
**Atividade antibacteriana de *Geophila sp* (rubiaceae)
Antibacterial activity of *Geophila sp* (rubiaceae)**

VAGNER MARQUES DE MOURA¹
SILVANA MARIA DE OLIVEIRA SANTIN²
FRANCIELI CASSASA VIEIRA³
CELSO VATARU NAKAMURA⁴

RESUMO: Neste trabalho avaliou-se a atividade antibacteriana de extratos de diferentes polaridades de *Geophila sp*. A atividade antibacteriana foi medida frente às cepas *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato clorofórmico inibiu o crescimento de *S.aureus* e *Bacillus sp*. e o extrato metanólico inibiu, em menor grau de crescimento de *Bacillus sp*. Os extratos bioativos foram submetidos a uma investigação fitoquímica que resultou no isolamento de β -sitosterol, 3-O- β -glicopiranosilsterol e de sacarose. As estruturas das substâncias isoladas foram definidas com base na análise de dados espectroscópicos de RMN uni e bi-dimensionais e comparação com os da literatura.

Palavras-chave: *Geophila sp*. Esteróides. Atividade Antibacteriana.

ABSTRACT: Antibacterial inhibition activities of different polarities extracts of *Geophila sp*. were evaluated. The antibacterial activity was assayed against of *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The chloroformic extract showed growth inhibition of *S.aureus* and *Bacillus sp*., and the methanolic extract showed, in lower extension, growth inhibition of *Bacillus sp*. The results of phytochemical investigation of actives extracts led to the isolation of

¹Professor Assistente da Faculdade Ingá – UNINGÁ – Av. Colombo, 9727, Km 130, Cep 87070-080, Maringá-PR, e-mail: vmmoura@yahoo.com.br.

²Professora Doutora do Departamento de Química da UEM.

³Mestranda em Química pela UEM.

⁴Professor Doutor do Departamento de Microbiologia da UEM.

the β -sitosterol, 3-O- β -glycopyranosylsitosterol and the sacarose. The structures of the isolated compounds were assigned on the basis of spectroscopic data, including two-dimensional NMR methods.

Key-words: *Geophila sp.* Steroids. Antibacterial Activity.

INTRODUÇÃO

Apesar de que a indústria farmacêutica nestas três últimas décadas tenha desenvolvido um grande número de antibióticos, o uso indiscriminado tem levado ao aumento da resistência bacteriana a múltiplas drogas (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006). Esta crescente resistência aos antimicrobianos tem gerado grandes problemas, como por exemplo, as infecções hospitalares, muitas vezes fatais quando associadas aos transplantes, à AIDS, etc. Por este motivo é preciso sempre a busca de novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, como as bacterianas. As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre foram importantes para o descobrimento de novas drogas, sendo fornecedoras de princípio ativo e por ser também uma alternativa mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento (NASCIMENTO et al., 2000; LIMA et al., 2006).

Em um levantamento bibliográfico foi constatada a carência de estudos químicos e farmacológicos para o gênero *Geophila* (Rubiaceae), sendo apenas registrada a atividade fungicida de *G. repens* frente a vários fungos, o que justifica o uso na medicina popular paraguaia desta espécie no tratamento de infecções da pele (CAÑIGUERAL et al., 2001).

O presente trabalho descreve os resultados da avaliação antibacteriana dos extratos obtidos das partes aéreas de *Geophila sp.* e o isolamento dos principais constituintes dos extratos ativos. As estruturas das substâncias isoladas foram definidas com base nas análises de dados IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C e de experimentos de DEPT 135° .

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Bomem, modelo MB, em pastilha

de KBr, na região de 400 a 4000 cm^{-1} . Utilizou-se absorção em 1028 cm^{-1} de um filme de poliestireno como referência. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro Shimadzu-CG/MS modelo QP 2000A operando pelo modo de ionização por impacto eletrônico (70 eV), equipado com probe para sólidos. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Varian modelo Gemini 2000, operando a 300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C , tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e os solventes deuterados utilizados foram CDCl_3 , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ e D_2O . Nas cromatografias em coluna (CC) utilizaram-se colunas de vidro de variadas dimensões e como fase estacionária sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) da Merck e sílica gel 60 (0,04 – 0,063 mm) da Fluka.

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em placas de sílica gel 60 GF254 da Merck. Para a visualização dos compostos em placa utilizou-se radiação no UV $\lambda = 254$ e 366 nm, seguida de nebulização com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) ou $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{anisaldeído}/\text{ácido acético}$ (1:0,5:50) e levadas à aquecimento.

Material vegetal

A espécie *Geophila sp* foi coletada às margens do rio Mandacarú, no Campus da Universidade Estadual de Maringá, em maio de 2001.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

As partes aéreas de *Geophila sp*. (633,0 g) foram secas ao ar, moídas e submetidas à extração por maceração em diferentes solventes à temperatura ambiente durante cinco dias. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotativo, foram obtidos os extratos hexânico (11,2 g), clorofórmico (58,0 g) e metanólico (49,9 g). Parte do extrato clorofórmico (20,5 g) foi submetido à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel, utilizando-se como eluente o solvente clorofórmio. Foram coletadas 72 frações de 30 mL cada e reunidas em 5 novas subfrações. A subfração 2 forneceu o esteróide **1** (10,0 mg) após sucessivas lavagens com éter de petróleo. A purificação da subfração 5 resultou após recristalização em acetona, no isolamento da mesma substância **1** (14,0 mg). O tratamento do extrato metanol (19,7 g) foi realizado mediante a uma separação em (CC) de sílica gel, eluída com CHCl_3 e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$

em gradiente crescente de polaridade obtendo-se 112 frações de 30 mL cada e reunidas em 12 novas subfrações. A subfração 5 forneceu a substância **2** (15,0 mg). A subfração 9 foi recromatografada em coluna de sílica gel, eluída com CHCl₃/MeOH em gradiente crescente de polaridade (5-40%) resultou em 53 frações de 30 mL cada e reunidas em 6 novas frações. A subfração 5 forneceu após sucessivas lavagens com acetona a frio a substância **3** (20,3 mg).

Avaliação da atividade antibacteriana

Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico obtidos por maceração de *Geophila sp.* foram avaliados frente aos microorganismos *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 pelo processo de microdiluição. Na determinação da concentração mínima inibitória (CMI), os extratos, foram mantidos em ágar simples e uma série de diluições foi conduzida utilizando caldo Mueller-Hinton. O inóculo da suspensão bacteriana foi preparado considerando densidade idêntica à suspensão padrão (BaSO₄), ajustada para 0,5 McFarland (10⁸ UFC/mL) e diluídos em 1:10 para o processo de microdiluição. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de cada bactéria foi adicionada em todos os poços da placa de microdiluição que continha 100 µL das amostras e os antibióticos de referência (cloranfenicol e penicilina) foram utilizados como controle nos ensaios. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A determinação da MIC foi evidenciada pela ausência de crescimento da bactéria no meio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

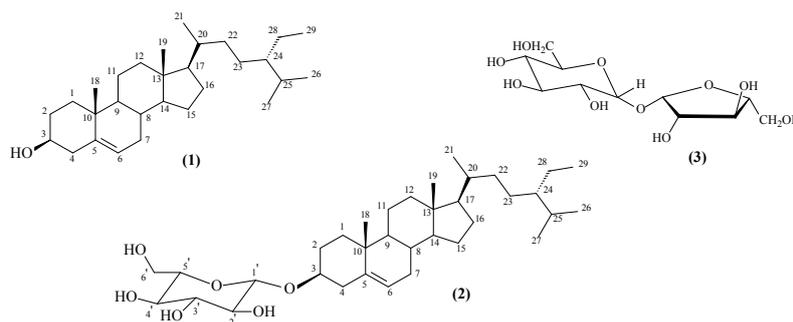
Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico da espécie *Geophila sp.* foram submetidos à avaliação do potencial de ação antibacteriana frente aos microorganismos *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, pelo método de microdiluição. Os resultados para estes testes estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (MICs) e concentração mínima bactericida (MBCs) dos extratos hexânico, clorofórmico e metanólico das partes aéreas de *Geophila sp*.

Extratos	MIC(MBC) $\mu\text{g/mL}$			
	<i>S. aureus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Hexano	>1000	>1000	>1000	>1000
Clorofórmio	250(250)	125(125)	>1000	>1000
Metanol	>1000	1000(1000)	>1000	>1000

O extrato clorofórmico foi efetivo frente *S. aureus* e *Bacillus sp* com concentração mínima inibitória (CMI) de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, e o extrato metanólico apresentou atividade frente com CMI de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Com estes resultados foi então realizado um estudo químico direcionado as frações ativas.

O extrato clorofórmio após tratamento em coluna cromatográfica de gel de sílica resultou no isolamento do esteróide 24 α -etil-colesta-5-enol (sitosterol) (**1**). O mesmo tratamento realizado para extrato metanólico forneceu o esteróide 3-O- β -glicopiranosil-24 α -etil-colesta-5-enol (3-O- β -glicopiranosil-sitosterol) (**2**) e um açúcar livre sacarose (**3**). As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base nas análises de dados de IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C e de experimentos de DEPT 135 $^\circ$.



A substância **1** foi isolada do extrato clorofórmico como um sólido branco. O espectro na região do infravermelho (IV) apresentou bandas de absorção típicas de grupo hidroxila (3427 cm^{-1}) e de carbonos olefínicos (1667 cm^{-1}). O espectro de massa apresentou o pico base em m/e 43 e o pico do íon molecular em m/e 414, característico de compostos com esqueleto esteroidal. Os dados espectroscópicos de RMN apresentou sinal

característico de grupo vinílico em δ_H/δ_C 5,35 (*m*, H-6)/121,8. A presença do carbono carbinólico é evidenciada em δ_C 71,8 e os sinais adicionais em δ_H/δ_C 0,92/18,7; 0,83/19,7; 0,80/18,9 e 0,85/11,9 foram atribuídos aos metilas 21, 26, 27 e 28 respectivamente, presentes na cadeia lateral. Através dos valores de deslocamentos químicos de RMN de 1H e $^{13}C/DEPT$ da substância **1** em comparação com os dados existentes na literatura (AGRAWAL, 1992, MOURA, 2006) foi possível confirmar a estrutura como sendo o esteróide 24 α -etil-colesta-5-enol.

A substância **2** foi isolada do extrato metanol como um sólido branco. O espectro no IV apresentou bandas de absorção dos grupos hidroxilas (3417 cm^{-1}) e de carbonos olefinicos (1638 cm^{-1}). Nos espectros de RMN 1H e ^{13}C foram observados sinais com deslocamentos químicos semelhantes àqueles apresentados para **1**, diferenciando apenas nos sinais na região entre δ_H 3,90 – 4,70 em conjunto com o sinal em δ_H 5,09 (*d*, $J= 7,8$ Hz, H-1') evidenciando a presença de uma unidade D- β -glicose. As atribuições foram confirmadas após análises dos espectros bidimensionais (2D) de correlação homonuclear $^1H-^1H$ COSY e heteronuclear HETCOR e por comparação dos valores encontrados na literatura (MATIDA et al., 1996). Os valores mostraram-se coerentes, e a substância foi identificada como sendo o esteróide 3-O- β -glicopiranosil-24 α -etil-colesta-5-enol.

No estudo de uma das frações do extrato metanol ainda foi possível isolar um sólido cristalino (**3**), solúvel em água. O espectro no IV mostrou intensas bandas de absorção característica de grupo hidroxila entre 3000 a 3450 cm^{-1} . A análise dos dados espectroscópicos de RMN 1H evidenciaram a presença de sinais característicos de uma unidade de açúcar entre δ_H 3,00 a 5,40. O duplete em δ_H 5,10 com uma constante de acoplamento $J= 7,8$ sugeriu a presença de uma glicose. A comparação e a coerência entre os dados de IV, RMN 1H e $^{13}C/DEPT$ com os valores encontrados na literatura (POUCHERT, 1984) permitiu-nos caracterizar e identificar a estrutura molecular da substância como sendo a sacarose.

As substâncias presentes nos extratos estudados são todas conhecidas e amplamente difundidas no reino vegetal, porém estes fitosteróides apresentam importantes atividades farmacológicas, como antiofídica, citotóxica, antiinflamatória, antimutagênica, analgésica e antibacteriana (CECHINEL FILHO, 1998, 2000; MORS, 2000; RATNAYAKE et al., 1992), que pode justificar as efetivas atividades apresentadas nestes extratos.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo químico e de avaliação de atividade antibacteriana de uma espécie do gênero *Geophila*. Estes resultados ampliam o conhecimento do potencial químico e farmacológico da família Rubiaceae.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, R.M.P. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacogen**, v.16, n.4, p.517-24, 2006.
- AGRAWAL, P.K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochem**, v.31, n.10, p.3307-30, 1992.
- CAÑIGUERAL, S. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J Ethnopharm**, v.76, n.1, p.93-8, 2001.
- CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.
- CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Quím Nova**, v.23, n.5, p.680-5, 2000.
- LIMA, M.R.F. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev Bras Farmacogen**, v.16, n.3, p.300-6, 2006.
- MATIDA, A.K. et al. 3-β-O-β-D-glucopyranosilsterol in species of Labiate, Verbenaceae and Apocynaceae. **Anais Assoc Bras Quím**, v.45, n.3, p.147-51, 1996.
- MORS, W.B. Plant natural products active against snake bite the molecular approach. **Phytochem**, v.55, n.6, p.627-42, 2000.
- MOURA, V.M.; SANTIN, S.M. O. Constituintes químicos da erva daninha *Scleria pterota*. **Rev Uningá**, n.7, p.127-36, 2006.
- NASCIMENTO, G.G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**, v.31, p.247-56, 2000.
- OLIVEIRA, F.P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev Bras Farmacogen**, v.16, n.4, p.510-6, 2006.
- POUCHERT, C. J. **The Aldrich Library of Infrared Spectra**. 3^a ed., Aldrich Chemical Company Inc., 1984.
- RATNAYAKE, S. et al. Bioactive Constituents from the Twigs of *Asimina parviflora*. **J Nat Prod**, v.55, n.10, p.1462-7, 1992.

Enviado em: maio de 2008.

Revisado e Aceito: setembro de 2008.

