



Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*

Arantes, V.P.^{1,2}; Sato, D.N.³; Vilegas, W.⁴; Santos, L.C.⁴; Leite, C.Q.F.^{1*}

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

² Departamento de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense, UNIPAR, Paranavaí, PR

³ Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP

⁴ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Recebido 18/08/05 / Aceito 14/03/06

RESUMO

Mycobacterium fortuitum é uma micobactéria de crescimento rápido, ubíquo na natureza e relacionada a micobacteriose de importância médica. Ela tem sido isolada de bacteremias, abscessos, endocardites, feridas cirúrgicas e traumáticas. De difícil tratamento, o bacilo é reconhecido na literatura como resistente inclusive aos medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose. O objetivo deste trabalho foi pesquisar extratos vegetais do Cerrado brasileiro com atividade contra *M. fortuitum*, empregando a técnica do *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) como método analítico. Dos 26 extratos testados frente ao *M. fortuitum*, o extrato apolar de *Quassia amara* (extrato diclorometânico) foi o que apresentou melhor resultado com valor de CIM de 62,5µg/mL seguidos pelos extratos apolares de *Syngonanthus macrolepsis*, *Davilla elliptica*, *Turnera ulmifolia* com CIM de 125µg/mL. Para as mesmas plantas analisadas, utilizando-se agentes extratores polares (etanol e metanol), foram verificados CIM superiores a 500µg/mL. Os valores foram semelhantes aos de extratos de outras plantas analisadas sendo considerados não promissores.

Palavras-chave: *M. fortuitum*, plantas do Cerrado, fitoterápicos, *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA).

INTRODUÇÃO

Mycobacterium fortuitum causa infecções pulmonares, septicemia, infecções cardíacas, infecções em feridas cirúrgicas e em feridas traumáticas. O microrganismo também pode ser encontrado como contaminante de aparelhos médicos e soluções, afetando principalmente pacientes imunodeprimidos (Blanco et al., 2002). Esta micobactéria de crescimento rápido foi descrita pela primeira vez em 1938 por Costa Cruz (Falkinham III, 1996) sendo naturalmente resistente aos medicamentos utilizados no tratamento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Swenson et al., 1985; Goodfellow & Magee 1998). Segundo

Unni et al. (2005), *M. fortuitum* também é resistente aos medicamentos empregados no esquema terapêutico da tuberculose. Neste sentido, salienta-se a necessidade da pesquisa de novos compostos, menos tóxicos e mais efetivos contra *M. fortuitum*.

A descoberta de novas drogas representa um desafio principalmente em relação as substâncias com atividade contra micobactérias que são organismos de crescimento lento, patogênicas e, sua parede rica em lipídio, representa verdadeira proteção contra os agentes agressores (Rando et al., 2002). As plantas através de vias metabólicas secundárias produzem diversos compostos, sendo já verificada atividade biológica contra micobactérias em algumas classes de terpenóides (Cantrell et al., 2001) e fialinas (Pietro et al., 2000; Januário et al., 2002). Em relação à polaridade, os extratos vegetais apolares são pouco estudados, pois requerem uso de solventes e meios de culturas especiais para a execução do trabalho experimental. No entanto, devido à alta porcentagem de lipídios na parede das micobactérias, são os extratos e princípios ativos apolares, os mais promissores em relação à atividade antimicobacteriana. (Grange, 1998; Goodfellow & Magee, 1998).

A atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a micobactérias pode ser avaliada por diferentes metodologias (Cardoso et al., 2004), sendo determinada preferencialmente pela microtécnica em placas de 96 poços denominada de MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*). Nesta, é verificada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato necessário para inibir em 90% a proliferação bacteriana. O corante *Alamar Blue* é empregado para avaliar a viabilidade bacilar (Franzblau et al., 1998). A técnica do MABA tem sido utilizada por diversos autores para triar princípios ativos naturais (Pietro et al., 2000; Januário et al., 2002) e novas drogas sintéticas (Rando et al., 2002; Kritski, 2003) com atividade contra o bacilo da tuberculose.

Neste estudo procurou-se pesquisar plantas do Cerrado brasileiro com atividade contra *M. fortuitum* empregando o MABA para avaliar atividade antimicobacteriana dos extratos vegetais.

*Autor correspondente: Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite - Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - 14801-902 - Araraquara - SP. e-mail: leitecqf@fctfar.unesp.br - Fone: (16) 3301-6953

MATERIAL E MÉTODOS

Material analisado: Foram analisados 26 extratos vegetais (Tabela 1). Os espécimes vegetais foram coletados e identificados pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro do Instituto de Biociências da Unicamp (2001-2003) e os extratos vegetais obtidos no Instituto de Química –UNESP.

Obtenção de extratos: Para a obtenção dos extratos polares e apolares, em linhas gerais, o material vegetal foi desidratado em estufa a 50°C e pulverizado em moinho de facas. O pó obtido (500g) foi submetido à extração exaustiva por maceração com clorofórmio ou diclorometano (extratos apolares) e etanol ou metanol (extratos polares), à temperatura ambiente por 48 horas, empregando no total dois litros de cada solvente. Em seguida, os solventes foram evaporados a 60°C sob pressão reduzida. Os extratos secos foram transferidos para frascos de vidro e armazenados em geladeira até sua utilização. Para o uso, inicialmente os extratos foram diluídos em DMSO obtendo assim concentrações denominados de solução estoque, cujos valores são apresentados na Tabela 1.

Micobactéria empregada: Cultura confluenta crescida no meio de Lowenstein-Jensen (LJ) da cepa padrão de *M. fortuitum* ATCC 6841 foi mantida sob refrigeração até o momento do uso. Para o ensaio inicialmente, foi retirada uma alçada que foi semeada no meio de Middlebrook 7H9 com incubação por 10 dias. A cultura foi então diluída até a turvação correspondente a turvação do tubo 1 da escala de MacFarland e a partir desta, realizada a diluição 1:25 que foi empregada como suspensão inoculante

Avaliação da atividade antimicobacteriana por MABA: Para determinar a atividade antimicobacteriana, a partir da

solução estoque os extratos foram diluídos para obter concentrações de 4000 a 62,5µg/mL. A atividade foi determinada em triplicatas utilizando microplacas estéreis de 96-poços. (Falcon 3072; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) e o método de MABA segundo Franzblau et al.(1998) com redução do tempo de incubação das micobactérias de cinco para dois dias. Reduziu-se o tempo de incubação das placas baseado no ensaio prévio descrito abaixo, pois Franzblau et al.(1998) padronizaram a metodologia para *M. tuberculosis*, micobactéria de crescimento lento e o *M. fortuitum* é de crescimento rápido. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da droga capaz de prevenir a alteração de cor do reagente *Alamar Blue* (Accumed International, Westlake, Ohio) de azul para rosa. A cor azul no poço foi interpretada como ausência de crescimento da micobactéria e a cor rosa como de viabilidade e multiplicação bacilar. No presente estudo foram considerados promissores, extratos com valor de CIM igual ou inferior a 250µg/mL.

Padronização do tempo de incubação: Para determinar o tempo de incubação e adição do *Alamar Blue*, a suspensão de *M. fortuitum* na diluição de 1:25 foi inoculada em microplacas e a partir de 24 horas de incubação, foram adicionados 25µL da solução de MABA na primeira coluna, com reincubação e leitura após 24 horas. Para os controles negativos foram adicionados 25µL de solução de *Alamar Blue* na segunda coluna e incubação por mais 24 horas, repetindo a operação, nos dias subsequentes, até a viragem da solução de *Alamar Blue* de azul para rosa. Neste procedimento, verificou-se que o melhor tempo de incubação para o *M. fortuitum* era de dois dias e a adição da solução reveladora de *Alamar Blue* foi padronizada para o segundo dia de incubação. No terceiro dia foi então realizada a leitura do teste.

Tabela 1 - Relação do componente do vegetal utilizado, agente extrator e concentração dos extratos utilizados na determinação da atividade antimicobacteriana.

Planta	Parte vegetal	Agente Extrator	Estoque (mg/mL)
1. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	Diclorometano	115
2. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	Metanol	630
3. <i>Byrsonima cinera</i>	Folhas	Metanol	292
4. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Clorofórmio	177
5. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Etanol	494
6. <i>Byrsonima crassa</i>	Aéreas	Clorofórmio	228
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	Folhas	Metanol	419
8. <i>Cissus suncicaulis</i>	Folhas	Clorofórmio	159
9. <i>Curatella americana</i>	Cascas	Clorofórmio	173
10. <i>Davilla elliptica</i>	Folhas	Diclorometano	211
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	Escapos	Clorofórmio	500
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	Escapos	Clorofórmio	206
13. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	Diclorometano	224
14. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	Metanol	729
15. <i>Quassia amara</i>	Cascas	Diclorometano	53
16. <i>Solanum cernuum</i>	Folhas	Diclorometano	225
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	Metanol	679
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	Diclorometano	183
19. <i>Syngonanthus arthrochichus</i>	Escapos	Diclorometano	195
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	Capitulo	Etanol	214
21. <i>Syngonanthus macrolepis</i>	Escapos	Diclorometano	163
22. <i>Syngonanthus macrolepis</i>	Escapos	Clorofórmio	199
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Escapos	Etanol	718
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanol	729
25. <i>Turnera ulmifolia</i>	Flores	Clorofórmio	87
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	Folhas	Diclorometano	260

RESULTADOS

Os resultados da atividade antimicobacteriana dos diferentes extratos são apresentados na Tabela 2. Os valores de CIM variaram num intervalo de 62,5 a 4000 µg/mL. Com exceção de extratos apolares de *Q. amara*, de *D. elliptica*, de *S. macrolepis* e de *T. ulmifolia*, os demais extratos apresentaram valores de CIM iguais ou superiores a 500 µg/mL. O extrato apolar de *Q. amara* apresentou valor de CIM promissor de 62,5 µg/mL, seguidos pelos extratos apolares de *D. elliptica*, *S. macrolepis* e *T. ulmifolia* com CIM de 125 µg/mL. Para as mesmas plantas analisadas, utilizando extratores polares (etanol ou metanol), foram verificados CIM superiores a 500 µg/mL.

Tabela 2 - Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o *M. fortuitum* ATCC 6841 pela técnica do MABA.

Planta	Agente Extrator	CIM (µg/mL)
1. <i>Ananas ananassoides</i>	DCM	4000
2. <i>Ananas ananassoides</i>	Metanol	4000
3. <i>Byrsonima cinera</i>	Metanol	1000
4. <i>Byrsonima crassa</i>	Clorofórmio	4000
5. <i>Byrsonima crassa</i>	Etanol	4000
6. <i>Byrsonima crassa</i>	Clorofórmio	500
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	Metanol	4000
8. <i>Cissus suncicaulis</i>	Clorofórmio	1000
9. <i>Curatella americana</i>	Clorofórmio	4000
10. <i>Davilla elliptica</i>	Diclorometano	125
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	Clorofórmio	500
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	Clorofórmio	1000
13. <i>Mouriri pusa</i>	Diclorometano	4000
14. <i>Mouriri pusa</i>	Metanol	4000
15. <i>Quassia amara</i>	Diclorometano	62,5
16. <i>Solanum cernuum</i>	Diclorometano	500
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Metanol 70%	4000
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Diclorometano	500
19. <i>Syngonanthus arthrochichus</i>	Diclorometano	500
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	Etanol	4000
21. <i>Syngonanthus macrolepis</i>	Diclorometano	1000
22. <i>Syngonanthus macrolepis</i>	Clorofórmio	125
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Etanol	4000
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Etanol	4000
25. <i>Turnera ulmifolia</i>	Clorofórmio	125
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	Diclorometano	125

DISCUSSÃO

A necessidade de pesquisas de novas drogas para tratamento de micobacterioses, é relatada por diferentes autores (Swenson et al., 1985; Brown et al., 1992). Neste estudo, para *M. fortuitum* valores de CIM igual ou inferior a 125 µg/mL foram encontrados apenas nos extratos apolares de *Q. amara*, *D. elliptica*, *S. macrolepis*, *T. ulmifolia* e *T. ulmifolia* indicando que extratos apolares destas plantas têm componentes com atividade promissoras contra *M. fortuitum*. A elevada concentração de lipídios de alto peso molecular presentes na parede de micobactérias (Cantrell

et al., 2001) provavelmente funcionou como uma barreira para os compostos polares, justificando os valores mais promissores para os extratos apolares. Os componentes ativos apolares sendo compostos lipofílicos, provavelmente puderam permear mais facilmente a barreira lipídica presente na parede das micobactérias.

Em relação aos componentes ativos presentes nos extratos, alguns óleos essenciais como terpenol, geraniol, citrionelol, cineol e outros presentes no gênero *Eucalyptus* L'Herit, são reconhecidas como bactericidas (Hinou et al., 1989; Leite et al., 1998). Outros constituintes químicos como os terpenóides, flavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e alcalóides também tem sido estudados quanto a sua atividade antimicrobiana (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Cantrell et al., 2001). As espécies *Q. amara*, *D. elliptica*, *S. macrolepis*, *T. ulmifolia* e *T. ulmifolia*, que neste trabalho apresentaram melhor atividade antimicobacteriana, possuem como constituintes flavonóides, triterpenos e esteróides (David et al., 1996; Cantrell et al., 2001) os quais são melhor extraídos por extratores apolares (Other Phytochemical Screening, 2004).

Os terpenóides são chamados de inseticidas naturais e esta classe integra os limonóides, limoneno e o mirceno, os quais desempenham um papel de proteção às plantas contra os insetos. Alguns terpenóides já foram testados e apresentaram atividade contra micobactérias (Cantrell et al., 2001). Os terpenos são formados por unidades básicas de isopentenil-pirofosfato ou isopreno ativo, originando os triterpenos e os sesquiterpenos já citados na literatura como substâncias dotadas de ação bactericida (Pietro et al., 2000; Januário et al., 2002). Os flavonóides constituem um grande grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza que protegem as plantas contra infecções bacterianas e fúngicas (Hamburger & Hostettman, 1991).

Em relação ao método analítico, o método do MABA empregado neste trabalho apresentou inúmeras facilidades na triagem de extratos vegetais com atividade antimicobacteriana como rapidez nos resultados, sensibilidade e possibilidade de testar inúmeros compostos empregando quantidade reduzida de extratos vegetais. Outras vantagens que podem ser citadas são: não alterar a constituição dos componentes termolábeis e possibilidade de avaliar concentrações múltiplas e diversos extratos simultaneamente (Franzblau et al., 1998).

MABA foi empregado neste trabalho para determinar a atividade de substâncias naturais contra o *M. fortuitum*. Para *M. tuberculosis* já é preconizando a incubação de cinco dias para adição da solução de *Alamar Blue* (Franzblau et al., 1998). Para *M. fortuitum* com menor tempo de geração, foi padronizada a aplicação do corante *Alamar Blue* após dois dias de incubação. O estudo mostrou a viabilidade da utilização do MABA mesmo para as micobactérias de crescimento rápido, fato que possibilita estudo de novas drogas contra *M. fortuitum* que mesmo pertencendo ao gênero *Mycobacterium*, apresenta sensibilidade diferenciada em relação ao *M. tuberculosis*.

Com os resultados deste trabalho pode-se concluir que a técnica do MABA pode ser usada, com sucesso, na triagem rápida de extratos vegetais com atividade contra

M. fortuitum utilizando tempo de incubação de dois dias e que extratos apolares de *Q. amara*, *D. elliptica*, *S. macrolepis* e *T. ulmifolia* apresentam atividade promissora contra esta bactéria.

AGRADECIMENTOS: AUXILIO FAPESP 02/05503-6

ABSTRACT

Brazilian cerrado plants active against Mycobacterium fortuitum

***Mycobacterium fortuitum* is a rapidly-growing species of bacteria, ubiquitous in the environment and related to important human mycobacterioses. It has been isolated from blood, abscesses, the endocardium and surgical and traumatic wounds. This mycobacterium is hard to treat, being recognized in the literature as resistant even to the drugs used in the treatment of tuberculosis. The objective of this study was to screen extracts prepared from plants of the Brazilian cerrado (extended savanna-like belt) with known activity against *M. fortuitum*, employing the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) as the analytical method. Out of 26 extracts tested against *M. fortuitum*, the nonpolar extract of *Quassia amara* (in methylene dichloride) gave the best result (MIC 62.5µg/mL), followed by the nonpolar extracts of *Syngonanthus macrolepis*, *Davilla elliptica* and *Turnera ulmifolia*, with equal MICs of 125µg/mL. The polar extracts (in ethanol and methanol) obtained from the same plants were considered inactive, since the MIC values determined were above 500µg/mL and not significantly different from those of extracts from other plants, without known activity.**

Keywords: *M. fortuitum*, Cerrado plants, phytotherapy, Microplate Alamar Blue Assay (MABA).

REFERÊNCIAS

- Blanco RM, Inumar VTG, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E, Yoshida JTU, Telles MAS. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002;61(2):91-6.
- Brown BA, Swenson JM, Wallace JM. Agar disk elution test for rapidly growing mycobacteria. In: Isenberg H D. *Clinical Microbiology procedures handbook*. Washington Dc: American Society Microbiology, 1992. p.1-11.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock G, Barco P, Cecon L, Foresteiro F, Leite CQF, Sato DN, Shikima ML, Mamizuka EM, Hirata R, Hirata MH. Screening and Characterization of Mutation in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2004;48(9):3373-81.
- Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* 2001;67(1):1-10.
- Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova* 1998;21(1):99-105.
- David JM, Cruz FG, Guedes MLS, Chavez JP. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. *J Braz Chem Soc* 1996;7(1):115-8.
- Falkinham III JO. Epidemiology of infection by nontuberculous micobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(1):177-215.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Fuentes P, Cook MB, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Quenzer VK, Feerguson RM, Sheen P, Gilman RH. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *J Clin Microbiol* 1998;32(2):362-6.
- Goodfellow M, Magee JG. Taxonomy of mycobacteria. In: Gangadharam PRJ, Jenkins PA. *Mycobacteria: basic aspects*. New York: Champman & Hall; 1998. v.1, p.1-71.
- Grange JM. Pathogenesis of mycobacterial disease. In Gangadharam PRJ. and Jenkins PA. *Mycobacteria: basic aspects*. New York: Champman & Hall; 1998. v.1, p.145-75.
- Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 1991;30(1):3864-74.
- Hinou JB, Harvala CE, Hinou EB. Antimicrobial activity screening of 32 comomos constituents of essential oils. *Pharmazie* 1989;(44):302-3.
- Januário AH, Rodrigues E, Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN, França SC. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. *Phytother Res* 2002;16(5):445-8.
- Kritski, AL. Perfil dos pacientes portadores de *Mycobacterium* sp. *J. Pneumologia* 2003;29(6):338-9.
- Leite CQF, Moreira RRD, Jorge Neto J. Action of Eucaliptus oils against *Mycobacterium avium*. *Fitoterapia*. 1998;1:282-3.
- Other Phytochemical Screening. *Presence of compounds in Amargo (Quassia amara)* 2004. Disponível em: <http://www.Rain-tree.com/amargo-chemicals.pdf>. [2004 dez 12]
- Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN, Januário AH, França SC. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine* 2000;7(4):335-8.
- Rando DG, Sato DN, Siqueira L, Malvezzi A, Leite CQF, Amaral AT, Ferreira EI, Tavares LC. Potential Tuberculostatic Agents, Topliss Application on Benzoic Acid. *Bioorg Med Chem* 2002;10:557-60.
- Swenson JM, Wallace Jr RJ, Silcox VA, Thornsberry AC. Antimicrobial susceptibility of five subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28(6):807-11.
- Unni M, Jesuadason MV, Rao S, George B. *Mycobacterium fortuitum* bacteraemia in an immunocompromised patient. *Indian J Med Microbiol* 2005;23(2):137-8.