

# COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Vatairea macrocarpa* (BENTH) DUCKE

**Byanka Silva Sena<sup>1</sup>; Angélica Maria Lucchese<sup>2</sup>; Jade Ribeiro Carneiro<sup>3</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[byankasena8@gmail.com](mailto:byankasena8@gmail.com)

2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[angelica.lucchese@gmail.com](mailto:angelica.lucchese@gmail.com)

3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[rc.jade@hotmail.com](mailto:rc.jade@hotmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** Cromatografia; Atividade antimicrobiana; Fracionamento.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Vatairea* é nativo do Brasil, porém pode ser encontrado em outras regiões como Guiana e regiões litorais atlânticas da América Central e do México. No Brasil as espécies do gênero *Vatairea* estão presentes nas regiões dos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, podendo ser encontradas neste país sete espécies desse gênero (Cardoso, 2012). A espécie *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke é típica do cerrado, campo cerrado e cerradões do Brasil, sendo conhecida popularmente como maleiteira, angelim-do-cerrado e como amargoso, devido ao chá da casca do caule ser amargo (Oliveira et al, 2008).

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (Penna et al., 2001).

Em estudos anteriores do presente grupo de pesquisa, o extrato metanólico da espécie *V. macrocarpa* foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* com CIM de 350 µg.mL<sup>-1</sup>, *Candida albicans* com CIM de 600 µg.mL<sup>-1</sup> e *Candida parapsilosis* com CIM de 170 µg.mL<sup>-1</sup> apresentando um grande potencial como produto na busca de antimicrobianos (Valadares, 2014). Desta forma objetivou-se, com este trabalho, continuar as pesquisas com a espécie, prosseguindo com fracionamento e análise das frações mais ativas.

## METODOLOGIA

### 1. Preparação das frações

Para a preparação das frações, o extrato bruto de *Vatairea macrocarpa* foi ressuspenso em metanol/água (8:2) e extraído sucessivamente com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Após as extrações, o solvente das frações foi removido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão. A fase aquosa resultante foi armazenada em freezer para posterior liofilização.

### 2. Determinação da atividade antimicrobiana

Foi utilizada a metodologia de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrita no *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2002), para leveduras, e no CLSI (2003), para as bactérias. Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistente à Estreptomicina e Dihidrostreptomicina; *Candida albicans* (CCMB 286) resistente à Fluconazol e Anfotericina B. A determinação da CIM dos extratos metanólicos foi realizada em placas estéreis de poliestireno, com 96 poços, através de microdiluição e as concentrações variaram de 9,9 mg/mL a 0,0048 mg/mL nos poços.

No teste CMM foram retirados 5 µL de cada poço das placas de CIM em que houve inibição do crescimento microbiano, e transferidos para uma placa de Petri com meio ágar Müeller Hinton. O conteúdo de cada poço foi colocado em quadrantes específicos da placa de Petri, identificados com o número e a letra do poço a ser testado, o micro-organismo teste e o código da amostra. As placas com as bactérias foram incubadas por 24 h a 37°C e as placas com leveduras por 48 h a 28°C. Depois desse período, a Concentração Microbicida Mínima foi a menor concentração da amostra onde não ocorreu crescimento microbiano.

### **3. Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada**

O perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada foi determinado com o emprego de reveladores químicos para a detecção das classes de metabólitos, como terpenos e esteroides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, entre outros, conforme Wagner e Bladt (1995).

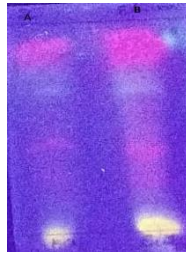
## **RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO**

### **Preparo das frações:**

Após a ressuspensão do extrato bruto das folhas de *Vatairea macrocarpa* em metanol/água, e extração sucessiva com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol foram obtidas as respectivas frações com os seguintes teores de extrativos: fração em hexano – 10,14%, fração em diclorometano - 8,79%, fração em acetato de etila - 17,75% e fração em butanol - 53,29%.

### **Cromatografia em camada delgada:**

Para a eluição das amostras foi utilizado dois tipos de sistemas de misturas, um para frações apolares e outro para polares, para frações polares foi utilizada a mistura acetato de etila e clorofórmio (25:6), enquanto que para apolares foi utilizado o sistema tolueno e acetato de etila (8:2). O teste para detecção de terpenos se mostrou positivo em todas as frações analisadas. A revelação com o reagente Liebermand-Buchard mostrou teste positivo para a presença de triterpenos e esteroides, em todas as frações. Com o revelador NP/PEG, observou-se a presença de compostos flavonoides em todas as frações presentes, como pode ser observado na figura 1 para as frações em acetato de etila e butanol. Pode se observar que o reagente KOH para detecção de antraquinonas se mostrou negativo quando observado à luz UV. Para o teste de detecção de alcalóides, as amostras também obtiveram resultado negativo para o reagente Dragendorff. Diante dessas informações observa-se que as frações contêm uma variedade de compostos metabólitos secundários, como terpenos, esteroides e flavonoides, que poderão ser responsáveis pelas atividades das mesmas.



**Figura 1:** Cromatografia em camada delgada com revelador NP para compostos fenólicos, A – fração em acetato de etila e B – fração em butanol.

### Atividade antimicrobiana:

Os testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração microbicida mínima (CMM) foram realizados para todas as frações e o resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana das frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol.

Fração	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>	
	CIM( $\mu\text{g/mL}$ )	CMM( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM( $\mu\text{g/mL}$ )	CMM( $\mu\text{g/mL}$ )
Hexano	R	R	R	R
Diclorometano	51,99 $\pm$ 12,92	55,24 $\pm$ 9,77	25,78 $\pm$ 9,7	77,34 $\pm$ 0
Acetato de etila	309,38 $\pm$ 0	309,38 $\pm$ 0	77,34 $\pm$ 0	223,44 $\pm$ 29,77
Butanol	R	R	1737,5 $\pm$ 0	4125,00 $\pm$ 1237,50
Controle	<10 $\mu\text{g/mL}$	NT	<10 $\mu\text{g/mL}$	NT

NT = Não testada R = Resistente até a maior concentração testada (9,9  $\mu\text{g/mL}$ ) Controles: Nistatina para *C. albicans* e Cloranfenicol para *S. aureus*.

Diante dos dados dessa tabela pode-se observar que a fração que apresentou um melhor resultado para o teste de concentração inibitória mínima foi a fração em diclorometano, apresentando uma menor concentração necessária de 25,78  $\mu\text{g/mL}$ , para a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e de 52,00  $\mu\text{g/mL}$  para inibir o crescimento de *Candida albicans*, assim esta se mostrou uma fração mais potente em testes *in vitro* para a inibição destes microrganismos. Com relação à concentração microbicida mínima, observou-se que esta fração apresenta uma ação bacteriostática no valor da concentração inibitória mínima, uma vez que os valores de CMM foram mais elevados que da CIM.

A fração em acetato de etila apresentou uma concentração inibitória mínima de 309,38  $\mu\text{g/mL}$  frente à *Candida albicans*, sendo esta também a sua concentração microbicida mínima. Já sua concentração inibitória mínima frente à *Staphylococcus aureus* foi de 77,34  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto sua concentração microbicida mínima foi de 223,44  $\mu\text{g/mL}$ , portanto com ação bacteriostática até esta concentração.

A fração butanólica testada não foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, portanto demonstrou ser resistente a esta fração, uma vez que até concentrações de 0,0048  $\mu\text{g/mL}$  a fração não foi capaz de inibir seu crescimento, no entanto apresentou atividade quanto à *Staphylococcus aureus*, apesar das concentrações terem sido relativamente altas. Além disso, a fração hexânica não demonstrou atividade satisfatória frente à nenhum microrganismo, sendo resistente até as maiores concentrações avaliadas (9,9  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os controles positivos para a realização dos testes foram o cloranfenicol para a *S. aureus* e a nistatina para a *C. albicans*, e apresentaram concentrações de atividade menores que 10  $\mu\text{g/mL}$ . A placa do teste de determinação da CIM para a fração em acetato de etila após revelação pode ser observada na figura 2:



**Figura 2:** Resultado da determinação da CIM para a fração em acetato de etila frente à *S. aureus*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a fração em diclorometano foi a que apresentou melhor atividade, o que indica que os componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana em sua maioria, ou os de maior potência, estavam contidos nessa fração. Desta forma, sugere-se que, em trabalhos futuros, esta fração seja purificada para o isolamento dos metabólitos com ação antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

- CARDOSO, D. B. O. S. *Vatairea* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23208>>. Acesso em: 09 abr. 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2002. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição**. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- OLIVEIRA, H. C. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 115, p. 515–519, 2008.
- PENNA, C. ; MARINO, S. ; VIVOT E. ; CRUAÑES M. C. ; MUÑOZ, J. D. ; CRUAÑES, J. ; FERRARO, G. ; GUTKIND, G. ; MARTINO. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J Ethnopharmacol**, v.77, n.1, p. 37-40, 2001.
- VALADARES, S. N. S. **Composição Química e atividade antimicrobiana das folhas de Lueltzelburgia auriculata (allemao) Ducke e Vatairea macrocarpa (Benth) Ducke (Leguminosae)**. Feira de Santana, 2014. 57 p.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 1995. 384p.