

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA DAS FOLHAS DE *Ficus
benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (MIQ.) MIQ.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ritiel Corrêa da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA DAS FOLHAS DE *Ficus
benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (MIQ.) MIQ.**

Ritiel Corrêa da Cruz

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Farmacognosia, Fitoquímica e Farmacologia de Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA
DAS FOLHAS DE *Ficus benjamina* L. e
Ficus luschnathiana (MIQ.) MIQ.**

elaborada por
Ritiel Corrêa da Cruz

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Margareth Linde Athayde, Dr.
(Presidente/Orientador)

Cibele Rosa Gracioli (Unipampa)

Sydney Hartz Alves (UFSM)

Santa Maria, 15 de abril de 2011.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e servidores, que há anos vêm me abrindo portas e proporcionando crescimento pessoal e profissional sob as mais diversas formas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus membros, pela oportunidade, experiência e conhecimentos que me foram oferecidos.

A Prof. Dr^a. Margareth Linde Athayde, pela acolhida, orientação, esclarecimentos, ideias e incentivo, bem como a amizade, elementos sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos professores Dr. Solon Jonas Longhi e Dr^a. Cibele Gracioli pelas sugestões, opiniões e material bibliográfico e vegetal fornecido.

A Prof. Dr^a Marli Matiko Anraku de Campos, pelas análises microbiológicas, sugestões e suporte oferecido.

Ao biólogo Alessandro Abreu Favero pela grande ajuda com a parte teórica referente às plantas, e pela coleta e identificação do material vegetal.

Aos colegas, pós-graduandos e estagiários de iniciação científica, do Laboratório de Fitoquímica pela amizade e pela colaboração oferecida sob as mais diversas formas.

Aos meus pais, pelo suporte material e emocional proporcionado, e pela educação e valores transmitidos, que dentre tantas coisas boas me conduziram até esta dissertação.

As demais pessoas, não citadas, que de uma forma ou outra contribuíram para a execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DAS FOLHAS DE *Ficus benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (MIQ.) MIQ.

AUTOR: RITIEL CORRÊA DA CRUZ
ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 15 de abril de 2011.

A seguinte dissertação apresenta uma avaliação da atividade antimicobacteriana (frente à *Mycobacterium smegmatis*) de extratos, frações e substâncias fenólicas presentes nas folhas de *Ficus benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., juntamente com uma estimativa do teor de polifenóis totais e a quantificação de alguns destes compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O doseamento de polifenóis (método de Folin-Ciocalteu) revelou que os extratos brutos e as frações mais polares destes extratos (acetato de etila e *n*-butanol) são bastante providos de substâncias fenólicas, ainda que este teor não esteja diretamente relacionado à atividade antimicobacteriana. A avaliação desta atividade biológica foi realizada por método de microdiluição em caldo, que fornece a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos, frações e substâncias testadas. Uma boa atividade inibitória foi constatada para a fração butanólica de *F. luschnathiana* (MIC = 156,25 µg/mL) e para a fração acetato de etila de *F. benjamina* (MIC = 312,50 µg/mL). Entretanto, não foi possível correlacionar estes bons resultados a compostos em específico, visto que por dificuldades técnicas não foi realizado o isolamento de substâncias destas frações; e dos polifenóis pesquisados, somente a quercetina foi encontrada na fração butanólica. Esta por sua vez apresentou fraca atividade inibitória sobre *M. smegmatis* (MIC = 625,00 µg/mL), inferior a própria fração. Outros padrões investigados e que foram encontrados nos extratos e frações (ácidos cafeico e clorogênico, rutina e canferol), também apresentaram fraca atividade antimicobacteriana. Desta forma, a boa atividade inibitória das frações citadas acima possivelmente não se deve a estes polifenóis, ainda que possa estar relacionada a substâncias de natureza semelhante. Diversos polifenóis, como os flavonóides, têm sido reportados como inibidores do crescimento de micobactérias, de forma que também se pode concluir que as características estruturais da quercetina, rutina e canferol não favoreçam esta atividade biológica aqui apresentada.

Palavras-chave: *Ficus benjamina*; *Ficus luschnathiana*; *Mycobacterium smegmatis*; polifenóis; flavonóides; CLAE

ABSTRACT

Mastery Degree Dissertation
Pharmaceutical Sciences Post-Graduation Program
Federal University of Santa Maria

PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY FROM THE LEAVES OF *Ficus benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (MIQ.) MIQ.

AUTHOR: RITIEL CORRÊA DA CRUZ

ADVISER: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Place and Date of Defense: Santa Maria, 15 de abril de 2011.

The following work presents an evaluation of the antimycobacterial activity (against *Mycobacterium smegmatis*) of the extracts, fractions and some phenolic compounds present in the leaves of *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., along with an estimation of the total phenolic content and the quantification of some of these compounds by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The phenolic estimation (Folin-Ciocalteu method) revealed that the crude extracts and the high polarity fractions from these extracts (ethyl acetate and *n*-butanol) are rich in polyphenols, although, its amount are not directly related to the antimycobacterial activity. The evaluation of this biological activity was performed by broth microdilution method, furnishing the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts, fractions and tested compounds. The better biological activity was verified with butanolic fraction from *F. luschnathiana* (MIC = 156,25 µg/mL) and ethyl acetate fraction from *F. benjamina* (MIC = 312,50 µg/mL). However, the correlation of these good results with specific compounds was not possible, since technical difficulties prevented the isolation of substances from these fractions; and concerning the screened polyphenols only quercetin was encountered in butanolic fraction. In addition, quercetin exerted weak antimycobacterial activity against *M. smegmatis* (MIC = 625,00 µg/mL), much weaker than that observed for the fraction. The other investigated standards that were encountered in the extracts and fractions (caffeic and chlorogenic acids, rutin and kaempferol), also exhibited weak inhibitory effect. Thus, the good antimycobacterial activity observed for the fractions above mentioned are probably not related to these phenolics, still it may be related to compounds of the same nature. Many polyphenols, such as flavonoids, have been reported as mycobacterial growth inhibitors, thus it is also possible to conclude that the structural characteristics of quercetin, rutin and kaempferol do not support the biological activity studied.

Keywords: *Ficus benjamina*; *Ficus luschnathiana*; *Mycobacterium smegmatis*; polyphenols; flavonoids; HPLC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de flavonóides totais.....44

Dentro da seção 4 (manuscrito):

Table 1 - Total phenolic content of crude extracts and fractions.....34

Table 2 - MIC of the extracts and fractions of *F. benjamina* and *F. luschnathiana* against *M. smegmatis*.....35

Table 3 - HPLC-DAD phenolics screening and its quantification, in crude extracts and fractions of *F. benjamina* and *F. luschnathiana*.....36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Ficus benjamina</i> L. – Aspecto geral.....	13
Figura 2 – Ramo e folhas de <i>Ficus benjamina</i> L.....	14
Figura 3 – Compostos novos isolados de <i>F. benjamina</i>	16
Figura 4 – Isolados de <i>F. bejnamina</i>	17
Figura 5 – <i>Ficus luschnathiana</i> (Miq.) Miq.....	18
Figura 6 – Estrutura geral dos flavonóides.....	45
Figura 7 – Quercetina (A), canferol (B) e rutina (C).....	46
Figura 8 - Estrutura geral de flavonóis (A) e flavanonóis ou di-hidroflavonóis (B)..	46
Figura 9 - Estrutura geral de flavonas (A), flavanonas (B) e isoflavonas (C).....	47
Figura 10 – Estrutura geral das chalconas.....	48
Dentro da seção 4 (manuscrito):	
Figure 1 - HPLC profile of <i>F. luschnathiana</i>	37
Figure 2 - HPLC profile of <i>F. benjamina</i>	38

LISTA DE REDUÇÕES

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês acquired immunodeficiency syndrome

CCD - Cromatografia em camada delgada

CE - Crude extract

CFU - Colony-forming unity

CG-EM - Cromatografia gasosa - Espectrometria de massas

CIM - Concentração inibitória mínima

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO - Dimetilsulfóxido

EtOH - Etanol

GAE - Gallic acid equivalent

HIV - Vírus da imunodeficiência humana, do inglês Human immunodeficiency virus

HPLC - High-performance liquid chromatography, o mesmo que CLAE

HPLC-DAD - High-performance liquid chromatography - Diode-array detector

MeOH - Metanol

MIC - Minimum inhibitory concentration, o mesmo que CIM

MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

OADC - Oleic acid-albumin-dextrose-catalase

OMS - Organização Mundial de Saúde

TB - Tuberculose

TLC - Thin layer chromatography, o mesmo que CCD

UV - Ultravioleta

WHO - World Health Organization, o mesmo que OMS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 <i>Ficus benjamina</i>	13
3.2 <i>Ficus luschnathiana</i>	17
3.3 Atividades biológicas e atividade antimicrobiana em plantas do gênero <i>Ficus</i>	18
3.4 Atividade antimicobacteriana em plantas do gênero <i>Ficus</i>	20
4 MANUSCRITO.....	24
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), doença infecciosa há muito conhecida e cujo principal agente etiológico é o microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*, é hoje um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Em dados de 2007, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima em 1,3 milhões as mortes causadas por TB no mundo em pacientes HIV (vírus da imunodeficiência humana)-negativo. Apesar do crescimento em termos absoluto de novos casos de TB, as taxas de incidência per capita já estão em lento decréscimo, ainda que dificultado por fatores como o crescimento populacional acelerado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Nas últimas décadas a propagação da doença teve grande impulso junto ao crescimento no número de indivíduos de alguma forma imunodeficientes. O principal grupo destes tem sido os doentes da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HANEKOM et al., 2010). A OMS estima que em 2007, 14,8% dos novos casos de TB no mundo estavam associados a portadores do vírus HIV, e resultaram em aproximadamente 23% das mortes atribuídas a AIDS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento da enfermidade já estão no mercado há décadas e se mostraram bastante eficientes. Entretanto cada vez mais os microrganismos estão se adaptando e desenvolvendo mecanismos de resistência de forma que novas alternativas terapêuticas se fazem necessário (PAULI et al., 2005). Uma das linhas de pesquisas nesta busca é, a que investiga as plantas e seus metabólitos secundários. Apesar de poucos antibióticos serem de origem vegetal, as plantas são reservatório natural de grande parte das substâncias atualmente comercializadas como medicamentos para as mais diversas finalidades, e têm demonstrado ser uma fonte em potencial para a obtenção de novos fármacos com atividade sobre micobactérias (COPP, 2003; NEGI et al., 2010).

A pesquisa *in vitro* de atividade antimicobacteriana de extratos vegetais ou substâncias isoladas pode ser considerada a primeira etapa no desenvolvimento de novos medicamentos, seja na forma de fitoterápico ou um princípio ativo único. Diversos métodos têm sido utilizados nas avaliações *in vitro*, destacando-se os

métodos de microdiluição em caldo, pela facilidade e confiabilidade (MCGAW et al., 2008).

Diferentes microrganismos podem ser utilizados para se avaliar a capacidade antimicobacteriana de extratos e isolados vegetais. O mais apropriado é certamente o *M. tuberculosis*, porém, este é de difícil manejo e de crescimento lento, desta forma para fins de triagem pode ser mais cômodo utilizar microrganismos de crescimento rápido e de menor periculosidade. Dentre estes se destaca o *Mycobacterium smegmatis*, que tem sido largamente utilizado, devido às características de crescimento rápido e de menor infectividade, bem como por apresentar similaridade genética e um perfil de sensibilidade semelhante ao *M. tuberculosis*, dessa forma sendo adequado a testes prospectivos de atividade (MITSCHER; BAKER, 1998; MCGAW et al., 2008).

Além disso, algumas micobactérias não-tuberculosas utilizadas em testes preditivos fazem parte do chamado grupo de microrganismos “oportunistas”, podendo causar infecções graves em indivíduos imunocomprometidos, e que muitas vezes possuem uma resistência intrínseca maior aos antibióticos clássicos (FONSECA et al., 2008). Tal situação ainda é recorrente em várias partes do mundo onde os serviços médico-hospitalares são precários (COOK, 2010). Desta forma todo conhecimento e novas possibilidades terapêuticas para combater tais microrganismos são válidos, visto que estes também podem rapidamente desenvolver mecanismos de resistência quando submetidos à antibioticoterapia tradicional.

Nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado extratos e substâncias isoladas de espécies do gênero *Ficus* com atividade inibitória sobre micobactérias (ANTOUN et al., 2001; ELDEEN; STADEN, 2007; KUETE et al., 2008; RAMOS et al., 2008). Estes resultados promissores estimularam o estudo apresentado nesta dissertação, com as figueiras *Ficus benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq.

A presente dissertação apresenta seus resultados na forma de artigo científico, sendo este formatado de acordo com o periódico ao qual foi submetido. Também é apresentado um item de discussão geral com alguns resultados não publicados e considerações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um estudo químico das folhas das espécies *Ficus benjamina* L. e *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq., a fim de se conhecer parte de seus metabólitos secundários e avaliar a atividade antimicobacteriana destas plantas.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Fracionar os extratos brutos através de métodos de extração orgânica e cromatografia em coluna a fim de se testar a atividade das frações obtidas;
- b) estimar o total de compostos fenólicos nos extratos e frações;
- c) avaliar a presença de compostos fenólicos nos extratos e frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e quantificá-los se presentes;
- d) avaliar a atividade antimicobacteriana frente à *Mycobacterium smegmatis*, no intuito de direcionar o estudo químico às frações mais ativas;
- e) avaliar a atividade antimicobacteriana dos padrões das substâncias fenólicas pesquisadas por CLAE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Ficus benjamina*

Ficus benjamina L. (Figura 1), é uma espécie exótica, natural da Ásia e Oceania, amplamente utilizada para ornamentação de ambientes urbanos, é conhecida popularmente por figueira ou fico-chorão. Planta da família Moraceae, apresenta o látex característico, nas folhas e caules. Como característica deste gênero, desenvolve-se bem em regiões de clima tropical e subtropical (CARAUTA; DIAZ, 2002; JOLY, 2005).



Figura 1 – *Ficus benjamina* L. – Aspecto geral.

Caracteriza-se por possuir uma copa de grande porte, porém seus ramos são pêndulos e podem vir a tocar o solo. É uma árvore de crescimento moderado e em

condições naturais, pode chegar a 30 metros de altura. O caule é acinzentado e possui uma casca áspera e ferrugínea. Suas folhas (Figura 2) são perenes, pequenas e de coloração verde. Suas raízes agressivas e superficiais chamam a atenção, e podem rachar pavimentos. (CARAUTA; DIAZ, 2002).



Figura 2 – Ramo e folhas de *Ficus benjamina* L.
Reproduzido de Plant This (2010)

Em suas regiões de origem o *F. benjamina* é utilizado tradicionalmente como estomáquico, hipotensor e antidiarreico, também há relatos de uso para problemas respiratórios e afecções de pele (MOUSA et al., 1994; ALMAHY et al., 2003). Alguns estudos já foram conduzidos no intuito de se avaliar atividades biológicas e

identificar metabólitos secundários ativos na planta, e serão comentados a seguir, entretanto, até o momento não há relato de avaliação de sua atividade antimicobacteriana.

Mousa e colaboradores (1994) pesquisaram diferentes atividades biológicas para o extrato bruto dos frutos de *F. benjamina*. Este apresentou atividade antimicrobiana considerável frente a bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Escherichia coli*, porém o extrato não se mostrou ativo contra fungos e nem contra o *Mycobacterium fortuitum*, utilizados no ensaio de disco-difusão. No mesmo estudo, o extrato bruto dos frutos não demonstrou toxicidade no teste preliminar realizado com o crustáceo *Artemia salina*, mas apresentou atividade antitumoral, inibindo os tumores induzidos por *Agrobacterium tumefaciens* no ensaio de disco de batata. Também foi avaliada a capacidade do extrato de antagonizar o cálcio, em modelo experimental, onde não se verificou inibição da captura de cálcio por células GH₄C₁ expostas ao extrato.

Almahy e colaboradores (2003) relatam a presença de diferentes metabólitos secundários nas folhas, cascas e frutos de *F. benjamina*. Do extrato clorofórmico das folhas foi isolado o ácido cinâmico, já do extrato metanólico os autores isolaram os flavonóides naringenina e quercetina bem como o ácido cafeico. O fitoesteróide estigmasterol foi também isolado, a partir do extrato clorofórmico das cascas. A naringenina e a quercetina apresentaram considerável atividade antibacteriana, frente à *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, já o ácido cafeico foi o único isolado a se destacar pela atividade citotóxica determinada com linfócitos T linfoblásticos (leucemia) (CI₅₀ = 25 mg/mL, concentração necessária para inibir 50 % do crescimento dos linfócitos T).

A atividade antimicrobiana de *F. benjamina* também foi estudada, com relação às folhas, por Reschke e colaboradores (2007). A técnica de macrodiluição em caldo revelou os melhores resultados para o extrato etanólico das folhas adultas da planta frente às bactérias patogênicas *P. aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* (concentrações inibitórias mínimas – CIM = 256 µg/mL), e *S. aureus* (CIM = 512 µg/mL).

Mais recentemente, novas estruturas foram isoladas e elucidadas a partir de extratos de baixa polaridade de *F. benjamina*. Parveen e colaboradores (2009a) isolaram e caracterizaram um novo triterpeno (Figura 3), denominado como *serrat-3-one*, a partir do extrato clorofórmico das folhas. Também é relatado o isolamento

dos compostos decanoato de pentacontanila (Figura 4), friedelina e β -sitosterol. No mesmo estudo foi avaliada a atividade antinociceptiva do extrato alcoólico das folhas, com resultados semelhantes aos obtidos com o fármaco padrão (pentazocina).

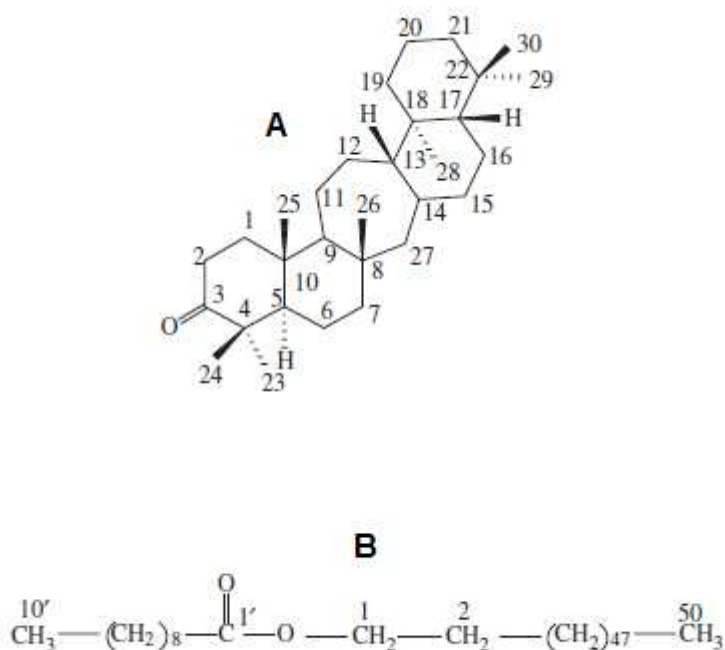


Figura 3 – Compostos novos isolados de *F. benjamina*.

A: *Serrat-3-one*; B: Decanoato de pentacontanila.

Reproduzido de Parveen e colaboradores (2009a).

O mesmo grupo do trabalho anterior também descreve o isolamento de um triterpeno já conhecido, a β -amirina, bem como de um novo ácido triterpênico ((9,11), (18,19)-disecoolean-12-en-28-oic acid, Figura 4). Este último apresentou atividade antimicrobiana contra *Salmonella thyphimurium*, *Candida albicans*, *S. aureus* e *E. coli* (PARVEEN et al., 2009b).

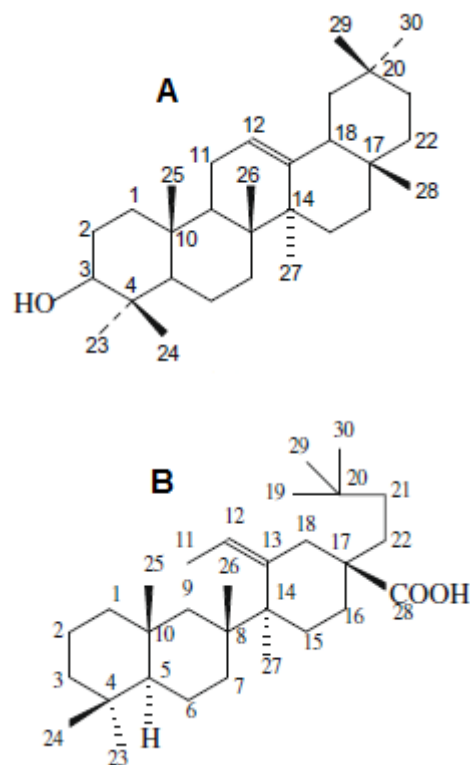


Figura 4 – Isolados de *F. bejnamina*.

A: β -amirina; B: (9,11), (18,19)-disecoolean-12-en-28-oic acid.

Reproduzido de Parveen e colaboradores (2009b).

3.2 *Ficus luschnathiana*

Ficus luschnathiana (Miq.) Miq. (Figura 5) é uma espécie da família Moraceae, nativa do Uruguai, Argentina, Paraguai e sul do Brasil (do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro), conhecida por figueira-do-mato ou figueira-mata-pau, dentre uma rica sinonímia popular (MARCHIORI, 1997). Como sendo parte da flora nativa do estado, a espécie é protegida de corte, de acordo com o artigo 33 do capítulo III, do Código Florestal do Estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 1992)

Caracteriza-se por ser uma árvore de grande porte (até 30 m), latescente, com tronco de casca lisa e copa que se estende horizontalmente, à semelhança de uma grande sombrinha. Desenvolve-se com frequência sobre o tronco de outras árvores, acabando por estrangulá-las (constrictora) (MARCHIORI, 1997).

Até o presente momento não há registro, ou casos de possível uso medicinal. Na literatura científica não há relatos envolvendo possíveis atividades biológicas de

extratos e preparados de *F. luschnathiana*. Também não foi encontrada nenhuma referência ou publicação relatando estudos fitoquímicos com a planta, mesmo para testes mais preliminares para metabólitos secundários mais comuns.



Figura 5 – *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq.
Reproduzido de Uruguay's wildlife & Natural sanctuaries (2006)

3.3 Atividades biológicas e atividade antimicrobiana em plantas do gênero *Ficus*

Carauta e Diaz (2002) comentam que há séculos diversas figueiras têm sido utilizadas com fins medicinais e que o volume de referências a elas na literatura é bastante extenso. O potencial farmacológico de espécies de figueiras pode ser visualizado pelo nome de um dos subgêneros de *Ficus*, o *Pharmacosycea*. No Brasil, o látex de figueiras deste subgênero tem sido utilizado principalmente como vermífugo pelos indígenas pré-colombianos e mais tarde por brasileiros em geral. O

Ficus adhatodifolia Schott exemplifica esta situação, sendo seu nome vulgar figueira-vermífuga.

Diversas atividades biológicas têm sido estudadas e relatadas com relação a diferentes espécies de figueiras, Lansky e colaboradores (2008) elaboraram uma extensa revisão demonstrando o potencial destas plantas como agentes antitumorais e antiinflamatórios. Também há estudos relativos às atividades antiulcerogênica (RAO et al., 2008), antifúngica (MAVLONOV et al., 2008; KUETE et al., 2009), antiviral (MAREGESI et al., 2008), antioxidante e de neutralização de radicais livres (SHUKLA et al., 2004; AO et al., 2008; ABDEL-HAMEED, 2009; PANDE; AKOH, 2010; OLIVEIRA et al., 2010) de figueiras de diferentes regiões do mundo.

Já um pouco mais relacionado com a atividade biológica apresentada nesta dissertação esta a atividade antibacteriana, frente a microrganismos gram-positivos e gram-negativos em geral. E neste caso também há espécies de *Ficus* apresentando bons resultados, como demonstram os estudos comentados a seguir.

Koné e colaboradores (2004) apresentaram os resultados de um estudo de atividade antibacteriana, em larga escala, com 50 espécies de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população da Costa do Marfim. Neste estudo 10 extratos de diferentes plantas se destacaram pela capacidade inibitória sobre diversas bactérias patogênicas, entre elas o *Ficus thonningii*. O extrato etanólico das folhas desta figueira demonstrou atividade inibitória sobre as bactérias testadas, tanto as cepas padrão quanto isolados clínicos resistentes a antibióticos.

Em estudo de triagem com 30 espécies de plantas medicinais da flora do Iêmen, Al Fatimi e colaboradores (2007) demonstraram ser o *Ficus vasta* uma das espécies mais promissoras em relação a sua atividade antibacteriana. Em teste de disco-difusão, discos impregnados com o extrato metanólico dos frutos da planta na concentração de 2 mg/mL apresentaram grandes halos de inibição sobre o crescimento das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. De forma oposta, o extrato diclorometano não se mostrou ativo, evidenciando que compostos de caráter mais polar estão relacionados aos melhores resultados obtidos.

Ao e colaboradores (2008) avaliaram atividade antioxidante e antibacteriana de *Ficus microcarpa*. O extrato bruto (metanólico) das cascas se mostrou bastante ativo frente a *E. coli* e algumas bactérias gram-positivas. Os extratos dos frutos e

folhas também apresentaram atividade, mas em intensidade bem menor. O teste foi realizado por método de disco-difusão, com os discos contendo 400 µg de extrato.

Mais recentemente Kuete e colaboradores (2009) obtiveram bons resultados de atividade antibacteriana com a espécie *Ficus ovata*. O extrato metanólico das cascas se mostrou ativo contra todas as bactérias testadas, especialmente *Enterococcus faecalis* (CIM = 156 µg/mL). O fracionamento deste extrato por cromatografia em coluna com sílica-gel forneceu seis frações, e destas, a fração obtida com uma mistura de 25% de hexano e 75% de acetato de etila reteve a atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos, e apresentando grande atividade inibitória contra *S. aureus* (CIM = 39 µg/mL). A mesma técnica cromatográfica propiciou o isolamento de diferentes substâncias (triterpenos e compostos fenólicos), estes isolados também foram testados e a isoflavona hidroxiisoprunitina foi o composto mais ativo.

Como se pode perceber, uma breve pesquisa na literatura científica revela que a maior parte das publicações relatando diferentes propriedades biológicas e estudos de composição química de figueiras se referem a espécies nativas da Ásia e África. Isto ocorre por diferentes motivos, esses continentes são, respectivamente, os que mais possuem espécies nativas de *Ficus*, além disso, é grande a utilização destas plantas por suas populações autóctones, o que facilita na orientação dos estudos etnofarmacológicos, com bons resultados, corroborando o uso popular. Estes fatos estimulam o desenvolvimento de pesquisas com espécies nativas da rica flora brasileira, visando não somente o látex das figueiras, mas também outras de suas partes, como as folhas de *F. luschnathiana*, parte desta dissertação.

3.4 Atividade antimicobacteriana em plantas do gênero *Ficus*

A atividade antimicobacteriana tem sido avaliada em extratos, frações e isolados de diferentes partes de diversas figueiras, em vários casos com resultados bastante promissores, corroborando o uso popular para afecções respiratórias como também indicando uma fonte para futuras pesquisas visando o desenvolvimento de novos agentes contra micobactérias. Estes testes podem ser realizados com o próprio *M. tuberculosis*, bem como com outras espécies de micobactérias, como o

M. smegmatis, por diferentes métodos *in vitro* bem estabelecidos e descritos. Nos parágrafos posteriores seguem alguns exemplos.

Em um estudo de triagem de atividade antimicobacteriana da flora portorriquenha, Antoun e colaboradores (2001) constataram que das 50 espécies de plantas investigadas somente duas exibiram atividade inibitória sobre o *M. tuberculosis*. Para serem considerados ativos, os extratos etanólicos – na concentração de 100 µg/mL – deveriam apresentar no mínimo 85% de inibição do crescimento microbiano, no método automatizado de radioespirometria (BACTEC 460). Dentre as espécies ativas está o *Ficus citrifolia*, cujo extrato das folhas exerceu 91% de inibição do crescimento microbiano.

Eldeen e Staden (2007) testaram a atividade antimicobacteriana de diversas espécies nativas da África do Sul as quais há relatos de uso popular, entre elas o *Ficus sur*. O método utilizado foi a microdiluição em caldo, permitindo assim o cálculo da CIM e o teste foi realizado com o *Mycobacterium aurum* A+. Nessas condições o melhor valor de CIM obtido para o *F. sur* foi com o extrato acetato de etila das raízes da planta (78 µg/ml) seguido do extrato acetato de etila das folhas (195 µg/ml). Os extratos etanólicos das folhas, cascas e raízes apresentaram baixa atividade (inibição do crescimento somente com altas concentrações) e os extratos diclorometano não foram ativos na maior concentração testada.

De forma semelhante ao relatado no artigo anterior, Ao e colaboradores (2008) obtiveram atividade inibitória sobre o *Mycobacterium avium* somente com a fração acetato de etila, obtida por partição líquido-líquido do extrato metanólico das cascas de *Ficus microcarpa*. O extrato metanólico e as frações hexano e água não exibiram atividade. Contudo este é um resultado bastante preliminar, visto que o teste foi realizado por método de disco-difusão e o halo de inibição obtido com a fração foi bem menor do que o halo do antibiótico padrão (ampicilina). Ainda assim, o estudo contribuiu com uma caracterização química da fração, quantificando o total de polifenóis (436,21 mg de ácido gálico por g de fração seca) e identificando tais compostos, como sendo a vanilina, o vinilguaiacol, o catecol entre diversos outros fenóis. Desta forma é possível que essas substâncias isoladamente e/ou em maior concentração do que contido na fração possam proporcionar melhor atividade antimicobacteriana do que a fração em si.

A investigação do potencial antimicobacteriana de extratos e compostos de figueiras nativas do Brasil também vem sendo realizada. Ramos e colaboradores

(2008) testaram a atividade de 36 extratos etanólicos de plantas da Mata Atlântica brasileira. O ensaio foi realizado com o *M. tuberculosis* e com o *Mycobacterium kansasii*, uma micobactéria não-tuberculosa, porém patogênica, que causa infecções em indivíduos imunologicamente debilitados. Dentre as 36 espécies vegetais avaliadas encontra-se o *Ficus gomelleria*, o extrato desta figueira foi ativo contra *M. kansasii*, apresentando uma CIM de 50 µg/mL, entretanto não exerceu atividade sobre *M. tuberculosis* na maior concentração testada (100 µg/mL).

O *F. gomelleria* também foi avaliado frente a outras duas micobactérias não tuberculosas por Fonseca e colaboradores (2008). O extrato bruto da planta não exerceu atividade contra *M. fortuitum*, porém se mostrou ativo contra o *Mycobacterium malmoense*, com CIM determinado como sendo 100 µg/mL.

Kuete e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos e de substâncias isoladas de *Ficus chlamydocarpa* e de *Ficus cordata*, duas figueiras de uso medicinal na África. A análise microbiológica foi realizada com *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, e este último se mostrou levemente mais suscetível aos produtos naturais do que o agente da tuberculose, mas ainda assim com um perfil de resistência bastante semelhante. Quanto aos resultados, o extrato mais ativo foi o de *F. cordata*, CIM = 39,06 µg/mL para as duas micobactérias, mas de forma oposta, os flavonóides isolados de *F. chlamydocarpa* exibiram melhor atividade. As isoflavonas alpinum-isoflavona, genisteína e laburnetina exibiram CIMs variando entre 0,61 a 19,53 µg/mL frente a *M. smegmatis* e de 4,88 a 19,53 µg/mL frente a *M. tuberculosis*, seguidas da flavona luteolina (78,12 µg/mL para as duas micobactérias).

Mais recentemente Chen e colaboradores (2010) demonstraram o potencial antimicobacteriano de substâncias isoladas de *Ficus nervosa*, partindo de um estudo prévio, em que o extrato das raízes da planta já havia apresentado atividade. O extrato metanólico, após ser concentrado, foi particionado com água e acetato de etila, e desta última porção, através de técnicas cromatográficas realizou-se o isolamento de diversas substâncias. Estes isolados foram submetidos à avaliação de atividade frente a *M. tuberculosis*, e das 24 diferentes substâncias testadas, os melhores resultados, em geral, foram obtidos com flavonóides. A flavanona naringenina apresentou maior atividade (CIM ≤ 2,8 µg/mL), seguida das isoflavonas prunetina (CIM = 30 µg/mL) e genisteína (CIM = 35 µg/mL). A exceção aos

flavonóides foi o piranocumarina *3-hydroxyxanthyletin*, pela primeira vez isolada e caracterizada, este composto exibiu concentração inibitória mínima de 16 µg/mL.

A exemplo de outras atividades biológicas já relatadas, os estudos envolvendo atividade antimicobacteriana ainda, em sua maior parte têm sido realizados com figueiras africanas e asiáticas. Muitas espécies destas regiões são utilizadas popularmente para afecções respiratórias e permitem um estudo mais direcionado a isolamento e elucidação de estruturas responsáveis pelas propriedades, como no estudo de Kuate e colaboradores (2008). Outra abordagem utilizada em pesquisas fitoquímicas e de atividade biológica são os estudos de triagem com diversas espécies de plantas, escolhidas por algum critério, como no caso de Ramos e colaboradores (2008), onde a investigação de plantas da Mata Atlântica levou a um dos primeiros registros de atividade antimicobacteriana para uma figueira do Brasil.

4 MANUSCRITO

Esta seção compreende o manuscrito redigido com os principais resultados obtidos no trabalho, bem como acompanhado de sua introdução, materiais e métodos, discussão, conclusão e referências. O manuscrito é apresentado e formatado na forma requerida pelo periódico ao qual foi submetido, o *Natural Product Research*. O Anexo A desta dissertação apresenta a carta de submissão do manuscrito.

RESEARCH ARTICLE***In vitro* antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. leaves**

Ritiel Corrêa da Cruz¹, Vanessa Agertt², Aline Augusti Boligon¹, Vanessa Janovik¹, Marli Matiko Anraku de Campos², Dominique Guillaume³, Margareth Linde Athayde^{1*}.

¹*Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;* ²*Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;* ³*Medicinal Chemistry Department, Université de Reims-Champagne Ardenne, Reims, France.*

*Corresponding author: margareth@smail.ufsm.br

Phytochemical Research Laboratory at Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, room 1115, Santa Maria, RS, ZIP Code 91105-900, Brazil

***In vitro* antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. leaves**

Total phenolic content (Folin-Ciocalteu) of the leaves of *Ficus benjamina* and *Ficus luschnathiana* was evaluated and screened by HPLC-DAD. *F. luschnathiana* crude extract (CE) presented a phenolic content higher than that of *F. benjamina* (149.92 ± 3.65 vs. 122.63 ± 2.79 mg of GAE). Kaempferol (1.63 ± 0.16 mg/g dry weight of CE) and chlorogenic acid (17.77 ± 0.57 mg/g of butanolic fraction) were identified and quantified in *F. benjamina* whereas rutin (1.39 ± 0.20 mg/g), caffeic (1.14 ± 0.13 mg/g) and chlorogenic (3.73 ± 0.29 mg/g) acids were quantified in the CE of *F. luschnathiana*. Additionally, rutin (15.55 ± 1.92 mg/g) and quercetin (3.53 ± 0.12 mg/g) were quantified in ethyl acetate and butanolic fractions, respectively. Antimycobacterial activity (broth microdilution method) of CEs and fractions was evaluated against *Mycobacterium smegmatis*. Ethyl acetate fraction from *F. benjamina* and *n*-butanol fraction from *F. luschnathiana* displayed the highest inhibitory activity (MIC = $312.50 \mu\text{g/mL}$ and $156.25 \mu\text{g/mL}$; respectively). Further studies are required to identify the compounds directly related to the antimycobacterial activity.

Keywords: *Ficus luschnathiana*; *Ficus benjamina*; *Mycobacterium smegmatis*; phenolic compounds; HPLC-DAD.

1. Introduction

Global number of mycobacterial infections increases annually and 8 millions of new cases of tuberculosis infection occur each year worldwide resulting in 1.8 million deaths (Dye, 2006). Antimycobacterial drugs presently available produce strong side effects and multidrug resistant is another problem that makes the search for new therapeutic alternatives an urgent necessity (Lechner, Gibbons, & Bucar, 2008; Pauli et al., 2005).

Extracts from some *Ficus* species have already been shown to possess interesting inhibitory activity against different *Mycobacterium* species (Kuete et al., 2008). Phenolics and flavonoids were identified as responsible for this activity (Chokchaisiri et al., 2009; Koysomboon, van Altena, Kato, & Chantrapromma, 2006; Suksamrarn et al., 2004). To the best of our knowledge no studies concerning the antimycobacterial activity of *F. luschnathiana* and *F. benjamina* have been reported, so far. Furthermore, the chemical composition of *F. luschnathiana* has never been studied. *F. benjamina* already possess some reports concerning its chemical constitution and biological activities (Parveen, Ghalib, Mehdi,

Mattu, & Ali, 2009; Parveen, Ghalib, Mehdi, Rehman, & Ali, 2009). Therefore, we decided to evaluate the antimycobacterial activity of these two species, both common in the South of Brazil, and to identify the phytochemicals related to this activity based on the approach “follow up of antimicrobial activity reports” (Cos, Vlietinck, Berghe, & Maes, 2006). In this paper we report the antimycobacterial activity of *F. benjamina* and *F. luschnathiana* phenolic-rich extracts and fractions against *Mycobacterium smegmatis*.

2. Results and Discussion

Ficus luschnathiana (Miq.) Miq. (Moraceae family) is a native South American species. It is a large tree, known in South Brazil as “figueira-do-mato”, and there is no important record of its medicinal use. *Ficus benjamina* L. (Moraceae family) is a well-known ornamental plant widespread throughout the world these days and known in Brazil as “fico-chorão”. In some parts of the world its leaves are used for the treatment of skin and respiratory disorders (Mousa et al., 1994). The crude hydroalcoholic extract of each plant presented a high phenolic content of 149.92 ± 3.65 and 122.63 ± 2.79 mg GAE/g for *F. benjamina* and *F. luschnathiana*; respectively (Table 1). Because the Folin-Ciocalteu assay is known to lead sometimes to significant underestimation of total phenolic, values are given as an indication and are not a precise quantitative determination (Martin, Krueger, Rodriguez, Dreher, & Reed, 2009). Such values are in the same range than those reported for the leaves of *Ficus microcarpa* (128.00 ± 1.2 mg GAE/g) (Ao, Li, Elzaawely, Xuan, & Tawata, 2008) and also of *Camellia sinensis* (green tea) and *Ilex paraguariensis* (maté) (148.77 ± 6.11 and 94.91 ± 4.18 mg GAE/g; respectively) (Chandra & Mejia, 2004), two well-known sources of polyphenols. Ethyl acetate fractions of the crude extract of *F. benjamina* and *F. luschnathiana* contained the largest amount of phenolics (148.92 mg GAE/g and 186.76 mg GAE/g; respectively) while the *n*-butanol fractions presented a phenolic content of 108.7 mg GAE/g, and 133.57 mg GAE/g; respectively. Those values are similar values to those reported for egyptian *Ficus* by Abdel-Hameed (2009).

Table 1 Here

Antimycobacterial activity was determined as minimum inhibitory concentration (MIC). Results are given in Table 2. Comparison of the phenolic content values (Table 1) and

the MIC (Table 2) did not reveal any relationship. Whereas the ethyl acetate fraction of *F. benjamina* displayed a MIC of 312.50 $\mu\text{g/ml}$, that of *F. luschnathiana* presented a very weak activity (MIC = 2500.00 $\mu\text{g/ml}$) even though its phenolic content was large. This clearly showed that the nature of the polyphenols is essential for the activity and that the presence of phenolics does not guarantee a good inhibitory activity.

The high antimycobacterial activity displayed by the butanolic fraction of *F. luschnathiana* (MIC= 156.25 $\mu\text{g/ml}$, Table 2) encouraged us to fractionate it by silica gel column chromatography, and to submit the each fractions to the bio-guided assay. Only the less polar fraction (sub-fraction A) retained the antimycobacterial activity (Table 2).

Table 2 Here

The phenolic HPLC-DAD analysis (Fig. 1 and 2 and Table 3) revealed differences in the composition of the extracts and fractions. Rutin as well as caffeic and chlorogenic acids were identified in the crude extract of *F. luschnathiana* (Fig. 1a and 1b). Rutin was also identified in the ethyl acetate fraction of the plant (Fig. 1c). Quercetin was identified in sub fraction A (Fig. 1d). Concerning *F. benjamina*, only kaempferol was identified in the crude extract (Fig. 2a), chlorogenic acid was identified in the *n*-butanol fraction (Fig. 2b).

Figure 1 Here

Figure 2 Here

Table 3 Here

The assay of the antimycobacterial activity of chlorogenic and caffeic acids, rutin, and kaempferol (Table 2) demonstrated that chlorogenic and caffeic acids do not possess any antimycobacterial activity against *M. smegmatis* (MICs > 2500.00 $\mu\text{g/mL}$) even though Tasdemir, Brun, Franzblau, Sezgin, & Çalis (2008) reported a marginal activity for chlorogenic acid against *M. tuberculosis*. Our microbiological data are consistent with the weak activity observed for *F. luschnathiana* crude extract (MIC = 1250.00 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 1a) and *F. benjamina n*-butanol fraction (MIC = 2500.00 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 2b) that are rich in these two acids. Calculated rutin MIC (625.00 $\mu\text{g/mL}$) is in agreement with literature data (Lechner

et al. 2008) and consistent with the activity (MIC= 2500.00 µg/mL) observed for the ethyl acetate fraction from *F. luschnathiana* wherein rutin is the major compound (Fig 1c).

The good antimycobacterial activity obtained with *F. luschnathiana* *n*-butanol fraction and sub-fraction A, and *F. benjamina* ethyl acetate extract cannot be attributed neither to rutin nor to caffeic and chlorogenic acids. The best inhibitory effect was observed for *F. luschnathiana* *n*-butanol fraction and its sub-fraction A, where only quercetin was identified by the chromatographic conditions used in this assay (Fig. 1d and Table 3). Quercetin possesses antimicrobial properties against gram-negative and -positive bacteria (Rauha et al., 2000). It also shows variable inhibitory activity against mycobacteria (Lechner et al. 2008). In line with these findings, the inhibitory activity of standard quercetin was tested and the resulting MIC was stated at 625 µg/ml. Therefore, it is unlikely that quercetin is the only molecule responsible for the antimycobacterial activity observed in our study.

3. Conclusion

These study highlighted, for the first time, the presence of some important phenolic's constituents in both species (quercetin, rutin, caffeic and chlorogenic acids in *F. luschnathiana* ; and kampferol and chlorogenic acid for *F. benjamina*), which are not totally correlated with the activity observed. Therefore, the good microbiological activity observed for *F. luschnathiana* butanolic extract and sub fraction A, probably may be due to so far unidentified compounds, or is the consequence of synergistic effects between several metabolites. More studies are required to identify the compound(s) responsible of the antimycobacterial activity.

Acknowledgements

We thank A. A. Favero (Department of Forest Sciences of Federal University of Santa Maria) for providing the botanical identification of the two *Ficus* species, and A. A. Boligon for the statistical assistance.

References

- Abdel-Hameed, E-S.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, *114*, 1271-1277. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.005
- Ao, C, Li, A., Elzaawely, A.A., Xuan T.D., Tawata, S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. extract. *Food Control*, *19*, 940-948. doi:10.1016/j.foodcont.2007.09.007
- Chandra, S., & Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *52*, 3583-3589. doi:10.1021/jf0352632
- Chokchaisiri, R., Suaism, C., Sriphota, S., Chindaduang, A., Chuprajob, T., Suksamrarn, A. (2009). Bioactive flavonoids of the flowers of *Butea monosperma*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *57*, 428-432.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, *106*, 290-302. doi:10.1016/j.jep.2006.04.003
- Dye, C. (2006). Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*, *367*, 938-940.
- Koysomboon, S., Van Aaltena, I., Kato, S., Chantrapromma, K. (2006). Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, *67*, 1034-1040. doi:10.1016/j.phytochem.2006.03.019
- Kuete, V., Ngamenis, B., Simo, C.C.F., Tankeu, R.K., Ngadjui, B.T., Meyer, J.J.M., Lall, N., Kuiate, J.R. (2008). Antimicrobial activity of crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *120*, 17-24. doi:10.1016/j.jep.2008.07.026

Lechner, D., Gibbons, S., & Bucar, F. (2008). Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in *Mycobacterium*. *Phytochemistry Letters*, *1*, 71-75.

doi:10.1016/j.phytol.2008.01.002

Martin, K.R., Krueger, C.G., Rodriguez, G., Dreher, M., Reed, J.D. (2009). Development of a novel pomegranate standard and new method for the quantitative measurement of pomegranate polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*, 157-162.

doi:10.1002/jsfa.3423

Mousa, O., Vuorela, P., Kiviranta, J., Wahab, S.A., Hiltunen, R., Vuorela, (1994). H. Bioactivity of certain Egyptian *Ficus* species. *Journal of Ethnopharmacology*, *41*, 71-76.

Parveen, M., Ghalib, R.M., Mehdi, S.H., Mattu, R.U.H., Ali, M. (2009). A novel antimicrobial triterpenic acid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. *comosa*). *Journal of Saudi Chemical Society*, *13*, 287-290. doi:10.1016/j.jscs.2009.10.010

Parveen, M., Ghalib, R.M., Mehdi, S.H., Rehman, S.Z., Ali, M. (2009). A new triterpenoid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. *comosa*). *Natural Product Research*, *23*, 729-736. doi:10.1080/14786410802362204

Pauli, G.F., Case, R.J., Inui, T., Wang, Y., Cho, S., Fischer, N.H., Franzblau, S.G. (2005). New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences*, *78*, 485-494. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.004

Rauha, J-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T.,; Pihlaka, K., Vuorela, H., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, *56*, 3-12.

Suksamrarn, A., Chotipong, A., Suavansri, T., Boongird, S., Timsuksai, P., Vimuttipong, S., Chuanynugul, A. (2004). Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Archives of Pharmacal Research*, *27*, 507-511.

Tasdemir, D., Brun, R., Franzblau, S.G., Sezgin, Y., Çalis, I. (2008). Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and other metabolites of *Scrophularia cryptophila*. *Phytomedicine*, 15, 209-215. doi:10.1016/j.phymed.2007.07.032

Table 1. Total phenolic content of crude extracts and fractions.

Extract/Fraction	Polyphenols (mg GAE/g of dry extract or fraction)^{1, 2}	
	<i>F. benamina</i>	<i>F. luschnathiana</i>
Crude extract	122.63±2.79 ^a	149.92±3.65 ^a
Chloroform fraction	119.22±2.37 ^a	76.86±5.63 ^b
Ethyl acetate fraction	148.92±2.62 ^b	186.76±2.13 ^c
<i>n</i>-Butanol fraction	108.70±2.50 ^c	133.57±2.71 ^d

Note 1. Values are expressed as mean (n = 3) ± standard deviation.

Note 2. Numbers followed by different letters in each column are significantly different and differ by Tukey test at $p < 0.05$.

Table 2. MIC of the extracts and fractions of *F. benjamina* and *F. luschnathiana* against *M. smegmatis*.

Extract/Fraction	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ¹	
	<i>F. benjamina</i>	<i>F. luschnathiana</i>
Crude extract	2500.00	1250.00
Chloroform fraction	625.00	1250.00
Ethyl acetate fraction	312.50	2500.00
<i>n</i>-Butanol fraction	2500.00	156.25
Sub-fraction A	-	156.25
Sub-fraction B	-	> 2500.00
Sub-fraction C	-	> 2500.00
Caffeic acid	> 2500.00	
Chlorogenic acid	> 2500.00	
Quercetin	625.00	
Rutin	625.00	

Note 1. Standard drugs isoniazid and rifampicin presented MICs of 0.78 and 19.53 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Table 3. HPLC-DAD phenolics screening and its quantification, in crude extracts and fractions of *F. benjamina* and *F. luschnathiana*.

Plant	Extract/Fraction	Phenolic	Amount¹ (mg/g dry weight)
<i>F. benjamina</i>	Crude extract	Kaempferol	1.63±0.16
	<i>n</i> -Butanol fraction	Chlorogenic acid	17.77±0.57
<i>F. luschnathiana</i>		Caffeic acid	1.14±0.13
	Crude extract	Chlorogenic acid	3.73±0.29
		Rutin	1.39±0.20
	Ethyl acetate fraction	Rutin	15.55±1.92
	<i>n</i> -Butanol fraction	Quercetin ²	3.53±0.12

Note 1. Results are expressed as mean (n = 3) ± standard deviation.

Note 2. Identified and quantified in sub-fraction A.

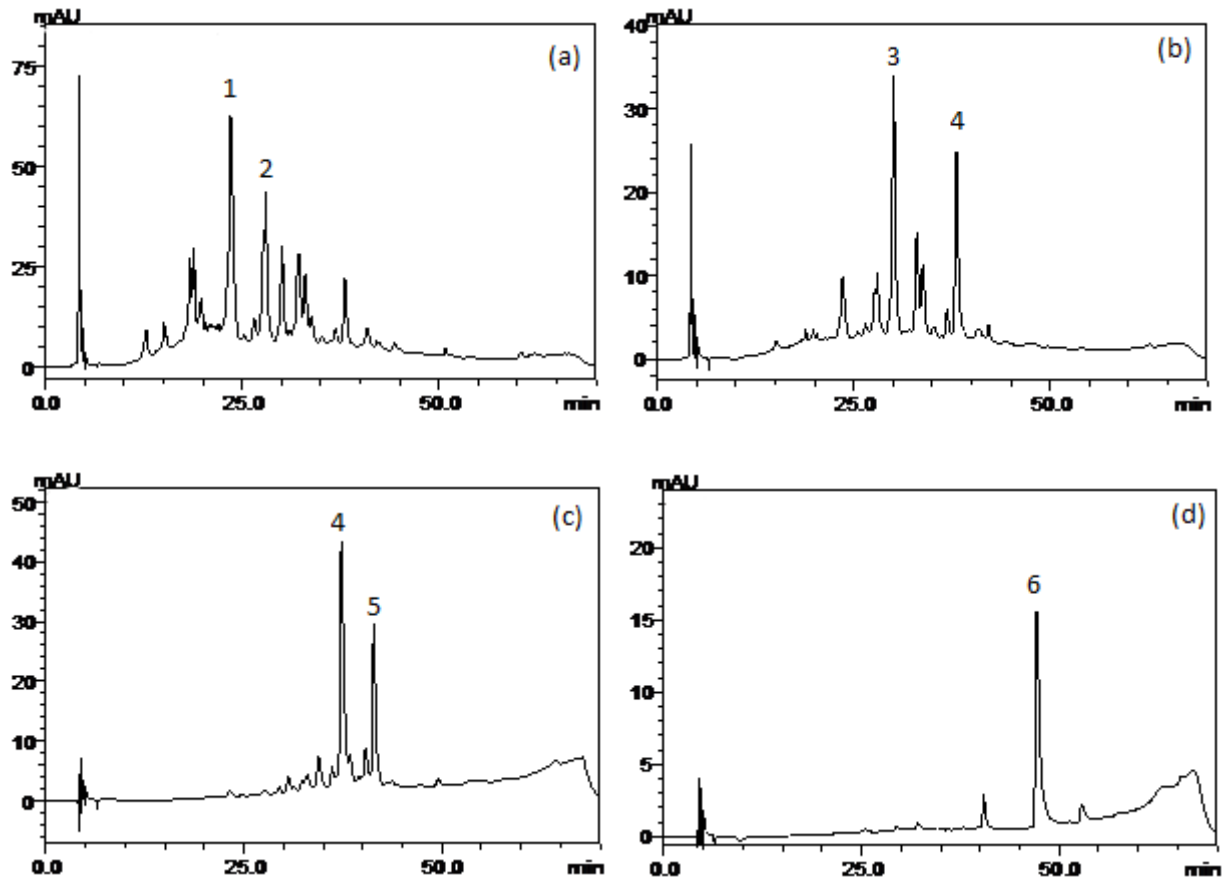


Figure 1: HPLC profile of *F. luschnathiana*: Crude extract at 327 nm (a) and 365 nm (b), ethyl acetate fraction at 365 nm (c), sub-fraction A at 365nm (d). Chlorogenic acid (1); Caffeic acid (2); unknown flavonoid (3, based on UV-DAD spectra); Rutin (4); unknown flavonoid (5, based on UV-DAD spectra); Quercetin (6).

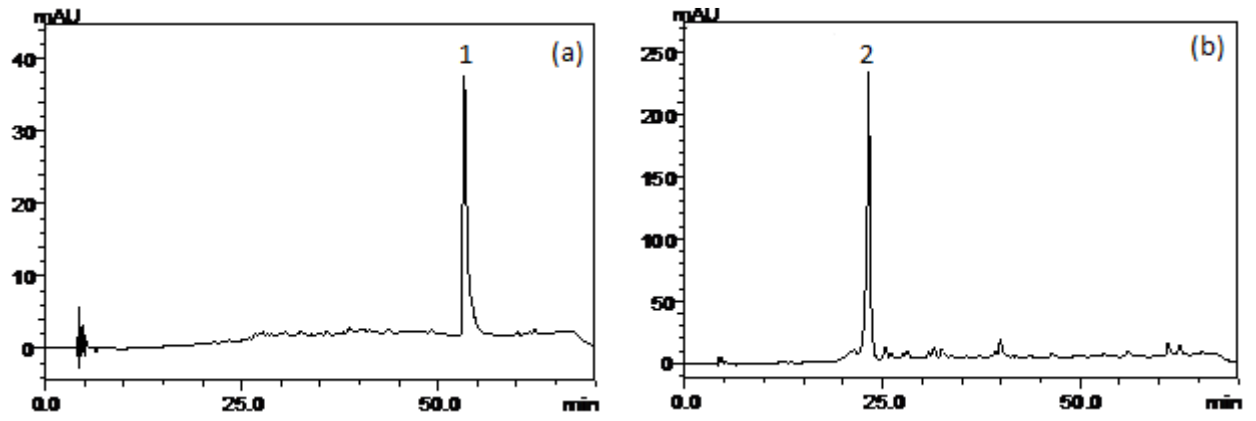


Figure 2: HPLC profile of *F. benjamina*: Crude extract at 365 nm (a), *n*-butanol fraction at 327 nm (b). Kaempferol (1), Chlorogenic acid (2)

O item "Experimental", contendo as técnicas e respectivas referências foi submetido em um arquivo a parte, como material suplementar, de acordo com a opção oferecida do periódico. Desta forma fica apresentado após o manuscrito.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

***In vitro* antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. leaves**

Ritiel Corrêa da Cruz¹, Vanessa Agertt², Aline Augusti Boligon¹, Vanessa Janovik¹, Marli Matiko Anraku de Campos², Dominique Guillaume³ and Margareth Linde Athayde^{1*}.

¹Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ² Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ³ Medicinal Chemistry Department, Université de Reims-Champagne Ardenne, Reims, France.

Total phenolic content (Folin-Ciocalteu) of the leaves of *Ficus benjamina* and *Ficus luschnathiana* was evaluated and screened by HPLC-DAD. *F. luschnathiana* crude extract (CE) presented a phenolic content higher than that of *F. benjamina* (149.92±3.65 vs. 122.63±2.79 mg of GAE). Kaempferol (1.63±0.16 mg/g dry weight of CE) and chlorogenic acid (17.77±0.57 mg/g of butanolic fraction) were identified and quantified in *F. benjamina* whereas rutin (1.39±0.20 mg/g), caffeic (1.14±0.13mg/g) and chlorogenic (3.73±0.29 mg/g) acids were quantified in the CE of *F. luschnathiana*. Additionally, rutin (15.55±1.92 mg/g) and quercetin (3.53±0.12 mg/g) were quantified in ethyl acetate and butanolic fractions, respectively. Antimycobacterial activity (broth microdilution method) of CEs and fractions was evaluated against *Mycobacterium smegmatis*. Ethyl acetate fraction from *F. benjamina* and *n*-butanol fraction from *F. luschnathiana* displayed the highest inhibitory activity (MIC = 312.50 µg/mL and 156.25 µg/mL; respectively). Further studies are required to identify the compounds directly related to the antimycobacterial activity.

Keywords: *Ficus luschnathiana*; *Ficus benjamina*; *Mycobacterium smegmatis*; phenolic compounds; HPLC-DAD.

Experimental

Chemicals and general procedures

All chemicals were of analytical grade. Silica gel 70-230 mesh, silica gel 60 F₂₅₄ coated plates, and solvents for extractions or analytical procedures were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-Ciocalteu phenol reagent, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) bromide dye (MTT), quercetin, rutin, kaempferol, gallic, chlorogenic and caffeic acid standards were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Lowenstein-Jensen medium, middlebrook 7H9 broth and oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) were purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).

Plant material and extraction methods

Leaves of *F. benjamina* and *F. luschnathiana* were collected in the city of Santa Maria (State of Rio Grande do Sul, Brazil) in March 2009. Dried voucher specimens are preserved in the herbarium of the Department of Forest Sciences at the Federal University of Santa Maria under the register codes HDCF-5945 and HDCF-6133, respectively.

Leaves of *F. benjamina* were dried at room temperature, while leaves of *F. luschnathiana* were kept fresh until the moment of the extraction, due their high water content. The dried (*F. benjamina*, 666.95 g) and fresh leaves (*F. luschnathiana*, 453.92 g) were submitted to size reduction and then separately macerated for a week at room temperature with 7 and 5 liters of 60% ethanol in water; respectively. Each resulting crude extract was filtered and the alcoholic solution was evaporated under reduced pressure, affording aqueous extracts. These latter were successively partitioned with chloroform, ethyl acetate, then *n*-butanol until depletion of the color visible components. Each organic extract was subsequently dried under reduced pressure, resulting in chloroform (4.85 and 3.25 g), ethyl acetate (0.99 and 0.43 g), and *n*-butanol (4.27 and 3.90 g) extracts for *F. benjamina* and *F. luschnathiana*; respectively.

Column chromatography of the n-butanol fraction from F. luschnathiana

About 1.45 g of the dried *n*-butanol fraction from *F. luschnathiana* was chromatographed on a silica gel column eluted with successive gradients of CHCl₃:acetone (800 mL, initial 8:2 and final 2:8), acetone:EtOH (1600 mL initial 9:1 and final ethanol), and MeOH (1200 mL, initial 9:1 and final methanol) resulting in 180 fractions of 20 mL that were

pooled according to their TLC profile. Combined fractions 1-40, 41-120, and 121-180, afforded sub-fractions A, B, and C; respectively.

Determination of the total phenolic content

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method with minor modifications (Boligon et al., 2009). Briefly, 0.5 mL of 2 N Folin-Ciocalteu reagent was added to 1 mL of each sample solution (0.15 mg/mL). The mixture was allowed to stand for 5 min before addition of 2 mL of a 20% aqueous Na₂CO₃ solution. The resulting solution was then allowed to stand for 10 min before absorbance reading at 730 nm on a Shimadzu-UV-1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. Analyses were carried out in triplicate. The total phenolic content was expressed in milligram gallic acid equivalent (GAE) per gram of dry extract/fraction.

HPLC-DAD qualitative and quantitative analysis

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) equipped with Shimadzu LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan) reciprocating pumps connected to a DGU-20A5 degasser and a CBM-20A integrator. UV-VIS detector DAD SPD-M20A and software LC Solution 1.22 SP1 were used. Reverse phase chromatography analyses were carried out with a Phenomenex C-18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. Injection volume was 40 µl and the gradient elution was conducted according to the slightly modified Evaristo and Leitão method (2001). UV absorption spectra were recorded in the 200-400 nm range.

Each crude hydroalcoholic extract, organic extract, and the sub-fractions from *F. luschnathiana* were individually screened for the presence of the following polyphenolic compounds: gallic, chlorogenic, and caffeic acids, quercetin, rutin, and kaempferol. Identification of the compounds was performed by comparing their HPLC retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. Stock methanolic solutions of standards were prepared in the range of 0.0025-0.045 mg/mL. Quantification was carried out by integrating the peaks using external standard method at 327 nm wavelength for chlorogenic and caffeic acids and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. Chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Determination of the antimycobacterial activity

Antimycobacterial activity was tested against *M. smegmatis* mc² 155 (ATTC700084). Mycobacterias were plated onto Löwenstein-Jensen medium and incubated for 3-5 days, at 35° C. From this culture a portion was placed into Middlebrook 7H9 broth, supplemented with 10% OADC and 0.2% glycerol (MD7H9), and then homogenized by sonication for one minute. The bacteria concentration was adjusted to 0.5 McFarland scale, and then diluted with MD7H9 up to 10⁵ CFU/mL. Plant extracts and fractions were dissolved in DMSO, at a concentration of 50 mg/mL and then diluted in MD7H9 until the desired concentration; initial concentration was 2500 µg/ml.

The activity test was performed using the broth microdilution method (National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS], 2003), which presents the results as a minimum inhibitory concentration (MIC) for each compound. Mycobacterial inoculum (100 µL) was placed in each well of a microtitre plate, as well as the extracts and fractions at corresponding concentrations. Analyses were carried out in triplicate. Plates were incubated for 48 hours at 37°C. The MTT dye was used to check the growth of microorganisms (Sankar, Gopinath, Singla, & Singh, 2008). MTT solution at 0.5 mg/mL were prepared by dilution with absolute ethanol up to 1 mg/mL, and then by dilution half to half with a solution of 10% Tween 80 in ethanol. The final solution (25 µl) was added to each plate well, and the first well concentration where the drug prevented the color change from yellow to purple (visual reading) was considered the MIC.

Statistical analysis

The results from the determination of the total phenolic content were submitted to variance analysis (ANOVA) and the means were compared by Tukey test at $p < 0.05$. These statistical analysis were performed with the support of the software SAS, version 8.0.

5 DISCUSSÃO

A idéia central da discussão apresentada no manuscrito é a de que os melhores resultados de atividade antimicrobacteriana obtidos – com a fração butanólica de *F. luschnathiana* e com a fração acetato de etila de *F. benjamina* – não se devem as substâncias fenólicas padrões analisadas, visto que além de apresentarem fraca atividade, algumas não foram encontradas nestes extratos. Também fica claro na discussão do manuscrito que o teor total de polifenóis não está intrinsecamente relacionado com a atividade antimicrobacteriana, sendo a natureza de compostos fenólicos em específico mais relevante do que a quantidade. Partindo destas proposições, este item de discussão geral irá tratar de alguns aspectos não discutidos e mencionados no artigo, ainda que relevantes.

O estudo aqui apresentado foi delineado de forma a ser um estudo bio-guiado (do inglês *bio-guided assay*), de forma que extratos, frações e sub-frações que apresentassem melhor desempenho no teste de atividade biológica seriam investigados mais a fundo (CECHINEL; YUNES, 1997). Desta forma *F. luschnathiana* e conseqüentemente a fração butanólica (CIM = 156,25 µg/mL) de seu extrato bruto foram a escolha inicial para a busca de substâncias isoladas. A cromatografia em coluna de vidro empacotada com sílica-gel realizada uma vez com esta fração, não resultou em nenhuma substância isolada. Entretanto, como consta no artigo, em uma de suas sub-frações iniciais foi possível identificar o flavonol quercetina. Por motivos técnicos, novas tentativas de isolamento pela técnica de cromatografia em coluna não foram realizadas com esta fração. É patente a dificuldade em se trabalhar amostras de polaridade mais elevada utilizando sílica-gel como fase estacionária, devido à forte afinidade dos componentes destas frações pela sílica, resultando em alta retenção destes compostos na coluna (STAHL et al., 1965), além disso, apesar de a fração butanólica ter apresentado um bom rendimento, a maior parte de sua composição é de polissacarídeos (dados não apresentados). Os metabólitos secundários com atividade antimicrobacteriana possivelmente estão em baixa concentração na fração, o que dificultaria ainda mais a tarefa de isolamento. Isto fica evidente pela

quantificação da quercetina na sub-fração, 0,35 % da massa da sub-fração, valor que se extrapolado para a massa total da fração butanólica ficaria ainda menor.

De acordo com a premissa de um estudo bio-guiado, a fração acetato de etila de *F. benjamina* seria a próxima escolha para isolamento de substâncias ativas, pois: apresentou considerável atividade biológica (CIM de 312,50 µg/mL, sendo esta a fração mais ativa da planta), possui a maior quantidade de compostos fenólicos e possivelmente seus componentes permitiriam o trabalho de isolamento utilizando sílica-gel como fase estacionária sem maiores transtornos. Entretanto o rendimento na obtenção desta fração foi bastante pequeno, e com um total de 666,95 g de folhas secas da planta somente 0,99 g de massa de fração seca foi obtido através das extrações orgânicas. Esta pequena quantidade permitiu somente a realização do teste de atividade biológica, bem como a determinação do teor de polifenóis, flavonóides e a investigação por CLAE.

A fração clorofórmica de *F. benjamina* foi avaliada como a terceira fração mais ativa investigada no estudo, apresentando uma CIM de 625,00 µg/mL. Este valor, quando comparado a dados da literatura científica, já não caracteriza uma boa atividade antimicrobacteriana. Contudo, por motivos de rendimento e técnicas laboratoriais, e a fim de se aumentar o conhecimento a respeito da fitoquímica da espécie, bem como delinear outras possíveis investigações em um futuro próximo, o trabalho de fracionamento por cromatografia em coluna foi realizado com esta fração. Análises preliminares por cromatografia em camada delgada (CCD) das sub-frações eluídas da coluna revelaram a presença de triterpenos como lupeol, acetato de lupeol e estigmasterol (dados não apresentados), e que já foram submetidos à análise por cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massa (CG-EM), no intuito de confirmar a identidade dos compostos. De acordo com Copp (2003) e Okunade e colaboradores (2004), triterpenos tais como os identificados podem apresentar considerável atividade antimicrobacteriana. Desta forma é possível que parte da atividade biológica observada para esta fração seja proveniente destas substâncias, ou é possível que tais compostos quando em maior concentração possam exercer uma atividade melhor do que a observada para a fração clorofórmica.

Como parte de uma avaliação mais geral das plantas, e não estritamente ligado a atividade antimicrobacteriana, realizou-se a estimativa do teor de polifenóis, apresentado e discutido no manuscrito, que também foi acompanhado de uma

avaliação do conteúdo de flavonóides por método de cloreto de alumínio (AlCl₃). Estes dados (Tabela 1) não foram incluídos no artigo devido à menor especificidade e relevância do método, todavia algumas considerações a respeito podem ser feitas. O maior teor de flavonóides foi obtido para as frações clorofórmicas de ambas as plantas, valores que não condizem com a técnica de polifenóis, em cujos resultados as frações clorofórmicas se mostraram pouco proeminentes. Tal incoerência é decorrente da grande quantidade de clorofilas presente nas folhas das plantas, substâncias de baixa polaridade extraídas pelo clorofórmio, o solvente mais apolar utilizado no fracionamento. Segundo Costa (2002), as clorofilas interferem na reação do AlCl₃ podendo superestimar o teor de flavonóides. Desta forma os altos teores obtidos para as frações clorofórmicas superestimam o valor real, ou mesmo podem caracterizar um resultado "falso-positivo". Corrobora este fato os resultados das análises por CLAE, em que nem o glicosídeo (rutina) e nem mesmo as agliconas (quercetina e canferol), de caráter mais apolar, foram encontrados nas frações clorofórmicas.

Tabela 1 – Teor de flavonóides totais*

Extrato/Fração	Teor (mg/g de massa seca)	
	<i>F. benjamina</i>	<i>F. luschnathiana</i>
Extrato Bruto	21,85±1,24	31,06±1,13
Fração Clorofórmio	212,59±4,64	261,66±3,56
Fração Acetato de Etila	13,51±0,61	124,62±1,61
Fração <i>n</i> -Butanol	5,18±0,20	6,11±0,27

* Análise realizada pelo método de Woisky e Salatino (1998)

Outro aspecto não detalhado no manuscrito foi o da atividade antimicobacteriana dos padrões de flavonóides testados e suas relações estruturais. Como ficou evidente, os padrões avaliados (quercetina, rutina e canferol) não possuem atividade relevante e não estão relacionados com a atividade biológica observada para as frações que se mostraram mais ativas. Porém, a literatura científica tem relatado diversos flavonóides (Figura 6) com atividade

antimicrobacteriana, de forma que o estudo apresentado contribuiu para ampliar a compreensão desta classe de compostos vegetais.

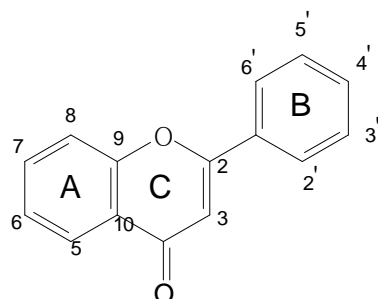


Figura 6 – Estrutura geral dos flavonóides.

Os padrões avaliados e aqui apresentados foram: quercetina, rutina e canferol (Figura 7). Quimicamente, estes compostos pertencem ao subgrupo dos flavonóis (Figura 8) e caracterizam-se pela hidroxila na posição 3. Não possuem grupamentos substituintes grandes e complexos, sendo os seus grupamentos menores e de caráter mais polar (hidroxilas), como também o dissacarídeo substituinte na rutina (posição 3), que a caracteriza como um heterosídeo (ZUANAZZI, 2002).

Outros flavonóis também já tiveram sua atividade antimicrobacteriana avaliada. Os resultados de Lechner e colaboradores (2008) demonstraram baixa atividade para a isoramnetina e a taxifolina (este um flavanonol – Figura 8) frente a diferentes cepas de *M. smegmatis*. Somente a miricetina apresentou boa atividade, porém não foram propostas explicações para tal, visto que o objetivo do estudo era avaliar o sinergismo entre os flavonóides e antibióticos comumente utilizados para tratamento de tuberculose.

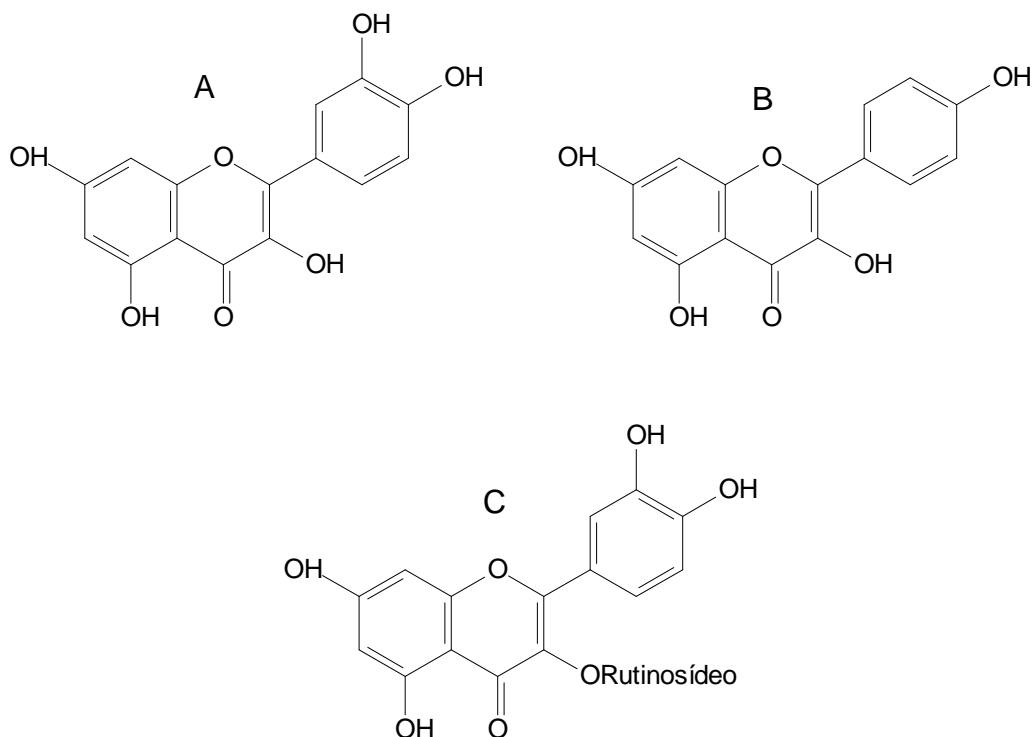


Figura 7 – Quercetina (A), canferol (B) e rutina (C).

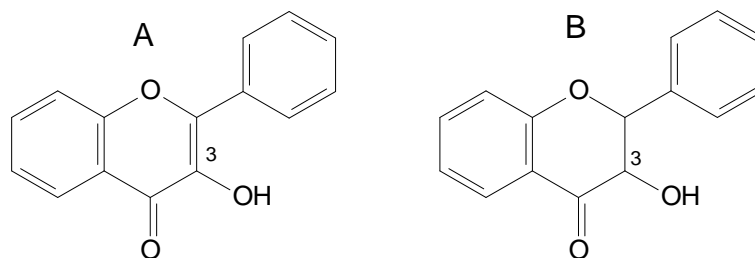


Figura 8 - Estrutura geral de flavonóis (A) e flavanonóis ou di-hidroflavonóis (B).

As flavonas são um subgrupo de flavonóides, bastante difundido e semelhante aos flavonóis. Diferenciam-se destes pela ausência de hidroxila na posição 3, restando somente o átomo de hidrogênio (Figura 9). Apesar da pequena diferença estrutural entre os grupos, diversas flavonas têm sido apresentadas com forte atividade antimicrobacteriana. O trabalho de Lechner e colaboradores, acima citado, avaliou a flavona luteolina, que apresentou uma CIM entre 128,00 e 256,00 $\mu\text{g/mL}$ frente à mesma cepa de *M. smegmatis* utilizada em nosso estudo. Esta mesma flavona também foi isolada de *F. chlamydocarpa* por Kuete e colaboradores

(2008) e teve atividade testada em relação à mesma micobactéria apresentando CIM de 78,00 µg/mL. A discrepância nos valores se deve possivelmente a diferenças nos métodos microbiológicos, o que demonstra a dificuldade de realizar comparações diretas entre resultados, bem como a falta de uma padronização maior para os testes preditivos de atividade antimicobacteriana. Ainda assim os valores concordam ao indicar que a flavona apresenta considerável atividade antimicobacteriana.

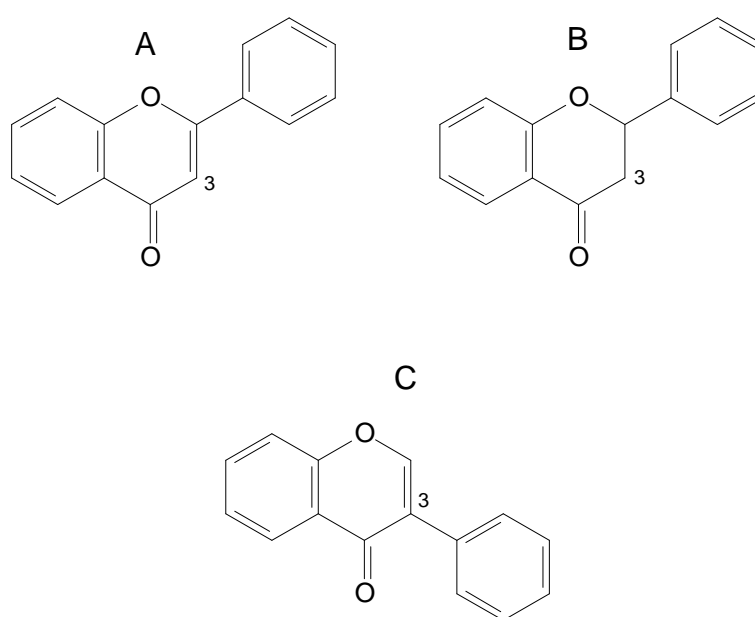


Figura 9 - Estrutura geral de flavonas (A), flavanonas (B) e isoflavonas (C).

Suksamran e colaboradores (2004) também avaliaram a atividade antimicobacteriana de flavonas, isoladas de *Chromolaena odorata*. Acacetina e luteolina, esta comum a diversas plantas, estão entre os isolados submetidos à avaliação com *M. tuberculosis*. Ambas as flavonas se mostraram ativas, no caso da luteolina, como esperado, em menor grau do que o observado nos trabalhos citados acima, que utilizaram *M. smegmatis*, um microrganismo um pouco mais sensível. Também foram isoladas flavanonas ativas da planta, de forma que isto permitiu aos autores do artigo propor que a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, presente nos flavonóis e flavonas e ausente nas flavanonas e flavanonóis (Figuras 8 e 9), não é essencial a ocorrência da atividade biológica estudada.

Isoflavonas também vem exibido forte atividade inibitória sobre micobactérias em diferentes estudos. No caso de Kuete e colaboradores (2008), já mencionado pela atividade inibitória observada para a luteolina, os melhores resultados foram de fato, obtidos com isoflavonas alpinum-isoflavona, genisteína e laburnetina. Esta última apresentou uma CIM de 0,61 µg/mL frente a *M. smegmatis*, uma inibição da mesma ordem do que a observada para os antibióticos utilizados como referência. Outras isoflavonas isoladas e avaliadas também têm corroborado esta constatação (KOYSOMBOON et al., 2006; CHOKCHAISIRI et al., 2009).

Chokchaisiri e colaboradores (2009) também demonstraram que chalconas (Figura 10) podem ter considerável atividade antimicobacteriana. Dos compostos isolados de *Butea monosperma*, a buteína foi a substância mais ativa, com CIM de 12,50 µg/mL. Outras chalconas, como a isoliquiritigenina também se mostraram ativas, com CIM observado de 25,00 µg/mL, valor igual ao da isoflavona afrormosina e superior a formonetina.

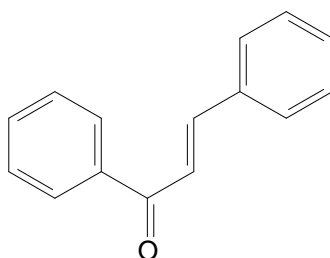


Figura 10 – Estrutura geral das chalconas.

Os resultados acima expostos expandem a questão, já apresentada por Brown e colaboradores (2007), que testaram a atividade antimicobacteriana de 4 flavonóides contra o *Mycobacterium bovis* BCG. Capacidade inibitória mais pronunciada foi observada justamente com as chalconas buteína e isoliquiritigenina, e a mais fraca foi a apresentada pelo flavonol fisetina. Porém, este era um estudo mais amplo, e através de técnica bioquímica apropriada, foi possível observar que estes flavonóides inibem a atividade, *in vitro*, da enzima ácido graxo sintase II obtida de *M. smegmatis*. Desta forma foi possível propor que um dos mecanismos de ação destes flavonóides sobre o *M. bovis* e micobactérias em geral é a inibição desta

enzima, envolvida na formação dos ácidos micólicos, componentes específicos e essenciais da parede celular de micobactérias.

Uma breve pesquisa na literatura científica permite averiguar os dados acima expostos, que levam ao entendimento de que flavonóis em geral, possivelmente possuem menor atividade antimicobacteriana do que outros subgrupos de flavonóides, ainda que não haja motivos claros e correlações com sua natureza química. Contudo, tais idéias não são fatos absolutos e já estabelecidos, havendo resultados divergentes.

Evidentemente, flavonóis mais simples tais como a quercetina, rutina, canferol, fisetina e outros, apresentam uma fraca atividade antimicobacteriana, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação proposto por Brown e colaboradores (2007), porém o trabalho de Koysomboon e colaboradores (2006) deixa claro a influência dos grupamentos substituintes e da natureza em específico de cada molécula, e não só as questões estruturais referentes a cada sub-classe. A avaliação apresentada por estes autores e já citada por motivo de suas isoflavonas ativas, também possui flavonóis ativos, e de fato estes compõem os melhores resultados em termos de CIM. É válido ressaltar que estes flavonóis exibem diferentes padrões de substituição, mas todos são metoxilados na posição 3, desta forma, pode-se sugerir que um substituinte de caráter mais apolar nesta posição possa favorecer a atividade antimicobacteriana. Isto é o que ocorre com flavonas e chalconas (somente o átomo de hidrogênio na posição 3), com as isoflavonas (anel ligado em 3) e no caso dos flavonóis acima mencionados, uma metila ligada ao átomo de oxigênio.

6 CONCLUSÃO

Os extratos brutos das duas espécies não apresentaram atividade antimicobacteriana, entretanto seu fracionamento com diferentes solventes orgânicos forneceu, para cada planta, uma fração ativa. Os compostos mais polares de *F. luschnathiana*, extraídos pelo butanol exerceram boa atividade inibitória sobre *M. smegmatis*, juntamente com uma de suas frações obtida por cromatografia em coluna constituem os melhores resultados antimicobacterianos obtidos. Na sequência, por parte de *F. benjamina*, os compostos extraídos com acetato de etila também exerceram boa atividade biológica.

A atividade exercida por estas frações claramente não está relacionada aos compostos fenólicos que foram identificados, visto que os padrões dos ácidos hidroxicinâmicos e dos flavonóides encontrados não exerceram atividade considerável. Tampouco se pode fazer uma correlação direta entre o teor de fenóis totais e a atividade biológica, de forma que aspectos estruturais específicos de certos polifenóis parecem ser mais relevantes biologicamente do que a quantidade.

Se pelo lado biológico os padrões de fenóis avaliados não se mostraram promissores, seus resultados do ponto de vista fitoquímico são bastante relevantes. Até onde se sabe, a avaliação realizada para *F. luschnathiana* é a primeira do gênero, evidenciando que as folhas da planta possuem alto teor de compostos fenólicos, bem como ficou demonstrado a presença de quatro destas substâncias: quercetina, rutina e os ácidos cafeico e clorogênico. Já para *F. benjamina*, os dados gerados agregam ao que já se conhece da planta, e pela primeira vez é relatada a presença de canferol e de ácido clorogênico como metabólitos secundários da espécie.

Os resultados obtidos demonstram que ambas as espécies de figueiras possuem substâncias com atividade antimicobacteriana, e são fontes em potencial para futuras pesquisas a fim de se identificar tais compostos ativos, sejam eles fenólicos ou não. Futuras investigações também devem ser realizadas no sentido de se averiguar se estas substâncias são mais ativas isoladas ou no conjunto das frações, bem como se deve aumentar o espectro de micobactérias avaliadas. Além disso, a quantidade a diversidade de polifenóis presentes nas folhas das duas

espécies indicam o potencial destas em relação a atividades e propriedades biológicas mais relacionadas a tais compostos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E-S.S. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1271-1277, 2009.
- AL-FATIMI, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657-666, 2007.
- ALMAHY, H.A. et al. The chemical constituents of *Ficus benjamina* Linn. and their biological activities. **Pertanika Journal of Science & Technology**, v. 11, n. 1, p. 73-81, 2003.
- ANTOUN, M.D. et al. Evaluation of the flora of Puerto Rico for *in vitro* antiplasmodial and antimycobacterial activities. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 638-642, 2001.
- AO, C. et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. **Food Control**, v. 19, p. 940-948, 2008.
- BROWN, A.K. et al. Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase II. **Microbiology**, v.153, p. 3314-3322, 2007.
- CARAUTA, J.P.P.; DIAZ, B.E. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. da UFRJ, 2002. 208 p.
- CECHINEL, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CHEN, L-W. et al. Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 1814-1821, 2010.
- CHOKCHAISIRI, R. et al. Bioactive flavonoids of the flowers of *Butea monosperma*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 4, p. 428-432, 2009.

COOK, J.L. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. **British Medical Bulletin**, v. 96, p. 45-59, 2010

COPP, B.R. Antimycobacterial natural products. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 535-557, 2003.

COSTA, A.F. Fármacos com heterosídeos flavonóides. In: **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. p. 195-224.

ELDEEN, I.M.S.; STADEN, J.V. Antimycobacterial activity of some trees used in South African traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 248-254, 2007.

FONSECA, T.L et al. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoense*. **Vittale**, Rio Grande, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2008.

HANEKOM, W.A. et al. Tuberculosis research update. **Tropical Medicine and Health**, v. 15, n. 8, p. 981-989, 2010.

JOLY, A.B. *Moraceae*. In: **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Cia. Ed. Nacional, 2005. p. 234-239.

KONÉ, W.M. et al. Traditional medicine in North Cotê-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 43-49, 2004.

KOYSOMBOON, S. et al. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1034-1040, 2006.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 556-561, 2009.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 17-24, 2008.

LANSKY, E.P. et al. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 195-213, 2008.

LECHNER, D.; GIBBONS, S.; BUCAR, F. Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in *Mycobacterium*. **Phytochemistry Letters**, v. 1, p. 71-75, 2008.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997. 271 p.

MAREGESI, S.M. et al. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 58-66, 2008.

MAVLONOV, G.T. et al. Chitin-binding antifungal protein from *Ficus carica* latex. **Chemistry of Natural Products**, v. 44, n. 2, p. 216-219, 2008.

MCGAW, L.J. et al. Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1429-1433, 2008.

MITSCHER, L.A.; BAKER, W.R. A search for novel chemotherapy against tuberculosis amongst natural products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n.2, p. 365-371, 1998.

MOUSA, O. et al. Bioactivity of certain Egyptian *Ficus* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p.71-76, 1994.

NEGI, A.S. et al. Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 603-645, 2010.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1017-1032, 2004.

OLIVEIRA, P.A. et al. Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* latex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3393-3398, 2010.

PANDE, G.; AKOH, C.C. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterization of Georgia-grown underutilized fruit crops. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1067-1075, 2010.

PARVEEN, M. et al. A new terpenoid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. *comosa*). **Natural Product Research**, v. 23, n. 8, p. 729-736, 2009a.

PARVEEN, M. et al. A novel antimicrobial triterpenic acid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. *comosa*). **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, p. 287-290, 2009b.

PAULI, G.F. et al. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**, v. 78, p. 485-494, 2005.

PLANT THIS. *Ficus benjamina* L. Sydney, Austrália, 2011. Disponível em: <<http://www.plantthis.com.au/plantinformation.asp?gardener=16198&tabview=photos&plantSpot=0>>. Acesso em: 06 dez. 2010.

RAMOS, D.F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

RAO, C.V. et al. Gastroprotective effect of standardized extracts of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 323-326, 2008.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIO GRANDE DO SUL. Lei 9.519 de 21 de janeiro de 1992. **Institui o Código Florestal do Estado do Rio Grande do Sul e dá outra providências**. Porto Alegre, 1992.

SHUKLA, R. et al. Antioxidant effect of aqueous extract of the bark of *Ficus bengalensis* in hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 47-51, 2004.

STALH, E.; HOWARD, A.N.; MORRIS, L.J. **Thin-layer chromatography: a laboratory handbook**. New York: Springer, 1965. 553 p.

SUKSAMRARN, A. et al. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 5, p. 507-511, 2004.

URUGUAY'S WILDLIFE & NATURAL SANCTUARIES. ***Ficus luschnathiana* on *Butia palm*tree**. Montevideu, Uruguai, 2006. Disponível em: <<http://uruguay1.blogspot.com/2006/10/ficus-luschnathiana-on-butia-palmtree.html>>. Acesso em: 06 dez. 2010.

WOISKY, R.G; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Report. **Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing**. Geneva, Switzerland, 2009.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002. p. 499-526.

ANEXOS

Anexo A - Carta de submissão

----- Mensagem Original -----
Assunto: Natural Product Research - Your Manuscript ID is GNPL-2011-0471
De: alessandro.venditti@uniroma1.it
Data: Qui, Março 17, 2011 4:10 pm
Para: marga@ccs.ufsm.br

17-Mar-2011

Dear Professor Athayde:

Thank you for submitting your manuscript entitled "In vitro antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. leaves" to our ScholarOne Manuscripts site.

Your manuscript ID is GNPL-2011-0471.

This manuscript ID should be used in all future correspondence with the journal office and editors. Please do not hesitate to contact the journal office if you have any queries about your paper.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/gnpl> .

Thank you for submitting your manuscript to Natural Product Research.

Sincerely,
Natural Product Research Editorial Office