



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
'JULIO DE MESQUITA FILHO'  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Busca de fitofármacos com potencial  
atividade contra *Mycobacterium  
tuberculosis* a partir de óleos  
essenciais**

Thaís Cristina Almeida de Gusmão

Araraquara – SP  
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
'JULIO DE MESQUITA FILHO'  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Busca de fitofármacos com potencial atividade contra  
*Mycobacterium tuberculosis* a partir de óleos  
essenciais**

Thaís Cristina Almeida de Gusmão

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

**Orientador:** Profa. Dra. Raquel Regina Moreira Duarte

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara – SP  
2012

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Antônio e Emilia, pela educação, pela preocupação e pela paciência nos tempos de angústia.

A minha irmã, Ana Carolina, pelo companheirismo e ensinamentos de vida.

A minha sobrinha Helenah pela alegria que me proporciona sempre.

Aos professores que passaram por minha vida, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Raquel Regina Duarte Moreira pela orientação exemplar, sempre disposta a colaborar.

Ao Prof. Dr. Fernando Pavan, que foi um grande mentor no período em que realizei os meus experimentos.

Ao Luis Eduardo dos Santos pelo apoio técnico.

A Heloisa Barbosa, estagiária do laboratório de microbiologia, pelos ensinamentos práticos e teóricos e pelo tempo que passamos juntas.

Às repúblicas Benzaminas e Quinto dos Infernos pelo companheirismo e amizade durante meus anos em Araraquara.

## SUMÁRIO

### RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Tuberculose.....	7
1.2. Epidemiologia.....	7
1.3. Terapêutica .....	8
1.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e suas peculiaridades .....	9
1.5. Novas frentes de pesquisa de fitofármacos .....	9
1.6. <i>Hedychium coronarium</i> .....	10
2. DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1. <i>Objetivo</i> .....	11
2.2. <i>Materiais e Métodos</i> .....	11
2.2.1. <i>Materiais</i> .....	11
2.1.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura.....	11
2.1.1.2 Equipamentos e Utensílios.....	12
2.1.1.3 Material vegetal.....	12
2.1.1.4 Cepa padrão.....	13
2.1.1.5 Droga padrão.....	13
2.1.2 <i>Metodologia</i> .....	13

<b>2.1.2.1</b>	<b>Obtenção dos óleos essenciais .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2.2</b>	<b>Preparo do antimicrobiano .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.2.3</b>	<b>Preparo da suspensão de microrganismos .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.2.4</b>	<b>Estoque dos óleos essenciais e marcadores .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2.5</b>	<b>Preparação do meio de cultura.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2.6</b>	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2.6</b>	<b>Revelação da placa de 96 orifícios com resazurina.....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>

## RESUMO

A Tuberculose é um problema grave de Saúde Pública em todo o mundo, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e considerada a principal causa de morte entre as doenças infecto-contagiosas. Cerca de 80% da população infectada habitam países subdesenvolvidos, onde o Brasil ocupa a 19ª posição entre os países mais afetados. Embora existam agentes anti-tuberculosos, que são razoavelmente eficazes no tratamento da tuberculose, há uma crescente prevalência de cepas resistentes à múltiplos fármacos devido principalmente ao abandono do tratamento. Outros fatores como a co-infecção HIV/TB e a infecção com bactéria em estado de latência denotam a necessidade em se buscar novos fármacos contra TB. Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana do óleo extraído da planta *Hedychium coronarium* e seus marcadores fitoquímicos frente ao *M. tuberculosis* utilizando a técnica de *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), que utiliza como revelador a resazurina. Com a técnica de REMA pudemos verificar a atividade dos óleos essenciais de *H. coronarium* e seus marcadores fitoquímicos frente ao *M. tuberculosis*. Futuros estudos buscando o isolamento de compostos a partir desses óleos e testá-los para a verificação de suas atividades anti-tuberculose, é válido e deve ser encorajado, pois existem características antimicrobianas promissoras e é interessante que se realize estudos de sinergismo com outros compostos naturais, podendo assim dar continuidade na busca de novos fitofármacos na luta contra a tuberculose.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Tuberculose**

No Brasil e em outros 21 países em desenvolvimento, a tuberculose é um importante problema de saúde pública. *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose pulmonar, que no adulto se caracteriza por uma inflamação crônica intensa e necrose do tecido pulmonar. As cavidades que se formam nos pulmões podem se romper nos brônquios, permitindo a difusão de bacilos através da tosse, havendo, dessa maneira, a possibilidade de contaminação de outros indivíduos. (MENEZES e SILVA et al., 2006).

### **1.2. Epidemiologia**

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, cerca de um terço da população mundial está infectada com o *M. tuberculosis*, com o risco de desenvolver a enfermidade. Mais de 64 milhões de pessoas estão infectadas pelo bacilo da tuberculose. Todo ano são notificados aproximadamente 69 mil novos casos e de 4,6 mil mortes em decorrência da tuberculose. Com o surgimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/ Aids), em 1981, observa-se, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, um crescente número de casos notificados de tuberculose em pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A associação dessas duas doenças constitui um sério problema de saúde pública, podendo levar ao aumento da morbidade e

mortalidade pela tuberculose em muitos países. (Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde do Brasil)

### **1.3. Terapêutica**

A terapêutica recomendada pelo Ministério da Saúde contra tuberculose pulmonar padroniza três esquemas de tratamentos com fármacos chamados de “primeira-linha”. O esquema I (para pacientes que nunca apresentaram a doença): utiliza-se de três drogas, isoniazida, rifampicina e pirazinamida, pelo período de seis meses e mais dois meses com duas drogas (isoniazida e rifampicina). Esquema IR (falha no esquema terapêutico I ou abandono do tratamento): dois meses com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, e quatro meses com rifampicina, isoniazida e etambutol. Em casos de falha nessa conduta terapêutica e/ou diagnóstico de TB multi-droga resistente, será aplicado o esquema III: três meses de estreptomicina, etionamida, etambutol e pirazinamida e nove meses de etionamida e etambutol (CASTELO FILHO et al., 2004).

Essa quimioterapia atual utiliza drogas que inibem o metabolismo bacteriano com maior ênfase em inibidores da síntese de parede celular. De acordo com sua modalidade de ação, drogas anti-TB de “primeira” e “segunda” linha podem ser agrupadas como inibidores de parede celular (isoniazida, etambutol, etionamida, cicloserina), inibidores da síntese de ácidos nucleicos (rifampicina, quinolonas), inibidores da síntese proteica (estreptomicina, kanamicina) e inibidores do metabolismo energético de membrana (pirazinamida) (ZHANG, 2005).

A baixa propriedade esterilizante dos fármacos vigentes para o tratamento da tuberculose é uma das principais características negativas da quimioterapia atual. Apesar da rifampicina e da pirazinamida serem drogas parcialmente esterilizantes e desempenharem um papel importante na redução do tempo da terapia, podem ainda sobreviver uma pequena população de bactérias persistentes. (MEDICINS SAN FRONTIÈRE, 2006).

#### **1.4. *Mycobacterium tuberculosis* e suas peculiaridades**

*M. tuberculosis* é um organismo de crescimento lento, patogênico. Sua parede rica em lipídio representa uma verdadeira proteção contra os agentes agressores. A elevada concentração de lipídios de alto peso molecular presentes na parede de micobactérias provavelmente funciona como uma barreira para os compostos polares, justificando os valores mais promissores para os extratos apolares. As plantas através de vias metabólicas secundárias produzem diversos compostos, sendo já verificada atividade biológica contra micobactérias em algumas classes de terpenóides e fisalinas (PIETRO et al., 2000; JANUARIO et al., 2002).

#### **1.5. Novas frentes de pesquisa de fitofármacos**

Muitos pesquisadores têm desenvolvido, com sucesso, muitas linhas de pesquisas baseadas nas propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias de diferentes plantas de utilização na medicina popular, que poderão contribuir na terapêutica antimicrobiana (HOLETZ et al., 2002).

Atualmente 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal e 50% são de origem sintética, embora estejam intimamente relacionados aos princípios ativos de plantas medicinais. Em geral, isto se deve à grande variedade de espécies de plantas existente na flora mundial, algumas com importantes propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998).

### **1.6. *Hedychium coronarium***

*Hedychium coronarium* é uma planta que tem sido usada para o tratamento de inflamação, doenças de pele, dor de cabeça entre outros. É uma planta perene da família *Zingiberaceae* encontrada em regiões subtropicais. De acordo Joy B., Rajan A., Abraham E. (2007) em seu trabalho publicado, há a presença de constituintes antimicrobianos nos rizomas da *H. coronarium*. Nesse trabalho foi feita a pesquisa dos componentes químicos dessa planta. Um dos principais compostos dos rizomas de *H. coronarium* que se foi achado nesse trabalho é o 1,8 cineol que tem uma gama muito grande de atividade biológica. O óleo essencial pode ser usado em sabonetes e cosméticos devido seu cheiro agradável e sua ação antimicrobiana.

Os óleos essenciais produzidos por plantas também têm sido tradicionalmente utilizados para infecções do trato respiratório e, portanto, podem atuar como adjuvantes no tratamento da Tuberculose ou mesmo na cura desta doença.

## **2. DESENVOLVIMENTO**

### **2.1. Objetivo**

Avaliação da atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* de óleos essenciais extraídos dos rizomas e das folhas de *Hedychium coronarium* e seus principais marcadores fitoquímicos (1,8- cineol dos rizomas e óxido de carioflieno das folhas) empregando a técnica de microdiluição em placa de REMA (Resazurin Microtiter Assay).

### **2.2. Materiais e Métodos**

#### **2.2.1. Materiais**

##### **2.1.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura**

- 1,8-cineol: Sigma
- Água destilada
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Tedia
- Isoniazida: Sigma/Aldrich
- Meio de cultura Middlebrook 7H9 Brother dehydrated: DIFCO Laboratórios
- Meio de enriquecimento OADC enrichment BBL Middlebrook: DIFCO Laboratórios

- Oxido de cariofileno: Sigma
- Resazurina: Sigma/Aldrich

#### **2.1.1.2 Equipamentos e Utensílios**

- Balança analítica APX-200: Denver Instrument
- Câmara de incubação BOD
- Congelador -80 °C: Thermo Electron Corporation
- Espectrofotômetro Spectra Fluor Plus: Tecan
- Fluxo laminar: VECO
- Freezer 280: Brastemp
- Pipetadaores automáticos de volumes variados
- Placa de 96 orifícios: TTP
- Vidrarias e utensílios de laboratórios em geral

#### **2.1.1.3 Material vegetal**

As folhas e rizomas de *H. coronarium* foram coletados na Estação Ecológica Juréia-Itatins pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete G. Martins da UNESP litoral Paulista no dia 15/03/2011 e identificados pelo Dr. Vinícius Castro Souza. As exsiccatas das plantas encontram-se no Herbário da Escola Superior de Agricultura - ESA/USP sendo registrada com o número ESA 93272.

#### **2.1.1.4 Cepa padrão**

*Micobacterium tuberculosis* cepa padrão H<sub>37</sub>RV (ATCC 27294).

#### **2.1.1.5 Droga padrão**

A isoniazida é um fármaco antibacteriano utilizada no tratamento profilático e também na doença ativa da tuberculose. Esse fármaco inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular da micobactéria (SARICH et al, 1995). A isoniazida utilizada foi adquirida na empresa Sigma.

### **2.1.2 Metodologia**

#### **2.1.2.1 Obtenção dos óleos essenciais**

A extração dos óleos das folhas e dos rizomas de *H. coronarium* foi realizada pelo processo de Hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (Wasicky, 1963). Essa parte dos experimentos foi realizada no laboratório de Farmacognosia sob supervisão da Prof. Dra. Raquel Regina Moreira Duarte. A identificação química dos componentes dos óleos e seus marcadores fitoquímicos foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da FFUC da Universidade de Coimbra sob supervisão do Prof. Carlos Cavaleiro. O marcador fitoquímico principal das folhas de *H. coronarium* é o óxido de carioflieno e dos rizomas 1,8- cineol.

Depois da identificação dos marcadores fitoquímicos estes foram adquiridos no comércio da empresa Sigma, para a utilização nesse trabalho.

Tabela 1 Composição química dos óleos essenciais de *H. coronarium* (folhas e rizomas)

RI <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Composto	% nas amostras	
			Folhas	Rizomas
921	n.d.	$\alpha$ -Tujeno	-	0,1
928	1025	$\alpha$ -Pinoeno	0,2	1,9
941	1072	Canfeno	-	0,3
963	1124	Sabineno	T	0,2
968	1115	$\beta$ -Pinoeno	1,1	11,7
980	1159	Mirceno	-	0,4
997	1167	$\alpha$ -Felandreno	-	0,1
1005	1150	$\delta$ -3-Careno	-	0,2
1008	n.d.	$\alpha$ -Terpineno	T	-
1012	1272	$\mu$ -Cimeno	0,2	1,4
1019	1204	Limoneno*	T	2,4
1020	1212	1,8-Cineol*	0,7	31,7
1025	n.d.	Z-Ocimeno	-	0,3
1046	1246	$\gamma$ -Terpineno	-	0,5
1051	1457	<i>E</i> -Hidrato de Sabineno	-	0,5
1077	1284	Terpinoleno	-	0,3
1082	1542	Z-Hidrato de Sabineno	0,2	0,4
1084	1539	Linalool	-	0,7
1105	n.d.	Fenchol	-	0,2
1106	1488	$\alpha$ -Canfolenal	0,3	0,2
1109	n.d.	Z-p-Menth-2-en-1-ol	-	0,2
1119	1514	Canfora	-	0,1
1120	n.d.	Nopinona	T	-
1122	1645	<i>E</i> -Pinocarveol	1,3	0,4
1123	1645	Z-Verbenol	-	0,3
1129	1668	<i>E</i> -Verbenol	0,4	-
1136	1564	Pinocarvona	1,3	0,4
1145	1691	Borneol	T	3,1
1160	1594	Terpinen-4-ol	1,0	6,8
1164	1622	Mirtenal	1,4	0,1
1171	1687	$\alpha$ -Terpineol	0,6	12
1178	1780	Mirtenol	1,4	-
1186	n.d.	<i>E</i> -Piperitol	-	0,4
1191	n.d.	<i>E</i> -Carveol	-	0,2
1329	1688	$\alpha$ -Acetato de Terpinil	-	1,2
1403	1840	$\alpha$ -Ionona	0,2	-
1407	1591	<i>E</i> -cariofileno	12,1	1,3
1440	1661	$\alpha$ -Humuleno	0,8	0,2
1446	1659	<i>E</i> - $\beta$ -Farneseno	T	0,2
1460	1927	$\beta$ -Ionona	0,6	-
1469	n.d.	$\beta$ -Selineno	-	0,2
1502	1752	$\gamma$ -Cadineno	-	0,4
1559	1971	Óxido de Criofileno	43,9	1,1
1569	2078	Cariofila-2(12),6(13)-dien-5-ona	0,4	-
1582	2026	Epóxido de Humuleno II	2,8	0,2
1607	2277	Cariofila-2(12),6(13)-dien-5-beta-ol	1,8	-
1609	2283	Cariofila-2(12),6(13)-dien-5-alfa-ol	7,7	-
1631	2270	Cariofila-2(12),6-dien-5 alfa-ol	2,0	-
1645	2360	Cariofila-2(12),6-dien-5 beta-ol	5,6	-
<b>Monoterpenos hidrocarbonetos</b>			<b>1,5</b>	<b>19,5</b>
<b>Monoterpenos que contêm oxigênio</b>			<b>8,6</b>	<b>58,8</b>
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</b>			<b>12,9</b>	<b>2,4</b>
<b>Sesquiterpenos contem oxigênio</b>			<b>64,2</b>	<b>1,3</b>
<b>Outros compostos</b>			<b>0,8</b>	<b>14,1</b>
<b>Total identificado</b>			<b>88</b>	<b>86,1</b>

Compostos em maiores quantidades ( $\geq 5.0\%$ )

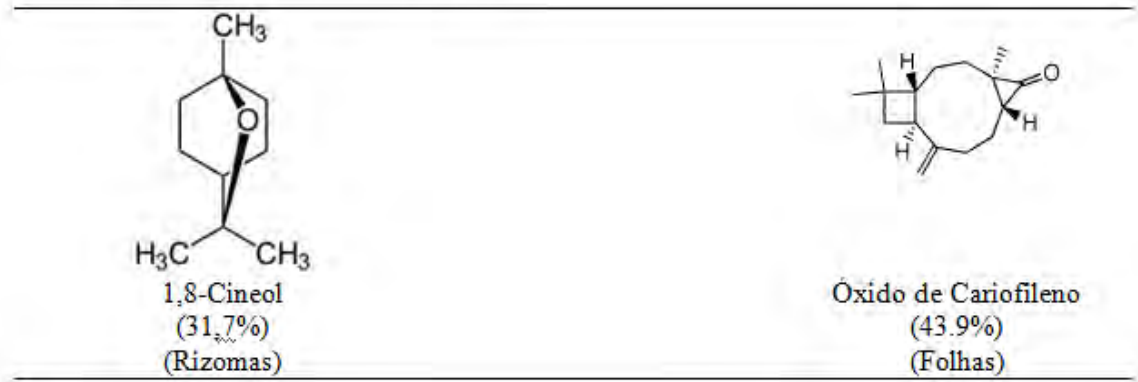


Figura 1 Maiores componentes ( $\geq 5.0\%$ ) dos óleos essenciais de *Hedychium coronarium* (folhas e rizomas )

### 2.1.2.2 Preparo do antimicrobiano

A droga utilizada como antimicrobiano padrão foi a isoniazida, a solução mãe congelada estava em uma concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir dessa solução foram preparadas três soluções:

- A: 90 $\mu\text{L}$  meio de cultura 7H9 + 10 $\mu\text{L}$  sol. mãe
- B: 90 $\mu\text{L}$  meio de cultura 7H9 + 10 $\mu\text{L}$  sol. A
- C: 360 $\mu\text{L}$  meio de cultura 7H9 + 15 $\mu\text{L}$  sol. B

### 2.1.2.3 Preparo da suspensão de microrganismos

*Mycobacterium tuberculosis* mantida em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e após descongelamento foi feita uma solução 1:100 de bactérias suspensas em meio de cultura 7H9 enriquecido com OADC até atingir a concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL..

Para uma microplaca de 96 orifícios então calculou-se a seguinte solução: 90µL de bactérias + 8910µL de meio 7H9.

#### 2.1.2.4 Estoque dos óleos essenciais e marcadores

Primeiramente foram feitas as soluções mãe (concentração 10.000µg/mL) com os óleos de amostragem. Foram pesados 5,2mg do óleo obtido da folha de *H. coronarium*; 5,4mg do óleo obtido do rizoma da *H. coronarium*; 6,0mg do marcador cineol e 3,0mg do marcador cariofileno. Depois de pesados foram feitas as diluições desses óleos com dimetilsulfóxido (DMSO):

- *H. coronarium* folha: 5,2mg óleo + 520 µL DMSO
- *H. coronarium* rizoma: 5,4mg óleo + 540 µL DMSO
- 1,8-cineol: 6,0mg óleo + 600 µL DMSO
- Óxido de cariofileno: 3,0mg óleo + 300 µL DMSO

A partir dessas soluções mãe foram feitas mais duas soluções para cada amostra:

- *H. coronarium* folha: solução A = 90µL meio + 10µ sol. mãe; solução B = 180µL meio + 20µL sol. A
- *H. coronarium* rizoma: solução A = 90µL meio + 10µ sol. mãe; solução B = 180µL meio + 20µL sol. A

- 1,8-cineol: solução A = 90 $\mu$ L meio + 10 $\mu$  sol. mãe; solução B = 180 $\mu$ L meio + 20 $\mu$ L sol. A
- Óxido de cariofileno: solução A = 90 $\mu$ L meio + 10 $\mu$  sol. mãe; solução B = 180 $\mu$ L meio + 20 $\mu$ L sol. A

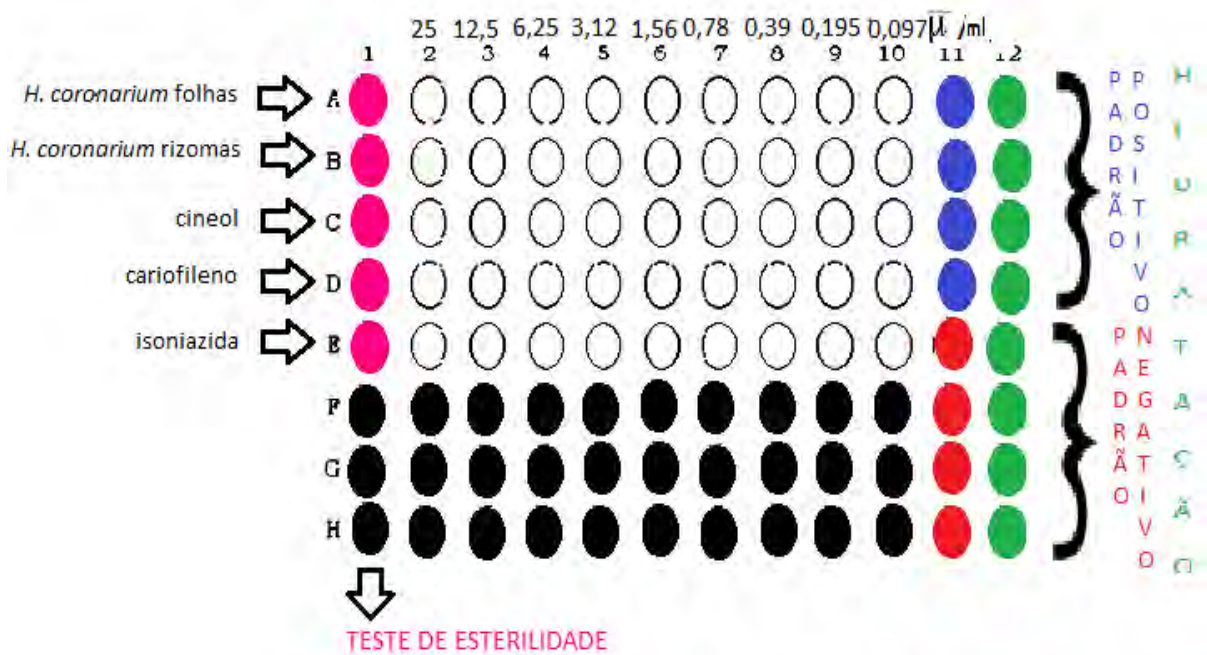
#### **2.1.2.5 Preparação do meio de cultura**

Para o preparo de 500mL de meio de cultura 7H9, diluiu-se em água destilada 2,61g de pó junto com 1,11mL de glicerol e 0,25mL de Tween (0,05%). Antes de ser utilizado o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C e após, enriquecido com 10% de OADC (BD/BBL).

#### **2.1.2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima**

Utilizando microplacas de 96 orifícios, a concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 90% da proliferação bacteriana, utilizando o revelador resazurina no método REMA (PALOMINO et al. 2002). A resazurina é um indicador colorimétrico de oxido-redução de cor azul no estado oxidado, transformando-se em resorufina, de cor rosa fluorescente no estado reduzido (NATECHE et al. 2006). A fluorescência emitida pela resorufina se deve ao fato de que este composto age como um aceptor de elétrons intermediário no sistema de transporte de elétrons e exibe forte emissão em comprimentos de onda maiores que 550 nm (COLLINS, 1996). A fluorescência e/ou absorção podem ser lidas como uma medida da viabilidade do crescimento

bacteriano. (VIDAL-AROCHA et al. 2009), tornando este reagente adequado para avaliação da atividade dos fármacos frente ao *M. tuberculosis*.



**Figura 2 Esquema da microplaca de 96 orifícios**

Onde foi colocado:

- 100µL do meio 7H9 em todos os orifícios da placa, da fileira A até E nas colunas de 1 a 10; A até H nas colunas 11 e 12.
- Coluna 1: teste de esterilidade = adiciona-se 50µL de meio 7H9 + 50µL de cada óleo de amostra em suas fileira pré-determinadas.
- Coluna 11: Padrão positivo = fileiras de A até D adiciona-se 100µL bactérias. Padrão Negativo = fileiras E até H adiciona-se 100µL de meio 7H9.
- Coluna 12: Hidratação = adiciona-se 100µL de meio 7H9.

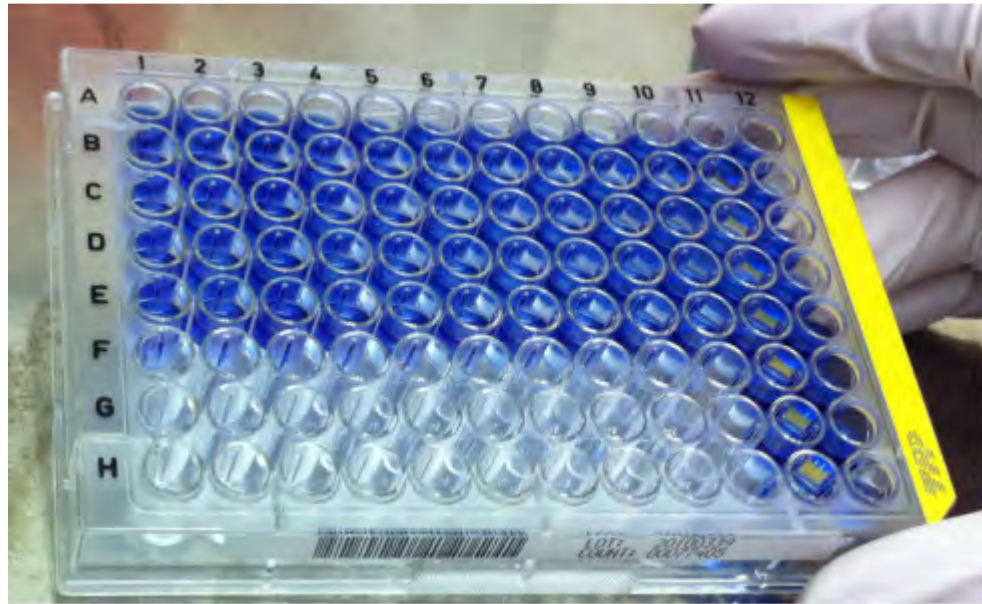
- Colunas 2 até 10 é feita a diluição dos óleos a partir da concentração de 25µg/mL até a concentração de 0,097µL/mL.
- Colunas 2 até 10 e coluna 11 (fileira A até E) foram adicionadas *M. tuberculosis*.

O teste foi feito em duplicata onde a primeira placa foi feita dia 31/01/2012 e a duplicata foi feita dia 01/02/2012.

As placas são cobertas por plástico filme e alumínio para que não haja desidratação e são colocadas na câmara de incubação por sete dias.

#### **2.2.2.6 Revelação da placa de 96 orifícios com resazurina**

Depois de sete dias na câmara de incubação é feita a adição do revelador, a resazurina. A preparação da desta é feita previamente: 1mg para cada 10mL de água destilada. É colocado 30µL de solução de resazurina por poço da placa então para os 96 poços foram utilizados 2.880µL da solução. Depois as placas ficaram mais um dia na câmara de incubação para depois ser lida no espectrofotômetro.



**Figura 3 Placa 1 com revelador resazurina**

### **3. RESULTADOS**

No oitavo dia do experimento a placa foi retirada da câmara de incubação e foi feita a leitura computadorizada da placa no espectrofotômetro e os resultados são passados para o programa Magellan. Esse programa nos forneceu dados das leituras espectrofotométricas de cada poço da placa com suas determinadas amostras.

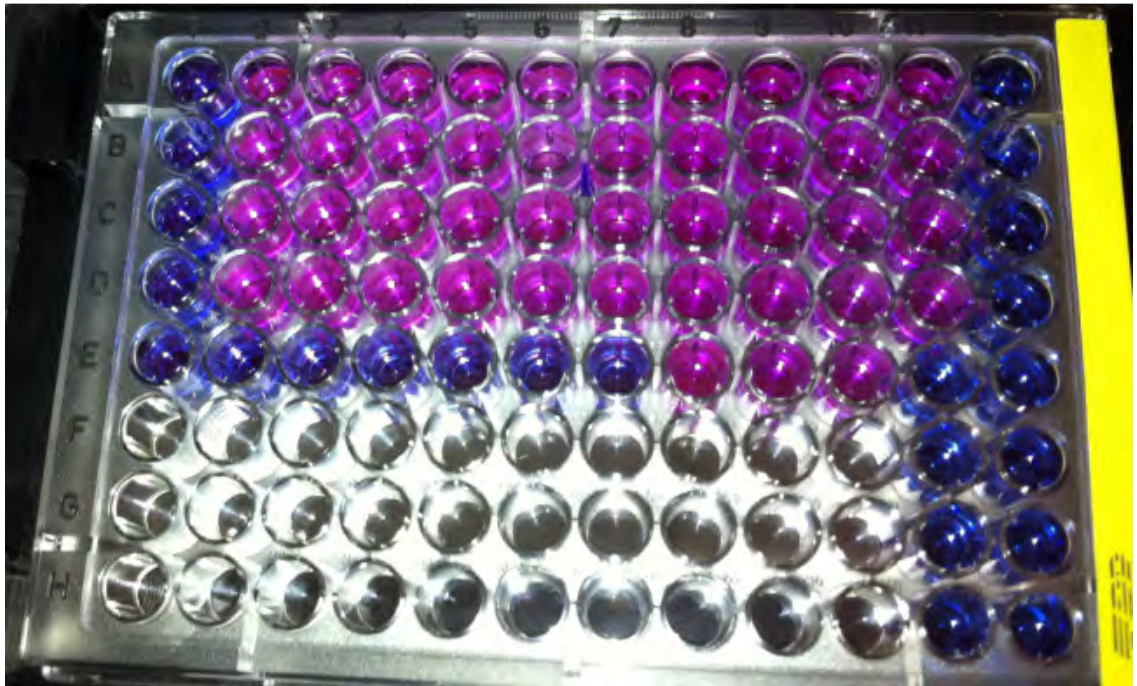
O princípio da leitura é por emissão e absorção de luz e no aparelho Tecan utilizamos os filtros de 530nm de excitação e 590nm de emissão. O revelador resazurina quando em presença do oxigênio do metabolismo da bactéria fica rosa fluorescente. A leitura é feita baseada no nível de fluorescência (metabolismo da bactéria), quanto a maior a quantidade de bactérias (se houver a proliferação bacteriana) mais fluorescente, portanto o resultado da leitura mais alto.

**Tabela 2 Placa 1: Resultados de leitura do espectrofotômetro**

	<b>T.E.</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,12</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>	<b>0,39</b>	<b>0,195</b>	<b>0,097</b>	<b>Pad.</b>	<b>Hid.</b>
Folha	4050	32819	39015	35105	33428	36720	37574	37813	35683	35741	31239	3958
Rizoma	4390	27687	45419	39616	38270	38867	35192	33902	35625	37229	31084	4284
Cineol	4053	35375	37124	35467	36992	37195	35291	33288	34311	38212	27026	3924
Cario.	4004	31430	37282	33703	33191	36061	35142	32542	34182	34461	29402	4141
Isoniaz.	4134	5258	6079	5350	5788	5567	5716	26426	33043	34416	4310	4286
F	18	19	14	19	19	18	20	17	25	20	4503	3920
G	22	20	15	21	19	20	17	20	22	17	4071	4215
H	17	17	20	18	17	19	17	20	22	21	3768	3758

**Tabela 3 Placa 2: Resultados de leitura do espectrofotômetro**

	<b>T.E.</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,12</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>	<b>0,39</b>	<b>0,195</b>	<b>0,097</b>	<b>Padrões</b>	<b>Hid.</b>
Folha	3590	26239	26155	25481	24592	21941	23543	29369	30569	25491	26065	3317
Rizoma	3595	30214	29248	26339	26408	19975	27568	31027	32816	27846	27500	3429
Cineol	3432	28028	27886	26858	26171	28762	26926	33046	30812	25674	26047	3162
Cario.	3685	28276	28317	26010	28884	23886	28250	30834	34743	30653	24168	3290
Isoniaz.	3545	3792	4302	4371	4578	4366	4623	35236	44566	36616	3580	3263
F	20	17	20	15	15	14	16	16	17	17	3526	3428
G	15	16	12	17	17	13	22	6	12	15	3363	3286
H	15	17	16	14	11	12	15	12	15	17	3051	3049



**Figura 4 Placa 1 revelada com resazurina**

Pode-se fazer a observação visual ou também a observação das leituras do espectrofotômetro, mas nas em ambas o resultado foi o mesmo. Os orifícios que continham o óleo de teste obteve a mesma coloração e também leituras comparativamente iguais as do padrão positivo. Isso significa que os óleos testados não obtiveram um resultado satisfatório. Pode-se comparar com os poços contendo nossa droga padrão, a isoniazida, que teve coloração e leitura comparativamente iguais as do padrão negativo, indicando que de fato não houve crescimento bacteriano.

#### 4. DISCUSSÃO

Atualmente várias tentativas vêm sendo realizadas no sentido de se encontrar alternativas para o tratamento da tuberculose. Um dos maiores problemas é o caso da resistência do *M. tuberculosis* aos diferentes quimioterápicos, e que são utilizados nos esquemas de tratamento da tuberculose (COHN et al., 1998).

A resistência que muitos patógenos humanos apresentam é devido à seleção que passaram pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, as pesquisas de novos antimicrobianos tornaram-se mais direcionadas às plantas medicinais, sendo que muitas espécies já se mostraram eficazes no combate aos microrganismos (ZAMPINI et al., 2005).

Substâncias antimicrobianas nos vegetais e também seu uso para tratar infecções não são recentes e o ser humano as tem empregado há muitos anos (BUHNER, 1999; COWAN, 1999; RODRIGUES, 1980; YUNES e CALIXTO, 2001).

Entre tantas plantas nativas do Brasil, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade dos óleos essenciais de *Hedychium coronarium* contra *M. tuberculosis*. Assim, para atingir o objetivo deste trabalho, foram necessários estudos destinados à avaliação da atividade contra *M. tuberculosis* dos óleos essenciais especificamente utilizando a metodologia de REMA.

Um dos fármacos padrão utilizado atualmente na terapêutica contra tuberculose é a isoniazida, que tem concentração inibitória mínima de 0,03-0,15µg/mL. Em relação aos óleos essenciais ainda não se tem definido uma concentração inibitória mínima ideal contra *M. tuberculosis*.

A atividade dos óleos dos rizomas e das folhas de *H. coronarium* contra a cepa de *M. tuberculosis* não foi eficaz uma vez que não houve inibição do

crescimento do mesmo frente aos óleos nas concentrações testadas. Os resultados das leituras do espectrofotômetro indicaram que os óleos tiveram absorbâncias comparativamente parecidas às do padrão positivo, isso significa que houve o crescimento bacteriano juntamente com óleos testados na mesma proporção dos padrões positivos que continham somente os microrganismos e meio de cultura.

Os óleos essenciais obtidos de *H. coronarium* são substâncias promissoras para terem atividade inibitória contra *M. tuberculosis*. Em geral, extrato de plantas contém baixa concentração dos compostos ativos e muitos outros compostos que podem ter atividades promissoras, necessitando assim de uma sensibilidade diferenciada dos testes, devido à variedade química destes compostos, mesmo que presentes em pequena quantidade (RATES, 2001).

Outra hipótese para a obtenção desses resultados é a possível volatilidade dos óleos no decorrer dos testes, fazendo com que estes perdessem ou tivessem suas ações antimicrobianas diminuídas.

A permeabilidade dos óleos essenciais testados na parede bacteriana pode ser questionada, já que pode ser uma das causas do resultado negativo. Se a droga não penetra na parede não há a ação antimicrobiana então pode ser uma das hipóteses a ser considerada.

## **5. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos, as conclusões estão apresentadas a seguir.

- Os óleos essenciais obtidos dos rizomas e das folhas de *H. coronarium* não apresentaram atividade contra *M. tuberculosis*.
- O marcador fitoquímico em maior quantidade nas folhas é óxido de cariofileno e não apresentou atividade contra *M. tuberculosis*.
- O marcador fitoquímico em maior quantidade nos rizomas é o 1,8-cineol e não apresentou atividade contra *M. tuberculosis*.

Vale salientar que esse é o primeiro estudo que descreve a atividade desses óleos essenciais frente ao *M. tuberculosis*. Modificações nesse estudo poderiam ser feitas, como por exemplo: aumentar a concentração dos óleos essenciais testados. E também fazer estudos levando em consideração a permeabilidade do óleo na parede bacteriana, já que esse pode ser um dos motivos para os resultados negativos obtidos.

Estudos de sinergismo entre os óleos essenciais brutos e seus principais marcadores devem ser realizados na busca de resultados mais promissores no combate aos *M. tuberculosis* para que haja um melhor entendimento desses anti-tuberculosos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUMANN, A. e ZEITSCHER, O. Ein Beitrag zur Autoxydation des Terpentinoels. **Chemische Berichte** v.46, p.1178–1198, 1913.

- BOYD, E. M. e SHEPPARD, E. P. Nutmeg oil and camphene as inhaled expectorants. **Archives of Otolaryngology**, v.92, p. 372–378, 1970.
- BUHNER, S. H. Natural Alternatives for Treating Drug – Resistant Bacteria (A medicinal herb guide). **Pownal, Vermont: Storey Books**, 1999.
- BURROW, A., ECCLES, R. e JONES, A. S. The effects of camphor, eucalyptus and menthol vapors on nasal resistance to airflow and nasal sensation. **Acta Otolaryngologica**, v.96, p. 157–161, 1983.
- CASTELO FILHO, A. et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Normas Brasileiras para Tuberculose. **J Bras Pneumol**, v.30, n.1, p. 54-56, 2004.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.
- CHO, S.H.; et al. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.4, p. 1380-1385, 2007.
- 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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1004-1009.
- COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

- DE ROSSI, E.; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol Rev**, v.30, n.1, p. 36-52, 2006.
- FARAG, R. S., DAW, Z. Y., HEWEDI, F. M. e EL-BAROTY, G. S. A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 665–667, 1989.
- FROHLICH, E. Lavender oil; review of clinical, pharmacological and bacteriological studies. Contribution to clarification of the mechanism of action. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 118, p. 345–350, 1968
- GLOBE, M.; ISEMAN, M. D.; MADSEN, L. A.; WAITE, D.; ACKERSON, L.; HORSBURGH, C.R. Jr. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. **N Engl J Med**, v.328, n.8, p. 527-532, 1993.
- GOCHO, S. Antibacterial action of aroma compounds in vapor state. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, v.19, p. 329–334, 1991.
- GRUPPO V.; et al. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.4, p. 1245-1250, 2006.
- HEYM, B.; et al. Implications of multidrug resistance for the future of shortcourse chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. **Lancet**, v.344, p. 293-298, 1994.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

- INOUE, S., GOI, H., MIYAUCHI, K., MURAKI, S., OGIHARA, M. e IWANAMI, Y. Inhibitory effect of volatile constituents of plants on the proliferation of bacteria. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, v.11, p. 609–615, 1983.
- INOUE, S., ISHIHARA, H., UCHIDA, K. e YAMAGUCHI, H. Preferential percutaneous absorption of monoterpene hydrocarbons and ester of essential oils in mice placed in aroma bath and alteration of compositions of essential oils. **Aroma Research** 1, v. 2, p. 75–83, 2000.
- JANUÁRIO et al. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae) **Phytother**, v 16, p.445-448, 2002.
- JOY, B., RAJAN, A., ABRAHAM, E. Composition of Essential Oil from *Hedychium coronarium*. **Phytother**, v.21, p.439–443, 2007.
- KIENHOLZ, M. Studies on the antibacterial action of ethereal oils. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v.9, p.519–521, 1959.
- KNOBLOCH, K., PAULI, A. e IBERL, B. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v.1, p.119–28, 1989.
- MARTINS, M. B. G. , CARAVANTE, A. L. C., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., SOARES, M. K. M., MOREIRA, R. R. D., SANTOS, L. Caracterização anatômica e fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae). **E Rev. bras. plantas med. [online]**, vol.12, n.2, p. 179-187, 2010.
- MARUZZELLA, J. C. e SICURELLA, N. A. Antibacterial activity of essential oil vapors. **Journal of American Pharmaceutical Association, Scientific Edition**, v.49, p.692–694, 1960.



- PALOMINO, J.C.; MARTIN A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.
- PANCHAL, P.K.; PAREKH, H.M.; PANSURIYA, P.B.; PATEL, M.N. Bactericidal activity of different oxovanadium(IV) complexes with Schiff bases and application of chelation theory. **J Enz Inhib Med Chem**, v.21, n.2, p. 203-209, 2006.
- PAULA, M., I. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Plinia cauliflora* e *Endopleura uchi***. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – UNESP, Araraquara, 2011.
- PAVAN, F., R. **Atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis* intra e extracelular e citotoxicidade dos complexos de rutênio e vanádio e seus ligantes**. 2009. Tese de doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2009.
- PIETRO, R. C. L. R.; ET al. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v.7, p. 335-338, 2000.
- PHAN. V., K. et al., Labdane-Type Diterpenoids from the Rhizomes of *Hedychium coronarium* Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Production of Proinflammatory Cytokines in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. **Chem. Pharm. Bull.** V.60 p.246—250 2012.

- PRIMM, T.P.; FRANZBLAU, S.G. Recent advances in methodologies for the discovery of antimycobacterial drugs. **Current Bioactive Compounds**, v.3, n.3, p. 201-208, 2007.
- PROTOPOPOVA, M.; et al. Identification of a new antitubercular drug **Antimicrob Chemother**, v.56, n.5, 2005.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RODRIGUES Jr, C.J. Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogénicos. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, p.23, 1980.
- SANTOS, A. C., MELLO, J. C. P.SIMÕES, C., M., O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J., C., P., MENTZ, L., A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC**. v.5, p. 615-656.
- SARICH, T. C., ZHOU, T., ADAMS, S. P., BAIN, A. I., WALL, R. A., WRIGHT, J. M. A model of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.34, p.109–116, 1995.
- SHUBINA, L. P., SIURIN, S. A. e SAVCHENKO, V. M. Inhalations of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis. **Vrachebnoe Delo (Kiev)**, v.5, p.66–67, 1990.
- SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Quim Nova**, v.28, n.4, p. 678-682, 2005.

- TOMIOKA H. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.3, n.1, p. 21-49, 2008.
- VIDAL-AROCA, F., MENG, A., MINZ, T., PAGE, M. G. P., DREIER, J. Use of resazurin to detect mefloquine as an efflux-pump inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods**, v.79, p.232–237, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Global tuberculosis control: Report 2011**.
- WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, v.1, n.1, p.77-81, 1963
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
- ZAMPINI, I.C.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 450-456, 2005.
- ZAKARYA, D., FKIH-TETOUANI, S. e HAIJI, F. Chemical composition–antimicrobial activity relationships of Eucalyptus essential oils. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.26, p.319–333, 1993.
- ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annu Ver Pharmacol Toxicol**, v.45, p. 529-564, 2005.