

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE MICROBIANA DA *Ixora warmingii* (RUBIACEAE)

SILVA, Rodrigo Alvesⁱ; **CHOZE**, Rafaelⁱⁱ; **LIÃO**, Luciano Moraisⁱⁱⁱ; **DELPRETE**, Piero^{iv}; **Silva**, Maria do Rosário Rodrigues^v

Palavras-chave: *Rubiaceae*, *Ixora*, Bioautografia, microorganismos.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como Phytomedicine, Phytochemical Analysis, Natural Product Letter, etc. (Yunes, 1998). Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (Braz-Filho, 1994).

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento acentuado de infecções fúngicas, as quais contribuem para uma elevada taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (CANTON 2001). A criptococose causada por *Cryptococcus neoformans* é considerada micose oportunista, freqüentemente diagnosticada produzindo lesões principalmente no sistema nervoso central em pacientes com AIDS (GUMBO 2001).

O tratamento da meningite criptocócica na fase aguda para pacientes imunocomprometidos bem como para imunocompetentes é feito normalmente utilizando-se anfotericina B ou anfotericina B associada a 5-fluorocitosina. Para pacientes infectados pelo HIV utiliza-se inicialmente anfotericina B com ou sem 5-fluorocitosina seguido por uma terapia de manutenção com fluconazol. Os efeitos colaterais verificados com estes antifúngicos fazem com que se busque alternativas ao tratamento desta micose (KULBERG 1997). Compostos com características antifúngica extraídos da vegetação nativa, que são encontrados em abundância no território brasileiro, poderiam constituir uma alternativa terapêutica (ALVES et al 1992)

A família Rubiaceae engloba cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies, classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) e 44 tribos, essencialmente tropicais (DELPRETE 2003). Segundo Mabberley (1997), ela ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, perdendo apenas para as Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae.

Diversos gêneros são endêmicos da região neotropical, que apresenta cerca de 4.555 espécies. Para o Brasil são estimados cerca de 96 gêneros (DELPRETE *et al.* 2003)

Ixora é um gênero pantropical com aproximadamente 350 espécies sendo que 45 são neotropicais. São espécies típicas do Cerrado, sendo encontradas preferencialmente no Cerrado *stricto sensu*, mas também ocorrem em florestas com clima quente e úmido, como a Floresta Amazônica. Os representantes do gênero *Ixora* são árvores de médio e pequeno porte, e arbustos. Este gênero pertence à subfamília Ixoroideae, tribo ixoreae. (DELPRETE 2003)

A espécie *Ixora warmingii* não apresenta registro de trabalhos sobre sua composição química nem ensaios preliminares, objetivando a detecção de substâncias com atividade antifúngica ou antibiótica.

Esse trabalho tem como objetivo o estudo fitoquímico de folhas e cascas da *I. warmingii*, identificação e elucidação estrutural dos metabólitos isolados e estudo de bioatividade frente à bactérias e fungos patogênicos, usando Bioautografia e realização de experimentos de CIM. (Concentração Inibitória Mínima).

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas e o casca da *I. warmingii*, foram coletados em áreas de Cerrado mato-grossense situado no Campus Samambaia da Universidade Federal de Goiás UFG, município de Goiânia, em novembro de 2005. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Piero Delprete (ICB/UFG). A exsicata está depositada no Herbário do ICB/UFG

2.2 Obtenção e tratamento preliminar dos extratos brutos

O material botânico coletado foi seco em estufa com ventilação forçada a 40°C. Após seco, o material vegetal foi pulverizado obtendo-se casca(1000g) e folha (890g). A casca e as folhas foram pulverizados e extraídos de maneira exaustiva à temperatura ambiente (em repouso) com etanol, mantendo-se o contato com o solvente durante três dias, repetindo-se o procedimento por quatro vezes. O extrato etanólico da casca foi submetido à partição líquido-líquido, utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade. Obteve as seguintes massas nos respectivos extratos: hexano (210 mg), clorofórmio (1,2 g), acetato de etila (960 mg) e n-butanólico (6g). O extrato n-BuOH foi posteriormente submetido a coluna de fase reversa com sílica silanizada, usando como sistema de eluição H₂O H₂O/MeOH(1:1) e MeOH.

2.3 Avaliação da atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos e das subfrações, foram usadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC); foram utilizadas as seguintes ATCCs: 56990, 56990B, 24066, 48184, 32296B e 28958 para *Cryptococcus neoformans*; 22019 para *Candida tropicalis* e 18804 para *Candida albicans*. Os microorganismos foram crescidos em meio de cultura agar sabouraud por 48h a 30°C

2.4 Teste de susceptibilidade antifúngica

A atividade antifúngica foi realizada segundo a técnica de diluição em ágar, proposta por (Alves & Cury 1992), modificada. O extrato bruto etanólico das cascas e sua fração: hexânica, cloformica, acetato de etila, n-butanólica e as subfrações do extrato n-BuOH (MeOH), (MeOH/H₂O(1:1)) e aquoso foram solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), diluídos ao dobro em caldo RPMI 1640 e, posteriormente distribuídos em placas de Petri contendo 20mL de ágar RPMI de maneira que se obtivesse uma concentração que variasse de 1.000µg/mL a 31,25µg/mL. Três microlitros da suspensão das células preparadas em solução fisiológica estéril, 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 1 – Atividade Antifúngica dos Extratos da *I. warmingii*

ATCC	Concentração Inibitória Mínima – CIM – (µg/mL)						
	A	B	C	D	E	F	G
56990B	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
56990	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
24066	250	62,5	250	250	>1000	250	250
48184	500	62,5	>1000	1000	>1000	1000	1000
22019	1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000
18804	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
32269B	125	125	62,5	125	500	62,5	62,5
28958	>100	500	62,5	125	1000	125	125

A = Extrato Bruto, B = Extrato Hexânico, C = Extrato Acetato de Etila, D = Extrato n-Butanólico, E = Subfração n-butanólica aquosa, F = Subfração n-butanólica (H₂O/MeOH(1:1)) e G = Subfração n-butanólica (MeOH)

O extrato bruto etanólico das cascas de *I. warmingii* não mostrou atividade antifúngica satisfatória sobre *Candida* que foram inibidos em uma concentração igual a 1.000µg/mL, porem *Cryptococcus neuformans* podemos observar uma inibição satisfatória com CIM de 500, 250 e 125µg/mL para diferentes ATCC. De acordo com a tabela1, podemos observar que a atividade fungicida tanto para *Candida albicans* quanto para *Candida tropicalis* foi muito baixa, sendo a maior CIM de 500 µg/mL para *Candida tropicalis* A análise de suscetibilidade *in vitro* com relação às variedade de *Cryptococcus* apresentou-se maior sensibilidade aos extratos hexanico e o acetato de etila de *I. warmingii*.

4. CONCLUSÕES

A grande incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumenta a importância da procura e descoberta de compostos terapêuticos alternativos. A atividade antifúngica de *I. warmingii* para *Cryptococcus* *neufomans* observada neste trabalho, pode abrir perspectivas no sentido de desenvolver um fitoterápico eficaz e de baixo custo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES SH, Cury AE. **Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 34:251-254, 1992.

ALVES TMA et al, **Biological screening of Brazilian medicinal plants.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95:367-373, 2000.

BRAZ-FILHO, R.; **Avaliação biológica em produtos naturais.** *Quím. Nova*, 398-405. 1994

CANTON E, VIUDES A, PEMÁN. J. **Infeción sistémica nosocomial por levaduras.** Revista Iberoamericana de Micología 18:51-55, 2001.

CARRILLO-MUÑOZ AJ, BRIÓ S, QUINDÓS G. **Una nueva generación de fármacos antifúngicos.** Revista Iberoamericana de Micología 18:2-5, 2001.

COSTA TR, et al. **Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil.** Journal of Ethnopharmacology 72:111-117,2000.

DELPRETE PG; **Revision and typification of some species of ixora (rubiaceae) from central and southern Brazil.** The new York Botanical Garden, 2003

GUMBO T, et al; ***Cryptococcus myelitis*: atypical presentation of a common infection.** *Clinical Infectious Diseases* 32:1235-1236, 2001.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry.** 3.ed. London: Academic, 1988.

KULBERG BJ. **Trends in immunotherapy of fungal infections.** European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases 16:51-55, 1997.

NEGRONI R, Arechavala et al; **Revisión clínica y evolución terapéutica de pacientes con criptococosis asociada al sida.** Revista Iberoamericana de Micología 12:12-15, 1995.

Paracoccidioides brasiliensis and *Histoplasma capsulatum*. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia 60:71, 2001.

ROZENBAUM R, GONÇALVES AJR, WANKE B, ***Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a brasilian AIDS patient.** Mycopathologia 112:33-34, 1990.

SHAHEEN, F. et al. **Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities,** Phytochemistry 66, 935-940, 2005.

YUNES R. A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais.** *Quim. Nova*, Vol. 21, Supl. 1, 99-105, 1998.

ZHU, W.M. et al. **Components of stem barks of *Winchia calophylla* A. DC. and their bronchodilatador activities.** Journal of integrative plant biology 47 (7): 892-896 Jul, 2005.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CAPES/FUNAPE

ⁱBolsista de mestrado. Instituto de Química – IQ-UFG - Laboratório de Produtos Naturais, rodrigo@posgrad.ufg.br

ⁱⁱBolsista de mestrado. Instituto de Química – IQ-UFG - Laboratório de Produtos Naturais, rafael@posgrad.ufg.br

ⁱⁱⁱOrientador- Instituto de Química – IQ-UFG, luciano@quimica.ufg.br

^{iv}Co-orientador- Instituto de ciências biológicas – ICB-UFG delprete@hotmail.com

^v Professor/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP/UFG, rosario@iptsp.ufg.br