 2009.

ARBEX, M.A., et al., Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36, Jun, p. 641-56, 2010.

AFFOLABI, D., et al., Rapid detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methords: Resazurin and nitrate reductase assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p. 1024-7, 2008.