

**ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Psychotria spp.*  
(RUBIACEAE)**

**Heggdorne-Araújo M.<sup>1</sup>, Moraes T.M.S.<sup>2</sup>, da Cunha M.<sup>3</sup>, Muzitano M.F.<sup>4</sup>, Lassounskaia, E.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>UENF/Laboratório de Biologia do Reconhecer, marlon.heggdorne@gmail.com

<sup>2</sup>UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, tarsilamoraes@uol.com.br

<sup>3</sup>UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, maura@uenf.br

<sup>4</sup>UFRJ - Macaé/Faculdade de Farmácia, mfmuzitano@yahoo.com.br

<sup>5</sup> UENF/Laboratório de Biologia do Reconhecer, elena@uenf.br

**Resumo** - A tuberculose, doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, representa hoje um desafio em várias regiões do mundo. Apesar de alguns avanços na quimioterapia e da existência da vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), a tuberculose permanece como uma doença infecciosa significativa sob o ponto de vista de saúde pública. Estudos relatando atividade antituberculose a partir de extratos e compostos de origem vegetal são cada vez mais presentes. E a persistência do *Mycobacterium* à ação dos antimicobacterianos ressalta a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose. Extratos vegetais de onze espécies do gênero *Psychotria* originários de dois fragmentos de Floresta Atlântica no Rio de Janeiro, foram testados quanto à sua atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium bovis* BCG utilizando o método de MTT nas concentrações de 100, 20, 4 µg/mL para os extratos. Entre os onze extratos testados, todos apresentaram atividade inibitória contra *M. bovis* BCG. O teste de citotoxicidade com células RAW 264.7 foi realizado com todos os extratos e apenas os extratos na concentração de 100µg/mL foram identificados como sendo tóxicos.

**Palavras-chave:** Tuberculose, *Mycobacterium bovis* BCG, produtos naturais.

**Área do Conhecimento:** Imunologia Celular

### **Introdução**

A tuberculose, doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, representa hoje um desafio em várias regiões do mundo. A estimativa mais recente relata que 8,9 milhões de novos casos de tuberculose ocorreram no ano de 2004 e 1,7 milhões de pessoas morreram nesse mesmo ano (WHO, 2008).

O seu tratamento envolve antimicrobianos e dura de 6 a 9 meses. Essa longa duração, a toxidez significativa e o desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados no

tratamento, leva à possível não adesão do paciente (Zhang *et al.*, 2006).

Na busca de produtos naturais (PN) para o tratamento da tuberculose, muitas espécies de plantas mostraram atividade significativa, embora poucos tenham chegado à etapas de otimização e desenvolvimento de um novo fármaco (Coop & Pearce, 2007). Por isso, se faz necessário um contínuo *screening* a cerca de plantas com propriedades microbicida e/ou microbiostática.

Neste estudo avaliamos *in vitro* (em cultura de *Mycobacterium bovis* BCG) a atividade antimicobacteriana de 10 extratos de espécies diferentes pertencentes ao gênero *Psychotria*,

família botânica *Rubiaceae*, sendo estas plantas características da Mata Atlântica.

### Metodologia

As plantas foram coletadas em dois remanescentes de Floresta Atlântica do Rio de Janeiro, no Parque Nacional do Itatiaia – Itatiaia, RJ e na Reserva Biológica do Tinguá – Nova Iguaçu, RJ. Exsiccatas de cada material botânico foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

As folhas foram secas à temperatura ambiente e reduzidas a pó, em seguida, 1g de cada material vegetal foi submetido à maceração sob agitação (120 rpm) em 20ml de etanol por 24h, com renovação do solvente extrator até o esgotamento da extração. Os extratos etanólicos foram filtrados e evaporados em banho-maria (50° C). Para os ensaios as amostras foram solubilizadas em DMSO.

A atividade antimicobacteriana dos extratos foi avaliada contra o *M. bovis* BCG. A princípio foi preparada uma suspensão de *M. bovis* BCG (3 x 10<sup>7</sup> CFU/ml), 300µl desta suspensão foram incubados com 7,2ml de meio de cultura Middlebrook 7H9, acrescido de 0,05% Tween 80 e suplemento ADC (albumina, dextrose, catalase). Quando na fase logarítmica de crescimento a cultura foi sonicada em banho de ultrassom por 1 minuto e agitada no vórtex para dispersão dos grumos.

No experimento 50µl da suspensão de *M. bovis* BCG foram plaqueados na microplaca, na concentração 1 x 10<sup>6</sup> CFU/poço. Em seguida foi adicionado 50µl do antibiótico rifampicina (fármaco controle) e extratos vegetais em três concentrações. A placa de 96 poços selada foi então incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias.

Após esse período, 10µl de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol – 5

mg/ml em PBS estéril) foi adicionado e incubado por mais 3h. Em seguida adicionou-se 100µl do tampão de lise (20% p/v de SDS / 50% de DMF – dimetilformamida em água destilada – pH 4.7) a leitura é feita após 24h a 570nm (Gomez-Flores *et al.*, 1995). Como controle positivo de atividade antimicobacteriana é utilizado meio de cultura não acrescido de bactérias e controle negativo de atividade, poços acrescidos de bactérias e não tratados.

Para avaliar a atividade citotóxica dos extratos, o sobrenadante da cultura após 24h de incubação das células (RAW 264.7) com as amostras em três concentrações, foi colhido e analisado quanto ao teor da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) no meio. Esta é uma enzima citoplasmática que é encontrada no sobrenadante quando há lise celular, sendo usada como indicativo de necrose celular. No ensaio foi utilizado o kit comercial Doles, modificado para uso em microplaca. Para obtenção de lise máxima utilizou-se Triton 1%, e lise mínima, o sobrenadante de uma cultura de macrófagos não tratados.

### Resultados

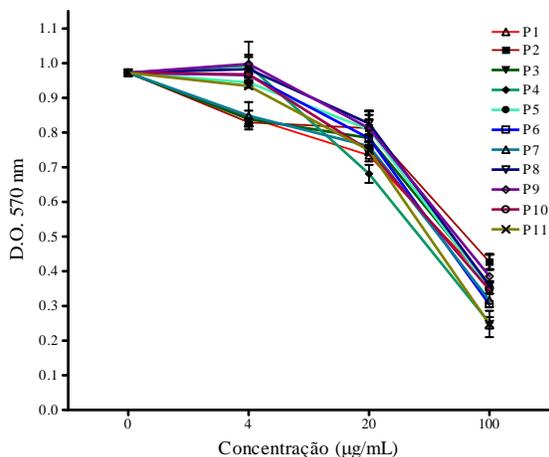
Para calcular Percentual de Inibição do crescimento do *M. bovis* BCG foi utilizada Média Aritmética ± Desvio Padrão. E para obter o IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento micobacteriano) das amostras testadas, os resultados foram plotados na forma de curva dose-resposta e o valor do IC<sub>50</sub> calculado por regressão não-linear utilizando o programa Prisma.

Nos ensaios realizados com os extratos de *Psychotria* na concentração de 250µg/mL, todos demonstraram alta atividade de inibição do crescimento da *M. bovis* BCG, apresentando valores em torno de 85 à 100% (Tabela 1). Em seguida foram testados a 250, 50 e 10µg/mL e continuaram apresentando valores significativos mesmo nas menores

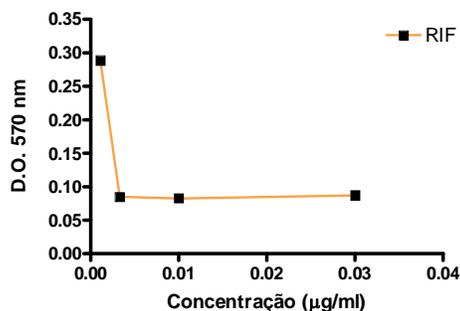
concentrações ( $P < 0,001$ ) comparado ao controle negativo de atividade.

Com objetivo de encontrar concentrações menores que ainda fossem capazes de inibir a *M. bovis* BCG e que não houvesse uma possível interferência do DMSO, utilizou-se 100, 20, 4  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 1), mesmas utilizadas para calcular o  $\text{IC}_{50}$  dos extratos (Tabela 1). O DMSO não apresentou efeito sobre o crescimento da cultura nas concentrações utilizadas. A Rifampicina, por ser um fármaco padrão no tratamento da tuberculose foi também utilizada como controle positivo (Figura 2).

Na avaliação de citotoxicidade em células (RAW 264.7) os extratos na concentração de 4 e 20  $\mu\text{g/mL}$  se assemelharam ao controle de lise mínima. Em 100  $\mu\text{g/mL}$  foi possível observar alta toxicidade com excessão da *P. nuda* e *P. pubigera* (Tinguá) (Tabela 2). O DMSO foi tóxico apenas na maior concentração 2% sendo seu percentual de liberação de LDH (25,86%) usado como basal para as amostras a 100  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 1.** Curva dose-resposta da inibição do crescimento de *M. bovis* BCG. Concentrações dos extratos 100, 20 e 4  $\text{mg/mL}$ .



**Figura 2.** Inibição do crescimento de *M. bovis* BCG pelo fármaco controle Rifampicina. Curva dose-resposta. Concentrações: 0,0300; 0,0100; 0,0033 e 0,0011  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 1.**  $\text{IC}_{50}$ : Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento de *M. bovis* BCG.

Extratos*	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>P. pubigera</i> – Itatiaia (P1)	48,06
<i>P. ruellifolia</i> (P2)	67,75
<i>P. suterela</i> (P3)	53,55
<i>P. stachyoides</i> (P4)	37,48
<i>P. capitata</i> (P5)	54,58
<i>P. glaziovii</i> (P6)	50,96
<i>P. leiocarpa</i> (P7)	45,70
<i>P. nuda</i> (P8)	63,67
<i>P. pubigera</i> – Tinguá (P9)	66,94
<i>P. racemosa</i> (P10)	52,34
<i>P. velloziana</i> (P11)	41,10
Rifampicina	0,0002271

\* O  $\text{IC}_{50}$  para as amostras de *Psychotria* foram calculadas utilizando as concentrações de 100, 20 e 4  $\mu\text{g/mL}$ . E a rifampicina as concentrações de 0,03, 0,01, 0,0033 e 0,0011  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 2.** Avaliação de citotoxicidade dos extratos em células de macrófagos (RAW 264.7). Triton (1%) lise máxima (110,39%±3,66) e macrófagos estimulados com LPS lise mínima (4,51%±2,40).

	Liberação específica de LDH (%)		
	4µg/mL	20µg/mL	100µg/mL
<i>Psychotria pubigera</i> – Itatiaia (P1)	1,27%±1,94	14,45%±2,90	91,38%±3,15
<i>Psychotria ruellifolia</i> (P2)	23,12%±5,31	23,02%±11,62	74,95%±22,37
<i>Psychotria suterela</i> (P3)	11,76%±2,44	25,86%±1,48	90,01%±0,93
<i>Psychotria stachyoides</i> (P4)	2,74%±11,33	12,02%±0,07	84,28%±7,60
<i>Psychotria capitata</i> (P5)	19,93%±11,55	62,93%±25,74	94,02%±1,86
<i>Psychotria glaziovii</i> (P6)	-6,08%±158	9,13%±9,61	90,92%±2,51
<i>Psychotria leiocarpa</i> (P7)	-9,84%±0,14	-1,77%±3,37	75,91%±3,37
<i>Psychotria nuda</i> (P8)	-8,72%±0,43	-4,06%±3,15	29,41%±1,00
<i>Psychotria pubigera</i> – Tinguá (P9)	-4,36%±0,72	17,30%±7,10	14,50%±5,74
<i>Psychotria racemosa</i> (P10)	-1,37%±8,53	3,19%±6,96	56,44%±10,11
<i>Psychotria vellosiana</i> (P11)	-7,86%±0,64	-0,10%±0,14	92,80%±0,43

## Discussão

Atualmente é cada vez mais presente a existência de trabalhos relatando atividade antituberculose a partir de extratos e compostos de origem vegetal, porém é escasso o relato de teste de citotoxicidade desses extratos e compostos para avaliar a sua seletividade. Em nossos ensaios avaliamos tanto a atividade antimicobacteriana *in vitro*, quanto a citotoxicidade dos extratos em cultura de macrófagos RAW 264.7.

Os resultados mostraram que é alta a atividade inibitória dos extratos de *Psychotria* em *M. bovis* BCG, sendo capazes de agir mesmo em menores concentrações. E que esse extratos apresentaram citotoxicidade apenas na maior concentração. Sendo assim, é possível observar concentrações onde existe atividade e não citotoxicidade. Dados da literatura mostraram anteriormente que o extrato vegetal de *Psychotria vellosiana* possui atividade

contra *M. tuberculosis* com MIC  $\leq 0,20$  µg / mL (Ramos *et al.*, 2008). Nosso resultado é compatível com este da literatura. Essa é a única espécie do gênero para qual encontramos relatos na literatura sobre atividade na tuberculose. Vale ressaltar que todas as outras espécies nunca haviam sido estudadas sob esse aspecto.

A atividade dos extratos de *Psychotria* contra as micobactérias poderia ser explicada pela presença de alcalóides indol, comumente encontrados em plantas da família Rubiaceae (Schripsema *et al.*, 2003). E Análises fitoquímicas de plantas do gênero *Psychotria* demonstraram a presença de psychotridinas, que têm sido associadas com efeito analgésico dose-dependente (Amador *et al.*, 2001).

## Conclusão

Com base nos resultados obtidos sugerimos que os extratos de *Psychotria* têm compostos ativos contra a *M. bovis* BCG e que possivelmente podem ser eficientes contra outras espécies de *Mycobacterium* mais virulentas. Dos extratos avaliados, seis podem ser ressaltados: *P. stachyoides*, *P. velloziana*, *P. leiocarpa* e *P. pubigera* (Itatiaia) apresentaram menores IC<sub>50</sub> (37,48, 41,10, 45,70 e 48,06µg/mL) respectivamente, sendo os mais ativos. E *P. nuda* e *P. pubigera* (Tinguá) mesmo com IC<sub>50</sub> maiores (63,67 e 66,94) apresentaram citotoxicidade baixa na maior concentração considerando o DMSO 2% como basal, 29,41%±1,00 e 14,50%±10,11 respectivamente, se destacando dos outros extratos.

Dessa forma, podemos concluir que os extratos vegetais de *Psychotria* por serem bastante ativos e pouco tóxicos são promissores na busca de novos fármacos para o tratamento da tuberculose.

## Referências

- AMADOR, T.A.; VEROTTA, L.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Involvement of nmda receptors in the analgesic properties of psychotridines. **Phytomedicine**, v.8, n.3, suppl.5, p.202-206, 2001.
- COOP, B.R.; PEARCE, A.N. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat. Prod. Rep.**, 24, 278-297, 2007.
- GOMEZ-FLORES, R.; GUPTA, S.; TAMEZ-GUERRA, R.; MEHTA, R. T. Determination of MIC's for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1842-1846, 1995.
- NUNN, P.; WILLIAMS, B.; FLOYD, K.; DYE, C.; ELZINGA, G.; RAVIGLIONE. Tuberculosis control in the era of HIV. **Nature Reviews Immunology** 5, p. 819- 826, 2005.
- RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J. V.; LEITÃO, S. G.; FERNÁNDEZ, S. L. S.; SILVA, P. E. A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora da UFSC. cap. 31: 918-958, 2003.
- World Health Organization** (WHO), <http://www.who.int> (acessado em Março de 2008).
- ZHANG, Y.; POST-MARTENS, K.; DENKIN, S. New drug candidates end therapeutic targets for tuberculosis therapy. **Drug Discovery Today**, 11, 21-27, 2006.