

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA – SÃO PAULO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DO CERRADO BRASILEIRO**

**Vinícius Pereira Arantes**  
**Farmacêutico-Bioquímico**

**ARARAQUARA**  
**2005**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA – SÃO PAULO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DO CERRADO BRASILEIRO**

**Mestrando: Vinícius Pereira Arantes**

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Clarice Queico Fujimura Leite**

Forma apresentada ao programa de pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Unesp- Araraquara- São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

**ARARAQUARA**  
**2005**

**DEDICO,**

*Ao ser todo poderoso que em algum momento de sua magnitude desejou proporcionar estes momentos de felicidade, amor e ciência a minha pequena sabedoria e ao meu ínfimo conhecimento. DEUS, simplesmente o mentor de tudo que aqui se encontra...*

*Aos meus grandiosos pais Agripino de Oliveira Arantes e Erude Pereira Arantes. Por aceitarem a distância durante estes longos três anos que tenho dedicado à ciência, pesquisa e docência. Além disto, obrigado por concederem através do amor a minha existência.*

*Aos meus queridos avós João Pereira Filho (in memorian) e Clotilde Ferreira da Silva Pereira. Muito obrigado por terem motivado sempre a esta e diversas outras conquistas. Palavras e gestos que a minha memória, tenho certeza guardarão por toda a eternidade, muito obrigado!*

*Minha grande Irmã Ana Célia Arantes dos Santos, ao meu cunhado e amigo José Maria dos Santos e a pequena Maria Fernanda dos Santos, que veio com o intuito de trazer alegria e vida a nossa família. E também a você pequenino João Agripino que hora maravilhosa. Vocês também auxiliaram neste trabalho!*

*A minha namorada Patrícia Dolfini, a Ivone Tomeleri Dolfini e Ricardo Dolfini. Obrigado pela atenção e respeito!*

*Aos professores que auxiliaram durante o início, os primeiros passos, gestos e paciência. A vocês amigos professores é que tenho o prazer de dividir a minha vitória com vocês: Geraldo Emilio Vicentini, Marcelo Antonio Dubuc, Ricardo de Melo Germano, Carlos Augusto Pereira, Paulo Pereira, Mariza Barion Romagnolo, Danil Agar Rocha Rúbio, Fátima Machado, Érica Valentini Pepliascov Pereira, Aldolino Zermiani, Evaldo Bertoldi, Roberto José Linarth (in memorian), Emerson Luis Botelho Lourenço, Irinéia Paulina Baretta, Antonio Marcus Paes, Samira, Marcela, Nelton, Francisco, Elizabethe, Marlene, Marcos, Gislaine, Sandra. Tantos foram aqueles que neste trabalho seria impossível agradecer a todos, a vocês infinitamente obrigado!*

*Aos funcionários da Universidade Paranaense – Unipar.*

*Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Unesp Araraquara- São Paulo. Em especial ao setor de pós-graduação e companheiros do laboratório: Carol Malaspina, Karina, Ivone, Célio e Will.*

*Que a ciência possa gerar cada vez mais dúvidas e incertezas, para que a cada trabalho, tenhamos novas perguntas e que a cada pergunta possamos ter nova resposta. E que assim a ciência possa prosperar entre perguntas e respostas. Muito obrigado!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

*A professora Dr<sup>a</sup> Clarice Queico Fujimura Leite. Pessoa incrível que não mediu esforços para auxiliar, ensinar e trabalhar o conhecimento científico, além das inúmeras dúvidas oriundas do trabalho laboratorial. Orientação, conquistas e vitórias é assim que resumo todo o nosso convívio. Muito obrigado!*

*A Dr<sup>a</sup> Daisy Nakamura Sato, incrível pesquisadora que abriu inúmeras portas na vigência de minhas dúvidas sobre microbiologia.*

*A professora Dr<sup>a</sup> Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, que acolheu as minhas dúvidas e soube ensinar cultivo de células e outras atividades inerentes ao estudo com micobactérias.*

*Ao professor Dr<sup>o</sup> Wagner Villegas, agradeço pela enorme atenção e os extratos gentilmente cedidos e testados neste trabalho.*

***O Senhor é o meu pastor***

*O Senhor é o meu pastor; nada me faltará.*

*Ele me faz repousar em pastos verdejantes.*

*Leva-me para junto das águas de descanso; refrigera-me a alma.*

*Guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome.*

*Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum,*

*Porque tu estás comigo; o teu bordão e o teu cajado me consolam.*

*Preparas-me uma mesa na presença dos meus adversários, unges-me a cabeça com óleo;*

*O meu cálice transborda.*

*Bondade e misericórdia certamente me seguirão por todos os dias de minha vida;*

*E habitarei na casa do senhor para todo o sempre.*

*Salmo 23*

João Pereira Filho (*In memoriam*)

“Um dos últimos momentos que oramos juntos celebramos a benção deste salmo, foi possível celebrar a sua força e contemplar o teu semblante. A saudade é grande, gostaria muito que estivesse aqui comemorando comigo todas estas vitórias, que o senhor nunca deixou desfarçar que torcia por mim. Hoje continuo a orar e a pedir que dentre as inúmeras facetas que a vida nos guarda um dia possa novamente contemplar a sua face e dar um abraço forte e dizer quanta falta a sua presença me faz.” Até um dia!

De seu neto

Vinícius Pereira Arantes

**SUMÁRIO**

	Página
<i>Lista de Abreviaturas</i> . . . . .	08
<i>Lista de Tabelas</i> . . . . .	10
<i>Resumo</i> . . . . .	11
<i>Abstract</i> . . . . .	12
1.0 Introdução. . . . .	13
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e outras micobactérias que não tuberculosis (MOTT) de importância médica. . . . .	17
1.2 Quimioterapia da Tuberculose. . . . .	22
1.3 Pesquisa de novas alternativas terapêuticas para Tuberculose. . . . .	24
1.4 Método de Determinação do perfil de sensibilidade utilizando <i>Alamar Blue Assay</i> – MABA. . . . .	27
2.0 Objetivos. . . . .	30
2.1 Objetivos Gerais. . . . .	30
2.2 Objetivos Específicos. . . . .	30
3.0 Material e Métodos. . . . .	31
3.1 Amostras. . . . .	31
3.1.1 Extratos Vegetais. . . . .	31
3.2 Droga de Referência. . . . .	32
3.3 Cepas do gênero <i>Mycobacterium</i> . . . . .	32
3.3.1 Cepa padrão de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . . . . .	32
3.3.2 Cepa padrão de <i>Mycobacterium avium</i> . . . . .	32

3.3.3 Cepa padrão de <i>Mycobacterium fortuitum</i> . . . . .	32
4.0 Metodologia. . . . .	32
4.1 Preparo de suspensões bacilares. . . . .	32
4.2 Técnica de Microdiluição utilizando <i>Alamar Blue Assay</i> – MABA. . .	33
4.3 Padronização do tempo de leitura para a técnica do MABA. . . . .	35
5.0 Resultados. . . . .	36
6.0 Discussão. . . . .	40
7.0 Conclusão. . . . .	47
8.0 Referências Bibliográficas. . . . .	49
9.0 Anexos. . . . .	67

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BAAR	Bacilo Álcool-ácido Resistente
BACTEC	Método Radiométrico para detecção de crescimento bacteriano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
°C	Graus Celsius
DOTS	Directly Observed Treatment Short Course
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
E M B	Etambutol
ETH	Etionamida
HIV	Human Immunodeficiency virus
INH	Isoniazida
LJ	Lowenstein Jensen
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MGIT	<i>Mycobacterium</i> Growth Indicator Tube
mL	Mililitro
MOTT	Micobactérias outras que não <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mg	Miligrama
MABA	Microplate Alamar Blue Assay
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde



PBS	Tampão fosfato (PBS)
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PNCT-MS	Plano Nacional de Controle da Tuberculose- Ministério da Saúde
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
SM	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose “Multi Drug Resistant”
μL	Microlitro
μg	Micrograma

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Apresentação das Tabelas</b>		<b>Pág</b>
Tabela I	Relação dos extratos vegetais, parte do vegetal utilizado, agente extrator e concentração dos extratos utilizados para determinação da atividade antimicobacteriana. ....	31
Tabela II	Padronização do tempo de leitura da técnica do MABA para as cepas de <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.avium</i> , <i>M fortuitum</i> . ....	35
Tabela III	Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 pela técnica do MABA. ....	36
Tabela IV	Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o <i>M. avium</i> ATCC 25291 pela técnica do MABA. ....	37
Tabela V	Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o <i>M. fortuitum</i> ATCC 6841pela técnica do MABA. ....	38
Tabela VI	Determinação da Concentração Mínima Inibitória para as cepas de <i>M. tuberculosis</i> , <i>M.avium</i> e <i>M. fortuitum</i> . ....	39

**RESUMO**

ARANTES, V.P. **Estudo da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais do Cerrado Brasileiro**. Araraquara. 2005 (Mestrado em Análises Clínicas) Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp.

A Tuberculose (TB) continua sendo um grave problema de saúde pública, considerada a principal causa de morte em países subdesenvolvidos de grande população e baixo padrão sanitário. Atualmente o aumento do número de casos em países subdesenvolvidos e desenvolvidos está associado à queda da qualidade de vida, aglomerações, infecções pelo “*Human Immunodeficiency Virus*” (HIV) e “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*” (AIDS). Apesar da eficácia dos esquemas terapêuticos utilizados atualmente, nos últimos anos tem-se observado, um aumento na incidência de tuberculose causada pelo *M. tuberculosis* resistente aos esquemas preconizados para o tratamento da doença, o que reflete falha no emprego dos referidos programas pré-estabelecidos como eficazes. A busca constante por produtos biologicamente ativos e capazes de combater o *M. tuberculosis* tem promovido a descoberta de novos compostos capazes de eliminar micobactérias, que sejam menos tóxicos, efetivos e que possam ser menos indutores de resistência, podendo associar dose e redução do número de abandono ao tratamento. Este trabalho tem como principal objetivo determinar o efeito antimicrobiano de extratos vegetais da biota brasileira, frente a cepas padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, *Mycobacterium avium* ATCC 25291, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841. A metodologia de *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA), foi empregado com o intuito de pesquisar atividade antimicrobiana, sendo determinado Concentração Mínima Inibitória correspondente a inibir 90% das células viáveis. Os resultados apresentados são promissores, frente à Cepa padrão de *M.tuberculosis* e *M. avium*, *M.fortuitum* destaca-se a grande atividade do extrato de *Quassia amara* (agente extrator: diclorometano) e *Syngonanthus macrolepis* (agente extrator: clorofórmio) com CIM inferior a 200µg/ml para as três espécies testadas.

Palavras-chave: Tuberculose, Tratamento, HIV, AIDS.

**ABSTRACT**

---

ARANTES, V. P. **Studying of antimycobactericide activity of vegetal extracts from Brazilian's "Cerrado"**. Araraquara. 2005 (Master in Clinical Analysis) State University "Julio de Mesquita Filho" – Unesp.

Tuberculosis (TB) is still a serious problem of public health, considered the main cause of death in undeveloped Countries of great population and low hygiene standard. In the present moment the increase in the number of cases at undeveloped and developed Countries is associated to the drop of life quality, agglomerations, infections from "*Human immunodeficiency Virus*" (HIV) and "*Acquired immunodeficiency Syndrome*" (AIDS). In spite of the present efficiency of the used therapeutics schemes, in the last years has been observed, an increase in the tuberculosis incidence caused by the *M. tuberculosis* resistant to the recommended schemes of treatment for the disease, which reflects in failures on the use of the referred programs pre-established as effectives. The constant search for products biologically actives and capable of fighting the *M. tuberculosis* has promoted the discovery of new compounds capable of eliminating mycobacteries, that are less toxic, effectives and that can be less inducer of resistance, letting associate dose and reduction in the number of treatment abandonment. This survey has the main purpose to determine the antimycobactericide effect of vegetal extracts from the Brazilian biota, in front of the strain standard of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, *Mycobacterium avium* ATCC 25291, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841. The methodology of *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) was used in the intention to search for antimycobactericide activity, having established a Minimal Inhibitory Concentration correspondent to inhibit 99% of the viable cells. The presented results are promising, in front of the strain standard of *M. tuberculosis* and *M. avium*, *M. fortuitum* stands out the great activity of the *Quassia amara* extract (extractor agent: dichloromethane) and *Syngonanthus macrolepsis* (extractor agent: Chloroform) with MIC below 200µg/ml in the three tested species.

Key words: Tuberculosis, Treatment, HIV, AIDS.

## 1.INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar é uma doença infecciosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *Mycobacterium microti* e *M. canetti*) é transmitida de homem a homem por aerossóis produzidos durante a expectoração (AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1990; ALCAIDE *et al.*,1997; BLOOM & SMALL,1998; ROXO,1997).

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae*, apresenta-se na forma de bacilos curvos ou retos, com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1,0 a 10,0 µm de comprimento e possui a propriedade de álcool-ácido resistência, devido a grande quantidade de lipídios presentes em sua parede celular. São aeróbios e classificados de acordo com o seu tempo de crescimento, sendo considerados de crescimento rápido quando requerem menos de 7 dias para produzir colônias visíveis, e de crescimento lento, aquelas que requerem mais de 7 dias para produzir colônias visíveis quando inoculadas em meios de cultura sólidos ( KONEMAN *et al.*,2001; AL-HAJJAJ *et al.*,2001; BARRETO *et al.*,1994; FREIRE,1989; HART *et al.*,1996).

A tuberculose pulmonar é uma doença que tem a sua magnitude ligada à situação socio-econômica da região ou do país (ROBBINS *et al.* 1996; HIJJAR *et al.*,2001; RAVIGLIONE *et al.*, 1997; DANNENBERG, 1993). Atualmente com o advento da AIDS, a coinfeção TB/HIV tem provocado um impacto na epidemiologia da tuberculose em todo o mundo, fato observado em

países desenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente nas Américas (GARCIA *et al.*, 1995; MACKENNA *et al.*, 1998; CANTRELL *et al.*, 2001; SNIDER *et al.*, 1998; BOSHOF& MIZRAHI, 2000; KUMAR *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 1998).

A epidemia de AIDS e o controle insuficiente da tuberculose apontam para a necessidade de medidas enérgicas e eficazes de saúde pública. A emergência de focos de tuberculose multirresistente (TBMDR), tanto nos Estados Unidos da América, no início dos anos noventa, quanto atualmente, nos países que compunham a antiga União Soviética, tem mobilizado o mundo para a questão da tuberculose (DALCOMO *et al.*, 1998; COOPER *et al.*, 1993).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam anualmente 1,9 milhões de mortes por tuberculose, 98% delas em países em desenvolvimento e cerca de 350.000 mortes em casos de associação da tuberculose com a AIDS. O número anual de novos casos de tuberculose é estimado em cerca de 8,7 milhões, sendo que 80% estão concentrados em 22 países, dentre eles o Brasil. A TBMDR está presente em 63 países que participaram do inquérito mundial, realizado no período de 1994-1999 (WHO, 2002; FAIRCHILD & OPPENHEIMER, 1998).

A Organização Mundial da Saúde expressa que no ano de 2020 aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo estejam infectadas, 200 milhões adoçam e 35 milhões morram (WHO, 1997). Os casos de tuberculose estimados pela OMS acredita-se que metade sejam notificados, situação que traduz a insuficiência das políticas de saúde e controle. Nos 22 países com maior carga de tuberculose, a estimativa é de 6.910.000 casos. A Índia ocupa o primeiro lugar, com 1.856.000 novos casos anualmente, e o

Brasil atualmente ocupa o 15º lugar com 129.000 casos por ano (HIJJAR et al., 2001), com cerca de 30 milhões de morte por tuberculose (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999).

A região das Américas alberga 7% do total mundial de casos de tuberculose. No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 129.000 casos novos por ano, dos quais apenas 90.000 casos novos são notificados oficialmente. O Estado de São Paulo, responsável pelo maior número absoluto de casos novos com um coeficiente de incidência de 50/100.000 habitantes e cerca de 1.500 óbitos por ano, notificou 20.125 casos novos no ano de 2001. (BRASIL.Ministério da Saúde, 2002).

O Brasil é um dos quatro países com maior número absoluto de casos de tuberculose no mundo. O total em 2001, segundo o Sistema Único de Saúde (SUS), é de 103.029 casos. A incidência da doença é de 60,68 /100.000 habitantes (SANT'ANNA, *et al.*, 2002). O percentual de tuberculosos no grupo de 0-14 anos situa-se entre 6% e 7% do total de casos notificados, a baixa taxa de positivos dentre este grupo é explicada pela dificuldade de confirmação baciloscópica nesta idade. A incidência de meningite tuberculosa a forma mais grave desta doença, o grupo de 0-4 anos é o mais atingido, coeficiente de 0,9/100.000 habitantes (BRASIL. Ministério da Saúde, 1993).

Entre as capitais brasileiras, as cidades do Rio de Janeiro, Porto Velho, Rio Branco, Recife e São Paulo, apresentam as maiores taxas de mortalidade que variam de 4,6 a 10,2 óbitos por 100.000 habitantes (ZACARIAS *et al.*, 1994). Segundo dados oficiais do Ministério da Saúde, em 1999 foram notificados 91.800 casos novos de tuberculose. É de conhecimento que estes representam 75% a 80% da incidência total, estima-se cerca de 130.000 novos

casos anualmente e deste montante diagnosticado cerca de 75% são curados (DOLIN *et al.*,1994; ROSEMBERG, 1990).

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) já em 1994 projetou aumentos na incidência global da tuberculose na ordem de 36 e 58% para os anos 2000 e 2005 respectivamente (DOLIN *et al.*, 1994; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1993). A Organização Mundial da Saúde fez uma estimativa de 30.000.000 de mortes por tuberculose nos próximos dez anos e calcula que pelo menos 8.000.000 de casos novos de tuberculose ocorreram no ano passado (WHO, 1997; RAVIGLIONE *et al.*, 1997).

A tuberculose tem aumentado nos últimos 10 anos, associada aos três importantes fatores emergenciais, a pobreza enquadra-se como sendo o primeiro deles, o segundo é considerado a associação entre tuberculose e HIV/AIDS e o terceiro fator o aumento considerável nos casos de resistência a drogas antituberculosas. O HIV é fator de risco para a tuberculose, já que o vírus desencadeia fator de imunodeficiência no paciente infectado, acredita-se existir atualmente cerca de 4,4 milhões de pacientes infectados simultaneamente com HIV e tuberculose no mundo (FIGUEROA & LÓPEZ, 2000).

A co-infecção pelo HIV e *M. tuberculosis* atualmente vem sendo estudada em inúmeros países, onde ocorrem as duas infecções de forma simultânea e que naturalmente representa problemas para aos órgãos de saúde pública (FIUZA & AFIÚNE,1993). Podemos admitir que as chances de um indivíduo HIV positivo em desenvolver a doença em comparação a um indivíduo normal é de



25 vezes maior (BILLO, 1995; CHAISSON & STOKIN, 1989; BENETUCCI *et al.*, 1992).

Estima-se que 500.000 pessoas infectadas pelo HIV vivem na América Latina, onde em algumas regiões urbanas segundo Organização Mundial de Saúde (OMS) são considerados locais de emergência mundial contra a tuberculose (LIMA & MADI, 1988; LOURES, 1995). As cidades do Rio de Janeiro (RJ) e de Rio Grande (RS), pertencem à área regional de alta prevalência para tuberculose. Segundo a OMS a tuberculose e a AIDS juntas constituem, hoje, uma calamidade sem precedentes na história. Em 1999, cerca de 1/3 dos infectados pelo HIV, o eram também pelo bacilo de Koch, segundo a atualidade o maior fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose em pessoas previamente contaminadas (BOFFO *et al.* 2004; HIJJAR *et al.*, 2001).

### **1.1. *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias outras que não tuberculosis (MOTT) de importância médica.**

O gênero *Mycobacterium* é formado por bacilos imóveis, com alta porcentagem de lipídios na parede, que conferem resistência a desinfetantes e antibióticos, bem como, a característica de álcool-ácido-resistência. O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, 25 identificadas como sendo patogênicas ao homem uma diversidade de espécies, de grande distribuição na natureza. Além do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. microti*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) existem espécies saprófitas e outras que atuam como patógenos oportunistas causando enfermidades denominadas de micobacterioses (CORTINAS *et al.*, 2002; POZNIAK *et al.*, 1996; RAYNAUD *et al.*, 1998).

Em 1882, Koch descreveu o agente causal da tuberculose humana (SHEPPARD,2001). Pouco tempo depois, diversos autores comunicaram o isolamento de outras espécies de micobactérias responsáveis por infecções animais. Strauss em 1891 descreveu o agente causal da tuberculose aviária e quatro anos depois Johnne descreve o bacilo causador da Enterite Hipertrófica Bovina. Em 1901 Marmoreck diferenciou os agentes responsáveis por causarem a tuberculose humana, bovina e aviária de outras espécies, que denominou de “Micobactérias paratuberculosis”. Logo mais foram isoladas amostras de micobactérias do solo e de amostras humanas, que em determinadas situações são chamadas de oportunistas (MANZANO *et al.*, 1998; SANT’ANNA, 2002; SANT’ANNA, *et al.*, 2002).

As espécies de micobactérias outras que não tuberculosis (MOTT) mais isoladas no Brasil são: Complexo *M. avium-intracellulare* (MAC), *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* e *M. scrofulaceum* (LEITE *et al.*, 1995 (a); LEITE & TELAROLLI, 1997; LEITE *et al.*, 1998) causando principalmente doença pulmonar e ganglionar, sendo que estas e outras MOTT são isoladas com maior frequência em pacientes soropositivos para o vírus da AIDS (BRASIL.Ministério da Saúde, 1994; LEITE *et al.*, 1995 (a); LEITE, *et al.*, 1998; WREN *et al.*, 1998).

Nesses pacientes geralmente a doença é disseminada e fatal em curto espaço de tempo (BARBER *et al.*, 1991; FALKINHAM III, 1996; RUNYON,1958). Trabalhos recentes destacam cada vez mais a prevalência de MOTT em pacientes HIV positivos (HIRSCHMAN, 1990; STRATTON, 1992; GIAYETTO & CABRERA, 1994; VON REYN, *et al.*, 1996; FALKINHAM III, 1996; LEITE *et al.*, 1998). LEITE, *et al.* 1995 (a) destacam o isolamento de *M.*

*avium-intracellulare*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* de pacientes internados no setor de Tisiologia do SESA em Araraquara-SP, sendo que a maior incidência das micobacterioses por MOTT foi encontrada em pacientes soropositivos para o HIV. Além dos pacientes HIV positivos, os imunocompetentes também desenvolvem as micobacterioses e novas espécies como, por exemplo: *M. celatum*, *M. mucogenicum* sp. nov. e *M. heidelbergense* sp. nov. tem sido isoladas de material clínico (HAAS *et al.*, 1993; BUX-GEWEHER *et al.*, 1998; MUÑOZ *et al.*, 1998).

Como estas e outras espécies podem ser isoladas de solo, águas e outras fontes naturais (COSTALLAT *et al.*, 1977; LEVY-FREBAULT & DAVID, 1983; GRAHAM-JR *et al.*, 1988; LEITE *et al.*, 1995; HAAS & FATTAL, 1990; SCHULZE-RÖBBECKE *et al.*, 1991; STOSÁREK *et al.*, 1993; FALKINHAM III, 1996; NEUMANN *et al.*, 1997; LEITE, *et al.*, 1998; FALKINHAM III, 1998), deve-se ter cautela ao atribuir a estas espécies a responsabilidade pela etiologia da doença. Já no caso de *M. tuberculosis* seu isolamento mesmo em cultura mista exclui a possibilidade de outra espécie ser o agente causal da infecção (BRASIL.Ministério da Saúde, 1994; FALKINHAM III, 1996).

As infecções causadas pelo complexo *M. avium-intracellulare* em pacientes imunocompetentes são principalmente pulmonares e disseminadas (HIRSCHMAN, 1990; ELLNER *et al.*, 1991; COOK, 1991; VON REYN *et al.*, 1996; FALKINHAM III, 1996), são descritos casos em grandes centros como Estados Unidos, França, África, Itália, Alemanha, Espanha, Áustria e outros (HORSBURG, *et al.* 1991; HORSBURG, 1991; NASSOS *et al.*, 1991; GARCIA GARCIA *et al.*, 1995; DABORN *et al.*, 1996) e no Brasil e América Latina (LEITE

*et al.*, 1995; LEITE & TELAROLLI, 1997; GARCIA GARCIA *et al.*, 1995; LEITE *et al.* 1998).

O complexo *M. avium-intracellulare* pode ser isolado de ambientes naturais, como água, solo com muita matéria orgânica, baixo pH e pouco O<sub>2</sub> dissolvido (FALKINHAM III, 1996; FALKINHAM III, 1998). Em laboratório, requer pH em torno de 5 a 5.5 para seu melhor desenvolvimento e também temperaturas no intervalo de 42 a 45°C (COSTALLAT *et al.*, 1977; GRAHAM-JR *et al.*, 1988; FALKINHAM III, 1996).

Existem muitos casos de *M. kansasii* isolados de amostras clínicas (LEVY-FREBAULT & DAVID, 1983; STRATTON, 1992; LEITE *et al.*, 1995; FALKINHAM III, 1996; ALCAIDE *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 1998) é uma micobactéria de crescimento lento, fotocromogênica, que exige temperaturas em torno de 32°C a 42°C, catalase positiva, reduz nitrato a nitrito e hidrolisa o tween 80. As cepas com catalase fortemente positiva são as mais virulentas (FALKINHAM III, 1996).

São descritos relatos de isolamento de *M. kansasii* de fontes de água naturais e tratadas, existe a hipótese de contaminação por aerossol (LEVY-FREBAULT & DAVID, 1983; FALKINHAM III, 1996; FALKINHAM III, 1998). As infecções são geralmente causadas em pacientes com doenças de base de origem pulmonar, câncer ou por alcoolismo (LEVY-FREBAULT & DAVID *et al.*, 1989; FALKINHAM III, 1996; FALKINHAM III, 1998). Segundo FALKINHAM III (1996), *M. kansasii* pode fazer parte da microbiota normal de plantas e é também encontrado em águas. Possui crescimento lento, pode crescer a 42°C, não hidroliza Tween 80 e possui muitas características comuns com *M. avium*, sendo diferenciado através de pigmentação, urease e catalase,

testes positivos para *M. kansasii* (KENT & KUBICA, 1985; DAVID *et al.*, 1989; BRASIL.Ministério da Saúde, 1994; FALKINHAM III, 1996; GOODFELLOW & MAGEE, 1998; HEIFETS & JENKINS, 1998).

Infecções causadas por *M. scrofulaceum* são historicamente relatadas em linfadenite cervical em crianças, mas existem casos de infecção pulmonar, geralmente associados à doenças de base e predisposição do hospedeiro (bronquite crônica, enfisema, câncer, pneumonia). Tem sido descrito aumento de casos de infecção por esta espécie, associados com o crescente número de casos de AIDS (DELABIE *et al.*, 1991; STRATTON, 1992; FALKINHAM III, 1996; LEITE *et al.*, 1998).

As espécies *M. fortuitum* e *M. chelonae* segundo GOODFELLOW & MAGEE (1998) são consideradas micobactérias de crescimento rápido, patogênicas, podendo causar infecções pulmonares, de pele e tecidos (FALKINHAM III, 1996). Existem muitos casos relatados de *M. fortuitum* e *M. chelonae* causando infecções pulmonares, de córnea e outras (LEITE *et al.*, 1995; WALLACE *et al.* 1991; BARBER *et al.*, 1991; STRATTON, 1992; LEITE *et al.*, 1995; FALKINHAM III, 1996; LEITE *et al.*, 1998). *M. fortuitum*, cresce a 43°C, enquanto *M. chelonae* não cresce a 43°C (KENT & KUBICA, 1985; DAVID *et al.*, 1989; BRASIL.Ministério da Saúde, 1994; FALKINHAM III, 1996; GOODFELLOW & MAGEE, 1998; HEIFETS & JENKINS, 1998; CONVILLE & WITEBSKY, 1998; MUÑOZ *et al.*, 1998). *M. fortuitum*, *M. chelonae* têm sido isolados de muitas fontes naturais, em rios, lagos, mar, solo e também de outras fontes como águas de hospitais, gelo e máquinas de gelo, águas de piscicultura e aquários e de fontes termais (LEITE *et al.*, 1989; FALKINHAM III, 1996; FALKINHAM III, 1998, LEITE *et al.*, 1998).

## 1.2. QUIMIOTERAPIA DA TUBERCULOSE

O esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) em 1979 é composto por isoniazida, rifampicina e pirazinamida, durante dois meses e isoniazida e rifampicina mantidos por mais quatro meses (Esquema I) (BRASIL. Ministério da Saúde,1999; TELLES *et al.*,1997;VERONESI & FOCACCIA,1996). O tratamento pode ser dividido em duas fases, a primeira chamada de ataque e a segunda de manutenção sob a finalidade de evitar resistência microbiana e persistência bacilar (BRASIL. Ministério da Saúde, 2002; DINIZ *et al.* 1995). As drogas têm locais diferentes de ação, a rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) são eficazes em população bacilares de crescimento rápido, já em populações bacilares intracelulares o emprego da pirazinamida (PZA) é fundamental (BRASIL.Ministério da Saúde, 2002). No fracasso do esquema I é indicado o esquema de retratamento (Esquema IR) que é composto por Rifampicina (RMP), Isoniazida (INH), Pirazinamida (PZA), Etambutol (EMB), durante dois meses e Rifampicina (RMP), Isoniazida (INH) e Etambutol (EMB) durante quatro meses. Caso os esquemas I e IRI venham a falhar é possível instalar o esquema III, composto por Estreptomicina (SM), Etionamida (ETH), Etambutol (EMB), Pirazinamida (PZA), que compreendem três meses e a segunda fase é composta por Etionamida (ETH) e Etambutol (EMB) durante nove meses (SCHECHTER, 2001). A resistência do *M. tuberculosis* aos medicamentos utilizados relaciona-se as mutações genéticas das populações bacilares, variando normalmente de acordo com a droga. Quanto mais drogas forem utilizadas de forma inadequada, mais resistência irá aparecer. A multiresistência é estabelecida no Brasil, como a falência dos

esquemas I e III e ou resistência a importantes drogas usuais como RMP, INH, SM, EMB e ou PZA (JARDIM *et al.*,2001).

O aparecimento de inúmeras cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* é alarmante, tendo em vista que poucos fármacos efetivos enquadram o arsenal terapêutico para tuberculose. Em pesquisa realizada no CDC durante o primeiro trimestre de 1991, foram encontrados isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a, no mínimo, uma droga antituberculosa em 14,9% dos casos; 3,3% dos isolados eram resistentes a isoniazida e rifampicina. Em certas localidades, sobretudo na cidade de Nova York, foram recuperadas cepas resistentes a, no mínimo, uma droga, incluindo resistência emergente as fluoroquinolonas, em 33% dos casos, e a incidência a isoniazida e a rifampicina foi de 19%. A evolução aleatória da resistência das micobactérias às drogas independe da exposição aos agentes antimicrobianos (KONEMAN *et al.* 2001; KRITSKI *et al.*,1993; LEITE *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 1994; ISEMAN, 1993).

Quando da associação tuberculose/Aids, a resistência do bacilo da tuberculose aos diferentes fármacos utilizados, está diretamente relacionada com a influência dirigida pela imunodeficiência gerada pelo HIV. A depleção dos linfócitos T e conseqüentemente de linfócitos T auxiliares CD4+, a inibição de resposta proliferativa e estímulos mitogênicos ou antigênicos desencadeados por proteína transmembrana gp41, diminuição gradual de reação de sensibilidade ao teste tuberculínico, linfócitos TCD4 inferior a 50 mm<sup>3</sup> inúmeros fatores que cooperam para o comprometimento da tuberculose (TIERNEY JR *et al.*, 2001).

### 1.3 PESQUISA DE NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA TUBERCULOSE

A população mundial utiliza as plantas como medicamentos desde a pré-história. Existem relatos do homem de Neandertal há cerca de 60.000 anos, do emprego de plantas com atividades medicinais para o tratamento de enfermidades humanas. Em meio ao desenvolvimento de cepas resistentes aos quimioterápicos e as infecções causadas por micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que naturalmente não respondem ao tratamento preconizado para tuberculose pulmonar. (WOLINSKY, 1992; BURMAN, 1997; COHN *et al.*, 1997).

Inúmeras plantas foram testadas e detectadas algumas substâncias com atividade contra micobactérias e até outros microrganismos (DI STASI, 1996). Alguns óleos essenciais também foram testados e determinados sua atividade micobactericida. O estudo de plantas com atividade micobactericida é alvo de inúmeros pesquisadores, que além de determinar compostos ativos contra micobactérias patogênicas de crescimento rápido, alegam atualmente de detectar também compostos ativos às espécies de crescimento lento e as MOTT que são causas importantes de infecções em imunodeprimidos (ABBOT & SMITH, 1981; BRASIL. Ministério da Saúde, 2002)

A toxicidade evidenciada pelos fármacos é alta e inclui, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, leucopenia, eosinofilia, febre, náuseas, vômitos entre outros. O problema da adesão aos quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose e das reações colaterais provocadas por eles tem levado os pesquisadores à busca de alternativas terapêuticas para a tuberculose. Nos últimos anos pesquisadores de inúmeras áreas têm dispensado atenção à



pesquisa de princípios ativos em extratos brutos de plantas e suas frações com atividade antibacteriana (GRINBAUM *et al.*,1995; SALTINI *et al.*,1993; ZACARIAS *et al.*,1994).

Atualmente, produtos naturais são responsáveis diretamente ou indiretamente por cerca de 40% dos fármacos disponíveis no mercado, sendo 70% antibióticos e antitumorais (CALIXTO & YUNES, 2001). O estudo de plantas pode envolver pesquisas diferentes como comprovação da identidade botânica, determinação de composição química e da ação farmacológica e determinação das estruturas químicas ativas envolvidas. Estudos são condicionados aos requisitos de qualidade e ausência de toxicidade dos princípios ativos vegetais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

As plantas através de vias metabólicas secundárias produzem compostos como os alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e substâncias oleosas, que por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Várias espécies de plantas têm sido pesquisadas em algumas classes como os terpenóides (CANTRELL *et al.*, 2001) e fisalinas (PIETRO *et al.*, 2000; JANÚARIO *et al.*, 2002) tem sido verificado atividade biológica contra micobactérias. Os estudos evidenciam a importância dos extratos vegetais e seus componentes na síntese de novos produtos farmacêuticos que possam ser eficientes no combate às infecções, atividades bactericida, antifúngica, espasmogênica e antiprotozoário associadas aos triterpenóides (ácido betulínico e lupeol), flavonóides (hiperina), quercetina, sulfonoglicosídeo, esteróides aromáticos, aminoácidos e proantocianinas (CALIXTO *et al.*, 2001).

As plantas e seus produtos já eram utilizados no tratamento das doenças infecciosas há muitos anos atrás. O conhecimento dos efeitos benéficos de certas plantas no tratamento de moléstias faz parte dos acervos populares desde a mais remota Antigüidade (ANDRADE *et al.*, 1994; BRUNETON, 1993; BURMAN, 1997). Não há dúvidas de que as plantas são excelentes fontes de agentes terapêuticos de todos os tipos. Essas substâncias de origem vegetal são biodegradáveis e renováveis, características de grande interesse na sociedade atual, especialmente quando se pensa não apenas na ocupação sustentável de uma região, mas sim de todo o planeta e, ainda, na conscientização das populações a fim de garantir um ecossistema viável no futuro.

Segundo CALIXTO & YUNES (2001) diversas espécies de plantas foram descritas com atividade micobactericida. Sendo que alguns compostos como terpenóides, fisalinas, Glabrol e alguns Compostos fenólicos tem sido descobertos compostos com atividade bactericida, antifúngica, espasmogênica e antiprotozoário associadas aos triterpenóides (ácido betulínico e lupeol), flavonóides (hiperina), quercetina, sulfonoglicosídeo, esteróides aromáticos, aminoácidos e proantocianinas (TUBERCULOSIS DRUG SCREENING PROGRAM, 2001).

Os Flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e substâncias oleosas, que por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Outros compostos como os terpenóides (CANTRELL *et al.*, 2001) e fisalinas (PIETRO *et al.*, 2000; JANÚARIO *et al.*, 2002) são responsáveis por atividade biológica contra micobactérias.

#### **1.4. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE UTILIZANDO ALAMAR BLUE ASSAY -MABA**

Quando se estuda a ação antimicrobiana de substâncias provenientes de plantas, geralmente são testadas várias bactérias Gram positivas e Gram negativas. Porém, raramente as micobactérias são estudadas devido a dificuldade do manuseio, crescimento lento e falta de laboratório adequado para processar este microrganismo que é considerado de nível 3 em relação a periculosidade (BRASIL.Ministério da Saúde, 1994). A descoberta de novas drogas representa um desafio principalmente com relação às substâncias com atividade contra as micobactérias, as quais têm crescimento lento, são patogênicas e sua parede rica em lipídio representa verdadeira proteção contra os agentes agressores.

Em relação à polaridade, os extratos vegetais apolares são pouco estudados, pois requerem uso de solventes, e meios de culturas especiais para a concretização do trabalho experimental. No entanto devido à alta porcentagem de lipídios na parede das micobactérias, são os extratos e princípio ativo apolar, os mais promissores em relação à atividade antimicobacteriana.

A célula micobacteriana se diferencia das demais eubactérias pela constituição de sua parede celular. Esta possui alto conteúdo lipídico (60% do peso seco das células), destacando-se os ácidos micólicos por suas características singulares e importância nos mecanismos de patogenicidade (GANGADHARAM,1998; ABBOT & SMITH,1981; GRANGE, 1998; GOODFELLOW & MAGEE, 1998; JAWETZ *et al.*,2000). Neste estudo é de grande interesse testar extratos vegetais apolares, que podem apresentar

melhor atividade antimicobacteriana, devido a maior facilidade destes compostos ativos em penetrar na parede de micobactérias.

A determinação do perfil de sensibilidade de cepas de *Mycobacterium* frente a compostos quimioterápicos, pode ser realizado por metodologias diferentes. O método das concentrações absolutas que também é referido como a determinação da concentração inibitória mínima, o método da proporção de resistência e, ainda, o método das proporções (KANTOR & LAZLO, 1998).

O método das proporções é utilizado no Brasil, incorporando-se as drogas antituberculose utilizadas no esquema terapêutico convencional em meio de Lowenstein-Jensen, no entanto os resultados fornecidos pelo uso desta metodologia oferecem resultados tardiamente, ocorrendo após 28 dias de incubação dos meios de cultura em estufa a 37°C (BRASIL.Ministério da Saúde, 1999).

O Alamar Blue (Resazurina) é composto capaz de indicar através óxido-redução à presença de crescimento microbiano. Atualmente muito empregado para determinar perfil de sensibilidade microbiano frente a fármacos sintéticos e naturais, principalmente frente ao gênero *Mycobacterium*. A utilização do MABA, frente a outras técnicas tem como benefícios à rapidez nos resultados, custo, sensibilidade, possibilidade de testar inúmeros compostos, técnica colorimétrica de fácil manejo, reprodutibilidade, emprego de quantidade reduzida de extratos vegetais comparados a outras técnicas (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU *et al.*, 1998; JANUÁRIO *et al.*, 2002).

A pesquisa da atividade antimicobacteriana de extratos vegetais é realizada preferencialmente pela técnica de microdiluição em placa, empregada

para determinar a CIM do extrato em inibir o bacilo e empregamos o Alamar Blue como revelador da sensibilidade bacteriana as drogas (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU *et al.*, 1998; BOLLELA *et al.*, 1999), sendo denominada pela técnica do MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*). A técnica do MABA tem sido empregada por diversos autores para determinar atividade antimicobacteriana de princípios ativos naturais (PIETRO *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002) e de novas drogas sintéticas (PÍCON *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 1994; BURMAN, 1997; CANTRELL *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 1994; HARDMAN & LIMBIRD, 1996; HINOUE *et al.*, 1989; JANUÁRIO *et al.*, 2002; KUBO, 1993; COWAN, 1999). Nesta técnica é determinada a Concentração Mínima Inibitória (CIM), necessária para matar 90% das células bacterianas. Entretanto a técnica do MABA não permite avaliar a atividade antimicobacteriana das drogas sobre as micobactérias internalizadas em macrófago.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS:**

Avaliar a atividade antibacteriana *In vitro* de extratos vegetais de plantas do cerrado Brasileiro frente à cepas padrões de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, *Mycobacterium avium* ATCC 25291 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**2.2.1** – Determinar Concentração Mínima Inibitória de extratos vegetais frente a cepa de *M.tuberculosis*, *M.fortuitum* e *M.avium*. Utilizando a técnica do *Microplate Alamar Blue Assay* – MABA.

**2.2.2** – Comparar os resultados de sensibilidade das espécies de micobactérias obtidos pela metodologia de Alamar Blue (*Microplate Alamar Blue Assay*) frente aos diferentes extratos utilizados.

### 3. MATERIAL E METODOS

#### 3.1. AMOSTRAS

Os extratos utilizados neste trabalho, integram o Projeto Temático Biota-Fapesp, os mesmos foram confeccionados e gentilmente cedidos pelo Dr. Wagner Villegas, Instituto de Química – Unesp – Araraquara.

##### 3.1.1. EXTRATOS VEGETAIS

Tabela I. Relação dos extratos vegetais, parte do vegetal utilizado, agente extrator e concentração dos extratos utilizados para determinação da atividade antimicrobiana. A metodologia de preparo dos extratos é apresentada no anexo: método 03.

Planta	Parte do vegetal	Agente Extrator	Solução Estoque (mg/mL)
1. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	DCM	115mg/ml
2. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	Metanol	630mg/ml
3. <i>Byrsonima cinera</i>	Folhas	Metanol	292mg/ml
4. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Clorofórmio	177mg/ml
5. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Etanólico 70%	494mg/ml
6. <i>Byrsonima crassa</i>	Aéreas	Clorofórmio	228mg/ml
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	Folhas	Metanol	419mg/ml
8. <i>Cissus suscicaulis</i>	Folhas	Clorofórmio	159mg/ml
9. <i>Curatella americana</i>	Cascas	Clorofórmio	173mg/ml
10. <i>Davilla elliptica</i>	Folhas	DCM	211mg/ml
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	Escapos	Clorofórmio	500mg/ml
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	Escapos	Clorofórmio	206mg/ml
13. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	DCM	224mg/ml
14. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	Metanol	729mg/ml
15. <i>Quassia amara</i>	Cascas	DCM	53mg/ml
16. <i>Solanum cernuum</i>	Folhas	DCM	225mg/ml
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	Metanol 70%	679mg/ml
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	DCM	183mg/ml
19. <i>Syngonanthus arthrochichus</i>	Escapos	DCM	195mg/ml
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	Capitulo	Etanólico	214mg/ml
21. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	DCM	163mg/ml
22. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	Clorofórmio	199mg/ml
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Escapos	Etanólico	718mg/ml
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	729mg/ml
25. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	500 mg/ml
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	Flores	Hexano	87mg/ml
27. <i>Turnera ulmifolia</i>	Folhas	DCM	260mg/ml

### **3.2. DROGA DE REFERÊNCIA**

Foram utilizadas soluções estoque de isoniazida (INH - Sigma) de concentração 10 mg/mL em água destilada.

### **3.3. CEPAS DO GÊNERO *Mycobacterium***

**3.3.1** Cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294

**3.3.2** Cepa padrão de *M. avium* ATCC 25291

**3.3.3** Cepa padrão de *M. fortuitum* ATCC 6841

As cepas foram então mantidas em meio inclinado de Lowenstein-Jensen até o momento do uso.

## **4.0 METODOLOGIA**

### **4.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES BACILARES**

Para a realização da técnica do MABA, foram utilizadas culturas de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. fortuitum*. Cada cepa foi mantida em meio de Lowenstein – Jensen (LJ) até o momento do uso, para obtenção da quantidade ideal de microrganismo. De cada cepa foi retirada uma alçada de bactérias, que corresponde a 5,0mg de peso seco bacteriano e incubado em meio de Middlebrook 7H9 e incubado por 10 dias a 37°C.

Após obtenção de quantidade ideal de microrganismo, as micobactérias foram transferidas para tubos Falcon de 10 ml e centrifugadas a 3.000 Rpm



durante 30 minutos. O sedimento foi então resuspendido e lavado duas vezes com tampão PBS pH 7.0, acrescido de Tween 80 estéril.

#### **4.2 TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO UTILIZANDO ALAMAR BLUE ASSAY (MABA) COMO REVELADOR (COLLINS & FRANZBLAU, 1998).**

Para a realização da técnica de microdiluição pela metodologia do MABA, foi utilizada placa estéril de 96 orifícios. Nas colunas de 1 e 12 em linhas de A a H foram adicionados 200  $\mu$ L de água destilada estéril, perfazendo a necessidade de evitar provável evaporação dos compostos a serem testados.

Os orifícios presentes nas linhas de A a D da coluna 11 receberam 200  $\mu$ L de meio Middlebrook 7H9, os orifícios correspondentes de E a H da coluna 11 receberam 100  $\mu$ L de meio Middlebrook 7H9. Os orifícios correspondentes da linha A de colunas de 2 a 10 receberam 150  $\mu$ L de meio Middlebrook 7H9 e os de linha B a H referentes a coluna 2 a 10, receberam 100  $\mu$ L de Middlebrook 7H9.

Foram então adicionados os extratos diluídos a serem testados. Todos os extratos foram diluídos para que estivessem na concentração inicial de 16.000  $\mu$ g/ml. A linha A e B da microplaca e colunas de 2 a 10, procede-se nova diluição e os extratos partem da diluição de 4.000  $\mu$ g/ml (linha A); 4.000  $\mu$ g/ml (linha B); 2.000  $\mu$ g/ml (linha C); 1.000  $\mu$ g/ml (linha D); 500  $\mu$ g/ml (linha E); 250  $\mu$ g/ml (linha F); 125  $\mu$ g/ml (linha G); 62.5  $\mu$ g/ml (linha H).

Os orifícios de coluna 2 a 10 da linha A receberam 50  $\mu$ L da diluição de 16.000  $\mu$ g/ml. Os orifícios de linhas B referentes às colunas de 2 a 9 receberam 100  $\mu$ L de extrato e a coluna 10 a droga padrão (Isoniazida 10mg/ml). Após a

homogeneização da linha B, procede à diluição de linha B a H de colunas de 2 a 10, ao final desprezar volume de 100 µl.

Ao final ser adicionado a suspensão bacilar diluída 1:25 referente a escala n.1 de MacFarland realizada após protocolo de obtenção da suspensão bacilar. Os orifícios de colunas de 2 a 10 e linhas de B a H receberam volume de 100 µl de suspensão bacilar, os orifícios das linhas E a H, referentes à coluna 11 receberam 100 µl da suspensão bacilar, com o intuito de ser controle positivo para micobactérias.

As placas então foram seladas com filme de polietileno e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, no quinto dia de incubação os orifícios A -11 e E -11, receberam 25 µl de solução reveladora de Alamar Blue na proporção 1:1 e solução de Tween 80 a 10% para a cepa de *M. tuberculosis*, quarto dia para a cepa de *M. avium* e três dias para a cepa de *M. fortuitum*. As placas então foram reincubadas por 24 horas a 37°C. A presença de cor rósea indica crescimento microbiano e a presença de coloração azul, indica ausência de crescimento microbiano, para as cores intermediárias as placas foram reincubadas por mais 24 horas. Os extratos apresentados neste trabalho foram submetidos frente as três cepas padrão e testados em triplicata.

### 4.3 PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE LEITURA PARA A TÉCNICA DO MABA

Para a realização da técnica do MABA, foi necessário padronizar o tempo de adição da solução reveladora (óxido-redução) solução de Alamar Blue. Em virtude do emprego de cepas diferentes (*M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. fortuitum*), tempo de geração diferentes, detivemos a necessidade de implantar tempo de adição específico da solução de Alamar Blue para cada espécie testada.

Para determinar a dia ideal de adição da solução de Alamar Blue, realizamos cultura das referidas cepas em placas de 96 Wells, na diluição de 1:25 a partir da escala nº1 de Mac-Farland. A partir de 24 horas de incubação adicionamos 25µL da solução de MABA na coluna A, novamente incubamos e realizamos a leitura após 24 horas. Para os testes negativos adicionamos 25µL de solução de Alamar Blue na coluna B e incubamos por mais 24 horas, sucessivamente até a determinação do ponto de viragem da solução de Alamar Blue para a coloração rosa (Vide anexo:Método 06)

Tabela II – Padronização do tempo de leitura da técnica do MABA para as cepas de *M.tuberculosis*, *M.avium* e *M.fortuitum*.

Período de Incubação (Tempo em dias)	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. frotuitum</i>
1º	-	-	-
2º	-	-	-
3º	-	-	+
4º	-	+	+
5º	+	+	+

A tabela apresenta o tempo de incubação necessário para adição da solução reveladora nas placas. Para o *M.tuberculosis* foram realizadas no quinto dia de incubação, quarto dia para *M.avium* e terceiro dia para *M. fortuitum*.

## 5. RESULTADOS

Os resultados apresentados seguem a faixa de corte preconizada por COLLINS & FRANZBLAU, (1997) como sendo de 200ug/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Tabela III: Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 pela técnica do MABA.

Planta	Parte do vegetal	Agente Extrator	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )
1. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	DCM	2000
2. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	Metanol	2000
3. <i>Byrsonima cinera</i>	Folhas	Metanol	250
4. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Clorofórmio	62,5
5. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Etanólico 70%	2000
6. <i>Byrsonima crassa</i>	Aéreas	Clorofórmio	250
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	Folhas	Metanol	500
8. <i>Cissus suscicaulis</i>	Folhas	Clorofórmio	62,5
9. <i>Curatella americana</i>	Cascas	Clorofórmio	62,5
10. <i>Davilla elliptica</i>	Folhas	DCM	2000
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	Escapos	Clorofórmio	500
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	Escapos	Clorofórmio	62,5
13. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	DCM	2000
14. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	Metanol	2000
15. <i>Quassia amara</i>	Cascas	DCM	62,5
16. <i>Solanum cernuum</i>	Folhas	DCM	500
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	Metanol 70%	2000
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	DCM	125
19. <i>Syngonanthus artrothichus</i>	Escapos	DCM	62,5
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	Capitulo	Etanólico	4000
21. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	DCM	500
22. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	Clorofórmio	62,5
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Escapos	Etanólico	1000
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	4000
25. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	4000
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	Flores	Hexano	250
27. <i>Turnera ulmifolia</i>	Folhas	DCM	500

Os resultados apresentados pelos extratos 04, 08,09,12,15,18,19 e 22 são promissores apresentando valores de CIM inferior a 200ug/ml.

A tabela IV apresenta os Concentração Inibitória Mínima (CIM), de extratos Vegetais, frente a cepa padrão de *M. avium*.

Tabela IV: Determinação da CIM de extratos vegetais, empregando-se o *M. avium* ATCC 25291 pela técnica do MABA.

Planta	Parte do vegetal	Agente Extrator	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )
1. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	DCM	2000
2. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	Metanol	2000
3. <i>Byrsonima cinera</i>	Folhas	Metanol	500
4. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Clorofórmio	250
5. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Etanólico 70%	2000
6. <i>Byrsonima crassa</i>	Aéreas	Clorofórmio	500
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	Folhas	Metanol	1000
8. <i>Cissus suscicaulis</i>	Folhas	Clorofórmio	250
9. <i>Curatella americana</i>	Cascas	Clorofórmio	250
10. <i>Davilla elliptica</i>	Folhas	DCM	125
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	Escapos	Clorofórmio	250
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	Escapos	Clorofórmio	500
13. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	DCM	4000
14. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	Metanol	4000
15. <i>Quassia amara</i>	Cascas	DCM	62,5
16. <i>Solanum cernuum</i>	Folhas	DCM	250
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	Metanol 70%	2000
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	DCM	250
19. <i>Syngonanthus artrothichus</i>	Escapos	DCM	125
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	Capitulo	Etanólico	4000
21. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	DCM	500
22. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	Clorofórmio	125
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Escapos	Etanólico	2000
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	4000
25. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	4000
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	Flores	Hexano	125
27. <i>Turnera ulmifolia</i>	Folhas	DCM	62,5

Os resultados indicam que os extratos 10,15,19,22,26 e 27, são promissores apresentando atividade antimicobacteriana frente a cepa padrão de *M.avium*, apresentando valores de CIM inferior a 200ug/ml.

A tabela V apresenta os Concentração Inibitória Mínima (CIM), de extratos vegetais, frente a cepa padrão de *M.fortuitum*.

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

Planta	Parte do vegetal	Agente Extrator	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )
1. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	DCM	4000
2. <i>Ananas ananassoides</i>	Folhas	Metanol	4000
3. <i>Byrsonima cinera</i>	Folhas	Metanol	1000
4. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Clorofórmio	4000
5. <i>Byrsonima crassa</i>	Folhas	Etanólico 70%	4000
6. <i>Byrsonima crassa</i>	Aéreas	Clorofórmio	500
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	Folhas	Metanol	4000
8. <i>Cissus suscicaulis</i>	Folhas	Clorofórmio	1000
9. <i>Curatella americana</i>	Cascas	Clorofórmio	4000
10. <i>Davilla elliptica</i>	Folhas	DCM	125
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	Escapos	Clorofórmio	500
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	Escapos	Clorofórmio	1000
13. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	DCM	4000
14. <i>Mouriri pusa</i>	Folhas	Metanol	4000
15. <i>Quassia amara</i>	Cascas	DCM	62,5
16. <i>Solanum cernuum</i>	Folhas	DCM	500
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	Metanol 70%	4000
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	Folhas	DCM	500
19. <i>Syngonanthus arthrochichus</i>	Escapos	DCM	500
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	Capitulo	Etanólico	4000
21. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	DCM	1000
22. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	Escapos	Clorofórmio	125
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Escapos	Etanólico	4000
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	4000
25. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	Capitulos	Etanólico 70%	4000
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	Flores	Hexano	125
27. <i>Turnera ulmifolia</i>	Folhas	DCM	125

Os resultados indicam que os extratos 10,15,22,26 e 27, são promissores apresentando atividade antimicrobacteriana frente a cepa padrão de *M.fortuitum*, apresentando valores de CIM inferior a 200 $\mu\text{g/ml}$ .

Tabela VI apresenta a determinação da Concentração Mínima Inibitória dos extratos vegetais utilizados frente às cepas de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. fortuitum*.

Tabela VI- Determinação da Concentração Mínima Inibitória para as cepas de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. fortuitum*

Planta	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) <i>M. tuberculosis</i>	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) <i>M. avium</i>	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) <i>M. fortuitum</i>
1. <i>Ananas ananassoides</i>	2000	2000	4000
2. <i>Ananas ananassoides</i>	2000	2000	4000
3. <i>Byrsonima cinera</i>	250	500	1000
4. <i>Byrsonima crassa</i>	62,5	250	4000
5. <i>Byrsonima crassa</i>	2000	2000	4000
6. <i>Byrsonima crassa</i>	250	500	500
7. <i>Byrsonima fagifolia</i>	500	1000	4000
8. <i>Cissus susciacaulis</i>	62,5	250	1000
9. <i>Curatella americana</i>	62,5	250	4000
10. <i>Davilla elliptica</i>	2000	125	125
11. <i>Eriocaulon ligulatum</i>	500	250	500
12. <i>Leiothrix flavescens</i>	62,5	500	1000
13. <i>Mouriri pusa</i>	2000	4000	4000
14. <i>Mouriri pusa</i>	2000	4000	4000
15. <i>Quassia amara</i>	62,5	62,5	62,5
16. <i>Solanum cernuum</i>	500	250	500
17. <i>Strychnos pseudoquina</i>	2000	2000	4000
18. <i>Strychnos pseudoquina</i>	125	250	500
19. <i>Syngonanthus artothichus</i>	62,5	125	500
20. <i>Syngonanthus bissulcatus</i>	4000	4000	4000
21. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	500	500	1000
22. <i>Syngonanthus macrolepsis</i>	62,5	125	125
23. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	1000	2000	4000
24. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	4000	4000	4000
25. <i>Syngonanthus xerantemoides</i>	4000	4000	4000
26. <i>Turnera ulmifolia</i>	250	125	125
27. <i>Turnera ulmifolia</i>	500	62,5	125

Dentre os extratos que apresentaram atividade antimicobacteriana, devemos destacar os extratos de número 15 e 22 que apresentaram CIM inferior a 200  $\mu\text{g/ml}$  para as três cepas analisadas.

## 6. DISCUSSÃO

Apesar da terapia antituberculosa datar de 50 anos atrás, o *M. tuberculosis* continua sendo um problema de saúde pública mundial. Acredita-se que 1,7 bilhões de pessoas em todo o mundo foram infectados em 1990 (PARRY & DAVIES,1996; PENNA,1998). A inconsistente eficácia da vacina do *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), o aumento dos casos de AIDS/tuberculose e desencadeamento de cepas resistentes, formam um dos pilares que esclarecem os elevados índices (COOK,1991;PENNA,1998;ABBOT & SMITH,1981). No Brasil foi possível detectar fatores de risco, tais como a redução da eficiência do Programa de Controle da Tuberculose (PCT), o uso incorreto da medicação, abandono ao tratamento, utilização abusiva de álcool e baixo nível de escolaridade (FREEDMAN & CASADEVALL, 1998; NATAL & ELIAS, 2000; MELO *et al.*,1996; MELO *et al.*,2000; OMS,1987).

O contexto entre sensibilidade e resistência de micobactérias aos diferentes antimicrobianos e a constante evolução da resistência ( SNIDER & CASTRO, 1998) pode-se dizer que os antimicrobianos que dispomos para a terapêutica estão fadados aos dialetos históricos.Provavelmente no futuro encontraremos que medicamentos como INH,RMP e PZA foram úteis ao tratamento da tuberculose e outras micobacterioses, ou ainda que são insuficientes para tratar um paciente com doença similar a Tuberculose ou ainda pelas causas inúmeras de processos infecciosos causados por MOTT (GARCIA, 1986; BARRETO *et al.*1994;WHO,1996;WAYNE & KUNBICA,1986; RODRIGUES *et al.*,2003)

O conhecimento entre pesquisadores é que se faz necessário a pesquisa de novos medicamentos para o tratamento da Tuberculose e outras doenças



causadas por micobactérias. A pesquisa por substâncias ativas contra micobactérias e por sua vez menos tóxicas, tem motivado e empenhado pesquisadores na busca de soluções para o tratamento da tuberculose que desde a antiguidade vem dizimando populações. Os medicamentos chamados fitoterápicos expressam o estudo por substâncias oriundas de plantas na necessidade da introdução de novos fármacos (ANDRADE *et al.*,1994; BELICKAS,1994; CUNHA *et al.*,1994; KUBO,1993; RAMAKERS *et al.*,1994)

Neste estudo, extratos apolares de *Byrsonima crassa*, *Cissus suscicaulis*, *Curatella americana*, *Leiosthix flavescens*, *Quassia amara*, *Strychnos pseudoquina*, *Syngonanthus artrothicus*, e *Syngonanthus macrolepis* apresentaram atividade contra a cepa padrão de *M. tuberculosis* CIM inferior a 200µg/ml. Para *M. avium* , valores de CIM inferior a 200µg/mL foram verificados para os extratos apolares de *Davilla elliptica*, *Quassia amara*, *Syngonanthus artrothichus*, *Syngonanthus macrolepis*, *Turnera ulmifolia*. Para *M. fortuitum* valores de CIM inferior a 200µg/mL foram encontrados apenas nos extratos apolares de *Davilla elliptica*, *Quassia amara*, *Syngonanthus macrolepis*, e *Turnera ulmifolia* . Para as mesmas plantas analisadas, utilizando agentes extratores polares (etanólico 70%), foram verificados CIM superiores a 200 µg/m. A elevada concentração de lipídios de alto peso molecular presente na parede de micobactérias provavelmente funcionou como uma barreira para os compostos polares, justificando os valores mais promissores para os extratos apolares (RODRIGUES *et al.*,2003; TOSSI & ELLNER,1998). Os componentes ativos, extraídos pelos extratores apolares, sendo compostos lipofílicos provavelmente puderam permear mais facilmente a barreira lipídica presente na parede das micobactérias.

Pelos dados da Tabela VI, é verificado que *M. tuberculosis* apresentou maior sensibilidade aos extratos quando comparado ao *M. avium* e ao *M. fortuitum*. Para os extratos de *Byrsonima crassa*, *Curatella americana*, *Leiothrix flavescens*, *Strychnos pseudoquina*, *Syngonanthus artrothichus* e *Syngonanthus macrolepsis*, valores crescentes de CIM foram verificados seqüencialmente para *M.tuberculosis*, *M.avium* e *M.fortuitum*. Este aumento era esperado em virtude da menor rigidez da parede do *M.tuberculosis* quando comparada à de outras duas espécies ( TOSSI & ELLNER, 1998). O *M. fortuitum* é caracterizado como sendo o mais resistente e o *M. avium* como de resistência intermediária (AL-HAJJAJ *et al.*,2001)

A Tabela VI, pode-se verificar também que extratos apolares de *Davilla elliptica*, *Turnera ulmifolia* apresentaram atividade contra *M.avium* e *M. fortuitum*, não foram efetivos para *M. tuberculosis*, fato que também poderia ser justificado pela diferença na constituição da parede entre as espécies analisadas. Entretanto devemos salientar que extrato apolares de *Quassia amara* e *Syngonanthus macrolepsis* foram ativos numa CIM inferior a 200µg/mL para as três cepas estudadas.

Alguns 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).

Os terpenóides são chamados de inseticidas naturais, dentre esta classe integram os limonóides, limoneno e o mirceno, desempenhando um papel de proteção às plantas contra a ação de 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; JANUARIO *et al.*, 2002).

Os flavonóides constituem um grande grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza, detêm presença abundante em plantas, desperta segurança e proteção aos vegetais contra a ação nociva de infecções bacterianas, fúngicas e até mesmo como agente protetor contra a ação dos raios ultravioleta e atração de polinizadores (BRUNETON, 1993; PELLETIER, 1983). Os taninos são polifenóis, associados na medicina popular para o tratamento de diversas patologias orgânicas tais como, diarreia, feridas, queimaduras, gastrite, úlcera gástrica, hemorragias, problemas renais e sistema urinário e processos inflamatórios (BEART *et al.*, 1985)

As Cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias, estruturalmente são lactonas (EVANS, 1996). A atividade farmacológica das cumarinas depende principalmente de seus padrões de substituições. O dicumarol (uma cumarina modificada) na medicina é utilizada como substância de atividade anticoagulante, a escoparona (curamina modificada) apresenta atividade imunossupressora e relaxante vascular e algumas xantonas possuem atividade antimicrobiana) contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Outras substâncias ainda pouco estudadas são citadas em alguns artigos científicos, são os chamados fitóis, um grupo de compostos que pouco interessam ao estudo químico por não apresentarem diretamente importância para a síntese orgânica, mas estão

também presentes em algumas plantas contidas neste trabalho ( HARDMAN & LIMBIRD, 1996; GHOSAL & CHAUDHURI,1975).

As plantas do gênero *Byrsonima* , possuem em sua constituição uma quantidade razoável de compostos derivados de Flavonóides, dentre eles os triterpenos (TEIXEIRA & MACHADO,2000). Estudos realizados anteriormente determinaram a existência de atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozoário. Os gêneros *Ananás*, *Cissus*, *Eriocaulon*, *Leiothrix*, *Mouriri*, *Quassia*, *Solanum*, *Strychnos*, *Syngonanthus*, *Turnera*. São extratos promissores, e escolhidos neste trabalho por serem citados na literatura com algum emprego na medicina popular para causas infecciosas e o presente tem o intuito de estudar a possível ação antimicobacteriana.

A pesquisa de novas drogas está intimamente ligada a métodos analíticos que proporcionem a detecção de compostos ativos contra bactérias. Diferentes técnicas são atualmente utilizadas, dentre elas talvez a mais conhecida é a diluição de extratos em tubos contendo meios sólidos, técnica de reprodutibilidade fácil, porém de determinação tardia onde para conseguirmos realizar a leitura são necessários no mínimo quatro a oito semanas de incubação(BRASIL.Ministério da Saúde,2002). Outro fator negativo é a necessidade de grandes volumes de extrato (que são incorporados no meio sólido). O problema se agrava quando são utilizados meios com ovos como o LJ e o Ogawa, pois os extratos são adicionados antes da fase de coagulação do meio, ocasionando aquecimento dos extratos. Caso haja presença de compostos termolábeis, pode ocorrer alteração da estrutura química com inativação dos princípios ativos (SIDDIQI *et al.*, 1993). Métodos mais novos como o sistema BACTEC e o MGIT são empregado na determinação de

sensibilidade para micobactérias frente a novos compostos, porém as metodologias apresentam elevado custo e necessita de leitores especializados (SIDDIQI *et al.*, 1993).

O BACTEC é muito empregado na determinação de sensibilidade para micobactérias frente a novos compostos, porém a metodologia apresenta elevado custo e necessita de leitor semi-automatizado, além de ser método radiométrico envolvendo riscos operacionais. O MGIT também é técnica revolucionária na análise de perfil de sensibilidade, porém apresenta elevado custo e indicador radiométrico, impossibilitando o seu emprego rotineiramente no estudo de compostos novos (SIDDIQI *et al.*, 1993).

A metodologia do MABA empregada neste trabalho oferece inúmeras facilidades, frente às outras técnicas tradicionais, por apresentar fácil manejo, reprodutibilidade dos resultados e baixo custo. Sendo uma microtécnica, a quantidade de extrato utilizada no MABA é bem inferior as demais. Outras vantagens que podem ser citadas são : menor tempo de espera, não alterar a constituição dos componentes termoláveis e possibilita avaliar concentrações múltiplas e diversos extratos simultaneamente (FRANZBLAU *et al.*,1998)

A metodologia do MABA, foi empregado neste trabalho para os testes com extratos vegetais utilizando cepa padrão de *M. tuberculosis*, *M. avium* *M. fortuitum*. Para determinar a atividade de substâncias naturais contra o *M. tuberculosis* já é preconizando a incubação de 05 dias para adição da solução de Alamar Blue (FRANZBLAU *et al.*, 1998). Porém para o emprego das cepas de *M.avium* e *M. fortuitum* foi necessário uma padronização em virtude do tempo de geração destes microrganismos, ser diferente comparado ao *M.tuberculosis*. Assim , foi definido neste trabalho a aplicação do revelador

Alamar Blue após incubação de 04 dias para *M. avium* e 03 dias para *M. fortuitum* (Anexo: Método 06). Os estudos mostraram a viabilidade da utilização do MABA mesmo para as micobactérias de crescimento rápido como *M. fortuitum*, possibilitando estudo de novas drogas para as MOTT, que mesmo pertencendo ao gênero *Mycobacterium*, apresentam sensibilidade diferenciada em relação ao *M. tuberculosis*.

Ainda citamos sobre a metodologia do MABA a reprodução fácil dos resultados, rapidez, confiabilidade, baixo custo e rentabilidade na comparação e obtenção dos referidos CIM apresentados. A metodologia do MABA foi facilmente empregada e adaptada a este trabalho já que a presença de crescimento de microrganismos e períodos de incubação foi facilitada, propicia emprego de vários extratos, facilitando a comparação entre os diferentes CIM.

O emprego de compostos apolares não exclui a atividade de extratos polares. A proposta deste trabalho é analisar se a presença de compostos solúveis e carregados pelos agentes extratores apolares que possam conferir melhor atividade antimicobacteriana. Assim como parte das plantas testadas, flores, folhas, escapos, cascas, capítulos podem apresentar compostos ativos.

Porém neste trabalho salientamos que para a espécie *M. tuberculosis*, só detivemos atividade antimicobacteriana (CIM inferior a 200 $\mu$ g/mL) utilizando agentes extratores apolares. Os agentes extratores polares como etanólico 70% detivemos CIM superiores a 200  $\mu$ g/mL. Para as cepas de *M. avium* e *M. fortuitum* repetimos a boa atuação dos extratos apolares e onde foram empregados agentes extratores de baixa polaridade, perfazendo a justificativa de que compostos lipofílicos possam permear mais facilmente a barreira lipídica presente na parede das micobactérias.

## 7.0 CONCLUSÃO

- A técnica do MABA utilizada neste trabalho, confirma o fácil manuseio da metodologia, sua real reprodutibilidade e a fácil comparação entre os resultados entre as três cepas padrão do gênero *Mycobacterium* que foram submetidas aos testes.
- A técnica de microdiluição é uma técnica que pode ser facilmente empregada para avaliar um grande número de extratos.
- Os extratos apolares apresentaram melhor CIM, justificando e comprovando a importância de utilização de agentes extratores apolares, na obtenção de compostos lipofílicos.
- A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* apresenta sensibilidade maior a alguns extratos, em relação às cepas de *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium fortuitum*.
- Podemos concluir que a atividade de CIM utilizando a cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, apresentou menores CIM os extratos do gênero: *Byrsonima*, *Cissus*, *Leiothrix*, *Quassia*, *Strychnos*, *Syngonanthus*. E por sua vez os agentes extratores utilizados foram Clorofórmio e Diclorometano.
- Os CIMs referentes a cepa de *Mycobacterium avium*, são atribuídos aos gêneros: *Davilla*, *Quassia*, *Syngonanthus*, *Turnera*. Os agentes extratores utilizados foram: Diclorometano, Clorofórmio e Hexano.

- Os CIMs referentes a cepa de *Mycobacterium fortuitum*, são atribuídos aos gêneros: *Davilla*, *Quassia*, *Syngonanthus*, *Turnera*. E os agentes extratores utilizados são: Diclorometano, Clorofórmio e Hexano.
- Neste estudo foi possível comprovar que os extratos polares, não apresentaram efeito antimicobacteriano e conseqüentemente CIM desfavorável e superior a 200µg/ml. Um exemplo é que em todas os extratos de *Syngonanthus macrolepsis*, obtido com agente extrator etanólico não apresentou efeito de CIM inferior a 200µg/ml, porém com a utilização de clorofórmio como agente extrator foi apresentado CIM , inferior a 200µg/ml. Comprovando a necessidade do estudo de extratos apolares.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ABBOT,M.R.; SMITH,D.D. Mycobacterial infections in immunocompromised patients. **Med. J. Aust.**, V.1 , p. 351- 353, 1981.

ALCAIDE, F.; RICHTER, I.; BERNASCONI, C.; SPRINGER, B.; HAGENAU, C.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; TORTOLI, E.; MARTÍN, R.; BÖTTGER, E. C. and TELENTI, A. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: Implications for epidemiological and pathogenicity studies. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 35, nº 8, august, p. 1959-1964,1997.

AL-HAJJAJ, M.S.; AL-KASSIMI, F.A. AL- MOBEIREEK, A.F.ALZEER, A.H. Progressive rise of *Mycobacterium tuberculosis* resistance and streptomycin in Riyadh, Saudi Arabia. **Respirology**, V.6, n.4, p.317-322, Dec. 2001.

AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.** , New York, v. 142, n. 3, p. 725-35, 1990.

ANDRADE,F.J.L.;MELO DINIZ,M.F.F.;OLIVEIRA,R.A.G. Plantas que atuam no trato respiratório. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil,13 Fortaleza, Ceará. Anais.1994**

BARBER, T. W.; CRAVEN, D. E. and McCABE, W. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. A report of 9 cases and a review of the literature. **Medicine**, vol. 69, nº 6, 375-383.1991

BARRETO, A.M.W.; CAMPOS,C.E.D.; MARTINS,F.M.Manual de bacteriologia da tuberculose:Centro de referência Prof. Hélio Fraga.2ed. **Rio de Janeiro: Guanabara**, 115p 1994.

BEART,J.E.;LILLEY,T.H.;HASLAM,E. Plant polyphenols –secondary metabolism and chemical defence: some observations. **Phytochemistry**, V.24,p-33-38, 1985.

BÉLICKAS,T.A saúde que vem das plantas.**Jornal da Unesp**, n. 89 , p 6 – 7, 1994

BENETUCCI, J. A.; BOUZA, J. .; COMPAGNUCCI, M. A.; CORTI, M.; ORTEGA, G.; BAJA, C. D.; LONARDO, M. D.; MONTANDER, L. J. G. and ASTARLOA, L. La tuberculosis como infección oportunista en el SIDA. **Infectologia y Microbiologia Clinica**, vol. 4, nº 3, 61-66.1992

BILLO, N.E. Programa de controle da tuberculose nos tempos da infecção pelo HIV. In: Seminário interprogramas HIV/ tuberculose. Brasília, 1994.**Anais**. Fortaleza, p.25-29,1995.

BLOOM, B. R. and SMALL, P. M. The evolving relation between humans and *Mycobacterium tuberculosis*. **The New England Journal of medicine**,vol. 338, nº 10, march, p. 677-678.1998.

BOFFO, M.M.S.;MATTOS,I.G.;RIBEIRO,M.O.;NETO,I.C.O. Tuberculose associada à AIDS:características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil.**J. Bras. Pneumol**. V.30(2), p. 141-146, 2004.

BOLLELA,V.R.;SATO,D.N.;FONSECA,B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar.**Rev. Saúde Pública**.V.33(3), p-281-286,1999.

BOSHOFF, H.I.M.; MIZRAHI,V. Expression of *Mycobacterium smegmatis* Pyrazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* Confers Hypersensitivity to Pyrazinamide and Related Amides.**J. of Bacteriology**. V.182 (19) , p.5479-5485, 2000.

BRASIL.Ministério da Saúde.Fundação Nacional de Saúde. Reunião de avaliação operacional e epidemiológica do programa Nacional de Controle da Tuberculose na década de 80. **Bol. Pneum.Sanit.** Número especial, Brasília,1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à saúde. Divisão Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis-SIDA/AIDS. **Co-infecção TB/HIV/AIDS.**Brasília, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Plano Nacional de Controle da tuberculose.**Brasília, DF, p.1-15,1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose.** Brasília, 2002, 64 p. (Cadernos de Atenção Básica nº 6. série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 148).

BRUNETON,J. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales. 2ed. **Paris: Tec & Doc,** 1993

BURMAN, W.J. The value of in vitro drug activity and pharmacokinetics in predicting the effectiveness of antimycobacterial therapy: a critical review. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v. 313, n. 6. p. 355-63, 1997.

BUX-GEWEHER, I; HAGEN, H. P.; RÜSCH-GERDES, S. and FEURLE, G. E. Fatal pulmonary infection with *Mycobacterium celatum* in na apparently immunocompetent patient. **Journal of Clinical Microbiology**,vol. 36, nº 2, feb., p. 587-588.1998

CALIXTO,J.B.;YUNES,R.A. Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.**Editora Argos,** Chapecó, 2001

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**, v. 67, p. 1-10, 2001.

CECHINEL FILHO,V.; YUNES,R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v.21, n.1, p-99 –105, 1998

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, Atlanta, v. 42, n. 49, p. 961-4, 1993.

CHAISSON,R.E.;STOKIN,G. Tuberculosis and human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.** V.159, p. 96-100, 1989.

COHN, D.L.; BUSTREO, F.; RAVIGLIONE, M.C. Drug-Resistant tuberculosis: review of de worldwide situation and the WHO/ IUATLD Global Surveillance Project. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 24, p. S121-30, 1997, Supplement 1.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother** , v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.

CONVILLE, P. S. and WITEBSKY, F. G. Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**,vol. 36, nº 6, june, p. 1555-1559,1998

COOK, G. C. Immunosuppression and *Mycobacterium* sp infection. **Quarterly Journal of medicine, New Series**,february, 78, nº 286, p. 97-99.1991

COOPER, A.M.; DALTON, D., STEWART A.; GRIFFIN, J. ; RUSSEL, D.; ORME, I. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, p. 2243-2247, 1993.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CORTINAS, M.N.; FERNANDEZ, M.; VALETA, M.I.; URIARTE, M.R.;MOGDASY,M.C.Caracterización genotípica de 80 cepas Del género *Mycobacterium* en Uruguay.**Rev Med Uruguay.**;V18, p.230-238,2002.

COSTALLAT, L. F.; DE CASTRO, A. F. P.; RODRIGUES, A. C. and RORIGUES, F. M. Examination of soils in the Campinas rural area for microorganisms of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. **Australian Veterinary Journal**,vol. 53, july, 349-350.1977.

CUNHA,G.M.A.; VIANA.G.S.B.; RAO,V.S.N.; MAFEZOLI,J.; OLIVEIRA,M.C.F.; LIMA,M.A.S.; SILVEIRA,E.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Cróton* e *Psidium*. In: **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil,13, Fortaleza, Ceará, Anais.1994**

DABORN, C. J.; GRANGE, J. M. and KAZWALA, R. R. The bovine tuberculosis cycle-an African perspective. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**,81, 27S-32S.1996.

DALCOMO M.P.; FORTES A , MOTTA R.M.; BARRETO, A M.W. GERHARDT, F.G. Retrospective analysis of multidrug resistant tuberculosis (MDRTB) cases treatment. **Am.J. Respir. Crit. Care med**, v.157 n.3,1998.

DANNENBERG, A.M. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Hosp. Pract.**,v.28, p. 33-40, 1993.

DAVID, H.; LEVY-FREBAULT, V. and THOREL, M. F. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Institut Pasteur, Paris. 85p. 1989

DELABIE, J.; WOLF-PEETERS, C.; BOBBAERS, H. BILBE, ,G. and DESMET, V. J. Immunophenotypic analysis of histiocytes involved in AIDS-associated *Mycobacterium scrofulaceum* infection: Similarities with lepromatous lepra. **Clinical Exp. Immunology**,85: 214-218.1991.

DINIZ, L.S.; GERHARDT,G.; MIRANDA,J.A.; MANCEAU,J.N.Efetividade do tratamento da tuberculose em oito municípios de capitais brasileiras.**Bol. Pneum. Sanit.** V.3, p. 8-18, 1995

DI STASI,L.C.Plantas medicinais:arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. **Editora Unesp**, São Paulo, 1996.

DOLIN, P.J.; RAVIGLIONE, M.C.; KOCHI,A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. **Bull World Health Organization**, Genebra, v. 72, n. 2, p. 213-20, 1994.

ELLNER, J. J.; GOLDBERGER, M. J. and PARENTI, D. M. *Mycobacterium avium* infection and AIDS: A therapeutic dilemma in rapid evolution. **The Journal of Infectious Diseases**,163: 1326-1335.1991

EVANS,W.C. Trease and Evan's Pharmacognosy.**London: WB Saunders**, 14 ed. 1996.

FAIRCHILD, A. L. and OPPENHEIMER, G. M. Public health nihilism vs pragmatism: History, politics and the control of tuberculosis. **American Journal of Public Health**,vol. 88, nº 7, 1105-1117.1998

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**,vol. 9, nº 2, april, 177-215.1996.

FALKINHAM III, J. O. Transmission of mycobacteria. In GANGADHARAM, P. R. J. and JENKINS, P. A. **Mycobacteria** vol. I Basic aspects.178-209, 400pp.1998.

FIGUEROA, M.L.; LOPEZ,V.C.S. Descripción de la resistência adquirida Del *Mycobacterium tuberculosis* a los antibióticos contra la tuberculosis en Bogotá entre octubre de 1996 y diciembre de 2000. **Calle**, V.13, p.32-69, 2000

FIUZA DE MELLO, F.A.; AFIÚNE,J.B.Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **J. Pneumol.**, Porto Alegre, v.19. n.1, p. 19-24, 1993

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M. B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; QUENZER, V. K.; FEERGUSON, R. M.; SHEEN, P.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol.**, V. 32, n. 2, p. 362-366, 1998.

FREEDMAN, A.G.; CASADEVALL, A. Serum Therapy for Tuberculosis Revisited: Reappraisal of the Role of Antibody-Mediated Immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Reviews**.V.11,n.3,p.514-532, 1998.

FREIRE, D. N. Tuberculose In AMATO NETO, V. ; BALDY , J. L. S. **Doenças Transmissíveis**, 3<sup>a</sup> ed., rev. e ampl., São Paulo, SARVIER,p. 845-868.; 929pp.1989

GANGADHARAM, P.R.J. Resistance in Tubercle bacilli. In: GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P.A. **Mycobacteria. I. Basic aspects**. New York: Chapman & Hall, V.1, p.72, 1998.

GARCIA,J.T. Manual da Sociedade Européia de Micobacteriologistas. Micobacteriologia Clínica e de Saúde Pública. Lisboa: **Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”**, 98p 1986

GARCIA GARCIA, M. L.; GÓMEZ, J. L. V.; SANCHO, M. C. G.; ÁLVAREZ, R. A. S.; ZACARÍAS, F. and AMOR, J. S. Epidemiology of AIDS and tuberculosis. **Bulletin of PAHO**, 29(1), p. 37-57.1995.

GHOSAL,S.;CHAUDHURI,R.K. Chemical constituents of Gentianaceae. Antitubercular activity of xanthonas of *Canscora decussata* Schuit. **J. Pharm. Sci.** V.64, p-888-889, 1975.

GIAYETTO, V. O. and CABRERA, L. Isolation of *Mycobacterium flavescens* from na AIDS patient. **Infectologia Y Microbiologia Clinica**,vol. 6, nº 4, p. 130.1994

GOODFELLOW, M.; MAGEE, J.G. Taxonomy of mycobacteria. In: GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P.A. **Mycobacteria I. Basic aspects**. New York: Champman & Hall, p.1-71.1998

GRAHAM-JR, L.; WARREN, N. G.; TSANG, A. G. and DALTON, H. P. *Mycobacterium avium* Complex pseudobacteriuria from a Hospital water supply. **Journal of Clinical Microbiology**,vol. 26, nº 5, may, p. 1034-1036.1988

GRANGE, J. M. Pathogenesis of mycobacterial disease. In GANGADHARAM, P. R. J. and JENKINS, P. A. **Mycobacteria** vol. I Basic aspects.145-175, 400pp.1998.

GRINBAUM,R.S.; DAHER,M.; MEDEIROS,E.AS.; MENDONÇA,J.S.; BEU.M.F.; KUSANO,E.; TELLES,M.AS.; EUKI,S.Y.M. Infecção casuada por *Mycobacterium tuberculosis* com resistência primária a múltiplas drogas:relato de um caso em pacientes com AIDS. **Ver. Ass. Med. Brasil.**, V. 41, p- 255 – 256, 1995

HARDMAN,J.G.;LIMBIRD,L.E. Gooldman e Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. **New York: Mac Graw-Hill**, 9 ed, 1996



HART, C.A.; BEECHING, N.J.; DUERDEN, B.I. Tuberculosis into the next century. **J. Med. Microbiol.** V.44 p.1-34, 1996.

HASS, W. H.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L. and CRAEFORD, J. T. Mixed –Linker Polymerase Chain Reaction: anew Method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**,vol. 31, nº 5, may, p. 1293-1298.1993.

HAAS, H. and FATTAL, B. Distribution of mycobacteria in different types of water in Israel. **Water res.**,vol. 24, nº 10, p. 1233-1235.1990.

HEIFETS, L. B. and JENKINS, P. A. Speciation of mycobacteria in clinical laboratories. In GANGADHARAM, P. R. J. and JENKINS, P. A. **Mycobacteria** vol. I Basic aspects. 308-350, 400p.1998.

HIJJAR, A. M.; PROCOPIO, M.J.; OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, G.M. A tuberculose no Brasil e no Mundo. **Bol. Pneumologia Sanitária.**, V.9, n.1, p.10, jul/dez 2001.

HINOUE, J.B.; HARVALA, C.E.; HINOUE, E.B. Antimicrobial activity screening of 32 comos constituents of essential oils. **Die Pharmazie**, v.44, p. 302-303, 1989.

HIRSCHMAN, S. Z. Mycobacterial infection in the AIDS era: Implications for infection control and employee health. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, vol. 54, nº 4, september, 207-208.1990

HORSBURGH, C. R. *Mycobacterium avium* Complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, may, 9, p. 1332-1338,1991.

HORSBURGH, C. R.; HAVLIK, J. A.; ELLIS, D. E.; KENNEDY, E.; FANN, S. A.; DUBOIS, R. E. and THONPSON, S. E. Survival of patients with acquired immune deficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* Complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 144: 557-559, 1991

ISEMAN, M.D. Treatment of multidrug resistant tuberculosis. **N. Engl. J. Med.** V.329, p. 784-791, 1993

JANUÁRIO, A. H.; FILHO, E. R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res.**, v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.

JARDIM, P.C.R.; ZAMARIOLI, L.A.; COELHO, A.G.V.; FIGUEIREDO, T.R.; ROZMAN, M.A. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas no município de São Vicente. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** V.60, n.2, p.119-123, 2001

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; BROOCKS, G. F.; BUTEL, J. S. & ORNSTON, L. N. **Microbiologia Médica**, 21 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.223-229, 2000.

KANTOR, I. M.; LAZLO, A. Tuberculosis laboratory procedures for developing countries. In: GANGADHARAM, P. R. & JENKINS, P. A. **Mycobacteria. I Basic aspects.** New York: Chapman & Hall, p. 351-390. 1998.

KENT, P. T. and KUBICA, G. P. **Public health mycobacteriology a guide for the level III laboratory, Centers for Diseases Control**, Atlanta, 207pp, 1985

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico laboratorial de Microbiologia: texto e Atlas colorido. 5.ed. São Paulo: **Editora Medsi**, p. 941 –947, 2001.

KRITSKI,AL.; DALCOMO,M.P.; BRAVO DE SOUZA,R.; HOLLANDA,T.; GONTIJO FILHO,P.P.;FIUZA DE MELO,F.A.Tuberculose entre profissionais de saúde. Risco ocupacional. **J. Pneumol.**,V.19,p 113- 121,1993

KUBO,I. Screening methods for antimicrobial agents from plants. **S.n.t.**,18p 1993.

KUMAR, R.A.; PAUL,K.L.; INDULAKSHMI,R.; MANJU,Y.K.; KUMAR,K.V.; AYYAPPAN,P.; JOSHI,M.; MUNDAYOOR,S. Analysis of drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Triruvananthapuram using Alamar Blue Assay.**C.Science**. V.80(1),p.70-72,2001.

LEITE, C. Q. F.; BARRETO, A. M. W. and LEITE, S. R. A. Thin-layer chromatography of mycobactins and mycolic acids for the identification of clinical mycobacteria. **Revista Microbiologia**, São Paulo,26(3):192-199.1995

LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JR.,R.Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose.**Rev.Ciênc. Farm.**São Paulo, v.18, n.1,p.17-28,1997

LEITE, C. Q. F.; SOUZA, C. W. O. and LEITE, S. R. A. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: Four years of experience. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, nov./dec.vol. 93(6):801-805.1998

LEVY-FREBAULT, V. and DAVID, H. L. *Mycobacterium kansasii*: Contaminat du réseau d'eau potable d'un hôpital. **Ver. Epidém. Et Santé Publ**,31, 11-20.1983

LIMA, R. J. ;MADI , K. Tuberculose na infância. **Cultura médica**. 2 ed. Rio de Janeiro, p17-26, 1988.

LIU, Z. SHILKRET, K. L.; TRANOTTI, J.; FREUND, C. G. and FINELLI, L. Distinct trends in tuberculosis morbidity among foreign-born and US-born persons in New Jersey, 1986 through 1995. **American Journal of Public Health**, vol. 88, nº 7, july, p. 1064-1067.1998

LOURES, L.A.M. Epidemiologia da interação HIV/TB.In: Seminário Interprogramas HIV/Tuberculose. Brasília, 1994. **Anais**. Fortaleza, p. 39-50,1995.

MAcKENNA, M. T.; McCRAY, E.; JONES, J. L.; ONORATO, I. M. and CASTRO, K. G. The fall after the rise: Tuberculosis in the United States, 1991 trough 1994. **American Journal of Public Health**, vol. 88, nº 7, 1059-1063.1998.

MANZANO.J.R.; MANTEROLA.J.M.; AUSINA.V.; SAURET,J. Nomenclatura y clasificación de las micobacterias. **Arch Bronconeumol**.V34, p.154-157, 1998.

MELO, F.A.F.; AFIUNE,J.B.;RIBEIRO,L.H.G.; CASTELO,A. A resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* num serviço ambulatorial de referência em São Paulo: evolução por três décadas e comparação com outros estudos nacionais. **J. Pneumol**. São Paulo, V. 1 p.3-7,1996

MELO, F.A.F; DE FELICE, E.A.A; SPADA, D.T.A.; AFIUNE, J.B.; CASTELO,A. Resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* em uma referência na cidade de São Paulo. Evolução por quatro décadas.**J. Pneumol**. São Paulo, V.26 (3), 2000.

MUÑOZ, M.; RAYNAUD, C.; LANÉELLE, M. A.; JULIÁN, E.; MARÍN, L. M. L.; SILVE, G.; AUSINA, V. DAFFÉ, M. and LUQUIN, M. Seroreactive species-specific lipooligosaccharides of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. (formerly *Mycobacterium chelonae*-like organisms): Identification and chemical characterization. **Microbiology**, 144: 137-148.1998

NATAL, S.;ELIAS,M.V. Projeto de Análise de Informação para Tuberculose. **Bol. Pneumol. Sanit.** V.8,n.1,p.15-22,2000

NASSOS, P. S.; YAKJO, D. M.; SANDERS, C. A. and HADLEY, W. K. Respiratory specimens from AIDS and non-AIDS patients in a San Francisco Hospital. **Am. Rev. Respir. Dis.**,143:66-68.1991

NEUMANN, M; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; HAGENAU, C. and BEHRINGER, K. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. **Applied and Environmental Microbiology**,vol. 63, nº 2, feb., p. 547-552.1997

OLIVEIRA, C.C.; SIQUIERA,J.M.; SOUZA,K.C.B.; RESENDE,U.M. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de plantas do cerrado. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL,13, Fortaleza, Ceará. **Anais,1994.**

OMS. Organización Panamericana de Salud. Manual de los metodos y procedimientos para los programas integrados de tuberculosis. **Washington. OPS Pub Cientif.** n.489, 1987

PARRY, C. and DAVIES P. D. O. The resurgence of tuberculosis. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**,81, 23S-26S,1996

PELLETIER,S.W. The Nature and definition of an alkaloid. In: PELLETIER,S.W.. Alkaloids. **Chemical and biological perspectives. New York: John Wiley.** p-131, 1983

PENNA,M.L.F.**Tuberculose e AIDS.Net**, abr. 1998. Disponível em:<<http://www.aids.gov.br/simposat/tuber.htm>>. Acesso em 16.02.2003

PICON,P.D.; GIUSTINA,M.L.D.; RIZZON,C.F.C.; BASSANESI,S.L.; ZANARDO,A.P.; MICHALCZUK,M.T.; RICARDI,L.R.Resultado do tratamento com estreptomicina, isoniazida e etambutol (esquema SHM).**J. Pneumol.V.28** (4), p-187-192,2002.

PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

POZNIAK, A. L.; UTTLEY, A. H. C. and KENT, R. J. *Mycobacterium avium* Complex in AIDS: Who, when, where, why and how? **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**,81, 40S-46S.1996

RAMAKERS,G.;NEUMANN,G.;MOREIRA LIMA,H.J. Estudo das plantas utilizadas como medicinais no estado do Ceará. **In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 13, Fortaleza, Ceará. Anais.** 1994

RAYNAUD, C.; ETIENNE, G.; PEYRON, P. LANÉELLE, M. A. and DAFFÉ, M. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, 144: 577-587.1998

RAVIGLIONE, M.C; DYE, C.; SCHMIDT, S.; KOCHI, A. WHO Global surveillance and monitoring project. Assessment of worldwide tuberculosis control. **Lancet**, London, v. 350, n. 9078, p. 624-9, 1997.

ROBBINS,S.L.;COTRAN,R.S.;KUMAR,V. Patologia estrutural e funcional.**Guanabara Koogan.** 5ed. Rio de Janeiro, p.286-288,1996.

RODRIGUES, M.A.V.; ANDRÉ,M.C.D.P.B.; ALVES,S.L.; SOUZA,M.P.M.; KIPNIS,A.; SERAFINI,A.B. Identificação e teste de susceptibilidade a drogas de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes provenientes de hospital público de referência, Goiânia/GO. **Rev Bras.Anal.Clinicas.V.** 35(2), p.59-62,2003.

ROSEMBERG, J. Tuberculose. In: Tarantino, A.B. Doenças Pulmonares. **Guanabara Koogan**. 3ed. Rio de Janeiro, 1990.

ROXO, E. *M. bovis* como causa de zoonose. **Revista Ciência Farmacêutica**, São Paulo, 18(1): 101-108, 1998.

RUNYON, E.H. Mycobacteria encountered in clinical laboratories. **Lepr. Briefs**, V.9, p 21-23, 1958

SALTINI, C.; AMICOSANTE, M.; GIRARDI, E.; ANTONUCCI, G.; HIPÓLITO, G.; AMEGLIO, F.; MONNO, L.; CONGEDO, P.; ANGARANO, G.; BABUDIERI, S.; GUARALDI, G.; VISCO, G.; PICCOLELLA, E.; PAONE, G.; PALLOTTA, G.; BISETTI, A. Early abnormalities of the antibody response against *Mycobacterium tuberculosis* in Human Immunodeficiency Virus Infection. **J. Infect. Dis.**, V.168, p 1409-1414, 1993

SANT'ANNA, C.C. Tuberculose na infância e na adolescência. São Paulo: **Editora Atheneu**, p. 1-15. 2002

SANT'ANNA, C.C.; MOURGUES, L.V.; FERRERO, F.; BALANZAT, A. M. Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil- uma visão atualizada de um antigo problema. **Jornal de Pediatria**. V.78 n.2 p.205, 2002

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D.V. Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. **Guanabara Koogan**. 2ed. Rio de Janeiro, p301-315, 2001.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; WEBER, A. and FISCHEDER, R. Comparison of decontamination methods of the isolation of mycobacteria from drinking water samples. **Journal of Clinical Methods**, vol. 14, p. 177-183. 1991

SHEPPARD, D. S. A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940. **História, Ciência e Saúde – Manguinhos**. V.3 n.1, p1-10 mar/jun 2001.

SIDDIQI, S. H.; HEIFETS, L. B.; CYNAMON, M. H.; HOOPER, N. M.; LAZLO, A.; LIBONATI, J. P.; LINDHOLM-LEVY, P. J.; PEARSON, N. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 9, p. 2332-2338, 1993.

SNIDER, D. E. and CASTRO, K. G. The global threat of drug-resistant tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, vol. 338, nº 23, june, 1689-1690,1998.

STOSÁREK, M.; KUBIN, M. and JARESOVÁ, M. Water-borne household infections due to *Mycobacterium xenopi*. **Central European Journal of Public Health**,vol. 1, nº 2, p. 72-80. 1993

STRATTON, C. W. Mycobacterial infections other than tuberculosis in the AIDS era. **Infectious Diseases Newsleter**, ELSEVIER, vol. 11, nº 12, december, 89-96.1992

TEIXEIRA,L.A.G.; MACHADO,I,C. Pollination and reproductive system of *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). **Acta Bot. Brás**,vol.14,nº03, Setembro, p-347-357.2000

TELLES, M.A.S.; CURCIO,M.; UEKI,S.Y.M.; PALACI,M. Quimioterapia da Tuberculose: Fundamentos, regimes e resistência bacteriana. **Rev.Ciênc. Farm.**São Paulo, v.18, n.1,p.29,1997 .

TIERNEY JR, L.M.; MCPHEE, S.J.;PAPADAKIS,M.A. Diagnóstico & Tratamento. **Atheneu Editora**. São Paulo, p.1228-1233,2001.

TOSSI, Z.; ELLNER, JJ.H. Response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Front Biosci**. V.25, n.3 p. 133-140, 1998



TUBERCULOSIS DRUG SCREENING PROGRAM. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia –São Paulo. **Ed. Atheneu.**, p 915-921, 1996

VON REYN, C. F.; ARBEIT, R. D.; TOSTESON, A. N. A.; RISTOLA, M. A.; BARBER, T. W.; WADDELL, R.; SOX, C. H.; BRINDLE, R. J.; GILKS, C. F.; RANKI, A.; BARTHOLOMEW, C.; EDWARDS, J.; FALKINHAM II, J. O.; O'CONNOR, G. T. and the International MAC study Group. The international epidemiology of disseminated *Mycobacterium avium* Complex infection in AIDS. **Rapid Science Publishers**, vol. 10, nº9, 1025-1032.1996

WALLACE, R. J.; BROW, B. A.; SILCOX, V. A.; TSUKAMURA, M.; NASH, D. R.; STEELE, L. C.; STEINGRUBE, V. A.; SMITH, J.; SUMTER, G.; ZHANG, Y. and BLACKLOK, Z. Clinical disease, drug susceptibility, and biochemical patterns of the unnamed third biovariant Complex of *Mycobacterium fortuitum*. **The Journal of Infectious Diseases** , 163: 598-603.1991

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. The Mycobacteria. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins,. p.1435-1457,1986

WOLINSKY, E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. **Clin. Inf. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **TB/HIV**. A Clinical manual. WHO Bull., 200 p.1-135, 1996

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report on the Tuberculosis Epidemic. Tuberculosis (TB) Annual Report** - DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course) - A Breakthrough in TB Control, 40 p., 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report – Global Tuberculosis Control – Surveillance Planning, Financing.** 2002 ([http:// www. Who.org](http://www.who.org))

WREN, B. W.; STABLER, R. A.; DAS, S. S.; BUTCHER, P. D.; MANGAN, J. A.; CLARKE, J. D.; CASALI, N.; PARISH, T. and STOKER, N. G. Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. **Microbiology**,144:1205-1211,1998

ZACARIAS, F.; GONZALES, R.S.; CUCHI,P. El Sida y su interacción con la tuberculosis en América Latina y el Caribe. **Bol. Of. Sanit. Panam.** V.116, n.3, p.250-262, 1994.

# **LISTA DE ANEXOS**

**Método-1****Preparo Dos Meios De Cultivo: Lowenstein – Jensen (Lj)****1) Composição**

Fosfato monopotássico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) -----	2.4g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )-----	0.5g
Ácido cítrico-----	0.5g
L-asparigina-----	3.6g
Fécula de batata-----	30g
Glicerol-----	9.6g
Água destilada-----	600ml
Ovos integrais homogeneizados-----	1000ml
Verde malaquita, 2% aquosa-----	20ml.

**2) PREPARO**

Dissolver os sais e a asparigina em água, realizar todo procedimento em erlenmeyer de 2000ml, adicionar a fécula de batata, levar ao fogo até que a fécula de batata se dissolva. Adicionar o glicerol e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Esfriar a temperatura ambiente, manter em estufa 37°C para teste de esterilidade.

Os ovos devem ser limpos, utilizando água e sabão 5% e em seguida escovados e submersos em álcool a 70% por 6 horas. Utilizando luvas, quebrar os ovos em batedeira (estéril), homogeneizar os ovos, filtrar em 4 camadas de gaze estéril, em funil estéril, para uma proveta (estéril) onde se mede o volume necessário de ovos homogeneizados.

Adicionar os ovos filtrados à mistura de sais e fécula de batata, adicionar o verde malaquita e agitar até completa dissolução.

### **3) Distribuição Do Meio Nos Tubos Com Tampa Rosca**

Os tubos utilizados são de tampa rosca 16 X 125 mm, sendo o meio distribuído num volume de 5 a 7 ml por tubo.

### **4) Coagulação Do Meio**

Os tubos são coagulados em estufa com temperatura de 80°C, por 60 minutos, os tubos são inclinados, com as tampas semi abertas para que a água evapore. Após coagulação, os tubos devem ser incubados a 37°C por 48 horas para teste de esterilidade com tampas ligeiramente frouxas, com a finalidade de eliminar água.

**Método – 2****Meio De Cultivo: Middlebrook 7h9****1) Composição Do Meio**

Citrato férrico amoniacal -----	0.04g
Fosfato dissódico-----	2.5g
Fosfato monopotássico-----	1.0g
Sulfato de magnésio-----	0.05g
Sulfato de amônio-----	0.5g
L – glutamato-----	0.5g
Piridoxina-----	0.01g
Biotina-----	0.0005g
Citrato de sódio-----	0.01g
Cloreto de cálcio-----	0.0005g
Sulfato de zinco-----	0.0001g
Sulfato de cobre-----	0.0001g
Tween 80-----	0.5 ml
Glicerol-----	5.0ml
Água destilada q.s.p-----	1.000ml
<b>OADC</b>	
Albumina bovina fração V-----	5.0g
Dextrose-----	2.0g
Catalase-----	0.0003g
Água destilada-----	100ml

## 2) Preparo Do Meio de cultura Middlebrook 7H9

O meio de cultura Middlebrook 7H9 é adicionado de glicerol a 50% e de Tween 80 a 20% para evitar a formação de grumos de micobactérias durante o período de incubação em estufa a 37°C.

Para o preparo de 100 mL do meio de cultura foram utilizados:

Middlebrook 7H9 .....	0,47g
Água destilada .....	90,0 mL
Tween 80 a 20% .....	250 µL
Glicerol a 50% .....	400 µL

O meio foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos e, após o resfriamento, acrescentado 10,0 mL do suplemento OADC, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima.

### Método – 3

#### Método De Solubilização Dos Extratos Brutos Vegetais

##### 1) Procedimento

- Pesar o extrato bruto na balança;
- Anotar a massa na respectiva folha do caderno;
- Transferir a massa num frasco apropriado e colocar inicialmente 1,5 mL do solvente (DMSO);
- Submergir o frasco com extrato bruto e o solvente no aparelho de ultra-som;
- Ligar o aparelho durante 5 minutos e transcorrido o tempo, repousar a solução durante 1 dia na geladeira;
- Ligar o aparelho por mais 5 minutos;
- Repetir o procedimento, 5 em 5 minutos acrescentando 0,5 mL nestes intervalos, até que o extrato solubilizar completamente. Deve-se anotar o tempo transcorrido e o volume utilizado;
- Pode-se utilizar o shake, para facilitar na solubilização.

##### Aparelho de ultra-som

- Completar o volume até o local indicado no aparelho com água;
- Completar o volume sempre que a água aproxima do limite da água permitida; (pode-se colocar o cano de plástico para cima, não a necessidade de preencher a água);
- Concluído o experimento, descartar a água;
- Limpar o aparelho.

##### Informações:

##### DMSO

DMSO: dimetil sulfóxido

$C_2H_6SO$  MM=78,13g/mol

Ponto de congelamento=18°C (facilmente congelado, descongela vagorosamente na temperatura ambiente)



**Método – 4****Solução De Alamar Blue**

(preparação de solução final 120 uL) – **2 pocinhos**

- Adicionar num tubo 900 uL de H<sub>2</sub>O destilada estéril e 100 uL de tween 80;
- Volume final anterior 1000 ul de **solução A**;
- Prepar numa razão volume:volume;
- Retirar 60 uL de **solução A**;
- Adicionar num tubo;
- Retirar 60 uL de **Alamar Blue**;
- **Razão 1:1**;
- Acrescentar no tubo anterior;
- Solução final 120 uL.

(preparação de solução final 4000 uL) – **todos os pocinhos: 2 placas**

- 1800 uL de H<sub>2</sub>O destilada estéril no tubo;
- 200 uL de tween 80;
- 2000 uL de alamar blue;
- Homogeneizar;
- 25 uL em cada weels, menos na coluna 1 e 12;
- Ficar 24h para verificar o resultado.

## **Método 5**

### **Tampão PBS (10X)**

- 80g NaCl (Merck)
- 20g KCl (Merck)
- 14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck)
- 4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- H<sub>2</sub>O milli-Q até perfazer um litro
- Ajustar o pH 7.4.

**Método 6****Padronização do tempo de leitura para a técnica do MABA****Padronização para *M.tuberculosis*****Técnica:**

- A coluna de número 1e12 apenas recebe 200uL de água destilada estéril, de linhas A-H
- A coluna número de 2 a 10 linha A 150ul de meio Middlebrook 7H9
- A coluna de 2-10 e linhas de B a H receberam 100 µl de meio Middlebrook 7H9
- Foi adicionado 50µL de suspensão bacteriana 1:25 a partir da escala nº 1 de Mac-Farland nos Wells da coluna de 2-10 e linhas de B-H
- A placa foi incubada a 37°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
B	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
C	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
D	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
E	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
F	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
G	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
H	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○

A coluna 2 = tempo zero

- A coluna 3 = recebe 25µL de solução de Alamar Blue após 24horas de incubação (teste negativo- permanece azul)
- A coluna 4 = recebe 25µL após 48 horas de incubação (teste negativo)
- A coluna 5 = recebe 25µL após 72 horas de incubação (teste negativo)
- A coluna 6 = recebe 25µL após 96 horas de incubação (teste negativo)
- A coluna 7 = recebe 25µL após 120 horas de incubação (teste positivo) – modificação da coloração de azul para rosa. Leitura realizada período vespertino.