

ESTUDO DE ALCALÓIDES DA ESPÉCIE VEGETAL *Abuta grandifolia* COMO REVELADORES DE CRESCIMENTO DE MICOBACTÉRIAS.

Berna Almeida de SOUZA¹; Júlia Iñez SALEM²; Luciana Botinelly Mendonça FUJIMOTO³; Valdir Florêncio da VEIGA JR.⁴

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Orientadora Pesquisadora/CPCS/Laboratório de Micobacteriologia/INPA; ³Colaborador Mestre/Faculdade de Medicina/UFAM; ⁴Colaborador Doutor/Departamento de Química/Produtos Naturais/UFAM.

1. Introdução

O diagnóstico da tuberculose é vital para a interrupção da cadeia de transmissão da doença e para o início de terapêutica específica. Para realização do diagnóstico, se faz necessário o encontro de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) nas secreções suspeitas e/ou o desenvolvimento do agente etiológico em meios de cultivo. Esses dependem da qualidade dos procedimentos dos exames, quantidade de bacilos presente na amostra e de componentes nos meios de cultivos que possam estimular a taxa de desenvolvimento do *Mycobacterium tuberculosis* (Brasil, 2008). Na tuberculose pulmonar, forma mais incidente da doença, quando as secreções dos pacientes são multibacilares (acima de 10.000 BAAR/mL de escarro), o diagnóstico é rápido e feito por exame baciloscópico, onde o bacilo é facilmente visualizado em cor vermelha devido à capacidade de reter o corante fucsina, mesmo após a tentativa de descoloração pelo uso de soluções álcool-ácidas. Para os pacientes considerados paucibacilares (número inferior a 10.000 BAAR/mL de escarro) deve-se realizar o isolamento do *M. tuberculosis* para a confirmação diagnóstica, o qual necessita de 30 a 60 dias em métodos de cultivos tradicionais e de 20 a 30 dias nos semi-automatizados (Salem *et al.*, 2007). Entretanto, a maior parte dos laboratórios brasileiros não realiza o método de cultivo, e os poucos que o executam ainda fazem uso dos métodos de isolamento tradicionais. Estes métodos tradicionais de isolamento merecem estudos que permitam sua utilização de forma otimizada e passível de implantação em unidades com poucos recursos. Uma das formas de aperfeiçoá-los seria mediante a inclusão de substâncias aceleradoras do crescimento micobacteriano (Carvalho, 2005) ou de substâncias reveladoras do crescimento micobacteriano. Em catálogos de substâncias químicas constatou-se a existência de alcalóide com as propriedades de baixa toxicidade e emissão de fluorescência, extraído de espécies vegetais pertencentes a diversos gêneros, entre eles o *Abuta* existente na Amazônia (Sigma-Aldrich, 2005). No gênero, a *Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith é encontrada em várias localidades da Amazônia, entre elas a Reserva Florestal Adolpho Ducke do INPA (Ribeiro *et al.*, 1999). Nessa espécie o alcalóide de interesse já foi descrito (Mari, 2007). Tal fato induziu o objetivo de extrair o alcalóide da referida espécie para verificar a utilização como revelador "*in vitro*" de crescimento micobacteriano, não acessível ao olhar humano.

2. Material e Métodos

Obtenção de amostras vegetais – Folhas íntegras, folhas denominadas como "fungadas" (com presença de fungos em sua superfície) e galhos (caule e galhos mais finos) foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke e no campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, ambos em Manaus-AM. O material coletado foi seco à temperatura ambiente e em estufa por 12h a 50 °C, e então triturado em moinho de quatro facas.

Obtenção dos extratos brutos- Para as folhas (íntegras e fungadas) foi realizada a extração com etanol HPLC, em aparelho Soxhlet, durante 12 h, seguida da remoção do solvente em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. Para os galhos foi realizada maceração do material seco em etanol HPLC, à temperatura ambiente. As soluções permaneceram em contato com o solvente por três dias, e depois de filtradas, foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até eliminação do solvente. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do extrato obtido com a massa de material vegetal seco utilizada na maceração.

Prospecção para alcalóides- Foram adicionados 2 mL de HCl 10% em 2 mL da solução etanólica do extrato bruto. Em seguida, a solução foi submetida ao aquecimento em banho-maria numa temperatura de 40°C. Após o aquecimento a solução foi distribuída em quatro tubos de ensaio. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo um revelador diferente, na seguinte ordem: Dragendorff, Mayer, Wagner e Hager. A leve turbidez ou a formação de precipitado roxo a laranja, branco a creme, marrom e marrom respectivamente indicaram a presença de alcalóides.

Cromatografia em camada delgada (CCD) – Foram aplicadas alíquotas de cada amostra em uma placa de sílica gel. Depois de seca, foi borrifado o reagente Dragendorff sobre a placa. O surgimento de coloração laranja na placa é indicativo da presença de alcalóides.

Obtenção das frações alcaloídicas- Foi utilizada a metodologia descrita por Djilani *et al.* (2006), em que os extratos brutos foram submetidos à partição ácido-base. Os extratos brutos foram suspensos em água destilada, acidificados com HCl 10% para o pH 3-4, e em seguida, extraído com hexano a fim de remover substâncias lipofílicas e neutras. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH₄OH (25%, m/m) para o pH 9-10, e em seguida, extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água destilada até o pH neutro. Os extratos foram então secos com Na₂SO₄ anidro, e concentrados à pressão reduzida para a obtenção de frações alcaloídicas.

Ensaio Micobacterianos - Devido aos reduzidos rendimentos fitoquímicos e ao tempo superior ao esperado para a secagem dos extratos brutos e frações alcaloídicas, não foi possível efetuar os ensaios micobacterianos. Estes terão continuidade pela equipe do laboratório de Micobacteriologia do INPA.

3. Resultados e Discussão

Obtenção dos extratos brutos- Os resultados referentes ao rendimento bruto dos extratos obtidos a partir dos materiais triturados e secos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Controle dos rendimentos brutos obtidos a partir das amostras coletadas.

Amostra	Parte da planta	Massa do material vegetal triturado (g)	Extrato bruto seco(g)	Rendimento bruto (%)
<i>Abuta grandifolia</i>	Folhas	834,5000	120,9406*	14,49
	Galhos	203,5250	40,2979	19,08

*Parcialmente seco

Verificou-se que o rendimento dos extratos brutos dos galhos, pelo método da extração exaustiva, corresponde com o referido na literatura. Segundo Steele *et al.* (1999), a partir de 60 g de galho de *A. grandifolia*, pôde-se obter um teor extrativo de 12,697 g de extrato bruto, correspondendo a um percentual de 21,3%. Fazendo uma relação entre o resultado de Steele *et al.* (1999) e os resultados dos rendimentos da Tabela 1, é possível verificar que a diferença é de 0,1% de rendimento bruto. Não foram encontrados trabalhos na literatura que informassem o rendimento a partir de folhas.

Prospecção para alcalóides e CCD - Os resultados referentes à prospecção de alcalóides pelos reveladores de Dragendorff, Mayer, Wagner e Hager estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultado qualitativo para alcalóides totais nos extratos brutos das amostras.

EXTRATOS		REVELADORES			
Amostra	Parte da planta	Dragendorff	Mayer	Wagner	Hager
<i>Abuta grandifolia</i>	Folhas	-	+	-	-
	Galhos	+	+	+	+

Os resultados demonstram a maior probabilidade de detecção de alcalóides em todos os extratos brutos etanólicos de galhos, situação corroborada por Simões *et al.* (2004), no qual os autores referem que, de forma geral, o encontro de alcalóides ocorre na casca e no caule de espécies vegetais. Na CCD, os resultados têm o mesmo seguimento da prospecção, pois todas as amostras dos galhos foram positivas.

Obtenção das frações alcaloídicas - Para a obtenção das frações alcaloídicas, utilizou-se apenas as quantidades que estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento da fração alcaloídica clorofórmica.

Amostra	Parte da Planta	Extrato bruto seco (g)	Fração alcaloídica seca (g)	Rendimento (%)
<i>Abuta grandifolia</i>	Folhas	15,3	0,2753	1,80
	Galhos	10,3	0,0722	0,70

O resultado foi satisfatório para a presença de alcalóides totais nas frações das folhas e dos galhos. Entretanto, os rendimentos foram baixos, e o tempo necessário à secagem dos extratos obtidos de folhas foi muito superior ao esperado, fato que retardou o início das atividades de ensaios micobacterianos.

4. Conclusão

Houve predominância da presença de alcalóides totais nos extratos etanólicos e nas frações alcaloídicas dos galhos da espécie *A. grandifolia* em relação às folhas. A metodologia para o processamento fitoquímico foi satisfatória, porém os reduzidos rendimentos indicam à necessidade de se mudar a metodologia fitoquímica para obtenção de um maior rendimento das frações alcaloídicas.

5. Referências

- Brasil, Ministério da Saúde, 2008. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. Brasília: Ministério da Saúde, 436pp.
- Carvalho, C. M., 2005. *Recursos Naturais Amazônicos com perspectivas de uso Biotecnológico sobre o Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo. 95pp.s
- Djilani, A.; Legseir, B.; Soulimani, R.; Dicko, A. & Younos, C., 2006. New extraction technique for alkaloids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17 (3): 518-520p.
- Mari, A. O., 2007. *Aspectos anatômicos etnofarmacológicos de Abuta grandifolia (Mart.) Sandwith (Menispermaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da Amazônia*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 71pp.
- Ribeiro, J.E.L. da S., et al, 1999. *Flora da Reserva Duke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA, p. 816
- Salem, J. I.; Carvalho, C. M.; Ogusku, M. M.; Maia, R. & Ruffino-Netto, A. , 2007. PKO– Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. *Acta Amazônica*, 37 (3): 419-240p.
- Sigma-Aldrich, 2005. *Fluka – Reidel-de-Haën- Laboratory Chemicals and Analytical Reagents*. p. 2055.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gasmann, G.; Melo, J. C. P.; Mentz, L. A. & PetrovicK, P. R., 2004. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5ªed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1102p.
- Steele , J. C. P.; Simmonds M. S. J.; Veitch, N. C. & Warhurst, D. C., 1999. Evaluation of the Anti-Plasmodial Activity of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Medica*, 65: 413-416p.