

Karina de Prince¹
Fernando R Pavan¹
Daisy N Sato²
Wagner Villegas⁵
Sergio RA Leite⁵
Clarice QF Leite^{1*}

Avaliação das moléculas com atividade antiTB das plantas do cerrado brasileiro

Screening of molecules with anti-TB activity from the brazilian cerrado plants

Introdução

A tuberculose (TB) ainda é, em todo o mundo, a doença infecciosa mais frequente e importante, causando morbidade e morte. Um terço da população mundial está infetada com *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e aproximadamente dois milhões de mortes são atribuídas à TB anualmente¹. Entre todos os países do continente americano, o Brasil tem o segundo maior índice de morbidade e de morte por TB, com uma prevalência de 62/100 000². O ressurgimento global da TB e o rápido aparecimento da tuberculose multirresistente (MDR-TB) sublinha a importância do desenvolvimento de novos fármacos antituberculose³.

Na busca de novos compostos a partir de plantas, as árvores forneceram muitos fármacos no passado e permanecem uma importante fonte de novos compostos. Recentemente os produtos naturais têm sido alvo de muita atenção como potenciais agentes antiTB⁴⁻⁶.

Introduction

Across the world, tuberculosis (TB) remains the most frequent and important infectious disease causing morbidity and death. A third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), and approximately two million deaths are attributable to TB annually¹. Among all the countries in the Americas, Brazil reports the second-highest TB mortality and morbidity, with a prevalence of 62 in /100 000². The global resurgence of TB and the rapid emergence of MDR-TB, underscore the importance of the development of new antituberculous drugs³.

Concerning the search for new compounds from Plants, trees have provided many drugs in the past, and remain a rich source of novel compounds. Natural products have recently received a lot of attention as potential anti-TB agents⁴⁻⁶. In Brazil, there is a traditional knowledge of how to use native plants

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, CEP 14801-902, Araraquara (SP), Brasil

² Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, CEP 14085-410, Ribeirão Preto (SP), Brasil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos (SP), Brasil

⁴ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970, São Carlos – SP, Brasil

⁵ Instituto de Química de Araraquara, UNESP, CEP 14801-902, Araraquara – SP, Brasil.

e-mail: leitecqf@fcar.unesp.br

No Brasil, existe um conhecimento tradicional de como utilizar plantas nativas no tratamento de várias doenças, porque muitas comunidades não têm acesso a medicamentos e usam essas plantas para se tratarem⁷.

Embora tenham sido encontradas várias centenas de produtos naturais de plantas com atividade antimicobacteriana, nenhuma delas atingiu a fase de desenvolvimento para fármaco devido a dificuldades, como a escassez de compostos, a elevada complexidade estrutural e a falta de estudos de acompanhamento de indícios promissores.

Objetivo

Neste contexto, iniciámos o projeto integrando análises químicas e testes de atividade antiTB de plantas, especialmente de espécies que compõem o cerrado brasileiro, bioma do tipo savana que predomina no planalto central brasileiro e que inclui milhares de espécies vasculares nativas agrupadas em centenas de famílias. Muitas destas plantas são habitualmente usadas como remédios naturais pela população local para tratar doenças várias.

Material e métodos

Os espécimes de plantas do cerrado foram colhidas nos estados de Tocantins (aproximadamente 11° S, 48° O) e Mato Grosso do Sul (aproximadamente 21° S, 56° O). Para a separação fitoquímica, usámos técnicas cromatográficas, essencialmente adequadas para separação de substâncias polares (GPC, XAD2, DCCC, HSCC, HPLC, etc.). Para determinar a estrutura dos compostos isolados usámos principalmente métodos espectrofotométricos, como NMR, IR, UV e MS. Avaliámos a atividade dos extratos, frações enriquecidas e

to treat several diseases because many communities don't have access to synthetic medicines and use those plants in treatments⁷. Although several hundred natural plant products with antimycobacterial activity have been found, none of them have moved towards drug development, because of difficulties, such as very low compound availability, high structural complexity and lack of follow-up studies of promising leads

Objective

In this context, we started the project integrating chemical analysis and anti-TB activity tests of plants, especially species that compose the "Brazilian Cerrado", a savannah like biome that predominates in the center-west region of the country. It includes more than several thousands native vascular plant species, grouped in hundreds of families. Many of these plants are commonly used as natural remedies by people living in this area to treat various illnesses.

Material and methods

The cerrado plant specimens were collected in the states of Tocantins (at nearly 11° S by 48° W) and Mato Grosso do Sul (approximately 21° S by 56° W). To perform the phytochemical separation, we used chromatographic techniques, mainly suitable for polar substances (GPC, XAD2, DCCC, HSCC, HPLC, etc.). To determine the structure of the isolated compounds we used mainly spectrophotometric methods such as NMR, IR, UV and MS. To evaluate the activity of the extracts, enriched frac-

substâncias puras contra o *M. tuberculosis* por *resazurin microtiter assay* (REMA), de acordo com Palomino *et al.* (2002) e *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294⁸.

Resultados e discussão

Sessenta e cinco extratos de 37 plantas distribuídas por 18 famílias foram testadas contra *M. tuberculosis*. Vinte e seis por cento dos extratos avaliados demonstraram actividade promissora, nomeadamente concentração inibitória mínima (CIM) $\leq 125 \mu\text{g}/\text{mL}$, 13 (76%) deles extratos de clorofórmio e 4 (24%) de metanol. Esses extratos foram selecionados para fracionamento guiado por actividade e avaliação detalhada das propriedades antituberculosas, sendo a sua composição química analisada (Quadro I).

Do extrato de clorofórmio de *B. fagifolia*, a mistura de lupeol, α -amirina e β -amirina revelaram CIM mais baixa (31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do que lupeol, α -amirina ou β -amirina isolados, cujos valores CIM foram $\geq 62,5 \mu\text{g}/\text{mL}$. A mistura de lupeol e acetatos de α -amirina e β -amirina mostraram o mesmo valor CIM (31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sugerindo que a acetilação de α -amirina e β -amirina não influencia a sua actividade⁹. Observou-se a mesma situação nas frações enriquecidas de extrato de clorofórmio de *B. crassa*. As CIM de 31,25 para a mistura de α -e β -amirina e de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o dobro do valor para o acetato puro de α -amirina, confirma o efeito sinérgico entre os componentes destas misturas contra *M. tuberculosis*¹⁰.

Para *C. adamantium*, a 5,7-dihidroxi-6,8-di-C-metilflavanona (A) isolada mostrou uma CIM superior a 250 e 2', 4'-dihidroxi-3', 5'-dimetil-6'-metoxicalcona (B) uma CIM de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto as suas misturas

tions and pure substances against *M. tuberculosis* we used the *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) according Palomino *et al.* (2002) and the *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 strain⁸.

Results and discussion

sixty five extracts from 37 plants, distributed in 18 families have been tested against *M. tuberculosis*. Out of all the extracts assayed, 26% showed promising activity, namely MICs below or equal to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 13 (76%) of these coming from chloroform extract and 4 (24%) from methanol extract. These extracts were selected for activity guided-fractionation and detailed evaluation of the anti-tuberculosis properties, and their chemical composition was analysed and showed in Table I.

From the *B. fagifolia* chloroform extract, the mixture of lupeol, α -amyrin and β -amyrin displayed a lower MIC (31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) than isolated lupeol, α -amyrin or β -amyrin whose MIC value were higher than or equal to 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The mixture containing lupeol and α -amyrin and β -amyrin acetates showed the same MIC value of 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, suggesting that the acetylation of α -amyrin and β -amyrin does not influence their activity⁹. The same situation was found in the enriched fractions from the *B. crassa* chloroform extract. MICs of 31.25 for the mixture of α -and β -amyrin and 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, double the value for the pure acetate of α -amyrin, confirms the synergistic effect among the components of these mixture against *M. tuberculosis*¹⁰.

For *C. adamantium*, the isolated 5,7-dihydroxy-6,8-di-C-methylflavanone (A) showed higher MIC of 250 and 2', 4'-dihydroxy-3', 5'-

Quadro I – Valores CIM das frações enriquecidas e compostos testados contra *M. tuberculosis*

Compostos	CIM (µg/mL)
Fração enriquecida / compostos de clorofórmio extrato de <i>B. fagifolia</i>	
Mistura de lupeol, α-e β-amirina	31,25
Mistura de lupeol, acetatos de α- e β-amirina	31,25
α-amirina	62,5
α-amirina acetato	62,5
Dotriacontano	62,5
Ácido básico	2,5
Fração enriquecida / compostos de extrato de clorofórmio de <i>B. crassa</i>	
Mistura de α-e β- amirina	31,25
Mistura de acetato de α-e β- amirina	31,25
Mistura de ácidos ursólico e oleanólico	62,5
Compostos de extrato de clorofórmio de <i>C. adamantium</i>	
5,7-dihidroxi-6,8-di-C-metilflavanona (A)	250
2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxicalcona (B)	62,5
Mistura A + B (2:8)	7,8
Mistura A + B (3:7)	15,6
Mistura A + B (7:3)	31,25
Mistura A + B (8:2)	62,5
Compostos de extrato de clorofórmio de <i>Qualea parviflora</i>	
Lupeol	62,5
Lupenona	125
Ácido betulínico	31,25
Ácido 3 epibetulínico	62,5
Friedelina	125
β sitosterol	125

 Table I – MIC values of enriched fractions and compounds tested against *M. tuberculosis*

Compounds	MIC (µg/mL)
Enriched fraction/compounds from chloroform extract of <i>B. fagifolia</i>	
Mixture of lupeol, α-and β-amyirin	31.25
Mixture of lupeol, acetates of α- and β-amyirin	31.25
α-amyirin	62.5
α-amyirin acetate	62.5
Dotriacontane	62.5
Bassic acid	2.5
Enriched fraction/compounds from chloroform extract of <i>B. crassa</i>	
Mixture of α-and β-amyirin	31.25
Mixture of α-and β-amyirin acetate	31.25
Mixture of ursolic and oleanolic acid	62.5
Compounds from chloroform extract of <i>C. adamantium</i>	
5,7-dihydroxy-6,8-di-C-methylflavanone (A)	250
2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone (B)	62.5
Mixture A + B (2:8)	7.8
Mixture A + B (3:7)	15.6
Mixture A + B (7:3)	31.25
Mixture A + B (8:2)	62.5
Compounds from chloroform extract of <i>Qualea parviflora</i>	
Lupeol	62.5
Lupenona	125
Betulinic acid	31.25
3 epi betulinic acid	62.5
Friedelin	125
β sitosterol	125

(A+B), em vários rácios, mostrou vários CIM, entre 62,5  g/mL para o rácio 8:2 (A+B) e a atividade muito melhor de 7,8  g/mL para o rácio 2:8. Há aqui claro sinergismo entre os compostos A e B quando misturados, e este sinergismo depende fortemente do seu rácio de concentra  o⁵. Nos compostos isolados de *Qualea parviflora*, apesar da grande semelhança estrutural de lupeol e lupenona, observou-se uma redução duas vezes maior da atividade antiTB de lupeol, que se deveu   substituição de  -hidroxilato C3 no lupeol para cetona na lupenona. Do mesmo modo, também se observou uma redução duas vezes maior da atividade antiTB entre os ácidos betulínico (CIM 31,2  g/mL) e epibetul nico (62,5 g/mL), devido à epimerização no ácido epibetul nico de  -hidroxil C3. Esses resultados corroboram os do trabalho de Cantrells *et al.* (2001), em que nos triterpenos,  -hidroxil em C3 é importante para a atividade anti-TB⁴. A melhor MIC observada foi no triterpeno do ácido básico de *B. fagifolia*, que mostrou forte atividade antitubercular, com valores CIM de 2,5  g/mL⁹. Este valor de concentração inibitória   comparável aos dos fármacos antiTB de primeira linha, como etambutol (1-5  g/mL) e estreptomicina (2-8  g/mL), e melhor do que a pirazinamida (20-100 g/mL)¹¹.

Conclusão

Os resultados indicam que as plantas do cerrado podem proporcionar frações e compostos com atividade antituberculose promissora.

dimethyl-6'-methoxychalcone (B) a MIC of 62.5  g/mL, while their mixtures (A+B), in several ratios, showed various MICs, ranging from 62.5  g/mL for the ratio 8:2 (A+B) down to the much higher activity of 7.8  g/mL, for the ratio 2:8. Here there is a clear synergism between compounds A and B when mixed and this synergism depends strongly on their concentration ratio⁵. For compounds isolated from *Qualea parviflora*, despite the great structural similarity of lupeol and lupenone a two-fold reduction of anti-TB activity was observed with lupeol. This was due to the substitution of   hydroxylat C3 in lupeol to the ketone on lupenone. Similarly a two fold reduction of anti-TB activity was observed between betulinic (MIC 31,2  g/mL) and epi-betulinic acid (62,5 g/mL), due to the epimerization in epi-betulinic acid of the   hydroxyl C3. Those results corroborate the report of Cantrells *et al.* (2001) in that within triterpenes, the   hydroxyl on C3 is important for anti-TB activity⁴. The best MIC found was for the triterpene basic acid from *B. fagifolia*, this showed strong antitubercular activity, with MIC values of 2.5  g/mL⁹. This inhibitory concentration value is comparable to those of first-line tuberculosis drugs, such as ethambutol (1-5  g/mL) and streptomycin (2-8  g/mL), and better than pyrazinamide (20-100 g/mL)¹¹.

Conclusion

The results indicated that plants of the "cerrado" can provide fractions and compounds with promising anti – tuberculosis activity.

Bibliografia/Bibliography

1. Global Alliance for TB Drug Development, www.tballiance.org, accessed June 1, 2009.
2. Malaspina AC, Cavalcanti HR, Leite CQF, Machado SM, Viana BH, Silva RM, Hage EF, Figueiredo WM, Marques E, Ferrazoli L, Arbex M, Lessi M, Fonseca LS, Rigouts L, Saad MH. *Jpn J Infect Dis* (2008); 231-233.
3. Lourenço MCS, Ferreira ML, Souza MV, Peralta MA, Vasconcelos TR, Henriques MGO. *Eur J Med Chem* 2008; 43:1344-1347.
4. Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. *Planta Med* 2001; 67:1-10.
5. Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG, Coutinho ID, Honda NK, Cardoso CAL, Vilegas W, Leite SRA, Sato DN. *Quim Nova* 2009; 32:1222-1226.
6. Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, Leite SRA, Micheletti AC, Lopes TIB, Misutsi MY, Beatriz A, Brum RL, Leite CQF. *Phytomedicine* (2009) in press.
7. Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro Cerrado JF. Espécies vegetais úteis. *In*: Sano SM, Almeida SP (Eds.). Planaltina, Distrito Federal, Brazil, 38-39.
8. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. *Antimicrob Agents Chemoter* 2002; 2720-2722.
9. Higuchi CT, Sannomiya M, Pavan FR, Leite SRA, Sato DN, Franzblau SG, Sacramento LVS, Vilegas W, Leite CQF. *eCAM* (2008) doi:10.1093/ecam/nen077.
10. Higuchi CT, Pavan FR, Leite CQF, Sannomiya M, Vilegas W, Leite SRA, Sacramento LVS, Sato DN. *Quim Nova* 2008; 31:1719-1721.
11. Collins L, Franzblau SG. *Antimicrob Agent Chemother* 1997; 1004-1009.