

***Ibicella lutea* COMO POTENCIAL AGENTE ANTIMICOBACTERIANO**

LISIANE MARTINS VOLCÃO¹; TATIANE SILVEIRA COELHO²; ALVARO VÁZQUEZ³; MARIA PIA CERDEIRAS⁴; PEDRO EDUARDO ALMEIDA DA SILVA⁵; DANIELA FERNANDES RAMOS⁶

¹Universidade Federal do Rio Grande – lisivolcao@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – tati.coelho85@gmail.com

³Cátedra de Farmacognosia – vazquez1956@gmail.com

⁴Cátedra de Microbiología – e-mail

⁵Universidade Federal do Rio Grande – pedrefurg@gmail.com

⁶Universidade Federal do Rio Grande – daniferamos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Ibicella lutea (Lindl.) Van Eselt., é uma planta pertencente à família Martyniaceae restrita a América do Sul (Giulietti; Harley, 2013). É conhecida popularmente como “Garra-do-Diabo” e utilizada na medicina popular uruguaia como antimicrobiano para o tratamento de infecções de pele e olhos (Wallace; Vázquez, 2011).

Compostos provenientes de matérias vegetais tendem a ter uma maior eficiência do que compostos sintéticos, pois podem atuar como substrato para sistemas transportadores para o meio intracelular do alvo (Harvey et al., 2015). Somado a isto, produtos naturais são o ponto de partida de diversas fármacos já disponíveis no mercado, como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, entre outros (Harvey et al., 2015). Desde 2000, 22 novos antimicrobianos, de origem natural e sintética, têm sido lançados para o tratamento de infecções em humanos, mas apenas cinco destes são considerados novas classes (Butler et al., 2013).

Dentre as patologias de grande importância atualmente, a tuberculose, é uma doença altamente infecciosa transmitida pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Desde 1993 a tuberculose é considerada uma emergência em saúde pública mundial, estimando-se uma incidência de 9,6 milhões de novos casos e um total de 1,5 milhões de mortes ao redor do mundo, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2015). Embora possa se observar, na última década, um progresso em relação à adesão ao tratamento da doença, ainda há a busca por novas alternativas de tratamento, como por exemplo medicamentos que diminuam o tempo de tratamento, que minimizem os efeitos tóxicos e interações com outras drogas, como é o caso dos anti-retrovirais, e compostos que apresentem atividade contra cepas resistentes aos fármacos disponíveis no mercado (Silva; Aínsa, 2007).

Com base no exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial *in vitro* dos extratos etanólico e clorofórmico de *I. lutea*, e de frações destes, frente a *M. tuberculosis*, assim como determinar a citotoxicidade destes produtos à células macrofágicas.

2. METODOLOGIA

Para o estudo foram utilizados os extratos etanólico e clorofórmico provenientes de partes aéreas de *I. lutea*, assim como duas frações originadas por cromatografia à vácuo do extrato clorofórmico (AcOE e MeOH). A extração dos

produtos e frações, foi realizada de acordo com Cerdeiras et al. (2000) pelo Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Química – Uruguai.

A fim de determinar a atividade antibacteriana dos extratos, foi utilizado o método REMA (Palomino et al., 2002) em placa de 96 poços, utilizando meio de cultivo Middlebrook 7H9 broth com 10% de OADC (Ácido Albumina Oléico Dextrose Catalase). Um inóculo preparado a $3,2 \times 10^6$ UFC/mL da cepa de *M. Tuberculosis* H37Rv pan-suscetível (ATCC 27294) foi adicionado a este meio, contendo diferentes concentrações do extrato e de suas frações previamente seriadas (1:2) iniciando com 200 µg/mL a 0,19 µg/mL. As placas foram incubadas 37°C durante sete dias, e após este período, foi adicionado a todos os poços da placa 30 µl de resazurina (0,02%), indicador de viabilidade celular. Após o período de 24h de nova incubação da placa, foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM), a qual foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para o ensaio de citotoxicidade dos compostos, foram utilizadas células macrofágicas J774A.1 (ATCC TIB-67). Em uma placa de microtitulação de 96 poços, foi adicionado 200 µl de suspensão contendo macrófagos (1×10^5 cel/mL) cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, mantido sob condições de umidade atmosférica de 5% CO₂ e 37°C por 24h. Logo após este período, as células foram expostas a diferentes concentrações (200 µg/mL → 0,78 µg/mL) dos extratos e frações, e a placa incubada *overnight*. Para a leitura foi adicionado 30 µl de resazurina a 0,01%, e o IC50 (concentração que mantém a viabilidade de 50% das células) foi mensurado após 24h por espectrofotometria a 620 nm (Ahmed et al., 1994). O experimento foi realizado em duplicata.

O Índice de Seletividade (IS) dos compostos foi calculado com base nos resultados da CIM e do IC50 de cada composto, com a seguinte fórmula: IC50/CIM. IS com valores maiores ou iguais a 10 indicam que o composto é 10 vezes menos tóxico para o macrófago em comparação a toxicidade ao *M. tuberculosis* (Pavan et al., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os extratos brutos de *I. lutea* avaliados neste estudo (etanólico e clorofórmico) apresentaram atividade inibitória nas concentrações utilizadas contra *M. tuberculosis*, assim as duas frações originadas do extrato clorofórmico apresentaram atividade antimicobacteriana (tabela 1), 50 µg/mL para ambas as frações.

De acordo com os resultados, pode-se observar uma maior atividade antimicobacteriana quando o micro-organismo é exposto aos extratos não fracionados. Para o extrato bruto clorofórmico, a CIM frente a espécie bacteriana é de 0,19 µg/mL, porém quando o teste é realizado com frações deste extrato, as CIM sobem para 50 µg/mL. A mistura de constituintes bioativos presentes em um extrato natural bruto, sem ter sido fracionado, pode ter um efeito sinérgico, potencializando a ação antibacteriana do composto (Wagner; Ulrich-Merzenich, 2009). Entretanto, ao fracionar um composto, algumas destas substâncias podem se perder, diminuindo assim seu potencial antibacteriano, como pode ser observado no presente estudo.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM), IC50 ($\mu\text{g/mL}$) e Índice de Seletividade (IS) dos extratos e frações de *Ibicella lutea* frente à *Mycobacterium tuberculosis*.

Extrato/Fração	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	IS (IC50/CIM)
<i>Ibicella lutea</i> extrato bruto etanólico	0,78	76,58	98,17
<i>Ibicella lutea</i> extrato bruto clorofórmico	0,19	74,47	391,94
<i>Ibicella lutea</i> fração AcOE	50	30,35	0,60
<i>Ibicella lutea</i> fração MeOH	50	128,24	2,56

Com os dados obtidos pelo teste de citotoxicidade (tabela 1), pode-se analisar um IC50 variando de 30,35 $\mu\text{g/mL}$ (para a fração AcOE) a 128,24 $\mu\text{g/mL}$ (para a fração MeOH). Apesar de menos tóxica as células macrofágicas, a fração obtida com Metanol (MeOH) não apresentou um IS satisfatório (>10), demonstrando pouca ação seletiva frente *M. tuberculosis*. Entretanto, quando analisados pelo IS, os extratos brutos, etanólico e clorofórmico, apresentaram melhores resultados, ambos com toxicidade maior as células bacterianas do que aos macrófagos, células as quais representam o sítio primário de infecção deste patógeno (Russel, 2007), fornecendo uma indicação de que novos experimento com estes produtos possam ser feitos com segurança. Levando em consideração os dados obtidos com os testes de inibição micobacteriana e citotoxicidade, a determinação da ação antimicobacteriana destes compostos em cepas resistentes de *M. tuberculosis* e testes com bacilos internalizados em macrófagos, podem ser novas etapas promissoras deste estudo, a fim de aproximar os resultados *in vitro* com o processo de infecção por este patógeno *in vivo*.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo demonstram o potencial do uso de compostos derivados dos extratos brutos etanólicos e clorofórmicos de *Ibicella lutea* no controle de infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Somado a isso, o exposto neste estudo dá suporte de que testes *in vivo* com estes extratos possam ser realizados com segurança, visto que os resultados demonstram uma possível toxicidade seletiva por parte dos extratos brutos de *I. lutea* frente as células de *M. tuberculosis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Giulietti, A.M.; Harley, R.M. Flora da Bahia: Martyniaceae. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 13, n. 1, p. 381-384, 2013.

Wallace, F.; Vàsquez, A. Anti-*Staphylococcus* Activity of *Ibicella lutea* Compounds. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 5, p. 1025-1027, 2011.

Harvey, A.L; Edrada-Ebel, RuAngelie; Quinn, R.J. The Re-emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. **Nature Reviews – Drug Discovery**, London, v. 14, n. , p. 111-129, 2015.

Butler, M.S; Blaskovich, M.A.; Cooper, M.A. Antibiotics in the Clinical Pipeline in 2013. **The Journal of Antibiotics – Nature**, Tokio, v. 66, n. 9, p. 571-591, 2013.

WHO – World Health Organization. **Antimicrobial Resistance, Global Report on Surveillance**, Geneva. Acessado em 1 de agosto de 2016. In press. Disponível em: www.who.int

Silva, P.A.; Aínsa, J.A. Drugs and Drug Interaction. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. Ed. **Tuberculosis: From Basic Science to Patient Care**, Antwerp: Institute of Tropical Medicine Antwerp, 2007. Cap. 18, p. 593-634.

Cerdeiras, M.P.; Fernández, J.; Soubes, M.; Vero, S.; Ferreira, F.; Moyna, P.; Olano, I.; Vásquez, A. A New Antibacterial Coumpound from *Ibicella lutea*. **Journal of Ethopharmacology**, Graz, v. 73, n. 3, p. 521-525, 2000.

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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

Ahmed, S.A.; Gogal Jr., R.M.; Walsh, J.E. A New Rapid and Simple Non-radioactive Assay to Monitor and Determine the Proliferation of Lymphocytes: an Alternative to [³H]thymidine Incorporation Assay. **Journal of Immunological Methods**, New York, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

Pavan, F.R.; Maia, P.I.S; Leite, S.R.A.; Deflon, V.M.; Batista, A.A.; Sato, D.N.; Franzblau, S.G.; Leite, C.Q.F. Thiosemicarbazones, Semicarbazones, Dithiocarbazates and Hydrazide/hydrazones: Anti – *Mycobacterium tuberculosis* Activity and Cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.

Wagner, S.H.; Ulrich-Merzenich, G. Synergy Research: Approaching a New Generation of Phytopharmaceutical. **Phytomedicine**, Vallberga, v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

Russel, D.G. Who Puts the Tubercle in Tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 1, p. 39-47, 2007.