

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Hyptis platanifolia* MART. EX BENTH CULTIVADA

Amanda dos Santos Teles¹; Angélica Maria Lucchese²; Ana Paula Trovatti Uetanabaro³; Lenaldo Muniz Oliveira⁴;

1. Bolsista FAPESB/PIBIC, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amandateles_@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
3. Co-orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, uetanabaro@yahoo.com.br
4. Co-orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, lenaldo.uefs@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Hyptis plantanifolia*, adubação, atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos químicos, etnofarmacológicos e farmacológicos apontam para o elevado potencial econômico de espécies do gênero *Hyptis* (URONES, 1998; FALCÃO; MENEZES 2003). *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth é uma planta perene com caule herbáceo ramoso que cresce de forma abundante no nordeste brasileiro (MARTIUS; EICHLER, 1857). Análises fitoquímicas dessa espécie têm revelado um rendimento médio de 0,5% de óleo em suas folhas, com atividade frente à *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*, com α -farneseno e γ -bisaboleno como constituintes majoritários (LUCCHESI et al., 2006).

Tendo em vista o grande potencial químico e econômico dessa espécie torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a avaliação do seu potencial produtivo sob condições de cultivo, possibilitando sua exploração de forma sustentável. As substâncias bioativas presentes nas plantas fazem parte do metabolismo secundário e estas, normalmente, são produzidos em resposta a condições de estresse ambiental. Assim, o perfil químico de plantas mantidas em condições de cultivo nem sempre é equivalente qualitativamente e quantitativamente ao observado em plantas no seu ambiente natural (FRANÇA, 2001). Sendo assim, mudanças no perfil químico da planta podem implicar em variações na sua ação antimicrobiana, devido a produção de diferentes substâncias bioativas produzidas sob condição de estresse.

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito da fertilização do solo com diferentes tipos de adubação sobre a atividade antimicrobiana de extratos de *Hyptis platanifolia* em condições de cultivo.

MATERIAL E MÉTODO

Plantas obtidas a partir de sementes foram cultivadas em canteiros com 1,0 X 3,0m, localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em espaçamento de 0,6 X 0,6m. Antes do plantio o solo foi revolvido com enxada e adubado com composto orgânico na proporção de 8 kg por m². Os tratamentos consistiram na fertilização suplementar com diferentes tipos de nutrientes: HPT01 - 120 kg Ha⁻¹ de N; HPT02 - 120 kg Ha⁻¹ de P₂O₅; HPT03- 120 kg Ha⁻¹ de K₂O; HPT04 - 120 kg Ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O (Fórmula 10-10-10); HPT05 - 120 kg Ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O + micronutrientes (Fórmula 13-13 -13) e HPT06 – sem fertilização (controle). A fonte de N, P e K utilizada foi uréia (44% de N), superfosfato simples (18% de P₂O₅) e cloreto de potássio

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

(58% de K₂O), respectivamente. A fonte de micronutrientes utilizada foi o fertilizante Nutriverde® (Vitaplan), com a seguinte composição: N -13%, P₂O₅ - 13%, K₂O - 13%, Ca - 1%, S - 4%, B - 0,05%, Co - 0,005%, Cu - 0,05%, Fe - 0,2%, Mg - 1%, Mo - 0,005%, Zn - 0,1%. As fertilizações foram subdivididas em três aplicações, realizadas aos 30, 60 e 90 dias após o plantio. Apenas a adubação com P foi realizada em aplicação única, incorporado ao solo no dia anterior ao plantio (T2). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um canteiro com 10 plantas. Decorridos 120 dias do plantio a parte aérea foi colhida, seca a sombra e encaminhada para análise fitoquímica e da atividade antimicrobiana.

O preparo dos extratos metanólicos bruto foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON), localizado no campus da UEFS. Folhas e caules foram separados e armazenados à temperatura ambiente, sendo posteriormente trituradas em moinho. Os extratos foram preparados utilizando aparelho de banho de ultrassom e metanol a 30°C. Após cada extração as amostras foram filtradas por filtração simples. O solvente foi removido por destilação à pressão reduzida e após a secagem completa dos extratos, estes foram pesados e conservados em geladeira.

A atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEN), localizado no campus da UEFS. Os micro-organismos testes utilizados para a determinação da concentração inibitória mínima foram: *Staphylococcus aureus* CCBM262; *Micrococcus luteus* CCBM283; *Bacillus cereus* CCBM282; *Escherichia coli* CCBM261; *Salmonella choleraesuis* CCBM281; *Pseudomonas aeruginosa* CCBM268; *Candida albicans* CCBM286. A concentração inibitória mínima, correspondentes aos diferentes tratamentos de adubação, diluídos a dimetilsulfóxido (DMSO) a 50%, foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo Müeller-Hinton para bactérias e levedura em placas contendo 96 poços. Os extratos foram esterilizados por filtração através da membrana de acetato celulose (Minisart®) de 0,20 µm. Os extratos foram preparados na concentração de 22mg/mL (sendo 90 µL desta suspensão aplicada no primeiro poço), prosseguindo com diluições geométricas que resultaram numa concentração de 0,08mg/mL dos extratos no último poço. Em seguida, cada poço recebeu 10µL de cada suspensão de micro-organismo teste.

A concentração de bactérias utilizadas foi de aproximadamente 1,5x10⁶ UFC.mL⁻¹ e de 5x10⁵ UFC.mL⁻¹ para as leveduras. As placas foram incubadas à temperaturas de 37°C (bactérias), por um período de 24 horas e 28°C (leveduras), por um período de 48 horas. Após o período de incubação foram adicionados 30 µL do revelador rezasurina, e a placa foi incubada por mais três horas, para análise quantitativa do crescimento microbiano. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e o antifúngico Nistatina (na concentração inicial de 0,04mg/mL) e do antibiótico Cloranfenicol (na concentração inicial de 10mg/mL) foram utilizados como controles positivos, além dos controles de viabilidade dos micro-organismos testados e da pureza do meio de cultura e dos extratos filtrados. Realizou-se o controle do solvente extrator, DMSO, de modo a verificar se este apresentava atividade frente aos micro-organismos testados. O teste para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizado através da verificação do crescimento ou não do micro-organismo teste, em placas com meio Ágar Muller Hinton, utilizando 5 µL dos poços que não apresentaram coloração pela rezasurina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados referentes ao CIM, CBM e CFM (em mg/mL) para o crescimento de levedura e bactérias frente aos extratos de caule e folha da planta *Hyptis*

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

platanifolia, obtidas a partir cultivo com as diferentes formas de adubação, estão expostos na Tabela 1.

Parte da planta	Extrato	Bactéria													
		<i>S.a.</i>		<i>M.l.</i>		<i>B.c.</i>		<i>S.c.</i>		<i>E.c.</i>		<i>P.a.</i>		Levedura	
		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
Tabela 1.															
Folha	HPT01F	2,75	2,75	5,50	5,50	2,75	2,75	2,75	2,75	5,50	5,50	2,75	2,75	1,37	2,75
	HPT02F	1,37	1,37	5,50	5,50	5,50	5,50	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	5,50	5,50
	HPT03F	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	2,75	5,50	1,37	2,75
	HPT04F	2,75	2,75	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50
	HPT05F	1,37	1,37	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75	5,50
	HPT06F	1,37	1,37	5,50	5,50	2,75	2,75	1,37	1,37	2,75	2,75	2,75	2,75	5,50	5,50
Caulo	HPT01C	5,50	5,50	11,00	11,00	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,5	5,50	2,75	2,75
	HPT02C	2,75	2,75	5,50	11,00	5,50	5,50	2,75	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	1,37	1,37
	HPT03C	5,50	5,50	11,00	11,00	5,50	5,50	5,50	5,50	11,00	11,00	5,50	5,50	5,50	5,50
	HPT04C	2,75	2,75	5,50	5,50	5,50	5,50	2,75	5,50	5,50	5,50	2,75	2,75	2,75	5,50
	HPT05C	5,50	5,50	5,50	11,00	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	2,75	5,50	5,50
	HPT06C	1,37	1,37	5,50	5,50	2,75	2,75	1,37	2,75	5,50	5,50	2,75	2,75	2,75	5,50
Clorafenicol	0,625	0,005		0,078		0,039		0,005		0,039		Concentração			
Nistatina															0,0003

Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos folha e caule de *Hyptis platanifolia*, cultivada sob diferentes formas de adubação.

S.a.: *Staphylococcus aureus* / *M.l.*: *Micrococcus luteus* / *B.c.*: *Bacillus cereus* / *S.c.*: *Salmonella choleraesuis* / *P. a.*: *Pseudomonas aeruginosa*

O DMSO apresentou inibição do crescimento microbiano nas respectivas concentrações 12,5% para *E. coli*, *S. choleraesuis*, *B. cereus* e *C. albicans* (correspondente a concentração de 5,50 mg/mL do extrato), 6,20% para *P. aeruginosa* e *M. luteus* (correspondente a concentração de 2,75mg/mL do extrato), 3,10% para *S. aureus* (correspondente a concentração de 1,37mg/mL do extrato). A partir desta verificação foram considerados para análise apenas os extratos em que os valores do CIM foram inferiores ao valor observado para o DMSO.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Sendo assim, avaliou-se que o extrato da folha HPT01F foi ativo frente a *S. choleraesuis*, *B. cereus* e *C. albicans*; o HPT02F foi capaz de inibir o crescimento da *E. coli* e da *S. choleraesuis*, o extrato HPT03F foi ativo apenas para a *C. albicans*, o extrato HPT04F foi inativo frente a todos os micro-organismos, o HPT05F foi ativo frente a *E. coli* e a *C. albicans*, enquanto o extrato HPT06F foi capaz de inibir a *S. choleraesuis* e *B. cereus*. Em relação aos extratos do caule HPT01C, HPT02C, HPT04C, HPT06C tiveram ação inibitória frente a *C. albicans* e o extrato HPT06C foi capaz de inibir também as bactérias *S. choleraesuis* e *B. cereus*. Os extratos HPT03C e HPT05C não apresentaram resultados de atividade.

Comparando-se os resultados do CIM para os extratos de folha e caule, constata-se que os micro-organismos testes foram mais sensíveis aos extratos da folha. Isso pode ocorrer pelo fato desta parte da planta conter um maior arsenal de produtos químicos biologicamente ativos frente ao caule.

No que se refere aos valores de CBM/CFM, dentre os extratos de folha e caule, os resultados obtidos com o tratamento HPT01C foram os que apresentaram menor concentração fungicida (1,37 mg/mL). Os extratos que apresentaram menor concentração bactericida foram HPT02F, HPT05F e HPT06C (frente a *S. aureus*) e HPT06F (frente a *S. choleraesuis*).

Analisando os dados de CIM é importante destacar a atividade desses extratos frente a levedura *C. albicans*. Três extratos da folha apresentaram ação contra a *C. albicans* (HPT01F, HPT03F, HPT05F) com valores de CIM inferiores ao tratamento controle HPT06F pertencentes, respectivamente, aos tratamentos de adubação com nitrogênio, potássio e fórmula NPK 10:10:10 + micronutrientes. Segundo GOBBO-NETO & LOPES (2007), solos ricos em nitrogênio podem levar a um aumento da biomassa e redução na produção de compostos fenólicos enquanto que solos ricos em potássio promovem alterações na atividade enzimática, incluindo aquela relacionada à via mevalonato, levando assim a uma mudança na composição química e, conseqüentemente, na ação antimicrobiana. Dentre os extratos de caule, àquele que apresentou melhor ação antifúngica foi o HPT02C com a concentração de 1,37 mg/mL (valor de CIM menor ao do tratamento controle, HPT06C), pertencente ao tratamento de adubação com fósforo, elemento este importante por participar de diversas etapas da rota biossintética dos monoterpenos. Como os tratamentos controle, HPT06F e HPT06C, não foram munidos de fertilização especial, apenas de adubação orgânica comum também aos demais tratamentos, valores CIM menores que os destes confirmam a influência do estresse nutricional sobre a variação de metabólitos secundários produzidos e demonstram possível seleção e/ou produção de substâncias bioativas mais eficazes contra a *C. albicans*.

CONCLUSÃO

A fertilização química promove diferenças frente ao comportamento antimicrobiano da espécie *H. platanifolia*, demonstrando que o controle deste fator é de importância relevante no cultivo de espécies medicinais. Considerando o grau de inibição microbiana observa-se que *C. albicans* foi o micro-organismo mais sensível quando correlacionadas às atividades dos extratos (caule e folha), sendo um indicativo de que esta planta representa uma fonte promissora de compostos antifúngicos. Embora a composição química destes extratos ainda não tenha sido determinada, sabe-se que este gênero é rico em compostos terpênicos e flavonóides (FALCÃO; MENEZES, 2003), e a presença de terpenos pode ser a chave para a atividade antimicrobiana, pois são capazes de atuar sobre a membrana celular causando danos às células (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

REFERÊNCIAS

- FALCÃO, D. Q; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. Revista Brasileira de Farmácia. v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.
- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, [s/l], v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- LUCCHESI, A.M. et al. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. Anais. Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2006.
- MARTIUS, C. F. P; EICHLER, A. G. Flora Brasiliensis. v. 8, parte I, 1857
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Microbiology.Review, 1995, 59, 201-222.
- URONES, J. G. et al. Triciclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. Phytochemistry, v. 48, n. 6, p.1035-1038, 1998.