

Atividade antifúngica de *Augusta longifolia* (Rubiaceae)

CHOZE, Rafael ¹; LIÃO, Luciano Morais²; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues³; SILVA, Rodrigo Alves da⁴

Universidade Federal de Goiás - Instituto de Química

Palavras-chave: *Augusta longifolia*, atividade antifúngica, *Rubiaceae*

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma em área do país, ocupando 23% do território nacional (dois milhões de km²), estando localizado basicamente no planalto central e sendo considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica (NETO; MORAIS, 1997). Ainda há carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. O desconhecimento de sua riqueza e possibilidades se agrava quando estima-se que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado (RATTER et al, 1997).

A família Rubiaceae apresenta um enorme potencial biológico destacando-se a atividade antibacteriana e antioxidante (AHMAD, 2005) e antifúngica (NINO, 2003), dentre outras. A família caracteriza-se principalmente pelo acúmulo de alcalóides, iridóides, flavonóides e cumarinas (SIMÕES, 2003).

O gênero *Augusta* compreende quatro espécies: *A. longifolia* (espécie endêmica do Brasil), *A. rivalis* (localizada na América Central), *A. vitiensis* (habitat nas ilhas Fiji) e *A. austro-caledonica* (localizada na Nova Caledonia). A espécie *Augusta longifolia* é representada por arbustos ou subarbustos, sendo que em ambos os biomas que ela ocorre (cerrado e floresta atlântica) são encontradas apenas entre rochas ao longo de riachos ou pequenos rios usualmente com correntezas fortes e sazonalmente variáveis ao nível de água (planta reófito) (DELPRETE, 1997). Há registros de um trabalho sobre a composição química da espécie *A. austro-caledonica*, relatando a caracterização de dois iridóides alcaloídicos (SAAD et al, 1988), não havendo descrição de atividade biológica da espécie.

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento acentuado de infecções fúngicas, principalmente de micoses oportunistas como a candidíase e a cryptococose em pacientes imunocomprometidos, tendo em vista a crescente resistência dos microorganismos patogênicos frente aos produtos sintéticos, justificando uma procura por possíveis compostos com características antifúngicas extraídos da vegetação nativa.

No presente trabalho foi descrita a atividade antifúngica da casca (extrato bruto, fração hexânica, acetato de etila, n-butanólica e suas subfrações) de *A. longifolia* sobre ATCCs de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *C. parapsilosis*. O fato desta espécie ser de estudo inérido e pertencente a uma família de grande potencial biológico (Rubiaceae), reforça a necessidade de estudos que visem avaliar seu possível potencial medicinal.

2. METODOLOGIA

2.1 - Coleta da Amostra

As folhas e a casca de *A. longifolia* foram coletadas em áreas de cerrado existente na reserva Serra Dourada e identificadas pelo Prof. Dr. Piero G. Delprete especialista da família Rubiaceae. Uma exsicata foi depositada no Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFG.

2.2 - Obtenção e tratamento preliminar dos extratos brutos

As folhas (900 g) e a casca (1,5 kg) após secas e moídas foram submetidas, separadamente, a extração exaustiva, por percolação a temperatura ambiente com etanol (3 x 500 mL). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e forneceram 9,5 g e 17,5 g de extrato bruto respectivamente. Parte do extrato bruto da casca (17 g) foi submetida a uma partição líquido-líquido obtendo-se três frações; hexânica, acetato de etila e n-butanólica.

2.3 - Microorganismos

O ensaio da atividade antifúngica foi realizado utilizando-se o método da diluição em ágar, sendo-o realizado no Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP/UFG), em colaboração com a equipe da Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário, frente uma cepa padrão de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. albicans* (ATCC 18804) e seis cepas padrões de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045, 56990, 24066, 48184, 32269 e 28958). Os microorganismos foram cultivados em ágar Sabouraud e deixados por 24h a temperatura ambiente para seu crescimento.

2.4 - Teste de suscetibilidade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através da técnica de diluição em ágar (ALVES; CURY, 1992), adaptada. Ao extrato bruto das folhas e da casca foi realizado um screening, tendo a casca um resultado mais expressivo frente aos microorganismos, direcionando o trabalho para o estudo da casca do material vegetal. Além do extrato bruto, a fração hexânica, acetato de etila e n-butanólica juntamente com suas partições realizadas em sílica silanizada (H₂O, H₂O/MeOH 1:1 e MeOH) foram solubilizadas em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), fazendo diluições seriadas ao dobro em caldo RPMI -1640 previamente ajustado em pH 7 através da adição de MOPS. Posteriormente 2 mL destas soluções foram distribuídos em placas de Petri estéreis juntamente com 18 mL de ágar RPMI a 45°C e imediatamente homogeneizados, obtendo uma concentração que variasse de 31,25µg/mL a 1000µg/mL. Três microlitros da suspensão das células preparadas em solução salina 0,85%, homogeneizadas e ajustadas com espectrofotômetro em comprimento de onda de 530nm, de forma a obter 10⁶ células/mL foram semeados com o auxílio de uma micropipetadora sobre o ágar em pontos equidistantes nas placas de Petri, contendo ágar RPMI nas diferentes concentrações dos extratos. A concentração inibitória mínima (CIM) obtida após incubação a 37°C por 48 horas foi definida como a menor concentração da amostra teste capaz de inibir completamente o crescimento visível do fungo. Os ensaios

foram feitos em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da suscetibilidade *in vitro* mostrou que o extrato bruto da casca inibiu o crescimento de 100% das ATCC de *Cryptococcus neoformans* em concentração menor ou igual a 500 µg/mL. Os resultados mostraram ainda que as ATCC de *Candida* mantiveram-se resistentes frente ao extrato bruto e frações (nas concentrações estudadas), apresentando valores de CIM > 1000 µg/mL. A fração acetato de etila apresentou valores de CIM variando de 125 a 250 µg/mL nas ATCC de *C. neoformans* enquanto que a ação antifúngica da fração hexânica e n-butanólica apresentaram valores de CIM variando de 500 a 1000 µg/mL e 250 a 1000 µg/mL, respectivamente sobre as cepas padrões de *C. neoformans*. Os resultados de CIM do extrato bruto e suas subfrações estão apresentados na Tabela 1. A fração n-butanólica, através de sua partição com sílica silanizada, forneceu três subfrações, sendo estas testadas sobre as ATCCs de *Cryptococcus* (Tabela 2).

Tabela 1. Perfil de suscetibilidade *in vitro* de ATCC de *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* frente às frações hexânica, acetato de etila e n-butanólica da casca de *A.longifolia*.

Microrganismos	Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)			
	Extrato bruto	Fração hexânica	Fração acetato de etila	Fração n-butanólica
32045 [♦]	250	1000	125	250
56990 [♦]	500	1000	250	1000
24066 [♦]	500	500	250	1000
48184 [♦]	500	500	250	1000
32269 [♦]	250	500	125	250
28958 [♦]	250	1000	250	1000
22019 [#]	>1000	>1000	>1000	>1000
18804 ^º	>1000	>1000	>1000	>1000

♦ ATCCs de *Cryptococcus neoformans*

ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*)

º ATCC 18804 (*Candida albicans*)

Tabela 2. Atividade antifúngica das subfrações da fração n-butanólica sobre as ATCC de *C. neoformans*.

Microrganismos	Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)		
	Subfração NBA ¹	Subfração NBB ²	Subfração NBC ³
32045	1000	250	500
56990	>1000	1000	>1000
24066	>1000	1000	1000
48184	>1000	1000	>1000
32269	>1000	250	1000
28958	>1000	>1000	1000

¹ Subfração obtida do fracionamento da subfração n-butanólica tendo como eluente H₂O

² Subfração obtida do fracionamento da subfração n-butanólica tendo como eluente H₂O/MeOH 1:1

³ Subfração obtida do fracionamento da subfração n-butanólica tendo como eluente MeOH

Os resultados mostraram que *A. longifolia* apresenta um certo potencial antifúngico sobre as ATCC de *C. neoformans*, principalmente em relação à fração acetato de etila na qual os microrganismos foram mais suscetíveis. Das ATCC estudadas verificou-se que as ATCC 32045 e ATCC 32269 de *Cryptococcus neoformans* apresentaram maior vulnerabilidade frente a esta fração.

A resposta biológica da fração hexânica foi bastante inferior tendo como parâmetro as outras frações, tendo como melhores resultados a inibição de três ATCC de *C. neoformans* em uma CIM de 500 mg/mL. Os resultados mostraram que a ação fungitóxica da fração n-butanólica se concentrou na sua subfração NBB, apresentando uma CIM variando de 250 a 1000 mg/mL.

4. CONCLUSÃO

A grande incidência de infecções aumenta a importância da procura e descoberta de compostos terapêuticos alternativos. A atividade fungitóxica de *A. longifolia*, principalmente referente à fração acetato de etila foi bastante relevante. A análise dos constituintes químicos do material vegetal (os espectros de Ressonância Magnética Nuclear estão sendo feitos na UFSCar), seguido de novos ensaios em nível de compostos isolados mostrarão quais compostos são responsáveis por tal atividade nas frações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.; ALI, A.M., USRAF, D.A., ISMAIL, N.H., SAARI, K., LAJIS, N.H. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis species*. *Life Sciences*, v.76, p. 1953-1964, apr. 2005.

ALVES, S.H.; CURY, A.E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* v.34, p. 251-254, apr. 1992.

DELPRETE, P.G. Revision and typification of Brazilian *Augusta* (RUBIACEAE,

RONDELETIEAE), with ecological observations on the riverine vegetation of the cerrado and Atlantic forests. *Brittonia*, v.49, n.4, p. 487-497, dec. 1997.

NETO, G.G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta bot. bras*, v.17, n. 4, p. 561-584, mai. 2003.

NINO, J.; ESPINAL, C.M.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Antimycotic activity of 20 plants from Colombian flora. *Pharmaceutical Biology*, v.41, n. 7, p. 491-496, oct. 2003.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity *Annals of Botan*, v. 80, p. 223-230, 1997.

SAAD, H.E.A.; ANTON, R.; QUIRION, J.C.; CHAUVÈRE, G.; PUSSET, J. New-Caledonian plants. 116.(1) LINDENIALINE AND LINDENIAMINE, two new iridoids from *Lindenia austro-caledonica* Brongn. *Tetrahedron letters*, v.29, n.6, p. 615-618, 1988.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed rev, p-819-846, 2003.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/Capes

¹ Bolsista de pós-graduação (Capes). Instituto de Química - Laboratório Produtos Naturais, rafael@hotmail.com

² Orientador/Instituto de Química/UFG, luciano@quimica.ufg.br

³ Professora colaboradora na realização do ensaio antifúngico/ IPTSP/UFG, rosario@iptsp.ufg.br

⁴ Colaborador na realização do ensaio antifúngico/ Instituto de Química/UFG, rodrigo@quimica.ufg.br