



Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de *Morus Alba* L. (Moraceae)

Camila Bugnotto Pereira^{1*}; Aline Marin³; Sérgio Luiz Dalmora¹; Raquel Medina Martins Necchi¹; Luana Rossato²; Sydney Hartz Alves²; Melânia Palermo Manfron³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900 Brasil.

²Departamento de Parasitologia e Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 20, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil.

³Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil.

RESUMO

O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroetanólico e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica das folhas de *Morus alba* L. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Prothoteca zophii*. As frações que apresentaram melhores respostas para a atividade antimicrobiana foram acetato de etila e clorofórmica com CIM de 256 µg/mL. Não foi possível detectar atividade antimicrobiana para *Aspergillus fumigatus* em nenhuma das concentrações testadas. A citotoxicidade do extrato hidroetanólico foi avaliada através de culturas de células de ovário de hamster chinês (CHO) e células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929, determinando o índice de citotoxicidade (IC₅₀). O IC₅₀ foi de 0,34 mg/mL para as células CHO e 3,24 mg/mL para as células NCTC 929. De modo geral, as frações acetato de etila e clorofórmica das folhas de *M. alba* L. apresentaram moderada atividade antimicrobiana e o extrato bruto demonstrou ação citotóxica *in vitro* frente as células CHO e NCTC 929.

Palavras-chave: *Morus alba* L.. Atividade Antimicrobiana. Citotoxicidade. Moraceae.

INTRODUÇÃO

Morus alba L. é uma espécie pertencente à família Moraceae, nativa da China e conhecida popularmente como amoreira branca. Suas folhas, raízes e galhos são usados como hipoglicemiante, antipirético, hepatoprotetor, anti-inflamatório, antioxidante e no tratamento dos sintomas do climatério (Chen et al., 1995; Yen et al., 1996; Zhishen et al., 1999; Choi et al., 2005). Nas folhas de *M. alba* foram identificados flavonoides como quercetina e rutina e o alcaloide 1-desoxinojirimicina (Kim et al., 1999; Kimura et al., 2004).

Muitas espécies vegetais apresentam atividades antimicrobianas devido às propriedades apresentadas pelos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (Gotlieb, 1981). Os alcaloides e as substâncias fenólicas, como fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas e flavonas são os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas (Singh et al., 2002; Hatano et al., 2005; Esquenazi et al., 2002). Essas propriedades podem ser detectadas, principalmente, por meio da observação de sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismo (Souza et al., 2000). O estudo da atividade antimicrobiana de compostos naturais é instigante, visto que o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos é cada vez maior, além da ocorrência de efeitos colaterais como diarreias e vômitos (Aderinokun et al., 1999).

Demonstrada a atividade antimicrobiana para a espécie vegetal avaliada é importante também conhecer a citotoxicidade que a mesma pode apresentar. Atualmente as substâncias selecionadas pelos testes em cultura de células estão sendo avaliadas em modelos experimentais de câncer, utilizando animais de laboratório (Carvalho, 2006).

Diante dos diversos usos populares e da composição química dos extratos de *Morus alba* L., o presente trabalho teve como objetivos: investigar a atividade antibacteriana, antifúngica e algicida *in vitro* do extrato hidroetanólico das folhas de *M. alba* e de suas frações frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Prothoteca zophii*. Assim como determinar a citotoxicidade *in vitro* frente às células de ovário de hamster chinês (CHO) e células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *Morus alba* L. foram coletadas na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra do material vegetal foi identificada e depositada

Autor correspondente: Pereira, C. B. - Laboratório de Farmacognosia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Santa Maria - Prédio 26 - Santa Maria - RS - CEP:97105-900 Brasil - telefone: (055) 96480926 - e-mail: camilabugno@hotmail.com

no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, conforme exsicata SMDDB 13.079.

Extração e fracionamento

O extrato foi obtido por maceração à frio do material vegetal em pó (80 g) com solução hidroetanólica 70% na proporção 2:8 (p/v) durante 30 dias. Em seguida, o extrato foi concentrado, liofilizado e uma parte (20 g) submetida a extrações sucessivas com solventes orgânicos de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, obtendo-se respectivamente as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e frações utilizou-se o método de microdiluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards CLSI M27 A3 (2008) para leveduras, CLSI M7 A6 (2003) para bactérias e CLSI M38 A (2002) para fungos filamentosos, determinando assim a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Preparação das placas de microdiluição

Para a execução dos testes foram utilizadas placas estéreis de microdiluição com cavidade com capacidade de 500 µL, dispostas em 8 linhas e 12 colunas, totalizando 96 cavidades.

Preparação do inóculo

Os inóculos do fungo leveduriforme e de *Prototheca zopfii* foram preparados a partir de cultivos em ágar Sabouraud durante 48 h a 30°C. A seguir preparou-se uma suspensão em salina 0,85% esterilizada, ajustando-se a turvação dos microrganismos em espectrofotômetro até se obter transmitância equivalente a solução-padrão da escala de Mc Farland 0.5 em comprimento de onda de 530 nm. A suspensão de trabalho foi obtida pela diluição 1:50, no meio RPMI-1640, caracterizando-se em inóculo prévio. Esse, foi novamente diluído a 1:20 no mesmo meio. As placas com os patógenos foram incubadas a 35°C durante 48 h.

A preparação do inóculo das espécies bacterianas foi realizada de modo similar, substituindo-se apenas os meios agar Sabouraud e RPMI-1640, por agar Muller-Hinton (MH) e caldo Muller-Hinton. Os inóculos foram obtidos a partir de bactérias ativadas através de cultivos em ágar Muller Hinton durante 24 h a 35°C. A seguir foi preparada uma solução em salina 0,85% esterilizada, ajustando-se a turvação em espectrofotômetro até obter transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de Mc Farland 0,5 em comprimento de onda de 630 nm. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:10 com meio líquido caldo Mueller-Hinton. As placas com os patógenos bacterianos foram incubadas a 37°C durante 24 h.

O inóculo para o fungo filamentoso foi preparado em ágar batata-dextrose durante 7 dias por 35 °C. Decorrido esse

período, as colônias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de salina 0,85% esterilizada. A seguir, essa suspensão de conídios foi transferida para um tubo esterilizado, onde a densidade foi ajustada em espectrofotômetro a 530 nm, até atingir 80 a 82 % de transmitância (0,009 a 0,11 de absorbância). A suspensão foi diluída a 1:50 no meio de cultura. A seguir uma quantidade de 100 µL foi inoculada nas placas de microdiluição.

Inoculação no meio de cultura

As cavidades das placas de microdiluição contendo 100 µL do extrato bruto ou frações de *M. alba* foram inoculadas com 100µl de suspensão do inóculo com levedura e 10 µL de suspensão bacteriana. A cavidade do controle positivo continha 0,1 mL do inóculo e 0,1 mL do meio, sem extrato ou frações. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As concentrações do extrato variaram de 512 a 4 µg/mL.

Microrganismo

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 44373, *Aspergillus fumigatus* isolado clínico e *Prototheca zopfii* isolado clínico, disponíveis no Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM

Incubação e leitura do teste

As microplacas inoculadas com bactérias foram incubadas a 35 °C por 24 h, e as inoculadas com fungos foram incubadas a 35 °C por 48 h. A leitura foi realizada após período de incubação, mediante comparação visual com o controle de crescimento positivo. Os resultados foram expressos como concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração da amostra testada onde não foi visualizado crescimento do microrganismo.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células NCTC 929

Os ensaios foram realizados *in vitro* utilizando a cultura de linhagem de células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929 (fibroblastos de mamíferos ATCC CCL-1) por incorporação do corante vermelho neutro (Nogueira et al., 2008). As células foram mantidas no meio mínimo essencial de Eagle (MEM) com 0,1 mM de 146 aminoácidos não essenciais, 1 mM de sódio e suplementado com 10 % de soro bovino fetal. As células de aderência foram tratadas com tripsina e a suspensão celular ajustada para 2x10⁵ células/mL. O volume de 0,2 mL da suspensão celular foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços e colocado em incubadora de CO₂ a 37 °C por 24 h. Em seguida, as células foram expostas ao extrato das folhas de *M. alba* nas concentrações de 0,78 mg/mL; 1,56 mg/mL; 3,12 mg/mL; 6,25 mg/mL e como controle utilizou-se o

meio de cultura. Cada concentração foi testada em triplicata e o vermelho neutro extraído com solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Foi determinada a absorvância a 540 nm em leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células CHO

Os ensaios foram realizados *in vitro* utilizando cultura de linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) por incorporação do corante vermelho neutro (Nogueira et al., 2008). As células foram mantidas no caldo RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino. As células de aderência foram tratadas com tripsina e a suspensão celular ajustada para 2×10^5 células/mL. O volume de 0,2 mL da suspensão celular foi adicionado a cada poço da placa de 96 poços e colocado em incubadora de CO₂ a 37 °C por 24 h. Em seguida, as células foram expostas ao extrato das folhas de *M. alba* nas concentrações de 0,19 mg/mL; 0,39 mg/mL; 0,78 mg/mL; 1,56 mg/mL; 3,12 mg/mL e como controle utilizou-se o meio de cultura. Cada concentração foi testada em triplicata e o vermelho neutro extraído com solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Foi determinada a absorvância a 540 nm em leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

RESULTADOS

Os microrganismos utilizados neste ensaio abrangeram a classe dos Gram-positivos (*S. aureus*), Gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa*), fungo filamentoso (*A. fumigatus*), fungo leveduriforme (*C. albicans*) e ainda a alga unicelular *P. zopfii*. Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 1. *E. coli* foi sensível à fração acetato de etila na concentração de 256 µg/mL (CIM), *S. aureus* apresentou sensibilidade frente ao extrato hidroetanólico bruto (512 µg/mL) e as frações butanólica (512 µg/mL) e clorofórmica (256 µg/mL); *P. aeruginosa* e *P. Zophii* foram sensíveis ao extrato e às quatro frações, *C. albicans* foi sensível ao extrato hidroetanólico (512 µg/mL) e à fração acetato (256 µg/mL). *Aspergillus fumigatus* não apresentou sensibilidade nas concentrações testadas. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas evidenciaram componentes químicos no extrato e nas frações com potencial efeito antibacteriano e antifúngico.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *Morus alba* L. (µg/mL), frente a seis diferentes microrganismos.

Microrganismos	EB	Fr. AcOEt	Fr. ButOH	Fr. Clo.	Fr. Hex.
<i>Escherichia coli</i>	>512	256	>512	>512	>512
<i>Staphylococcus aureus</i>	512	>512	512	256	>512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	512	256	512	256	512
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>512	>512	>512	>512	>512
<i>Prototheca zopfii</i>	512	512	512	256	256
<i>Candida albicans</i>	512	256	>512	>512	>512

Concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato bruto e frações das folhas de *Morus alba* L. EB = extrato bruto, Fr. AcOEt = fração acetato de etila, Fr. ButOH = fração butanólica, Fr. Clo = fração clorofórmica, Fr. Hex = fração hexânica.

A atividade citotóxica em células CHO apresentou IC₅₀ (índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50 %) na concentração de 0,34 mg/mL, com intervalo de confiança superior e inferior de IC_{50S} 0,44 mg/ml e IC_{50I} 0,24 mg/ml, respectivamente. Para as células NCTC 929 o IC₅₀ foi obtido na concentração de 3,24 mg/ml, com IC_{50S} de 3,53 mg/ml e IC_{50I} de 2,98 mg/ml.

DISCUSSÃO

Várias razões levam pesquisadores a estudar a ação antimicrobiana dos metabólitos secundários, uma delas é o aumento da resistência bacteriana frente aos agentes antimicrobianos tradicionais. Segundo Bylka et al., (2004), a atividade antimicrobiana de um extrato pode ser devido a presença de flavonoides e taninos, os quais estão presentes nas folhas de *M. alba*, sugerindo uma possível atividade antimicrobiana. De acordo com Holetz et al., (2002), concentrações abaixo de 100 µg/mL apresentam boa atividade antimicrobiana, entre 100-500 µg/mL moderada e entre 500 e 1000 µg/mL fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

As frações que apresentaram moderada atividade antimicrobiana foram acetato de etila para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e a fração clorofórmica para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. zopfii*. Esses microrganismos são responsáveis por diversas patologias como doenças respiratórias, infecções intestinais, urinárias e septicemia, sendo de grande importância a descoberta da atividade antimicrobiana das folhas de *M. alba* L. frente a estes patógenos visando uma futura aplicação terapêutica (Urzua et al., 1998; Trabulsi et al., 1999). O extrato hidroetanólico e a fração butanólica apresentaram fraca atividade. A fração hexânica apresentou moderada atividade frente a *P. zophii*, patógeno oportunista de importância clínica em pacientes imunocomprometidos e de difícil erradicação com as drogas antifúngicas atualmente disponíveis (Lass et al., 2004).

Através da cultura de linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) por incorporação do corante vermelho neutro, foi determinado a IC₅₀ do extrato de *M. alba* na concentração de 0,34 mg/mL. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Albuquerque (2009), que ao expor células CHO a diferentes concentrações do extrato de *Plathymenia reticulata* Benth. obteve IC₅₀ de 0,331 mg/mL. No ensaio de citotoxicidade por meio da exposição do extrato de *M. alba* as células NCTC 929, foi obtido IC₅₀ na concentração de 3,24 mg/mL, valor superior ao encontrado frente à exposição do extrato as células CHO (0,331mg/mL), demonstrando maior citotoxicidade diante das células CHO. Essa diferença nos valores obtidos para concentração inibitória varia de acordo com o tipo de célula usada no ensaio. Segundo National Institute of Health (1996) (NIH), dados *in vitro* podem ser úteis na estimativa das doses iniciais para os testes *in vivo* de toxicidade aguda, que irão reduzir o número de animais necessários para tais determinações.

O extrato de *M. alba* possui ação citotóxica *in vitro* frente as células testadas, podendo ser avaliado em modelos experimentais de câncer, utilizando animais de laboratório. Os dados obtidos encorajam a realização de novos estudos

a fim determinar as substâncias que contribuem para a atividade biológica, entender seu mecanismo de ação e avaliar a toxicidade, visando uma possível aplicação farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pela bolsa concedida.

ABSTRACT

Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of crude extract obtained of Morus Alba L. (Moraceae)

This study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of hydroethanolic extract and hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol fractions from *Morus alba* L. leaves. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Prothoteca zophii*. The fractions that better responded the antimicrobial activity were ethyl acetate and chloroform with CIM of 256 µg/mL. It was unable to detect antimicrobial activity for *Aspergillus fumigatus* in the tested concentrations. The cytotoxicity of the hydroethanolic extract was evaluated by cell cultures of chinese hamster ovary (CHO) and connective tissue of mouse clone 929 (NCTC), determining the level of cytotoxicity (IC₅₀). The IC₅₀ obtained was 0.34 mg/mL for CHO and 3.24 mg/ml for NCTC 929 cells. In general, ethyl acetate and chloroform fractions from *M. alba* L. leaves showed moderate antimicrobial activity and its extract presented *in vitro* cytotoxicity against CHO and NCTC 929 cells.

Keywords: *Morus alba* L. Antimicrobial Activity. Cytotoxicity. Moraceae.

REFERÊNCIAS

- Aderinokun GA, Lawoyin JO, Onyeaso CO. Effect of two common Nigerian chewing sticks on gingival health and oral hygiene. *Odont Trop*. 1999;22(87):13-8.
- Albuquerque LBL. Estudos *in vitro* e *in vivo* da *Plathymenia reticulata* benth. [dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba; 2009. 95 p.
- Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *J Am Nutraceutical Assoc*. 2004;7:24-31.
- Carvalho JE. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *MultiCiência*. 2006;7:1-18.
- Chen FJ, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanism of extracts from mulberry leaves and cortex mori radices in streptozotocin induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi*. 1995;115:476-82.
- Choi EM, Hwang JK. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*. 2005;76:608-13.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. 3rd. ed. Wayne, PA: CLSI; 2008. M27-A3.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2003. M7-A6.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002. M38-A.
- Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozental S, Silva AJR, Alviano CS. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res Microbiol*. 2002;53:647-52.
- Gotlieb O. New and underutilized plants in the Américas: solution to problems of inventory through systematics. *Interciência*. 1981;6:22-9.
- Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa T, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 2005;66:2047-2055.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(7):1027-31.
- Kim HB, Chung WY, Ryu KS. Sensory characteristics and blood glucose lowering effect of ice-cream containing mulberry leaf powder. *Korean J Seric Sci*. 1999:129-34.
- Kimura T, Kiyotaka N, Yuko S, Kenji Y, Masahiro S, Kohji Y, Hiroshi S, Teruo M. Determination of 1 Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *J Agric Food Chem*. 2004;52:1415-8.
- Lass-florl C, Fille M, Gunsilius E, Gastl G. Disseminated Infection with *Prototheca zopfii* after Unrelated Stem Cell Transplantation for Leukemia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4907-8.
- National Institute of Health. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animal. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
- Nogueira DR, Sangoi MS, Silva LM, Todeschini V, Dalmora SL. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. *J Sep Sci*. 2008;31(16-17):3098-105.
- Singh B, Sahu PM, Singh S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Fitoterapia*. 2002;73:153-5.

Souza CAS, Avancini CAM, Wiest JM. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Braz J Vet Res Anim Sci*. [Internet]. 2000;37(6). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962000000600001>

Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

Urzua A, Caroli M, Vasquez L, Mendonza L, Wilkens M, Tojo E. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*. 1998;62:251-4.

Yen GC, Wu S, Duh PD. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of Mulberry (*Morus alba* L.) *J Agric Food chem*. 1996;44(7):1687-90.

Zhishen JT, Mengcheng WJ. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chem*. 1999;64:555-9.

Recebido em 19 de outubro de 2011.

Aceito para publicação em 20 de janeiro de 2012.

