

Astréa M. Giesbrecht (*)

Adhemar Purchio (*)

Keidi Ujikama (**)

Maria N. S. Ribeiro(***)

RESUMO

Este trabalho trata da determinação da atividade antibiótica dos extratos de *Gnetum paniculatum* e *G. schwackeanum* e dos constituintes químicos isolados deste último como resveratrol, gnetina C e E, os quais foram testados contra várias bactérias e fungos. O extrato de *Gnetum schwackeanum* e todas as substâncias dele isoladas foram ativos a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* e *Mycobacterium smegmatis*. Resveratrol e gnetina C são ativos contra a *Candida albicans*, mas somente gnetina C possui atividade em relação a *Candida parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*. O derivado sintético de gnetina E não mostrou nenhuma atividade. O extrato de *G. paniculatum*, é completamente inativo à bactéria e fungos o que sugere que a atividade de *G. schwackeanum* deve-se à presença dos hidroxiestilbenos e seus derivados, uma vez que *G. paniculatum* não contém esses tipos de substâncias.

INTRODUÇÃO

Algumas plantas possuem um mecanismo de resistência a doenças, baseado, pelo menos em parte, na presença de substâncias fungitóxicas pré-formadas.

Entre as muitas classes de compostos especificamente ligados à resistência ao ataque de microrganismos, estão os hidroxiestilbenos como a pinosilvina (1a) e o resveratrol (1b). Dímeros de resveratrol como a ϵ -viniferina (2) também foram reconhecidos como fitoalexinas de Vitaceae (Langcake & Pryce, 1977).

O estudo fitoquímico do extrato acetônico das sementes de *Gnetum schwackeanum* Taub., gnetácea da Amazônia, revelou a presença de resveratrol (1b), de gnetina C (3) e da gnetina E (4a), respectivamente, dímero e trímero do resveratrol (Lins et al., 1982).

(*) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

(**) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

(***) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, CNPq, Manaus.

Procedeu-se o estudo das propriedades antibióticas do extrato das sementes de *G. schwackeanum* e das substâncias dele isoladas. Ensaiou-se também um derivado semi-sintético, o heptacetato de gnetina E (4b) e um extrato hidroalcoólico de folhas de *Gnetum paniculatum*. Uma triagem química preliminar mostrou que esse extrato não contém resveratrol ou seus derivados.

MATERIAL E MÉTODOS

O material ensaiado consistiu dos extratos *G. schwackeanum* Taub. (sementes) e de *G. paniculatum* Spruce ex Benth. (folhas), resveratrol, gnetina C, gnetina E e do heptacetato de gnetina E, empregando-se como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO) puro ou DMSO 50% em água.

Determinação da Atividade Antibacteriana

Efetou-se o ensaio preliminar da atividade dos ensaios (método de estrias, processo de Mitscher et al., 1972) utilizando-se as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *Mycobacterium smegmatis*. Os extratos e as substâncias puras que mostraram atividade foram depois ensaiadas pelo processo de difusão cavidade-placa (Giesbrecht, 1980).

Como referência foram ensaiados o solvente e uma solução padrão de estreptomicina.

Para todos os ensaios utilizou-se o meio Trypticase-soy agar (DIFCO), incubando-se a 37°C por 24 horas.

Determinação da Atividade Antifúngica

Utilizaram-se os processos difusão cavidade-placa e disco-placa (Grove & Randall, 1955) com os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Aspergillus flavus* e os meios de cultura de Sabouraud ou meio D da British Farmacopeia 1980 (DBP 80). As placas foram incubadas a 25°C por 24h para as leveduras e 48 h para *Aspergillus flavus*.

As concentrações das amostras utilizadas no processo cavidade-placa estão especificadas nas tabelas 1 e 2. No processo disco-placa, as quantidades usadas por disco foram: 1000 mcg no caso dos extratos e do acetato de gnetina E; 50 mcg para resveratrol e 200 mcg para gnetina E.

Como referência ensaiaram-se soluções de ácido salicílico de concentração conhecida (200, 400 e 1000 mcg/disco).

RESULTADOS

Os resultados dos ensaios para verificar a presença de atividade antibacteriana estão apresentados na tabela 1. Verificou-se que o extrato das sementes, o resveratrol e as gnetinas C e D são ativos contra *S. aureus*, *S. epidermis* e *M. smegmatis*. O derivado sintético e o extrato de *G. paniculatum* são completamente inativos. Nenhuma das amos

tras mostrou-se ativa contra *K. pneumoniae* e *S. gallinarum*.

Quanto aos resultados dos ensaios contra *S. cerevisiae* e *A. flavus* pelo processo disco-placa, verificou-se que nenhuma das amostras foi ativa nas concentrações ensaiadas, tanto no meio Sabouraud quanto no meio D.

O ácido salicílico só mostrou atividade a partir de 400 mcg/disco.

Os resultados desses ensaios pelo processo difusão cavidade-placa contra *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* estão apresentados na tabela 2. Verificou-se que o resveratrol, o extrato de *G. schwackeanum* e a gnetina C inibem o crescimento de *C. albicans* mas apenas a última substância mostrou atividade contra *S. cerevisiae* e *C. parapsilosis*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Todas as substâncias naturais mostraram atividades antibacterianas comparáveis, mas acetilação dos grupos fenólicos no caso da gnetina E aboliu completamente essa atividade.

O resveratrol embora considerado como uma fitoalexina (Harborne, 1977) somente mostrou atividade antifúngica contra *C. albicans*.

A gnetina C foi ativa contra as duas espécies de *Candida* e inibiu o crescimento de *S. cerevisiae* na concentração de 1 mg/ml no processo cavidade-placa. Esta atividade foi comparável à do ácido salicílico na concentração 20 mg/ml, porém no processo disco-placa não produziu nenhuma inibição nem na proporção de 1/8 do padrão. Este fato poderia ser explicado pela pequena solubilidade e difusibilidade, no meio de cultura aquoso da substância quando em estado sólido no disco. Talvez isto também explicasse o fato de não ser ativa contra *A. flavus* que foi ensaiado apenas pelo processo de difusão disco-placa.

Parece que pelo menos em relação à atividade antifúngica, a atividade inibitória, aumenta do resveratrol ao seu dímero gnetina C, sendo abolida no caso do trímero gnetina E. O fato do extrato de *G. paniculatum* não conter hidroxiestilbenos ou seus derivados e ser completamente inativo, sugere que no caso do *G. schwackeanum*, a atividade demonstrada deve-se à presença desse tipo de substâncias naturais.

SUMMARY

The antibiotic activities of extracts of *Gnetum paniculatum* and *G. schwackeanum* and of substances isolated from the latter plant, namely resveratrol, gnetin C and gnetin E were tested against several bacteria and fungi. The extract and all the substances isolated from *Gnetum schwackeanum* were active toward *S. aureus*, *S. apidermis* and *M. smegmatis*. Gnetin C and resveratrol showed activity against *C. albicans* but only gnetin C was active toward *C. parapsilosis* and *S. cerevisiae*.

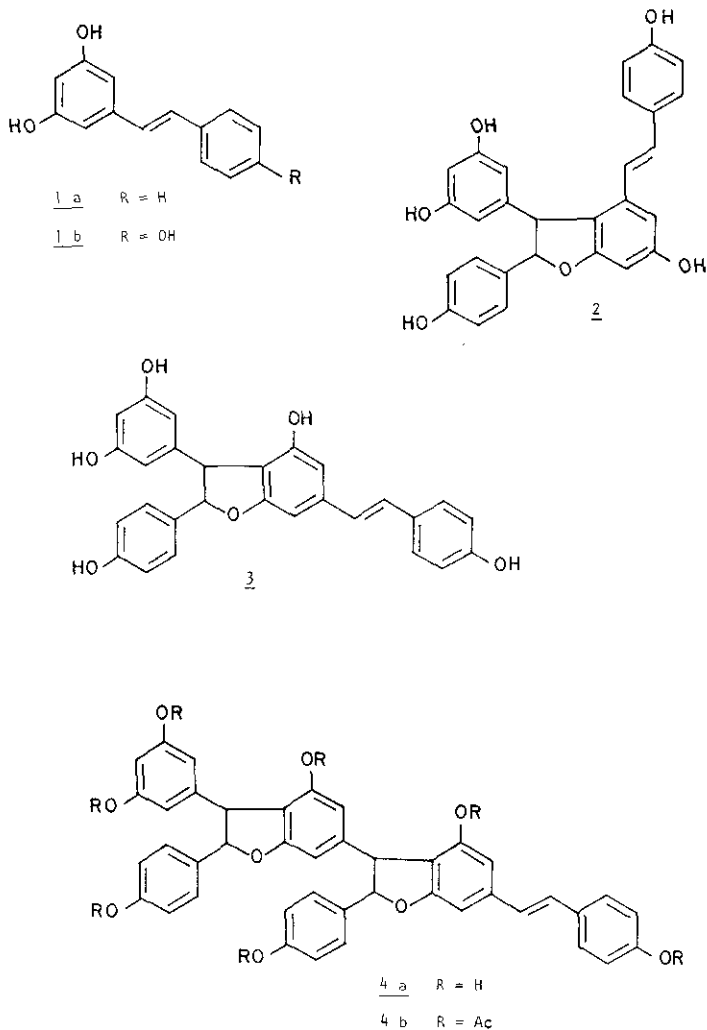


Tabela 1 - Atividade antibacteriana dos extratos e das substâncias.

Material	mg/ml	Atividade		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>G. schwackeanum</i>	10	16	14	20
<i>G. paniculatum</i>	10	-	-	-
Resveratrol	1	12	12	12
Gnetina C	1	20	20	15
Gnetina E	1	15	15	9
Acetato de gnetina E	2	-	-	-
DMSO 100%	-	-	-	-
Estreptomicina	1	20	25	30

Os números indicam o diâmetro do halo de inibição em mm.

0 sinal negativo indica ausência de atividade.

Tabela 2 - Atividade antifúngica dos extratos e das substâncias pelo processo de difusão cavidade-placa.

Material	mg/ml	Atividade		
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>G. schwackeanum</i>	10	-	14	-
<i>G. paniculatum</i>	10	-	-	-
Resveratrol	1	-	20	-
Gnetina C	1	12	14	9
Gnetina E	2	-	-	-
Acetato de gnetina E	10	-	-	-
Ácido salicílico	5	-	-	-
Ácido salicílico	10	9	-	-
Ácido salicílico	20	12	-	-
DMSO 100%		-	-	-
DMSO 50%		-	-	-

Referências bibliográficas

- Grove, D. C. & Randall, W. S. - 1955. Assay Methods of Antibiotics. New York, Medical Encyclopedia, 320 p.
- Giesbrecht, A. M. - 1980. **Atividade Antibiótica de Produtos Naturais**. São Paulo. Tese de Livre-Docência, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de S. Paulo, 64p.
- Harborne, J. B. - 1977. Introduction to Ecological Biochemistry, London, Academic Press.
- Langcake, P. & Pryce, R. J. - 1977. A New Class of Phytoalexins from Grapevines. **Experientia**, 33, 151-152.
- Lins, A. P.; Ribeiro, M. N. S.; Gottlieb, O. R.; Gottlieb, H. E. - 1982. Gnetins: Resveratrol oligomers from Gnetum species. **J. Nat. Prod.**, 45, 754-757.
- Mitscher, L. A.; Leu, R. P.; Bathala, M. S.; Wu, W. N.; Beal, J. L. - 1972. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction rationale and methodology. **Lloydia**, 37, 157-166.