



Atividade antiviral de *Musa acuminata* Colla, Musaceae

Fernanda Otaviano Martins,¹ Catharina Eccard Fingolo,^{*,2,3} Ricardo Machado Kuster,^{2,3}
Maria Auxiliadora Coelho Kaplan,^{2,3} Maria Teresa Villela Romanos¹

¹Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, ss, sala 064, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro-RJ, Brasil

²Programa de Biotecnologia Vegetal, Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Bloco K 2º andar, sala 032, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro-RJ, Brasil

³Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, 1º andar, sala 016, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

RESUMO: O presente trabalho avalia a atividade antiviral de extratos e frações de *Musa acuminata* Colla, Musaceae, coletada em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro (Petrópolis e Santo Antônio de Pádua). As inflorescências de *M. acuminata* apresentaram excelente atividade para os dois vírus avaliados: herpesvírus simples humano tipo 1 e herpesvírus simples humano tipo 2, ambos resistentes ao Aciclovir. Os resultados indicam que os extratos de *M. acuminata* testados podem constituir alvo potencial para uso em terapias antivirais.

Unitermos: *Musa acuminata*, Musaceae, atividade antiviral.

ABSTRACT: “Antiviral activity of *Musa acuminata* Colla, Musaceae.” This study evaluates the antiviral activity of extracts and fractions of *Musa acuminata* Colla collected in two regions of Rio de Janeiro State (Petrópolis and Santo Antônio de Pádua). The inflorescences of *M. acuminata* showed excellent activity for the two virus evaluated: simple human herpesvirus type 1 and simple human herpesvirus type 2, both resistant to Acyclovir. The results indicate that the tested extracts of *M. acuminata* can be potential target for use in antiviral therapy.

Keywords: *Musa acuminata*, antiviral activity.

INTRODUÇÃO

A espécie *Musa acuminata* Colla, conhecida popularmente como banana ouro, pertence à família Musaceae e é considerada a menor das bananas. A banana (*Musa* sp.) é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo cultivada na maioria dos países tropicais. No Brasil, a banana destaca-se entre os principais produtos agrícolas, ocupando o segundo lugar dentre as frutas na preferência dos consumidores (Bernardi et al., 2004).

De acordo com a literatura vigente, algumas espécies de *Musa* caracterizam-se pela presença de substâncias com potencial farmacológico bastante interessante, tais como: antioxidante (Kanazawa & Sakakibara, 2000; Someya et al., 2002), antiúlcera (Ghosal & Saini, 1984; Costa & Brito, 1997; Lewis et al., 1999), bactericida (Sharma et al., 1989), fungicida (Talero & Vejarano, 1973; Sharma et al., 1989; Hirai et al., 1994; Quinines et al., 2000; Kamo et al., 2001; Luque-Ortega et al., 2004), inseticida (Pascual-Villalobos & Rodriguez, 2006).

Este trabalho visa mostrar a atividade antiviral de *Musa acuminata*, nunca antes descrita na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi coletado no município de Petrópolis-RJ em novembro e dezembro de 2006 e em Santo Antônio de Pádua-RJ em novembro de 2006, identificado pelo Prof. Dr. João Marcelo de Alvarenga Braga, Jardim Botânico-RJ e depositado no Herbário da Faculdade de Formação de Professores por Ricardo de Moura Loyola, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), São Gonçalo, Rio de Janeiro, Brasil.

As inflorescências de *Musa acuminata*, ainda frescas, foram reduzidas a pequenos fragmentos utilizando faca e, em seguida, submetidas ao processo de extração exaustiva por maceração estática com etanol, o solvente tendo sido trocado vinte vezes, de 48 em 48 h. O material foi concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador, mantendo a temperatura do banho perto de 40 °C. Após secagem, o resíduo vegetal foi submetido à partição líquido-líquido em seqüência com solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etila e

*E-mail: fingoloco@nppn.ufrj.br; Tel. + 55-21-2562-6791.

n-butanol. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida, pesadas e então usadas nos testes de atividade antiviral.

Os extratos e as frações foram pesados separadamente e, posteriormente, solubilizados em 1% de DMSO e adicionados de água destilada para uma concentração estoque de 400 µg/mL, filtrados em membrana Millipore (0,22 mm), divididos em pequenos volumes e estocados a temperatura de -20 ° C até o momento de utilização.

Células e vírus

Para a realização desse estudo foi utilizada a cultura de células Vero (fibroblasto de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*), mantida em MEM (Meio Mínimo Essencial) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As amostras de vírus Herpes simplex tipos 1 e 2 resistentes ao Aciclovir (HSV-1-ACVr e HSV-2-ACVr), pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas), sob a responsabilidade da Professora Dra. Maria Teresa Villela Romanos.

Testes de citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada baseando-se na observação da alteração morfológica e na viabilidade celular.

Observação da alteração morfológica celular

Os extratos e frações foram submetidos a diluições seriadas, na razão 2, utilizando-se meio de cultura sem soro como diluente e colocados em contato com as monocamadas de células confluentes em microplacas de 96 poços e posteriormente incubadas a 37 °C em ambiente com 5% de CO₂ durante 48 h e examinada ao microscópio óptico invertido. O efeito citotóxico foi detectado pelo aparecimento de células morfológicamente alteradas (Rodríguez et al., 1990). A maior concentração da substância em que não houve alteração na morfologia celular foi denominada de concentração máxima não tóxica (CMNT) e utilizada para os estudos antivirais.

Verificação da viabilidade celular

Os extratos e frações nas mesmas diluições e condições já descritas foram colocados sobre as monocamadas de células confluentes. O efeito na viabilidade celular foi determinado através da técnica descrita por Neyndorff e colaboradores (1990), com pequenas modificações. A técnica consistiu na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e posterior quantificação por leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 492 nm. A percentagem de células viáveis foi obtida pela fórmula:

$$\frac{DO_{odr} - DO_{contr}}{DO_{vn} - DO_{contr}} \times 100$$

sendo calculada a toxidade para 50% das culturas de células (CC₅₀) onde:

- DO_{odr}, Densidade ótica da droga;
- DO_{contr}, Densidade ótica controle de células
- DO_{vn}, Densidade ótica Vermelho neutro

Avaliação da atividade antiviral

Suspensão viral em várias diluições foi inoculada em cultura de células na presença dos extratos na CMNT e na ausência dos extratos (controle de vírus), apenas com o meio de cultura sem soro. Ambas as culturas (teste e controle) foram incubadas a 37 °C por 48 h em ambiente com 5% de CO₂.

A atividade antiviral foi avaliada pela observação da redução do título viral na presença (teste) e na ausência (controle) dos extratos e frações, determinados por TCID₅₀/ml (Reed & Muench, 1938), sendo calculada a percentagem de inibição (PI), de acordo com a fórmula proposta por Nishimura e colaboradores (1977).

$$PI = \frac{1 - \text{anti log } T}{\text{anti log } C} \times 100$$

onde T corresponde a unidades infecciosas na cultura de células tratadas com os extratos e frações, e C, unidades infecciosas na cultura de células não tratadas (controle).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da atividade antiviral

Os extratos etanólico (EEPT), hexânico (EHPT), diclorometânico (EDPT), em acetato de etila (EAPT) e butanólico (EBPT) provenientes das inflorescências coletadas na região de Petrópolis foram testados *in vitro* para atividade contra o herpesvírus simples humano tipo 1 resistente ao Aciclovir (HSV-1-ACVr) e contra o herpesvírus simples humano tipo 2 resistente ao Aciclovir (HSV-2-ACVr) através da avaliação do índice de inibição viral (IIV) e da respectiva percentagem de inibição (PI).

Da mesma forma foi feita a avaliação com os extratos da planta proveniente da região de Santo Antônio de Pádua (de EEPD a FAPD), sendo que FAPD é a fração aquosa resultante da partição, não testada na amostra de Petrópolis.

Tabela 1. Citotoxicidade e atividade antiviral de inflorescências de *Musa acuminata* Colla, Musaceae.

	Citotoxicidade e atividade antiviral					
	CMNT ($\mu\text{g/mL}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	HSV-1-ACVr		HSV-2-ACVr	
			IIV	PI	IIV	PI
EEPT	100	> 200	0,88	86,8	0,38	58,3
EHPT	25	> 200	1	90	0,13	25,9
EDPT	25	> 200	0,63	76,5	0,23	41,1
EAPT	200	> 200	0,38	58,3	1,13	92,6
EBPT	200	> 200	0,88	86,8	0,88	86,8
EEPD	25	> 200	0,63	76,5	0	0
EHPD	50	> 200	0,88	86,8	0,32	52,1
EDPD	50	> 200	0,63	76,5	0,27	46,3
EAPD	100	> 200	1,03	90,6	0,63	76,5
EBPD	25	> 200	0,27	46,3	0,38	58,3
FAPD	50	> 200	0,38	58,3	0	0

Apesar de todos os extratos terem apresentado a CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das culturas de células) superior a 200 $\mu\text{g/mL}$, foram empregadas nas experiências as amostras em concentrações nas quais não foram observadas alterações na morfologia celular (CMNT).

As CMNT variaram de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Dos onze extratos avaliados, cinco foram capazes de inibir em mais de 80% a replicação da amostra do herpesvírus simples humano tipos 1 (HSV-1-ACVr). A amostra de herpesvírus simples humano tipo 2 (HSV-2-ACVr) foi inibida por dois extratos em concentrações não citotóxicas.

CONCLUSÃO

Os estudos com *M. acuminata* indicam grande potencial inibitório na replicação dos herpesvírus resistente ao Aciclovir. O extrato butanólico das inflorescências de *Musa acuminata*, coletadas em Petrópolis, foi o único extrato que apresentou inibição para as duas amostras testadas de vírus mostrando inibição superior a 80%, sem apresentar toxicidade para as células, na maior concentração empregada (200 $\mu\text{g/mL}$). Diante desses resultados, estudos posteriores serão realizados para determinar a(s) substância(s) bioativa(s) presente(s) nesses extratos e em qual(is) etapa(s) da síntese viral esses extratos atuam.

REFERÊNCIAS

- Bernardi WF, Rodrigues BI, Neto PC, Ando A, Neto AT, Ceravolo LC, Montes SMNM 2004. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas, Jaboticabal-SP. *Rev Bras Fruticul* 26: 503-506.
- Costa MAAM, Brito ARMS 1997. Effects of prolonged administration of *Musa paradisiaca* L. (banana), an antiulcerogenic substance, in rats. *Phytother Res* 11: 28-31.
- Ghosal S, Saini KS 1984. Sitoinosides I and II, two new antiulcerogenic sterylacetylglucosides from *Musa paradisiaca*. *J Chem Res-S* 4: 110.
- Hirai N, Ishida H, Koshimizu K 1994. A phenalenone-type phytoalexin from *Musa acuminata*. *Phytochemistry* 37: 383-385.
- Kamo T, Hirai N, Iwami K, Fujioka, D, Ohigashi H 2001. New phenylphenalenones from banana fruit. *Tetrahedron* 57: 7649-7656.
- Kanazawa K, Sakakibara H 2000. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *J Agric Food Chem* 48: 844-848.
- Lewis DA, Fields WN, Shaw GP 1999. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J Ethnopharmacol* 65: 283-288.
- Luque-Ortega JR, Martinez S, Saugar JM, Izquierdo LR, Abad T, Luis JG, Pinero J, Valladares B, Rivas L 2004. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: Antifungal phenylphenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Ch* 48: 1534-1540.
- Neyndorff HC, Bartel DL, Tufaro F, Levy JG 1990. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion* 30: 485-490.
- Nishimura T, Toki K, Fukuyasu H 1977. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 50: 39-46.
- Pascual-Villalobos MJ, Rodriguez B 2006. Constituents of *Musa balbisiana* seeds and their activity against *Cryptolestes pusillus*. *Biochem Syst Ecol* 35: 11-16.
- Quinines W, Escobar G, Echeverri F, Torres F, Rosero Y, Arango

- V, Cardona G, Gallego A 2000. Synthesis and antifungal activity of *Musa* phytoalexins and structural analogs. *Molecules* 5: 974-980.
- Reed LJ, Muench H 1938. A simple method of estimating fifty percents endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497.
- Rodriguez DJ, Chulia J, Simões CMO, Amoros M, Mariotte AM, Girre L 1990. Search for in vitro antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Med* 56: 59-62.
- Sharma KS, Porwal KM, Metha, BK 1989. *In vitro* antimicrobial activity of *Musa paradisiacal* root extracts, *Fitoterapia LX*: 157-158.
- Someya SI, Yoshiki Y, Okubo K 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). *Food Chem* 79: 351-354.
- Talero MMB de, Vejarano AX 1973. Esters with fungistatic activity present in the peel of ripe bananas (*Musa paradisiaca*). *Rev Colombiana Cien Quim-Farm* 2: 77-103.