



Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica em *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech.

Kássia Mantovan Fardin, Maria Cláudia Marx Young

Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, kasmfar@gmail.com

Resumo: *Avicennia schaueriana* pertence à família Acanthaceae é conhecida popularmente como mangue preto ou siriúba. O gênero *Avicennia* é caracterizado quimicamente pela presença de iridóides glicosilados, flavonóides, diterpenos e naftoquinonas. Essa espécie apresentou forte potencial antifúngico detectado em extratos obtidos dos caules e folhas, sendo o objetivo do trabalho realizar o seu estudo químico, monitorado por ensaio antifúngico para a obtenção e identificação das substâncias ativas. Para tanto, ramos caulinares e folhas de *A. schaueriana* coletados em Itanhaém, foram secos, moídos e submetidos, separadamente, à maceração com etanol. Os extratos etanólicos brutos de folhas e de caules foram particionados com metanol/água e éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila. As frações obtidas foram submetidas à bioautografia direta em placas de sílica gel (CCD) e reveladas com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* para a localização das substâncias ativas. As frações clorofórmicas de folhas (CHCl₃-F) e de caules (CHCl₃-C), a fração éter de petróleo de caules (EP-C) e a fração acetato de etila de caules (AcOEt-C) inibiram o crescimento dos fungos. A fração EP-C foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel fornecendo 25 sub-frações, que após bioautografia com *C. sphaerospermum*, foram reunidas de acordo com suas semelhanças em 6 grupos ativos. Esses grupos foram analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. A análise comparativa dos dados dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas NIST e Wiley, sugeriu a presença de lapachol e lupeol nos grupos 1, 2 e 3, os quais apresentaram inibição mais forte do crescimento do fungo. Desta maneira, *A. schaueriana* é uma planta promissora para o isolamento de substâncias com potencial antifúngico, sendo que os caules possuem atividade mais forte. A presença das substâncias lupeol e lapachol nos grupos ativos sugere que as mesmas sejam responsáveis pela atividade antifúngica.

Palavras-Chave: mangue preto, atividade antifúngica, lapachol, *Cladosporium sphaerospermum*.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior parte da população do mundo usa plantas na forma de medicamentos (Garcia 1995), mas a utilização de recursos naturais no tratamento e cura de doenças existe desde os primórdios da civilização (Di Stasi 1996).

As plantas mostram-se importantes no descobrimento de novos fármacos, pois fornecem princípios ativos para a síntese de novos medicamentos, os quais são baseados em modelos químicos oriundos de compostos secundários das plantas (Garcia 1995). Enquanto o metabolismo primário é responsável por sintetizar compostos considerados essenciais ao funcionamento celular, o metabolismo secundário vegetal sintetiza compostos que contribuem na defesa contra predadores, atração de polinizadores, ou na permanência em seu ecossistema (Fávero & Pavan 1997; Santos 2001), podendo assim apresentar atividades biológicas importantes para uso na indústria farmacêutica (Ferri 1996). Alcalóides, terpenos e flavonóides podem ser citados entre as classes químicas de metabólitos secundários com maior número de substâncias ativas (Di Stasi 1996).

Levando-se em consideração a falta de conhecimento sobre a diversidade da imensa flora brasileira, acredita-se que o seu estudo pode trazer grande benefício, tanto para a economia como para a farmacologia, possibilitando ainda o uso e o manejo sustentável destes recursos naturais (Garcia 1995).

O gênero *Avicennia* pertence à família Acanthaceae, com a ocorrência de duas espécies no Brasil, *Avicennia schaueriana* e *Avicennia germinans* (Profice *et al.* 2010), sendo elas bem adaptadas para sobreviver em substrato periodicamente inundado por águas salobras, constituindo a vegetação dos mangues (Barroso 1991). O gênero é caracterizado quimicamente

pela presença de iridóides glicosilados (Bousquet-Mélou & Fauvel 1998; Feng *et al.* 2006), flavonóides (Feng *et al.* 2006), diterpenos (Subrahmanyam *et al.* 2006) e naftoquinonas (Ito *et al.* 1999).

Avicennia schaueriana, conhecida popularmente como mangue preto ou siriúba (Ramos & Geraldo 2007), foi selecionada para este estudo devido ao forte potencial antifúngico detectado, em estudos de triagem realizados pelo grupo, em extratos etanólicos de seus caules e folhas quando ensaiados contra o fungo filamentosso *Cladosporium sphaerospermum*. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo realizar o estudo químico de *A. schaueriana*, monitorado por ensaio antifúngico para a obtenção e identificação estrutural das substâncias ativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal e dos extratos

Ramos caulinares e folhas de *A. schaueriana* foram coletados em agosto de 2009 (Cordeiro 3100 - SP), em Itanhaém- SP. O material foi separado em caules e folhas, colocado em estufa para secagem e posteriormente moído para obtenção dos pós. Estes foram submetidos à maceração com álcool etílico hidratado (92,8° INPM) a temperatura ambiente. Após filtração, as soluções etanólicas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório para obtenção dos extratos etanólicos secos.

Avaliação de atividade antifúngica

Os extratos etanólicos brutos de folhas (EEBF) e de caules (EEBC) (400 µg) e suas frações (100 µg) foram aplicados em placas de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F₂₅₄. As placas foram desenvolvidas com o sistema de solventes CHCl₃/MeOH (95:05, v/v) e após a eliminação do solvente, submetidas à bioautografia direta com esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penzig (CCIBt 491) e *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries (CCIBt 140) e incubadas em câmara úmida a 28 °C, por 2-3 dias, no escuro. Após este período, a presença de zonas claras de inibição sobre um fundo de coloração escura indicou a ocorrência de compostos com atividade antifúngica.

Fracionamento dos extratos por partição líquido/líquido

Tanto o EEBF, como o EEBC foram diluídos em MeOH:H₂O (8:2 v/v) e submetidos a partição com os solventes éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila. Após eliminação dos solventes

foram obtidas as respectivas frações: éter de petróleo de folhas (EP-F) e de caules (EP-C); clorofórmio de folhas (CHCl₃-F) e de caules (CHCl₃-C); acetato de etila de folhas (AcOEt-F) e de caules (AcOEt-C), e o resíduo hidrometanólico de folhas (MeOH/H₂O-F) e de caules (MeOH/H₂O-C).

Cromatografia em Coluna (CC)

A fração EP-C foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel, empregando os sistemas de solventes: CHCl₃:Hexano (6:4-8:2, v/v), CHCl₃, CHCl₃:MeOH (98:2, v/v) e MeOH, fornecendo ao final, 25 sub-frações, que após bioautografia com *C. sphaerospermum*, foram reunidas de acordo com suas semelhanças em 6 grupos ativos.

Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Cada um dos grupos ativos foi diluído em clorofórmio na razão de 1:100 (m/v) e analisados em cromatografia a gás, em aparelho Agilent (série 6890) Hewlett-Packard, acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), nas seguintes condições: injetor a 100°C, temperatura de aquecimento da coluna de 100 a 290°C a 15°C min⁻¹, 100°C por 2 min, e 290°C por 15 min (tempo total de análise 30 min) utilizando Hélio como gás de arraste a uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL min⁻¹. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente (Peng *et al.* 2010, modificado).

A identificação dos componentes dos grupos foi baseada na comparação dos espectros de massas destes com o das bibliotecas Wiley 275 e NIST 08.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do material das folhas (545g) e caules (575g) de *A. schaueriana* por meio de maceração e posterior liofilização forneceu um total de 29,12g de EEB de Folhas (EEBF), e 11,75g de EEB de Caules (EEBC), demonstrando assim, que as folhas apresentaram maior rendimento em relação aos caules. Os resultados da bioautografia, após a análise das cromatoplasmas reveladas com os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, mostraram que o extrato bruto de caule tem maior número de substâncias com capacidade de inibir o crescimento desses fungos. Os halos de inibição estão mostrados com seus respectivos valores de

Rf (fator de retenção) determinados (Figura 1) (Mariano *et al.* 2010).

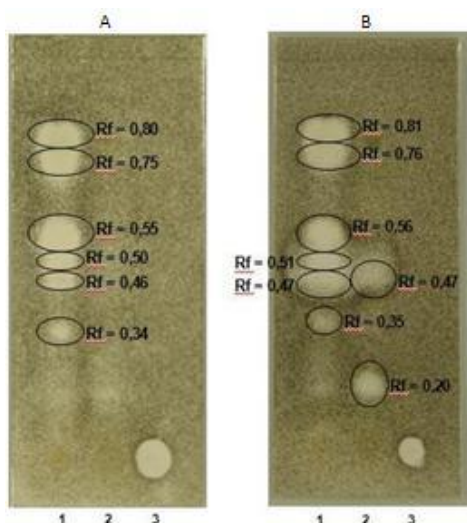


Figura 1. Fotos dos cromatogramas de *A. schaueriana*. 1-EEBC, 2- EEBF, 3- Nistatina. **A-** *Cladosporium cladosporioides* e **B-** *Cladosporium sphaerospermum*.

A bioautografia das frações, resultantes das partições com solventes orgânicos 1- EEBF, 2- EEBC, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- CHCl₃-F, 6- CHCl₃-C, 7- AcEt-F, 8- AcEt-C. com o fungo *C. sphaerospermum*, permitiu a localização dos compostos com atividade antifúngica, como demonstra a Figura 2.

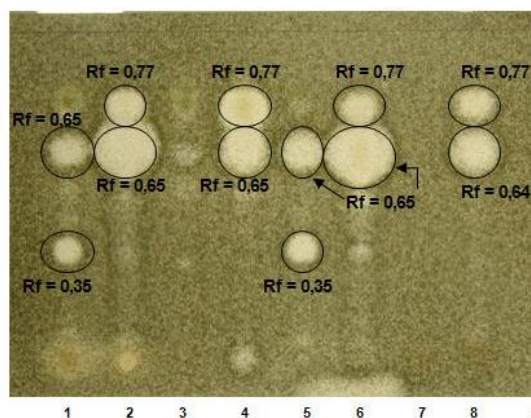


Figura 2. Bioautografia de *A. schaueriana*, revelada com *C. sphaerospermum*. 1- EEBF, 2- EEBC, 3- EP-F, 4- EP-C, 5- CHCl₃-F, 6- CHCl₃-C, 7- AcEt-F, 8- AcEt-C.

A partir da observação dos halos de inibição onde a atividade foi mais intensa, e dos valores de Rf obtidos, pode-se inferir que os compostos ativos presentes em EP-C, CHCl₃-C e AcOEt-C,

sejam os mesmos. Já os halos de inibição presentes no EEBF aparecem apenas na fração CHCl₃-F, com valores de Rf = 0,65, igual aos apresentados nas frações EP-C, CHCl₃-C e AcOEt-C, e Rf = 0,35.

A análise por CG/EM permitiu a identificação de cinco constituintes dos grupos ativos 1-3 (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos detectados por CG/EM nos grupos ativos obtidos a partir da união de sub-frações da CC de EP-C de *A. schaueriana*, apresentando os Tempos de Retenção (T.R.) e a % da área do pico correspondente em cada um dos grupos.

T.R.	Composto	G1	G2	G3
15,73	Naftaleno	2,45	-	-
15,86	Hexadecanoato de etila	4,44	-	-
16,89	Naftoquinona (Lapachol)	15,89	7,02	-
22,69	Esqualeno	2,75	-	-
27,49	Lupeol	22,64	71	35,6

O lupeol (figura 3) foi a substância de maior representatividade nos grupos G1, G2 e G3.

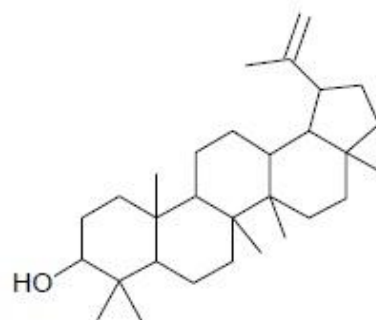


Figura 3. Lupeol

Em estudos realizados por Galho e Sarachine (2009), lupeol apresentou zonas moderadas de inibição contra o crescimento dos fungos *Aspergillus Níger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia phaseoli* e *Penicillium chrysogenum*, sendo este um indício de que o lupeol possa ser um dos responsáveis pela atividade antifúngica em *A. schaueriana*.

A naftoquinona lapachol (Figura 4) também apresentou abundância relevante, além de ter ocorrido em dois grupos, G1 e G2 (conforme tabela 1).

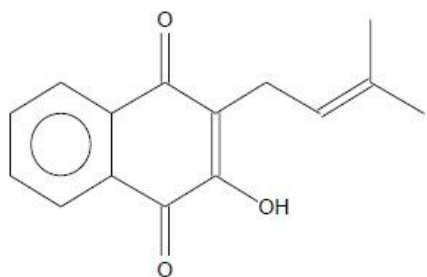


Figura 4. Lapachol

O lapachol demonstrou em estudos anteriores, atividade inibitória contra o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* em placas de petri (Sousa *et al.* 2008). Desta forma, pode-se inferir que ele também seja um dos responsáveis pela atividade antifúngica em *A. schaueriana*.

CONCLUSÕES

A. schaueriana é uma planta que se mostra promissora para o isolamento de substâncias com potencial antifúngico, sendo que os caules são os que possuem atividade mais forte. O isolamento das substâncias lupeol e lapachol sugere que as mesmas sejam parcialmente responsáveis pela atividade antifúngica.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao CNPq/PIBIC pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barroso, G. M.** 1991. Sistemática das Angiospermas do Brasil. 2. ed. Viçosa, MG: UFV Imprensa Universitária, pp. 337.
- Bousquet-Mélou, A.; Fauvel, M.** 1998. Inter-specific variation in the concentration of two iridoid glucosides in *Avicennia* L. (Avicenniaceae Endl.). *Biochemical Systematics and Ecology*. 26(8): 935-940.
- Di Stasi, L. C.** 1996. Arte, ciência e magia. In: Di Stasi, L. C. (ed.). *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora Fundação UNESP, pp. 1-175.
- Fávero, O. A.; Pavan, S.** 1997. *Botânica econômica*. São Paulo: Catálise Editora. pp. 1-175.
- Feng, Y.; Li, X. M.; Duan, X. J.; Wang, B. G.** 2006. Iridoid glucosides and flavones from the aerial parts of *Avicennia marina*. *Chemistry & Biodiversity*. 3 (7): 799-806.
- Ferri, P. H.** 1996. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: Di Stasi, L. C. (ed.). *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo*

interdisciplinar. São Paulo: Editora Fundação UNESP, pp. 1-175.

- Galho, M. B. C.; Sarachine, M. J.** 2009. Biological activities of lupeol. *International journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 3 (1): 46-66.
- Garcia, E. S.** 1995. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. *Cadernos de Saúde Pública*. 11(3): 495-500.
- Ito, C.; Katsuno, S.; Kondo, Y., Tan, H. T.; Furukawa, H.** 1999. Chemical constituents of *Avicennia alba*. Isolation and structural elucidation of a new naphthoquinones and their analogues. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 48(3): 339-343.
- Mariano, A. F. S.; Freitas, P. A. A.; Ramalho, V. L. A.; Couto, J. A.** 2010. Cromatografia de aminoácidos em papel em aulas práticas de bioquímica. *JEPEX 2010 – UFRPE: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*. 18 a 22 de outubro.
- Peng, W.; Han, T.; Xin, W.; Zhang, X. G.; Zhang, Q. Y.; Jia, M.; Qin, L.** 2010. Comparative research of chemical constituents and bioactivities between petroleum ether extracts of the aerial part and the rhizome of *Atractylodes macrocephala*. *Medicinal chemistry research*. 10 (2): 146-151.
- Profice, S. R.; Kameyama, C.; Côrtes, A. L. A.; Braz, D. M.; Indriunas, A.; Vilar, T.; Pessoa, C.; Ezcurra, C.; Wasshausen, D.** 2010. *Acanthaceae*. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, pp. 871.
- Ramos, M. G. M.; Geraldo, L. P.** 2007. Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais pesados em Ambientes de mangues. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*. 12(4): 440-445.
- Santos, R. I.** 2001. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, pp. 1102.
- Souza, M. A. A.; Silva, A. R.; Ferreira, M. A.; Lemos, M. J.; Ramos, R. G.; Ferreira, A. B. B.; Souza, S. R.** 2008. Atividade biológica do lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. *Química Nova*. 31 (7): 1670-1671.
- Subrahmanyam, C.; Kumar, S.R.; Reddy, G.D.** 2006. Bioactive diterpenes from the mangrove *Avicennia officinalis* Linn. *Indian Journal of Chemistry - Section B: Organic and Medicinal Chemistry*. 45 (11): 2556-2557.