

PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE *Mitracarpus baturitensis* (RUBIACEAE)
PHYTOCHEMICAL PROFILE AND EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF HEXANIC FRACTION OF *Mitracarpus baturitensis* (RUBIACEAE)

Andréa Maria Neves¹; Hélcio dos Santos Silva²; Elnatan Bezerra de Souza³;
Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle⁴; Ana Carolina Silva e Silva⁵; Selene Maia de Moraes⁶

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo determinar o perfil fitoquímico e a atividade antifúngica da fração hexânica de *M. baturitensis* contra espécies de *Candida spp.* Inicialmente, realizou-se o teste fitoquímico com reações químicas para detecção das principais classes de metabólitos secundários e na sequência foi realizado o teste antifúngico por meio da técnica de microdiluição em caldo contra duas espécies de *Candida*. A fração hexânica de *M. baturitensis* apresentou fenóis, taninos, flavonoides, saponinas e esteroides em sua composição, sendo verificada também atividade antifúngica frente às leveduras estudadas. Estes resultados corroboram outros achados na literatura que verificaram metabólitos secundários para outras espécies pertencentes ao gênero *Mitracarpus*, bem como atividade antimicrobiana, revelando, desta forma, potencialidade para esta espécie e evidenciando a importância de estudos futuros sobre os seus aspectos químicos e biológicos.

Palavras-chave: *Spermacoaceae*. Bioprospecção. Metabólitos. Fitoquímicos. Antifúngicos.

ABSTRACT

The present work aimed to determine the phytochemical profile and antifungal activity of the hexanic fraction of M. baturitensis against Candida spp. Initially, the phytochemical test was carried out through chemical reactions to detect the main classes of secondary metabolites and in the sequence the antifungal test was carried out using the broth microdilution technique against two species of Candida spp. The hexanic fraction of M. baturitensis presented phenols, tannins, flavonoids, saponins and steroids in its composition, being also verified antifungal activity against yeasts studied. These results corroborate with other findings in the literature that verified secondary metabolites for other species belonging to the genus Mitracarpus, as well as antimicrobial activity. Thus revealing potential for this species, evidencing the importance of future studies on the chemical and biological aspects for this species.

Recebido em: 24 abril 2019

Aprovado em: 05 junho 2019

Keywords: *Spermacoaceae*. Bioprospection. Metabolites. Phytochemicals. Antifungals.

¹Docente do Doutorado em Biotecnologia (Renorbio). Universidade Estadual do Ceará (UECE). Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: andreamarianeves@gmail.com

²Pesquisador do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Síntese e Biocatálise de Compostos Orgânicos. Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Sobral, Ceará, Brasil. E-mail: helciosilvadossantos@gmail.com

³Pesquisador do Herbário Francisco José de Abreu Matos. Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Sobral, Ceará, Brasil. E-mail: albzsousa@yahoo.com.br

⁴Pesquisadora do Laboratório de Microbiologia. Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Sobral, Ceará, Brasil. E-mail: raquelbios@yahoo.com

⁵Docente do Curso de Química. Universidade Estadual do Ceará (UECE). Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: carolinaana1310@gmail.com

⁶Pesquisadora do Laboratório de Química de Produtos Naturais. Universidade Estadual do Ceará (UECE). Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: selenamaisdemorais@gmail.com

INTRODUÇÃO

Algumas espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana natural. No entanto, estes organismos podem se tornar patogênicos em virtude dos fatores de virulência presentes no próprio micro-organismo, devido à baixa imunidade do indivíduo. As infecções fúngicas causadas por patógenos oportunistas, em especial leveduras do gênero *Candida spp.* são cada vez mais recorrentes. Este fato está muitas vezes associado ao uso exagerado de terapias antimicrobianas que desencadearam a resistência a múltiplas drogas, gerando, portanto, um obstáculo no tratamento contra estes patógenos (SANTOS et al., 2018).

Diante deste emergente problema de saúde pública, torna-se imprescindível a busca por novos tratamentos antifúngicos adequados. Desse modo, os produtos naturais para o manejo de doenças fúngicas podem ser considerados como uma alternativa aos fungicidas sintéticos devido à sua baixa toxicidade, menor custo e menos efeitos colaterais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial dependem da medicina tradicional para atender suas principais necessidades de saúde (SONY et al., 2018).

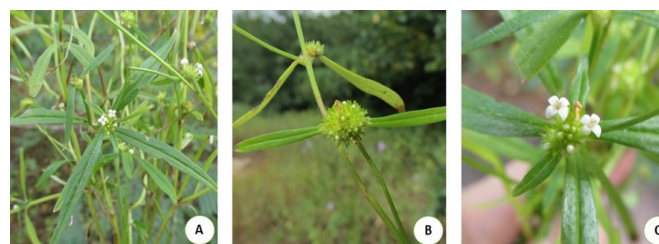
Muitas espécies vegetais são potenciais fontes de antifúngicos, em razão de sua ampla capacidade biossintética, além de apresentarem uma menor toxicidade, desde que sejam utilizadas de maneira correta. Os produtos provenientes de vegetais ricos em compostos fenólicos vêm ganhando destaque como fonte alternativa de antimicóticos devido ao aumento do fenômeno de resistência dos fungos aos antifúngicos usualmente utilizados (BUNSKOEK et al., 2017; IBOUDO et al., 2016; TAJ-ALDEEN et al., 2016.; SCORZONI et al., 2016; OLIVEIRA, ALMEIDA, 2016).

Nesse sentido, a flora brasileira, rica em biodiversidade, constitui uma fonte relativamente subutilizada e essencialmente muito valiosa, possibilitando, portanto, a pesquisa por novos agentes antifúngicos derivados de extratos vegetais e óleos essenciais, tendo em vista o pequeno arsenal de fármacos existentes para o tratamento de micoses (SANTOS et al., 2018; MOURA et al., 2016).

Mitracarpus baturitensis Sucre, popularmente conhecida como ervância-do-mato, é uma espécie

herbácea endêmica do Brasil pertencente à família *Rubiaceae*, inserida na tribo *Spermacoceae* (Figura 1). Ocorre no Distrito Federal e nos estados do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Goiás e Mato Grosso, geralmente habitando afloramentos rochosos nos domínios fitogeográficos da Caatinga e Cerrado (SOUZA; CABRAL; ZAPPI, 2010). Diversos fitoconstituintes vegetais de espécies desse gênero têm sido estudados, como o ácido ursólico e ursolato de metila, cujos resultados revelaram haver diversas ações biológicas, tais como *leishmanicida*, anti-inflamatório e antitumoral (FABRI et al., 2014). Além disso, outros estudos demonstraram que preparações obtidas de espécies do gênero *Mitracarpus* apresentaram atividades antimicrobianas (CAMPOS et al., 2018).

Figura 1 - A e C: Aspectos morfológicos gerais da *Mitracarpus baturitensis*. A: Ramo com inflorescência. B: Glomérulo; C: Detalhe das flores.



Jordão, Ceará. 2018.

Fonte: Souza (2018).

Mediante a falta de estudos mais aprofundados sobre o perfil químico e atividades biológicas para a referida espécie, e a elevada incidência de infecções fúngicas e a resistência desses organismos frente ao estreito arsenal de drogas antifúngicas existentes, assim como seus efeitos colaterais, a importância deste estudo está fundamentado na busca de novas descobertas sobre o potencial químico e antifúngico de *M. baturitensis*. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil fitoquímico e a atividade antifúngica da fração hexânica de *M. baturitensis* contra espécies do gênero *Candida*.

METODOLOGIA

Coleta, identificação e preparação do material vegetal

A planta inteira de *M. baturitensis* foi coletada em junho de 2018 no sítio São Miguel, na localidade de Serra do Rosário, distrito de Jordão, no município

de Sobral, Ceará, em área de floresta seca, com afloramentos rochosos, nas coordenadas 03° 41' 14" S, 40° 30' 24" W, com altitude de 650 m. A identificação botânica da espécie foi realizada no Herbário Francisco José de Abreu Matos (HUVA), da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA, pelo professor Dr. Elnatan Bezerra de Souza, sendo o voucher depositado sob o número de tombo HUVA 23376. Para o preparo do extrato, o material vegetal foi triturado e imerso em etanol e, na sequência, foi filtrado e concentrado em um evaporador rotativo a 60°C e, após este processo, foi mantido em banho-maria (40°C) até a eliminação total do solvente, obtendo-se o extrato etanólico (MATOS, 2009). O extrato etanólico foi solubilizado em água destilada e submetido à partição com hexano e acetato, o que resultou na fração hexânica e acetato.

Triagem fitoquímica

Após a obtenção da fração hexânica de *M. baturitensis*, esta foi submetida à triagem fitoquímica de acordo com a metodologia descrita por Matos (2009). Através deste ensaio preliminar, é possível verificar as principais classes de metabólitos secundários por meio de reações químicas que resultam no aparecimento de coloração e/ou precipitado, caracterizando cada classe de substância. Os ensaios foram conduzidos para as seguintes classes de substâncias: fenóis, taninos, flavonoides, saponinas, esteroides, triterpenoides e alcaloides. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Ensaio de Microdiluição em caldo

Para o ensaio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de *M. baturitensis*, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, de

acordo com a metodologia descrita por Fontenelle et al. (2007), com as normas do protocolo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI M27 - A3, 2008). Para este ensaio foram utilizadas duas espécies de *Candida*, sendo duas cepas de *C. albicans* e duas cepas de *C. tropicalis*, provenientes de pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Sobral.

Em placas com 96 poços estéreis, adicionaram-se inicialmente 100 µL de meio RPMI em todos os poços, e posteriormente 10 mg da amostra da fração hexânica de *M. baturitensis* foram diluídos em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%. Ao final 100 µL dessa solução foram acrescentados a todos os poços da primeira coluna para, em sequência, fazer as diluições seriadas. Finalmente, 100 µL do inóculo foi adicionado aos poços da placa, sendo todo este procedimento realizado em duplicata. Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B. As análises de susceptibilidade de *M. baturitensis* foram avaliadas em concentrações que variaram de 0,002 a 2,5 mg/mL. As placas foram cobertas com parafilme e incubadas a 37°C, e a leitura visual foi realizada após 48 horas. A CIM é definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir 100% do crescimento fúngico visível (FONTENELLE et al., 2007).

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada por meio da subcultura de 100 µL de solução removida de poços, sem turbidez, em meio Ágar Batata Dextrose, a 28 °C. A CFM foi determinada como a menor concentração que resultou na ausência de crescimento na subcultura após 48 horas (FONTENELLE et al., 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quadro 1- Triagem fitoquímica da fração hexânica de *M. baturitensis*. Fortaleza, Ceará. 2018.

METABÓLITOS	FH <i>M. baturitensis</i>	
	Presente: +	Ausente: -
Flavonoides		+
Fenóis		+
Saponinas		+
Taninos		+
Esteroides		+
Alcaloides		-
Triterpenoides		-

Fonte: Própria.

Quadro 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da fração hexânica de *M. baturitensis* frente às espécies de *Candida*. Fortaleza, Ceará. 2018.

Amostra	<i>C. albicans</i> 04		<i>C. albicans</i> JMOR		<i>C. tropicalis</i> AFS		<i>C. tropicalis</i> MSAU	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
FH	0,31	0,62	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	1,25
Anfotericina	2,0 µg/mL		2,0 µg/mL		2,0 µg/mL		2,0 µg/mL	

Fonte: LABIMIC: Laboratório de Microbiologia; FH- Fração hexânica.

Os resultados da triagem fitoquímica e da atividade antifúngica estão demonstrados nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Para a triagem fitoquímica, foi possível perceber que a FH de *M. baturitensis* apresentou a maioria dos metabólitos pesquisados, não sendo identificados apenas alcaloides e triterpenoides em sua composição. Tal fato pode estar atribuído aos processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, bem como sazonalidade, período circadiano, idade e desenvolvimento da planta, além da disponibilidade de nutrientes e água no solo. Outros fatores, como o método de coleta, secagem, acondicionamento e transporte, poderão implicar também no conteúdo dos metabólitos secundários (MIRANDA et al., 2016). Estes fatores podem explicar as diferenças observadas nos resultados da avaliação fitoquímica da amostra estudada.

Os resultados encontrados corroboram o estudo de Fabri et al. (2014) que, ao analisarem o extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Schum. por meio de análise de HPLC, foram identificados flavonoides e substâncias fenólicas em sua constituição. Alguns estudos têm demonstrado que muitos dos metabólitos secundários encontrados na presente pesquisa possuem alto valor biológico e farmacológico, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antidiabéticas, antibacterianas, antivirais, antioxidantes, antialérgicos, antitumorais citotóxicos, imunomoduladoras, entre outras (BAKARI et al., 2018; BANSODE; SALALKAR, 2015).

Quanto aos ensaios antifúngicos para *M. baturitensis*, foi encontrado potencial inibitório contra todas as cepas de *Candida spp.* testadas

com CIM, variando de 0,31 mg/mL a 0,62 mg/mL e CFM de 0,62 mg/mL a 1,25 mg/mL, com destaque para *C. albicans* 04 que apresentou maior susceptibilidade. Na literatura, não foram encontrados estudos do potencial antifúngico para a espécie de *M. baturitensis*, sendo este o primeiro relato de estudo de atividade antifúngica para a referida espécie. Entretanto, foi observado efeito antifúngico in vitro e in vivo do extrato metanólico de *M. frigidus* frente à cepa resistente de *C. albicans* ATCC 10231 com valor de CIM de 500 µg.ml⁻¹ (CAMPOS et al., 2018).

A atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos vegetais está relacionada a sua propriedade hidrofóbica. Ao entrar em contato com o fungo, os componentes do extrato ou óleo interagem com organelas como mitocôndria e também com os lipídeos da membrana plasmática, alterando a sua permeabilidade e consequentemente causando distúrbios estruturais, o que pode promover a exposição do conteúdo celular, inclusive do núcleo (GOMES et al., 2016).

Vale ressaltar que esta atividade antifúngica apresentada pela FH de *M. baturitensis* poderá estar associada a seus compostos fitoquímicos, particularmente taninos, flavonoides e substâncias fenólicas os quais já foram identificados em outra espécie do gênero (FABRI et al., 2014). Estes metabólitos têm recebido atenção pelo fato de que a maioria deles é capaz de inibir microrganismos e fatores de virulência (ARAÚJO et al., 2015).

Embora não existam relatos na literatura acerca de *M. baturitensis* sobre seu perfil fitoquímico e antifúngico, os resultados obtidos mostram ser uma espécie de grande relevância para o isolamento e identificação dos compostos responsáveis por esta atividade. A realização de

pesquisas in vivo, além de testes de toxicidade são imprescindíveis para que os extratos e os compostos isolados da referida espécie possam ser utilizados, clinicamente, no tratamento de candidíase, uma vez que o extrato possui metabólitos secundários que conferem inibição sobre *C. albicans*.

CONCLUSÃO

Os resultados da análise fitoquímica indicaram a presença de diferentes classes de metabólitos secundários, bem como efeito inibitório contra as espécies de *Candida* estudadas, evidenciando, portanto, potencialidade da FH de *M. baturitensis*. Recomenda-se que sejam feitos estudos sobre o isolamento de compostos químicos presentes na FH desta espécie, que, bioguiados pelas ações antifúngicas, poderão ser potenciais inibidores no tratamento de doenças recorrentes, tais como candidíases.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- RENORBIO, à Universidade Estadual do Ceará-UECE, à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP pelas bolsas de produtividade BPI de Elnatan Bezerra de Souza e Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA, ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, Síntese e Biocatálise de Compostos Orgânicos da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA e ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará-UECE.

REFERÊNCIAS

Araújo, E.R.D; et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente à bactérias gram negativa e gram positiva. *Biota Amazônia* (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), Macapá, Amapá, v 5, n 3, p. 66-71, 2015.

Bakari, S; et al. Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials and LC-MS analysis of hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of *Erodium glaucophyllum* collected from Tunisian Sahara. *Food Science and Technology*, Campinas, São Paulo, v 38, n 2, p. 310-317, 2018.

Bansode, T.S; et al. Phytochemical analysis of some selected Indian medicinal plants. *Int J Pharm Bio Sci*, Tamilnadu, India, v 6, n 1, p. 550-556, 2015.

Bunskoek, P.E; et al. Successful treatment of azole-resistant invasive aspergillosis in a bottlenose dolphin with high-dose posaconazole. *Medical Mycology Case Reports*, Amsterdã, Holanda, v 16, p. 16-19, 2017.

Campos, L.M; et al. *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Industrial crops and products*, Amsterdã, Holanda, v 123, p 731-739, 2018.

Clinical and laboratory standards institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts* (Approved Standard. Document M27. CLSI), vol. M27-A3, third ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008.

Fabri, R.L; et al. Pentacyclic triterpenoids from *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Shum: in vitro cytotoxic and leishmanicidal and in vivo anti-inflammatory and antioxidative activities. *Medicinal Chemistry Research*, Suíça, v 23, n 12, p. 5294-5304, 2014.

Fabri, R.L; et al. Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. *BioMed research international*, Londres, Inglaterra, v 2014, 2014.

Fontenelle, R.O.S; Morais, S.M.; Brito, E.H.S; et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Oxônia, Reino Unido, v 59, n 5, p. 934-940, 2007.

Fontenelle, R.O.S; Morais, S.M; Brito, E.H.S; et al. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of applied Microbiology*, Londres, Reino Unido, v 104, n 5, p. 1383-1390, 2008.

Gomes, E.M.C; et al. Composição fitoquímica e ação fungicida de extratos brutos de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Quambalaria eucalypti*. *Biota Amazônia* (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), Macapá (AP), v 6, n 4, p. 54-58, 2016.

liboudo, O; Bonzi, S; Tapsoba, I; Somda, I; Bonzi-Coulabay, Y.L. In vitro antifungal activity of flavonoid diglycosides of *Mentha piperita* and their oxime derivatives against two cereals fungi. *Comptes Rendus Chimie*, França, v 19, p. 857- 862, 2016.

Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. UFC. Fortaleza (CE): Editora UFC. 2009. p. 45.

Miranda, M.V; Firmo, W.C.A; Pereira, L.P.L.A; et al. Controle de qualidade de amostras comerciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) adquiridas em mercados públicos da cidade de São Luis-MA. *Biota Amazônia*, (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), Macapá, Amapá, v 6, n 1, p. 83-90, 2016.

Moura, L.F.W.G; Oliveira, M.V; Mota, J.G.S.M; et al. Isolamento e identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da caatinga da região dos Inhamuns, Tauá, Ceará, Brasil. *Essentia*, Sobral (CE), v 17, n 2, p. 43-63, 2016.

Oliveira, N.T; Almeida, S.S.M.S. Análise Fitoquímica, Citotóxica E Antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). *Biota Amazônia*, (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), Macapá, Amapá, v 6, n 1, p. 20-25, 2016

Santos, J.F.S; Rocha, J.E; Bezerra, C.F; et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. *Food Chemistry*, Amsterdã, Alemanha, p 1-20, 2018.

Souza, E.B; Cabral, E.L; Zappi, D.C. Revisão de *Mitracarpus* (Rubiaceae - Spermaceae) para o Brasil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v 61, n 2, p.319-352, 2010

Scorzoni, L; et al. Searching new antifungals: the use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of microbiological methods*, Holanda, v 123, p 68-78, 2016.

Sony, P; Kalyani, M; Jeyakumari, D; et al. In vitro antifungal activity of cassia fistula extracts against fluconazole resistant strains of *Candida* species from HIV patients. *Journal de mycologie medicale*, Inglaterra, v 28, n 1, p. 193-200, 2018.

Taj-Aldeen, S.J; Lass-Flörl, C; et al. In vitro resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Stanford, Estados Unidos, v 85, n 4, p. 438-443, 2016.