

Abordagem Antimicrobiana de Extrato, Frações e Substâncias Obtidas de *Ixora Brevifolia Benth* (Rubiaceae)

Antimicrobial approach of Extract, Fractions, and Substances from *Ixora Brevifolia Benth* (Rubiaceae)

Joel Rocha da Silva^{a*}

^aFaculdade Anhanguera de Anápolis, GO, Brasil

*E-mail: professorjoelrocha@hotmail.com

Resumo

O presente trabalho investiga a atividade antibacteriana e antifúngica de extrato etanólico, frações e substâncias isoladas das folhas de *Ixora brevifolia* Benth, através do método de difusão em gel e ágar, respectivamente. O extrato e suas frações foram testados frente às cepas padrões dos microorganismos *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. Os resultados preliminares são promissores para um possível uso de *I. brevifolia* como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Rubiaceae. *Ixora*. *Ixora brevifolia*. Atividade Antimicrobiana.

Abstract

The present study investigated the antibacterial and antifungal activity from ethanolic extract, fractions, and isolated compounds from *Ixora brevifolia* Benth leaves by gel and agar diffusion method, respectively. The extract and its fractions were tested for standard microorganisms *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. The preliminary results are promising for possible use of *I. brevifolia* as antimicrobial agent.

Keywords: Rubiaceae. *Ixora*. *Ixora brevifolia*. Antimicrobial Activity.

1 Introdução

O Bioma Cerrado possui uma das maiores floras vegetais do mundo, estimada em aproximadamente sete mil espécies (MENDONÇA *et al.*, 1998). Apesar de ser um bioma pouco estudado, sabe-se que o cerrado é rico em espécies utilizadas na medicina popular e possui cerca de 270 espécies catalogadas, representadas principalmente pelas famílias Leguminosae, Rubiaceae e Euphorbiaceae (VIEIRA; MARCUS, 2000). Os autores ainda relatam que grande parte das espécies da flora do cerrado poderia conter uma ou mais substâncias biologicamente ativas, mesmo estas não sendo utilizadas na medicina popular. Portanto, a investigação de espécies presentes neste bioma torna-se importante para a descoberta de novas espécies com propriedades farmacológicas.

Amplamente presente no Cerrado brasileiro, a família Rubiaceae é composta por aproximadamente 650 gêneros, 13.000 espécies e três subfamílias (Ixoroideae, Rubioideae e Cinchonoideae), sendo representada por ervas, arbustos, árvores e lianas, de distribuição tropical e neotropical (DELPRETE, 2004). Rubiaceae possui espécies de grande importância econômica, que são exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Mussaenda* spp., *Gardenia* spp., etc.), e também na indústria farmacêutica, como por exemplo *Cinchona pubescens* Vahl, produtora de quinina, empregada no tratamento da malária (COELHO *et al.*, 2006). Fitoquimicamente, estudos recentes

de Delprete *et al.*, 2006 mostram que esta família é conhecida por metabolizar principalmente flavonóides, cumarinas, iridóides, triterpenos e alcalóides indólicos e sesquiterpênicos (NASCIMENTO *et al.*, 2006). O estudo fitoquímico da espécie *Peritassa campestris*, realizado por Lião *et al.* 2001, ressalta a presença destes alcalóides. Neste contexto, destaca-se a subfamília Ixoroideae, a qual pertence o gênero *Ixora*, pela alta presença destes metabólitos.

Ixora é um gênero pantropical com aproximadamente 350 espécies, das quais 45 são neotropicais. No Brasil, espécies de *Ixora* podem ser encontradas no bioma cerrado, na mata atlântica e na bacia amazônica, como arbustos e árvores de médio e pequeno porte (DELPRETE, 2003). Na literatura existem apenas dois relatos de ensaios biológicos envolvendo espécies desse gênero. Annapurna *et al.* (2003) comprovaram a atividade antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *I. coccinea* frente a bactérias patogênicas, porém quando testado em fungos o resultado não foi satisfatório. As folhas de *I. coccinea* é amplamente utilizada na medicina popular contra bronquite, disenteria, doenças de pele, além de possuir propriedades antitumorais e ação anti-inflamatória (LATHA, 1988; DHAVAN *et al.*, 1977; SIVARAJAN *et al.*, 1941). O outro relato de bioatividade descreve a propriedade antigastagênica de *I. finlaysoniana* (SINGH *et al.*, 1993). Assim, estudos que visem explorar o potencial biológico do gênero *Ixora* representam uma excelente estratégia na prospecção de novas substâncias bioativas.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

As folhas de *Ixora brevifolia* foram coletadas no município de Goiânia, no Bosque Saint-Hilaire, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia (16°36'11"S, 49°15'37"W, 780 m de altitude), em outubro de 2010. O material foi identificado por Piero Delprete, sendo a exsiccata depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil, sob número 9278-A.

2.2 Extratos da planta

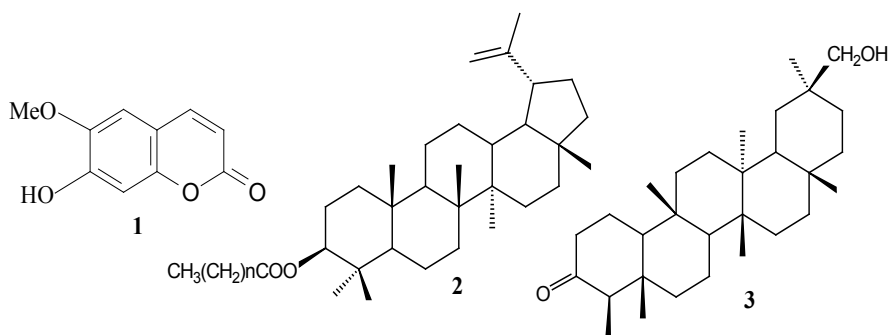
As folhas de *I. brevifolia* (1200g) foram secas em estufa com ventilação forçada (40 °C), moídas em moinho de facas

e em seguida percoladas a frio com etanol 96% (4 x 500mL), sob agitação durante 24 horas. A filtração do sobrenadante e a evaporação do solvente à pressão reduzida conduziram ao extrato bruto etanólico (85g). Parte do extrato (50g) foi fracionada com hexano, clorofórmio e metanol, seguido de evaporação do solvente orgânico.

2.3 Separação dos compostos

A fração clorofórmio foi submetida à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel, utilizando-se como eluentes a mistura dos solventes hexano/clorofórmio de forma gradiente, com taxa de 5%, levando ao isolamento dos compostos 1 a 3. As estruturas destes compostos estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Compostos testados frente aos microorganismos. 1- Escopoletina; 2- acil-lupeol; 3- 30-hidroxifriedelan-3-ona



Fonte: Dados da pesquisa.

2.4 Microorganismos utilizados

O extrato bruto, frações e compostos isolados foram testados frente a seis cepas padrões de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045, ATCC 56990, ATCC 24066, ATCC 48184, ATCC 32269 e ATCC 28958) e uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804). Os microorganismos foram cultivados em ágar Sabouraud por 24h à temperatura ambiente para seu crescimento.

O ensaio da atividade antibacteriana foi realizado frente a três cepas padrões *Staphylococcus aureus* – ATCC 29737, *Escherichia coli* – ATCC 25923, *Bacillus cereus* – ATCC 14579. Para o crescimento e manutenção das culturas bacterianas empregou-se o ágar Mueller-Hinton (Merck).

2.5 Teste de suscetibilidade antifúngica

A atividade antifúngica foi realizada segundo a técnica de diluição em ágar, proposta por (ALVES *et al.*, 2000), modificada. O extrato bruto, frações e compostos de *I. brevifolia* (100mg) foram solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido - DMSO, diluídos ao dobro em caldo *Yeast Nitrogen Base* - YNB DIFCO e posteriormente distribuídos em placas de Petri contendo 20mL de ágar YNB, de maneira a se obter uma concentração de 1.000 µg.mL⁻¹ a 15,6 µg.mL⁻¹. 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 micropipeta sobre o ágar em pontos equidistantes nas placas de Petri, contendo ágar YNB nas diferentes concentrações dos extratos. A concentração inibitória mínima - CIM obtida após incubação a 37 °C por 72 horas foi definida como a menor concentração da amostra teste capaz de inibir completamente o crescimento visível do fungo. Paralelamente, utilizando-se a mesma técnica, efetuou-se o teste de suscetibilidade das cepas padrões de *C. neoformans*, frente ao fluconazol. O fluconazol foi dissolvido em 1 mL de água destilada, diluído ao dobro em caldo YNB e distribuído em 20 mL de Agar YNB, de tal modo que as concentrações variaram de 15,6 µg.mL⁻¹ a 0,03 µg.mL⁻¹.

Os resultados dos ensaios antifúngicos e antibacterianos foram realizados em triplicata e expressos pelos valores medianos de crescimento.

2.6 Teste de difusão em gel

Para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico e das frações obtidas das folhas de *I. brevifolia*, foi utilizado o método da difusão em gel (SMÂNIA *et al.*, 1995; ULUBELEN *et al.*, 2000). Os materiais-teste foram incorporados em discos de papel (diâmetro de 6 mm), e

a atividade inibitória sobre as cepas padrões bacterianos foi verificada através da formação de halos de inibição do crescimento ao redor dos discos. O extrato bruto etanólico foi testado em cinco concentrações (62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/disco). Discos impregnados com os solventes foram utilizados como controle de inibição dos solventes e com cloranfenicol (30 µg/disco), como controle positivo de inibição.

3 Resultados e Discussão

Foram realizados todos os espectros das moléculas da Figura 1, que apresentaram absorções características de deformações axiais OH em aproximadamente 3375 cm⁻¹. Pelo fato desta região espectral apresentar estiramento OH, típico de moléculas de água, proveniente do próprio feijão ou pela alta tendência higroscópica do KBr, esta região foi retirada nas análises. O espectro indicou a presença de absorções características de deformações axiais C-H em 2945 cm⁻¹, C=O de carbonila em 1640 cm⁻¹, deformações axiais C-N de amins em 1220 cm⁻¹, além de outras absorções. Vale destacar que as análises de IV foram realizadas com o material embrionário moído, desprezando processos de isolamento; deste modo preservando os constituintes químicos da amostra.

3.1 Atividade antifúngica

De acordo com os ensaios realizados, a maioria das cepas

padrões foi sensível ao extrato bruto e frações das folhas de *I. brevifolia*. Os resultados, expressos em termos da concentração inibitória mínima, estão descritos no Quadro 1. A análise desse quadro mostra que o extrato bruto inibiu o crescimento de 100% das cepas em concentrações iguais ou inferiores a 250 µg.mL⁻¹. A fração clorofórmio apresentou valores de CIM de 15,6 e 1000 µg.mL⁻¹, enquanto as frações hexano e metanol apresentaram valores de CIM entre 31,2 e 1000 µg.mL⁻¹ e 250 e 1000 µg.mL⁻¹, respectivamente. *Candida albicans* foi a que apresentou o maior perfil de resistência ao extrato bruto e frações. Dentre as frações e substâncias estudadas, destacam-se a fração clorofórmio e a escopoletina (6-metoxi-7-hidroxi-cumarina - 1), isolada dessa fração, que inibiram o desenvolvimento desse fungo a uma CIM de 125 e 250 µg.mL⁻¹, respectivamente. Considerando as cepas padrões de *C. neoformans*, a fração clorofórmio inibiu completamente o crescimento de 66,6% dos microorganismos na concentração de 15,6 µg.mL⁻¹ e o fracionamento cromatográfico dessa fração resultou no isolamento da cumarina escopoletina (1) e dos triterpenos acil-lupeol (2) e 30-hidroxifriedelan-3-ona (3). Essas mesmas cepas foram inibidas pelas frações hexano e metanol nas CIM de 31,2 e 250 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os resultados da atividade antifúngica dos compostos isolados e frações são descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Perfil de suscetibilidade *in vitro* de cepas padrões de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Candida albicans* frente ao extrato bruto etanólico, frações e compostos isolados das folhas de *I. brevifolia* Benth., comparadas ao fluconazol (controle positivo).

CIM (µg.mL ⁻¹)	Microrganismos (ATCC)						
	32045♦	56990♦	24066♦	48184♦	32269♦	28958♦	18804*
Extratos	125	125	125	62,5	125	250	250
Extrato etanólico	31,2	31,2	31,2	31,2	125	125	-
Fração hexano	15,6	15,6	15,6	15,6	125	250	125
Fração clorofórmio	250	250	250	250	500	500	-
Fração metanol	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	7,8	15,6
Fluconazol (controle)	15,6	15,6	15,6	15,6	500	500	500
Escopoletina	500	500	500	500	-	-	-
acil-lupeol	500	500	500	1000	500	-	-
F							

♦ *Cryptococcus neoformans*; **Candida albicans*; (-) CIM (µg.mL⁻¹) > 1000; F: 30-hidroxifriedelan-3-ona.

Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 Atividade antibacteriana

A inibição do crescimento de *S. aureus* pelo extrato bruto etanólico foi avaliada através da técnica de difusão em gel, onde foram observados halos de inibição do crescimento medindo 11,0, 12,8 e 13,7mm, respectivamente, para as concentrações de 250, 500 e 1000 µg/disco desse extrato. Frente ao *B. cereus*, o halo de inibição de crescimento observado foi de 7,7 mm, na concentração de 1000 µg/disco. Dentre as frações avaliadas, a fração clorofórmio destacou-se como a mais ativa, formando um halo de inibição do crescimento de 9,1 mm, na concentração de 62,5

µg/disco, frente a *S. aureus* e 11,5 mm, na concentração de 250 µg/disco, sobre *B. cereus*. A fração metanol não conseguiu inibir o crescimento de nenhuma das bactérias estudadas. Dentre os compostos isolados, apenas o triterpeno 30-hidroxifriedelan-3-ona (3) apresentou uma moderada atividade, com inibição de 10,8 e 12,7 mm na concentração de 500 e 1000 µg/disco para *S. aureus*. Vale ressaltar que não houve inibição do crescimento *E. coli*, nas concentrações testadas, por parte do extrato bruto e suas frações. Os resultados dos ensaios antibacterianos estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Atividade antibacteriana do extrato bruto etanólico e frações das folhas de *I. brevifolia* Benth frente as cepas padrões de bactérias

Concentração (µg/disco)	Microrganismos					
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus cereus</i>		
	Extrato Etanólico	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Extrato Etanólico	Fração Hexano	Fração Clorofórmio
	Halo de Inibição (mm)					
62,5	-	-	9,1	-	-	-
125	-	-	9,7	-	-	-
250	11,0	8,2	10,1	-	9,4	11,5
500	12,8	11,1	13,9	-	12,1	12,1
1000	13,7	16,0	18,2	7,7	14,7	13,2
Cloranfenicol ^a		25,2			24,1	

(-) ausência de inibição. ^acloranfenicol 30 (controle positivo de inibição).

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados revelaram que *I. brevifolia* apresenta potencial antifúngico sobre as cepas padrões de *C. neoformans*. Em relação ao extrato bruto etanólico e frações estudadas, a maior atividade fungicida pertenceu à fração clorofórmio. O estudo fitoquímico mostrou que esta fração é rica em triterpenos e cumarinas, ressaltando que alguns esqueletos cumarínicos possuem elevadas atividades antifúngicas contra *C. neoformans* (STEIN *et al.*, 2006), em especial a escopoletina pelos relatos de propriedades antifúngicas contra outros microrganismos (VALLE, 1997). Estudos de Mutai *et al.*, 2009 comprovaram a atividade antimicrobiana de triterpenos da série dos lupanos; já os derivados do triterpeno friedelano destacam-se pela eficiência no tratamento de úlceras e gastrites estomacais (CORDEIRO *et al.*, 1999) e propriedades citotóxicas (BUFFA FILHO *et al.*, 2002). Dentre os compostos isolados de *I. brevifolia*, a escopoletina (1) foi a que mostrou maior CIM, inibindo o crescimento de quatro cepas de *C. neoformans* na concentração de 15,6 µg.mL⁻¹. As cepas 32269 e 28958 foram mais resistentes ao extrato, frações e aos compostos isolados.

A análise comparativa entre o fluconazol, utilizado como controle, e a fração clorofórmio, a mais ativa, evidenciou o potencial dessa fração que inibiu quatro cepas padrões de *C. neoformans* (66,6 %) na CIM de 15,6 µg.mL⁻¹, contra 3,9 µg.mL⁻¹ do fluconazol.

A fração hexano apresentou CIM de 31,2 µg.mL⁻¹ para as mesmas quatro cepas de *C. neoformans*. Frações compostas por hidrocarbonetos e ésteres de cadeia longa podem ser responsáveis pela resistência da planta a ataques de microrganismos (SCHOONHOVEN, 1998).

Já a atividade antifúngica da fração metanol pode ser devida à presença de substâncias fenólicas, visto que a triagem fitoquímica indicou a presença de flavonóides na fração e a literatura indica o uso de flavonóides biologicamente ativos no combate aos fungos (CÉSPEDES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 1999). A suscetibilidade de *C. albicans* foi mais discreta, onde seu crescimento foi inibido, principalmente pela fração clorofórmio e pela substância escopoletina (1).

Em relação à atividade antibacteriana, o estudo do extrato bruto etanólico das folhas de *I. brevifolia* e de suas frações apresentou inibição ao crescimento de *S. aureus* e *B. cereus*, especialmente a fração clorofórmio. Esta fração apresentou halos de inibição em baixas concentrações para *S. aureus* (CIM de 62,5 µg/disco), quando comparado com o cloranfenicol. Por outro lado, *B. cereus* se mostrou mais resistente ao extrato etanólico e suas frações, sendo a fração clorofórmio ainda a mais ativa. O ensaio antibacteriano com os compostos isolados desta fração (1-3) apontou para a 30-hidroxifriedelano-3-ona como o mais ativo, sendo específico para *S. aureus*.

4 Conclusão

Os resultados da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato e frações são promissores, apontando para um possível uso de *I. brevifolia* Benth como agente antimicrobiano, sendo que o estudo mostrou que a 30-hidroxifriedelano-3-ona foi a substância mais ativa para *S. aureus*.

Destaca-se que, embora alguns fármacos sejam resultado de descobertas fortuitas, a maior parte deles advém de programas de triagem de pesquisas minuciosamente elaboradas, de modificação molecular. A partir do isolamento e identificação estrutural dos princípios vegetais ativos, estas moléculas podem ser recriadas por síntese total no laboratório ou, mais importante, utilizando a substância de partida para a criação de estruturas químicas ligeiramente diferentes. As novas estruturas podem ter atividade farmacológica pouco ou muito diferente da substância de origem, dependendo da natureza e da extensão da alteração química.

Referências

- ALVES, T.M.A. *et al.* Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, p.367-373, 2000.
- ANNAPURNA, P.V.S. *et al.* Antimicrobial activity of *Ixora coccinea* leaves. *Fitoterapia*, v.74, p.291-293, 2003.
- BUFFA FILHO, W.J. *et al.* Quantitative determination of cytotoxic-Friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (celastraceae) by reverse-phase high-

- performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, v.13, p.75-78, 2002.
- CÉSPEDES, C.L. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *J. Agr. Food Chem.*, v.54, p.3521-3527, 2006.
- COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.16, p.170-177, 2006.
- CORDEIRO, P.J.M.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. HPGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira-santa"). *J. Braz. Chem. Soc.*, v.10, p.523-526, 1999.
- DELPRETE, P.G. *Revision and typification of some species of Ixora (rubiaceae) from central and southern Brazil*. New York: The new York Botanical Garden, 2003.
- DELPRETE, P.G. Rubiaceae. In: SMITH, N.P. *et al.* Flowering plant families of the american tropics. New York: Princeton University Press, 2004.
- DELPRETE, P.G. *et al.* Abstracts of the 3rd International Rubiaceae Conference, K.U. Leuven, Belgium, 2006.
- DHAWAN, B.N. *et al.* Screening of indian plants for biological activity. *Indian. J. Exp. Biol.*, v.15, p.208-219, 1977.
- LATHA, P.G.; PANIKKAR, K.R. Cytotoxic and antitumor principles from *Ixora coccinea* flowers. *Cancer Lett.*, v.130, p.197-202, 1998.
- LIÃO, L.M., *et al.* Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Peritassa campestris*. *Phytochemistry*, v.58, p.1205-1207, 2001.
- MENDONÇA, R.C.; FELFINI, J.M.; WALTER, B.M.T. Flora vascular do cerrado. In: Sano, S.M, Almeida, SP. Cerrado, ambiente e flora. Planaltina: Embrapa/CAPC, 1998, p.289-556.
- NASCIMENTO, C.A. *et al.* Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Z. Naturforsch B.*, v.61, p.1443-1446, 2006.
- MUTAI, C. *et al.* Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J. Ethnopharmacol.*, v.123, p.143-148, 2009.
- OLIVEIRA, M.C.C. *et al.* Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. *Quim. Nova*, v.22, p.182-185, 1999.
- SCHOONHOVEN, L.M.; JEREMY, T.; VAN LOON, J.J.A. Insect-Plant biology from physiology to evolution. London: Chapman & Hall, 1998.
- SINGH, M.M. *et al.* Antigestagenic activity of *Ixora finlaysoniana* in rat. *Contraception* v.48, p.178-191, 1993.
- SIVARAJAN, V.V.; BALACHANDRAN, I. Ayurvedic drugs and their plant sources. New Delhi: Oxford and IBH Publishing, 1994.
- SMÂNIA, A. *et al.* Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol.*, v.45, p.177-181, 1995.
- STEIN, A.C. *et al.* Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon*. *J. Ethnopharmacol.*, v.107, p.95-98, 2006.
- ULUBELEN, A. *et al.* Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. *Planta Med.*, v.66, p.458-462, 2000.
- VALLE, T. *et al.* Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant. Science*, v.125, p.97-101, 1997.
- VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. *Rev. Bras. Planta Med.*, v.3, p.13-36, 2000.