

Novo ensaio antibacteriano leva ao isolamento de diterpenos clerodanos de *Polyalthia* sp.

Mônica T. Pupo^{1,*} (PQ), Terence I. Moy² (PQ), Frederick M. Ausubel² (PQ), Jon Clardy³ (PQ)

mtpupo@fcrp.usp.br

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; ²Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, EUA; ³Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA.

Palavras Chave: antibacteriano, *Caenorhabditis elegans*, *Enterococcus faecalis*, diterpenos clerodanos, *Polyalthia* sp.

Introdução

Um novo ensaio antibacteriano *in vivo* em placas de 96 poços foi recentemente desenvolvido, usando o nematóide *Caenorhabditis elegans* infectado com o agente oportunista *Enterococcus faecalis*.¹ Entre outras vantagens, esse ensaio pode fornecer informações sobre a farmacocinética, detectar compostos inativos *in vitro* (ex: pró-fármacos) e compostos que atuam em alvos importantes apenas para a sobrevivência *in vivo* ou virulência, ou ainda ativadores da imunidade inata. Em um *screening* de 1.136 extratos de produtos naturais do National Cancer Institute (NCI), nove foram inicialmente identificados como ativos, e três foram confirmados como “hits” após repetição dos ensaios. O fracionamento do extrato N087659 (*Polyalthia* sp., Annonaceae) foi monitorado pelo ensaio usando o modelo animal *in vivo* e também antibacteriano *in vitro*. Foram isolados quatro diterpenos clerodanos, sendo um inédito.

Resultados e Discussão

Os ensaios *in vivo* utilizaram o modelo animal *C. elegans* infectado com duas diferentes linhagens *E. faecalis*: i) MMH594 (virulenta), para avaliação da ação antibacteriana, e ii) *Dfsr* (avirulenta), para avaliação da toxicidade dos extratos.¹ Foram também realizados ensaios *in vitro* contra *E. faecalis* MMH594 em placas de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).¹

Tabela 1. Atividade antibacteriana *in vivo*, *in vitro* e toxicidade dos extratos vegetais.

Extrato	Sobrevivência do <i>C. elegans</i> (infectado com a cepa MMH594)*	Sobrevivência do <i>C. elegans</i> (infectado com a cepa <i>Dfsr</i>)**	CIM (cepa MMH594) µg/mL
N082031	60%	100%	15.6
N087659	50%	100%	62.5
N087613	50%	100%	62.5

* concentração do extrato 62.5 µg/mL; ** 250 µg/mL. Controles positivos: tetraciclina e ampicilina. Controle negativo: DMSO.

A atividade antibacteriana *in vivo* é medida pela sobrevivência do nematóide infectado com a cepa virulenta, após o tratamento com os extratos ou substâncias. Os três extratos promoveram recuperação do *C. elegans* igual ou superior a 50%, índice considerado satisfatório quando comparado ao controle negativo (DMSO), que leva a morte completa do nematóide devido a infecção causada pela linhagem virulenta de *E. faecalis*. Nenhum dos extratos apresentou toxicidade, como mostrado pela sobrevivência total do *C. elegans* infectado com a linhagem avirulenta da bactéria. Adicionalmente, todos os extratos apresentaram atividade *in vitro* contra *E. faecalis*, conforme demonstrado pelos valores de CIM. O fracionamento do extrato N087659 (*Polyalthia* sp.) levou ao isolamento de quatro diterpenos clerodanos (1-4), sendo 4 inédito na literatura. As estruturas foram determinadas através dos dados de RMN 1D e 2D. As substâncias foram avaliadas nos mesmos ensaios, sendo que 1 e 2 apresentaram atividade *in vitro* contra *E. faecalis*. As substâncias foram ativas *in vitro* e não apresentaram toxicidade ao *C. elegans*, porém não promoveram a recuperação do nematóide da infecção, sendo inativas no modelo *in vivo*.

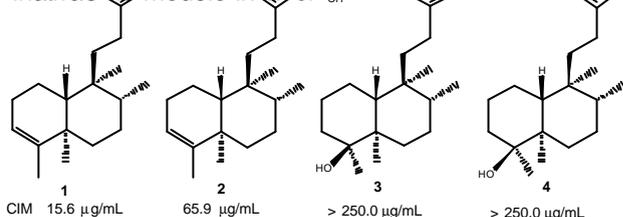


Figura 1. Diterpenos clerodanos isolados de *Polyalthia* sp. e respectivos valores de CIM frente a *E. faecalis*.

Os valores de CIM sugerem que a insaturação entre os carbonos 3 e 4 deve contribuir para a atividade antibacteriana *in vitro*.

Conclusões

O ensaio usando *C. elegans* infectado com bactérias patogênicas constitui uma nova e eficiente estratégia para a obtenção de novos “hits” para o desenvolvimento de antibacterianos, uma vez que pode antecipar informações sobre a atividade e a toxicidade *in vivo* das substâncias.

Agradecimentos

À FAPESP, pela bolsa concedida no Programa Novas Fronteiras (proc. nº 05/01032-7) e ao National Cancer Institute, EUA, pelo fornecimento dos extratos.

¹ Moy, T. I.; Ball, A. R.; Anklesaria, Z.; Casadei, G.; Lewis, K. E. Ausubel, F. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10414.