

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PATRÍCIA CONCEIÇÃO GONZALEZ DIAS

**"TESTE *IN VITRO* DE EXTRATO DE PLANTA DO CERRADO
(*Gochnatia polymorpha*) CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*, NA
BUSCA DE NOVAS DROGAS CONTRA A TUBERCULOSE"**

DOURADOS-MS, OUTUBRO, 2012

PATRÍCIA CONCEIÇÃO GONZALEZ DIAS

**"TESTE IN VITRO DE EXTRATO DE PLANTA DO CERRADO
(Gochnatia polymorpha) CONTRA Mycobacterium tuberculosis, NA
BUSCA DE NOVAS DROGAS CONTRA A TUBERCULOSE".**

“Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado, como parte das exigências, para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD.”

Orientador: Prof^o Dr. Julio Henrique Rosa Croda
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Simone Simionatto

DOURADOS-MS, OUTUBRO, 2012

**"Teste *in vitro* de extrato de *Gochnatia polymorpha*
contra *Mycobacterium tuberculosis*, na busca de novas drogas contra a
Tuberculose"**

Patrícia Conceição Gonzalez Dias^I; Júlio Henrique Rosa Croda^{II}; Rafaela Carla Pivetta^{III}; Simone Simionatto^{II}

I. Acadêmica de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados/Itahum - Km 12, Caixa Postal 533, 79804-970 Dourados, MS, Brasil. e-mail: paty_diaz2@hotmail.com

II. Professor(a) adjunto(a) da Universidade Federal da Grande Dourados

III. Mestranda em Ciências da Saúde: Doenças Infecto-Parasitárias

RESUMO

INTRODUÇÃO: Com o surgimento da tuberculose multidroga-resistente, há uma necessidade urgente de novas drogas com capacidade de reduzir a complexidade e tempo do tratamento, e de erradicar as infecções duráveis, desde modo foi avaliada a atividade antimicobacteriana do extrato etanólico de casca de tronco de *Gochnatia polymorpha* e as drogas padrão Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina e Etambutol.

MÉTODOS: O estudo da atividade anti-*M. tuberculosis* foi realizado através da metodologia de redução da resazurina, onde a mudança de cor do indicador é diretamente proporcional ao número de micobactérias viáveis no meio. Realizou-se a pesquisa de CIM (concentração inibitória mínima) do extrato. **RESULTADOS:** O extrato bruto de *Gochnatia polymorpha* apresentou CIM \geq a 500 μ g/mL.

CONCLUSÃO: O extrato etanólico bruto de *Gochnatia polymorpha* não possui atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*. Estudos adicionais são necessários para investigar outras atividades potenciais.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, *Gochnatia polymorpha*, Oxi-Redução Resazurina.

ABSTRACT

INTRODUCTION: With the emergence of multidrug-resistant tuberculosis, there is an urgent need for new drugs to reduce the complexity and duration of treatment, and eradicate durable infections, in order to access it, the antimycobacterial activity of the ethanol extract of bark trunk *Gochnatia polymorpha* and standard drugs Isoniazid, Rifampicin, Streptomycin and Ethambutol was realized. **METHODS:** The study of the anti-*M. tuberculosis* was accessed by the reduction of resazurin methodology, where the color change of the indicator is directly proportional to the number of viable mycobacteria in the middle. We carried out research of MIC (minimum inhibitory concentration) of extract. **RESULTS:** The crude extract of *Gochnatia polymorpha* showed a MIC $\geq 500\mu\text{g/mL}$. **CONCLUSION:** The ethanol extract of *Gochnatia polymorpha* has showed no activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Additional studies are needed to investigate other potential activities.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *Gochnatia polymorpha*, Oxi-Reduction Resazurin.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa transmissível, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria de morfologia bacilar, também conhecida como bacilo de Koch (BK), por ter sido identificada em 1882, pelo pesquisador Heinrich Hermann Robert Koch¹. Foi estimado que um terço da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis*. Estima-se que ocorram cerca de 8 a 9 milhões de casos novos de tuberculose a cada ano, e 1 a 2 milhões de mortes anuais devido à tuberculose². Como principais causas para a gravidade da situação atual da tuberculose no mundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta os seguintes fatos: desigualdade social, aumento da coinfeção com AIDS, envelhecimento da população, grandes movimentos migratórios³.

A terapia incorreta ou incompleta e o abandono do tratamento por parte do paciente estão associados ao surgimento da tuberculose multidroga resistente (MDR-TB)⁴ (doença causada pela resistência de cepas de *M. tuberculosis* a pelo menos duas

drogas de primeira linha)⁵ e da tuberculose extremamente resistentes às drogas (XDR-TB) (doença causada por cepas de *M. tuberculosis* que possuem resistências às mais importantes drogas anti-TB de primeira e segunda linha)^{6, 7}. A efetividade das drogas utilizadas para tratamento da tuberculose resistente às drogas de primeira linha é menor, tendo um custo superior e maior toxicidade se comparado àquelas utilizadas no esquema básico, causando o prolongamento do tempo de tratamento, diminuição da adesão, o aumento das chances de falha no tratamento e obviamente aumento nos seus custos^{8, 9}.

Em países desenvolvidos como os Europeus e Norte Americanos, a tuberculose tornou-se uma doença reemergente, devido principalmente às cepas multirresistentes as drogas e à AIDS. Contudo no Brasil ela não se enquadra em um problema de saúde pública emergente ou reemergente, mas sim é um problema presente e constante desde seu surgimento¹⁰.

Com o surgimento da multidroga resistência, há uma necessidade urgente por novas drogas com capacidade de reduzir a complexidade e tempo do tratamento, e de erradicar as infecções duráveis. Entretanto, nos últimos 40 anos, nenhuma nova droga foi desenvolvida¹¹. As plantas medicinais são vastamente utilizadas como adjuvantes no tratamento de diferentes doenças. Todavia, sabe-se que as plantas produzem metabólitos secundários com atividades biológicas diversas¹². A etnobotânica assim como a etnofarmacologia têm confirmado serem ferramentas importantes na investigação de substâncias naturais de funcionamento terapêutico¹³ para várias doenças.

Nos últimos anos ocorreu uma valorização das fontes naturais na busca por produtos ou processos com aplicações úteis, sendo desenvolvido um campo de pesquisa científica denominada bioprospecção, ou prospecção da biodiversidade. Trata-se de uma busca por compostos orgânicos úteis em microorganismos, plantas ou fungos que crescem em diferentes ambientes, tais como florestas, desertos e fontes termais¹⁴.

Dye et al.(2002)¹⁵ relata em seu trabalho o alerta da OMS sobre a necessidade de novas drogas para o tratamento da tuberculose. Produtos naturais são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos por serem disponíveis em abundância e por apresentarem a oportunidade de gerar produtos seguros, estáveis, padronizados e eficazes para uso em tratamentos primários de saúde. Estes podem também levar a descoberta de novos derivados de plantas biologicamente ativos, os quais poderão ser candidatos a novas drogas¹².

Desde antes da descoberta dos antibióticos, indígenas têm utilizado plantas e seus extratos para o tratamento de doenças infecciosas. Um estudo recente identificou 88 plantas utilizadas popularmente para o tratamento da tuberculose em Uganda¹⁶. Para Collins e Franzblau (1997)¹⁷ existe uma urgência no desenvolvimento de técnicas e ensaios para a triagem de novas drogas, que possuam maior rapidez, baixo custo e alto rendimento, devida ao aumento da necessidade de novas drogas para combater cepas resistentes às drogas de primeira e segunda escolha.

Estudos recentes têm identificado atividades medicinais em plantas, por exemplo, o gênero *Bauhinia* vem sendo estudado quanto à possível ação hipoglicemiante, uma vez que se observou sua utilização na medicina popular, para o tratamento da diabetes^{18, 19}.

A planta *Cymbopogon citratus* (DC) Strapf., popularmente utilizada contra gripes, disenteria, dores de cabeça, como calmante e antiespasmódico, teve seu óleo essencial testado, e apresentou atividade antimicrobiana e anti-hipertensiva²⁰.

O extrato etanólico das folhas de *Passiflora edulis* apresentou atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética, quando testado em laboratório²¹.

Na Bolívia, 30 espécies de plantas utilizadas popularmente contra os sintomas da malária foram estudadas, e a espécie *B. guianensis* destacou-se por apresentar bons resultados, amenizando os sintomas associados à patologia²².

Outro estudo realizado por Schuch et al. mostrou que extratos hidralcoólicos (EHAs) das plantas *B. grupo trimera*, *B. pilosa*, *Eucalyptus spp.*, *P. punctatum* e *T. minuta* apresentam atividade antifúngica frente a dermatófitos de interesse na saúde animal e humana²³.

Destaca-se, ainda, um estudo realizado com 16 plantas provenientes do viveiro de plantas medicinais da Universidade Federal de Viçosa, que evidenciou acentuada atividade bacteriostática do extrato *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), que levou a uma inibição completa do crescimento de *S. thyphimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Y. enterocolítica*²⁴.

Existem diversos estudos realizados com plantas em busca de potencial anti-*M. tuberculosis*, onde extratos vegetais foram testados e apresentaram resultados positivos como das espécies de plantas *Adhatoda vasica*²⁵, *Aristolochia taliscana*²⁶, *Acalypha*

indica, *Adhatoda vasica*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Aloe vera*²⁷ e *Mallotus philippensis*²⁸.

Gochnatia polymorpha (Less) Cabr. é uma árvore de médio porte encontrada em vários estados brasileiros e também no Paraguai, Uruguai e na Argentina. É conhecida no Brasil como Cambará, nome dado também a várias outras espécies do gênero. As suas folhas têm sido usadas na medicina popular contra afecções do sistema respiratório. São reconhecidas três subespécies: *polymorpha*, *ceanothifolia* e *floccosa*, sendo a última amplamente dispersa no estado do Paraná²⁹.

Apesar da ampla utilização popular observada, poucos estudos foram realizados a fim de avaliar a atividade biológica, potencial terapêutico e/ou toxicidade da planta, bem como estudos biomonitorados com o objetivo de identificar e isolar compostos que poderiam estar relacionados com tais atividades.

Um estudo evidenciou a atividade antimicrobiana da planta contra *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*²⁹.

Além do uso na medicina popular e escassez de estudos farmacológicos, a variabilidade química encontrada no extrato da *G. polymorpha*³⁰ corroborou a sua escolha para os testes contra *M. tuberculosis*.

Liu (1981)³¹ propôs o teste bioquímico de toxicidade baseado na redução do corante resazurina por meio da desidrogenase microbiana, com a resazurina atuando como um aceptor de elétrons, havendo mudança de cor na presença da enzima desidrogenase ativa, proveniente de uma cultura de bactérias crescente. A reação química que representa a conversão da resazurina no seu produto reduzido, representada na figura 1³².

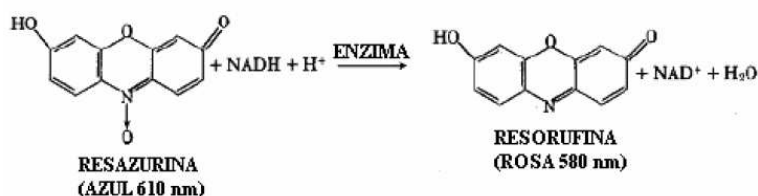


Figura 1 - Reação química de redução de resazurina para resorufina, com mudança de cor de azul para rosa.

Apenas por intermédio da desidrogenase pode ocorrer a redução da resazurina pelo sistema de transporte de elétrons microbiano, a desidrogenase pode ser usada para medir as atividades metabólicas de respiração e crescimento de uma cultura bacteriana pura, e na presença de tóxicos. Caso haja inibição da desidrogenase pelo composto químico investigado não ocorrerá a redução química da resazurina e a amostra permanecerá com a coloração azul. Caso o extrato ou drogas testados não apresentem efetividade sobre as bactérias, então a resazurina é reduzida para resorufina, assumindo a cor rosa³².

MÉTODOS

A metodologia deste estudo se baseia na utilização de um indicador de oxidação-redução, a resazurina, para identificação e quantificação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* do extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha*, planta do cerrado, através da análise da viabilidade celular dos bacilos submetidos ao extrato testado.

A coleta da planta e preparação do extrato foram realizados em parceria com a Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya. Para o preparo do extrato etanólico da casca do tronco de *Gochnatia polymorpha* o material botânico (cascas do tronco da *G. polymorpha* ssp. *floccosa*) após os processos de secagem e moagem, foi submetido à extração em temperatura ambiente (maceração) com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano e etanol), com renovação em intervalo de 24 horas. O volume de solvente foi de 500 mL para cada 100 g de material. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida, rendendo os extratos em hexano e EtOH. Os resíduos vegetais foram descartados³⁰. Foi utilizado no estudo apenas o extrato etanólico da planta *Gochnatia polymorpha*.

5.1. Estudos farmacológicos

Para a realização do teste de susceptibilidade *in vitro*, foram preparadas soluções-mãe do extrato de *Gochnatia polymorpha* a 10.000 µg/mL, bem como as drogas padrão utilizadas como controle no teste, Isoniazida e Rifampicina, Estreptomicina e Etambutol.

A redução da resazurina foi aplicada para os testes *in vitro*, conforme método descrito por Palomino et al., 2002³¹. A leitura dos resultados foi realizada em microfluorímetro Spectra Plus, TECAN.

5.2. Preparo das culturas estoque

O preparo das culturas estoque foi realizado por meio da inoculação da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) em meio Middlebrook 7H9 suplementado com AODC, e posterior incubação a 37°C por 15 dias. Após a verificação do crescimento bacteriano, realizou-se lavagem da cultura.

Para a lavagem a cultura foi aliquoteada em tubos de 15 mL. Centrifugou-se por 15 minutos de 1500 a 2000 rpm. Aguardou-se 10 minutos e foram abertos os tubos, posteriormente desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se H₂O estéril, agitou-se a solução no vórtex, centrifugou-se e repetiu-se a lavagem por mais duas vezes.

Depois de lavada a solução foi ressuspensa em H₂O e foi reduzida a um tubo, desta maneira conseguiu-se uma solução com maior concentração bacilar.

Em seguida ajustou-se para \pm duas escalas acima da Mac Farland 1 através da adição de água estéril. Aliquotou-se essa suspensão em criotubos com volume médio de 1mL. Posteriormente a suspensão foi exposta a uma temperatura de -20°C por 2 horas para seu congelamento e seguido esse tempo à uma temperatura de -80°C.

Após o congelamento a -80°C aguardou-se um tempo mínimo de dois dias retirou-se o criotubo do freezer e aguardou-se o descongelamento para o início das diluições seriadas (em H₂O estéril). Semeou-se 100 μ L em 7H10 + OAC (à 65°C) para contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

As diluições de -2 à -9 foram semeadas e contadas. Foram determinadas as quantidades de UFC por mL no criotubo. (expandiu-se para todos os tubos do mesmo lote essa contagem, identificados pela data de congelamento). Para o ensaio é necessário uma concentração de 1 a 5×10^5 UFC/mL.

5.3. Preparo das drogas e reagentes

Tanto as drogas de primeira quanto de segunda linha utilizadas para o tratamento da tuberculose foram empregadas como controle para os testes. Após a solubilização (de acordo com as recomendações do fabricante) as drogas foram armazenadas em alíquotas

a temperatura de -20°C. A resazurina foi diluída na concentração de 1mg/mL no momento do uso.

5.4. Ensaio de Redução da Resazurina (REMA)

As placas foram preparadas de acordo com o descrito por Palomino et al. (2002)³¹ para o ensaio de redução da resazurina. Utilizou-se meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e acrescido de PANTA (mistura de antibióticos liofilizados) para inibir possível contaminação do extrato. Foram adicionados de 100 a 150 µL de meio de cultura aos poços determinados, e 200 µL na coluna de hidratação (Coluna 12 da microplaca). Especificam-se na figura 2 os poços de controle da microplaca.

Após a adição do meio, realizou-se a diluição do extrato e drogas controle na microplaca, iniciando a uma concentração de 500 µg/mL para o extrato, e 1 µg/mL para as drogas. Partindo dessas concentrações, realizou-se diluição seriada, para ensaio de CIM. Manteve-se ainda uma coluna para verificar a esterilidade do extrato e das drogas (contendo meio de cultura e extrato/droga).

A solução bacteriana (congelada, previamente contada) na concentração de 1×10^5 UFC/mL foi adicionada.

Selou-se as placas com papel filme e papel alumínio, e incubou-se por 7 dias à 36°C.

Ao final do sétimo dia de incubação, as placas foram retiradas da incubadora, abertas, e foi adicionada a solução de resazurina 1 mg/mL (30 µL por poço). Em seguida as placas foram embaladas e incubadas por 24 horas à 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Após o período final de incubação, as placas foram retiradas, abertas, e foi realizada a leitura em fluorimetria, através de Leitora de microplacas Spectra Plus, TECAN utilizando-se filtros de excitação em 530 nm e de emissão em 590 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C.E.	[500]	[250]	[125]	[62,5]	[31,25]	[15,63]	[7,81]	[3,91]	[1,95]	C+/C-	H
A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
C	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
D	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
E	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
F	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
G	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
H	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●

- A INH
- B RFP
- C EST
- D BEM
- Coluna de Hidratação
- Controle Negativo
- Controle Positivo
- Controle de Esterelidade

Figura 2 - Esquema de microplaca

Primeiramente foi realizado um teste, em duplicata, com a concentração inicial do extrato em 250ug/mL. Como a CIM > 250ug/mL, foi realizado um segundo teste, em duplicata, com a concentração inicial do extrato em 500ug/mL.

As leituras de fluorimetria foram tratadas através de cálculos específicos, apresentando resultados de CIM em µg/mL. Os resultados encontrados foram compatíveis em todos os testes realizados.

RESULTADOS

O teste de atividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* foi realizado contra cepas H37RV ATCC 27294 e a CIM encontrada foi > 500 µg/mL.

O método de redução da resazurina foi utilizado para avaliar a atividade antimicobacteriana do extrato vegetal de *Gochnatia polymorpha*. A não emissão de fluorescência, e a manutenção da coloração azul inicial do indicador nos poços teste, são consistentes com muito baixos níveis, ou ausência de crescimento de micobactérias, demonstrando ação da droga/extrato. Por outro lado, elevadas leituras de fluorimetria e desenvolvimento de coloração rosa, são referentes a níveis elevados de proliferação micobacteriana.

As leituras de fluorimetria dos poços de controle positivo, que adquiriram cor rosa após 24 horas de incubação, eram condizentes com os níveis elevados de crescimento de micobactérias, enquanto os poços com o meio de cultivo estéril mantiveram cor azul após o período de incubação, e evidenciaram a falta de crescimento e ausência de contaminação.

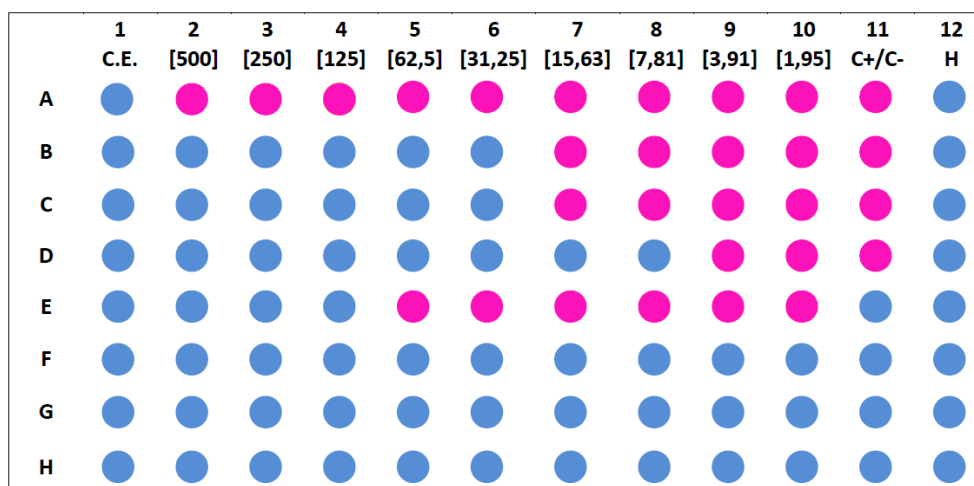
Os valores de CIM esperados e encontrados para o extrato etanólico de casca de tronco de *Gochnatia polymorpha* (GP) e das drogas padrão Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina, Etambutol são apresentados na tabela 1 e os resultados aproximados observados na microplaca de teste são apresentados na figura 3.

Tabela 1. Valores encontrados e valores esperados de CIM das drogas padrão e do extrato etanólico de G.P.

	CIM ENCONTRADA	CIM ESPERADA
G.P.	> 500 µg/mL	
INH	0,06 µg/mL	0,05 µg/mL
RFP	0,02 µg/mL	0,11 µg/mL
EST	0,18 µg/mL	0,26 µg/mL
BEM	1,7 µg/mL	1,64 µg/mL

Figura 3 - G.P- Extrato de Gochnatia polymorpha; INH- Isoniazida; RFP- Rifampicina; EST- Estreptomicina; BEM- Etambutol.

Os poços controle contendo rifampicina e isoniazida também revelaram CIM condizentes com o esperado. Rifampicina e isoniazida inibiram efetivamente o crescimento de *M. tuberculosis*, A CIM das drogas padrão encontrada nos testes *in vitro* está de acordo com o encontrado na literatura (INH 0,05 µg/mL; RFP 0,105 µg/mL;).



- A GP
- B INH
- C RFP
- D EST
- E BEM
- Ausência de crescimento bacteriano (extrato/droga eficientes)
- Ocorrência de crescimento bacteriano (extrato/droga não eficientes)

Figura 4 - Esquema de microplaca com a mudança de cor de acordo com os resultados obtidos no teste.

O extrato testado de *Gochnatia polymorpha* não apresentou atividade antimicobacteriana nas concentrações testadas, sendo que todos os poços teste, do 2 ao 10 apresentaram crescimento micobacteriano, com redução da resazurina ocorrendo assim alteração de cor de azul para rosa, indicando crescimento micobacteriano e não eficiência do extrato, portanto considera-se a CIM > 500 µg/mL (concentração inicial).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que o extrato etanólico bruto da casca do tronco de *Gochnatia polymorpha* não apresenta atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*, visto a concentração inibitória mínima ≥ 500 µg/mL. Extratos de plantas que não são capazes de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* a concentração ≥ 200 µg/mL são considerados inativos, enquanto que extratos apresentando CIM ≤ 128 µg/mL são ativos³².

As plantas tem demonstrado serem agentes antimicrobianos menos eficientes em comparação com os microrganismos. Contudo um grande número de extratos e

compostos vegetais têm demonstrado atividade antimicobacteriana. *Allium sativum*, *Borrichia frutescens*, *Ferula communis*, *Heracleum máximo*, *Karwinskia humboldtiana*, *Leucas volkensis*, *Moneses uniflora*, *Oplopanax horridus*, *Salvia multicaulis* e *Strobilanthus cusia* estão inclusos entre as espécies mais efetivas no controle no crescimento de micro-organismos. Em determinados casos os compostos isolados apresentaram atividade antimicobacteriana comparáveis a medicamentos³³.

Os componentes identificados a partir de plantas ativas contra os micro-organismos são aromáticos ou compostos orgânicos saturados, sendo mais frequentemente obtidos por meio do etanol e da água. Tentando transcrever a medicina popular utilizou-se, nesse e em outros estudos, o etanol absoluto, que tem polaridade semelhante à água, o solvente tradicional para a extração de compostos semelhantes. Utilizou-se o etanol uma vez que é mais rápido para extrair e reduz a contaminação microbiana.

Foi relatado, em estudos realizados por Stefanello et al., 2006³⁴, atividade antimicrobiana concentrada no extrato em CH₂Cl₂ (diclometano) das cascas do troco de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*. No entanto, o extrato testado por ele anteriormente foi mais potente²⁹. As únicas substâncias puras obtidas desta fração (acetato de baurenila e 11 α H,13-diidrozaluzanin C), que foram testadas se mostraram inativas. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as substâncias ativas podem ser constituintes minoritários no extrato. Por outro lado, muitas vezes a atividade de um extrato é função de um sinergismo entre os seus vários componentes e não das substâncias isoladas³⁵. Por esse motivo foi preferível o teste inicial do extrato completo da casca de tronco de *G. polymorpha*. Contudo o presente estudo demonstrou que o extrato etanólico da casca do tronco de *G. polymorpha*, preparado de uma maneira tradicional, não exibe forte atividade antituberculose *in vitro* com níveis comparáveis ao do controle positivo, a rifampicina e isoniazida.

A preocupação com o controle da emergência e da transmissão de cepas resistentes motiva o teste de novas metodologias fenotípicas para detectar susceptibilidade aos fármacos anti-TB, sobretudo INH e RMP, que possuam praticidade, eficiência e que permitam resultados mais rápidos do que o fornecido pelo método convencional. Dessa maneira, métodos fenotípicos de simples execução,

rápidos e confiáveis também veem sendo desenvolvidos no intuito de diminuir o tempo e o custo dos testes³⁶ apud³⁷.

O método de microtitulação da placa de ensaio com resazurina (REMA) é realizado em meio líquido, sendo uma ótima alternativa de validação por apresentar as vantagens desejadas, já que são muitas as limitações do método convencional de contagem de colônias em meio sólido, características como difícil dispersão, crescimento lento dos micro-organismos e dificuldades na padronização das condições de trabalho³⁸.

Sais de resazurina e de tetrazolium utilizados como indicadores para detectar viabilidade celular são uma boa opção para melhor visualização da leitura desses testes em microplacas. Esses substratos agem como cromogênicos de enzimas desidrogenases, como indicadores de oxi-redução, e são reduzidos através do ganho de hidrogênio por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular³⁶ apud³⁷.

O extrato de *Gochnatia polimorpha* não apresentou resultados de atividade anti-M.TB. promissores, todavia outros estudos contra diferentes microrganismos ou para diferentes atividades biológicas poderiam ser realizados para aproveitar o potencial medicinal dessa espécie de planta.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Cândida Aparecida Leite Kassuya por te auxiliado com a obtenção e preparação do extrato. À Fundect e ao CNPq pelo apoio financeiro, possibilitando assim a realização dos testes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. INdCMdS, 2005. Doenças infecciosas e parasitárias. Secretaria de Vigilância em Saúde MdS, ed. Brasília.
2. World Health Organization W, 2007. WHO report 2007: Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva: World Health Organization.

3. world Health Organization W, 1998. WHO report, Global Tuberculosis Control, WHO/TB.
4. Beck-Sague C, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT, Pitchenik AE, Woodley C, Cauthen G, Jarvis WR, 1992. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. *JAMA* 268: 1280-6.
5. World Health Organization W, 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) - 2010 global report on surveillance and response. Geneva: World Health Organization.
6. Raviglione M, 2006. XDR-TB: entering the post-antibiotic era? *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 1185-7.
7. Raviglione MC, Smith IM, 2007. XDR tuberculosis--implications for global public health. *N Engl J Med* 356: 656-9.
8. Affolabi D, Sanoussi N, Odoun M, Martin A, Koukpededji L, Palomino JC, Kestens L, Anagonou S, Portaels F, 2008. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Med Microbiol* 57: 1024-7.
9. Arbex MA, Varella Mde C, de Siqueira HR, de Mello FA, 2010. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J Bras Pneumol* 36: 641-56.
10. Ruffino-Netto A, 2002. Tuberculose: A calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 51-58.
11. Warner DF, Mizrahi V, 2004. *Mycobacterial* genetics in target validation. *Drug Discovery Today: Technologies* 1: 93-98.
12. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z, 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 63: 965-81.
13. Albuquerque UPd, Hanazaki N, 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 678-689.
14. Nature, 2009. Benefits-Sharing in the National Parks Environmental Impact Statement (What is Bioprospecting?). Accessed 12/08/2012, 2012.

15. Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG, 2002. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* 185: 1197-202.
16. Tabuti JR, Kukunda CB, Waako PJ, 2010. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners in the treatment of tuberculosis and related ailments in Uganda. *J Ethnopharmacol* 127: 130-6.
17. Collins L, Franzblau SG, 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1004-9.
18. Teske MT, A.M.M., 1995. *Compêndio de Fitoterapia*. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico.
19. Gupta MP, 1995. *Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Santafé de Bogotá: Talleres de Editorial Presencia.
20. Onawunmi GOO, E.O., 1986. A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Inst J Crude Drug Res* 24: 64-68.
21. Da silva BTFN, S.F.L.; Freire, S.M.D., 2001. Efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* varo *flavicarpa* (maracujá-amarelo). *Caderno de Pesquisa* 12.
22. Munoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Rojas I, Bravo JA, Balderrama L, Ortiz B, Gimenez A, Deharo E, 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *J Ethnopharmacol* 69: 127-37.
23. Schuch LFW, J.M.; Garcia, E.N.; Prestes, L.S.; Schramm, R.C.; Coimbra, H. e Meireles, M.C.A., 2008. Atividade antifúngica de extrato de plantas utilizadas por agricultores familiares como antimicrobiano. *Acta Scientiae Veterinariae* 36: 267-271.
24. Bara MTFV, M.C.D., 1998. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 7-8: 22-34.

25. Ignacimuthu S, Shanmugam N, 2010. Antimycobacterial activity of two natural alkaloids, vasicine acetate and 2-acetyl benzylamine, isolated from Indian shrub *Adhatoda vasica* Ness. leaves. *J Biosci* 35: 565-70.
26. Leon-Diaz R, Meckes M, Said-Fernandez S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jimenez-Arellanes A, 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 45-51.
27. Gupta R, Thakur B, Singh P, Singh HB, Sharma VD, Katoch VM, Chauhan SV, 2010. Anti-tuberculosis activity of selected medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* 131: 809-13.
28. Cabrera ALK, R.M.;, 1973. *Compostas - 1 Tribo Mutisieae*. Rodrigues HB, ed. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí.
29. Stefanello MEAS, M.J.; Ito, I.Y.; Macari, P.A.T., 2006. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia Polymorpha* ssp *floccosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16: 525-530.
30. Piornedo RR, 2010. Atividade Antiinflamatória de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* em camundongos. Mestrado em Farmacologia. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
31. Liu, D, 1981. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.26, p. 145-149
32. Brouwer, H, 1991. Testing for chemical toxicity using Bacteria; *Journal of Chemical Education*, v. 68, p. 695-697
33. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F, 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2720-2.
34. Tosun F, Kizilay CA, Sener B, Vural M, Palittapongarnpim P, 2004. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J Ethnopharmacol* 95: 273-5.
35. Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH, 1998. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta Med* 64: 2-4.

36. Stefanello MEAC, A.C., Wisniewski Junior, A. and Simionatto, E.L., 2006. Oleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (Less) *Cabr. Ssp floccose cabr.* Quimica Nova 29: 99-102.
37. Schlemper VF, S.A. and Schlemper, S.R.M., 2001. Antipasmodic Effects of Hydroalcoholic Extract from *Gochnatia polymorph* asp. *Floccose* in the Guinea Pig Ileum. Research Journal of Medicinal Plant 5 288-294.
38. Koneman EW, Stephen, S.D., Janda, W.M., Schrenberger, P.C., Winn, W.C., 1997. Diagnostic microbiology. Color atlas and textbook. New York
39. Ribeiro MOG, M. S.; Senna, S. G.; Rossetti, M. L. R.; Fonseca, L. S., 2004. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. J Bras Pneumol 30: 455-60.
40. Stavri D, Stavri H, Baroni M, Niculescu M, Lungu E, 1974. [Error factors intervening in the determination of the number of viable units of lyophilized BCG vaccine]. Arch Roum Pathol Exp Microbiol 33: 171-9.