

# ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE FRAÇÕES DO EXTRATO HEXÂNICO E DICLOROMETANO DE *Hyptis platanifolia*

**Dayse Alessandra Almeida Silva<sup>1</sup>; Carla Cardeal Mendes<sup>2</sup>; Aristóteles Góes Neto<sup>3</sup>.**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dayse.aasilva@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ccardealmendes@gmail.com

3. Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: agoesnt@uefs.br

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hyptis platanifolia*, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos vegetais com ação medicinal, largamente utilizados na medicina popular em várias regiões do país. (COUTINHO et al, 2004). A diminuição da eficácia das drogas devido à resistência de micro-organismos e o interesse por compostos que reduzam o efeito deletério dos radicais livres em sistemas biológicos, tornam importantes os estudos sobre o potencial terapêutico dos produtos naturais (COUTINHO et al, MOLYNEUX, 2004). A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser feita pela determinação da quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo-teste, conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (OSTROSKY, E. A. et al, 2008). A atividade antioxidante pode ser avaliada pela capacidade de captura de radicais livres, como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (SOUZA, T. J. T. et al, 2007).

O gênero *Hyptis*, da família Lamiaceae, possui espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica, que elaboram metabólitos com potencial farmacológico (FALCÃO; MENEZES, 2003). *Hyptis platanifolia* é uma espécie aromática endêmica da região do semi-árido brasileiro.

O primeiro estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e caules de espécimes de *H. platanifolia* coletados no semi-árido baiano (PINTO et al, 2008), revelou um potencial antimicrobiano promissor, com um bom espectro de ação frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, destacando-se os extratos hexânico e diclorometano de folhas. Um estudo recente mostrou que suas folhas e caules apresentam compostos com atividade antioxidante frente ao DPPH (PINTO et al, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo a continuidade da avaliação do potencial biológico de *H. platanifolia* a partir do estudo fitoquímico das frações mais ativas do extrato hexânico de folhas, do fracionamento cromatográfico preliminar do extrato diclorometano de folhas, da avaliação da ação antimicrobiana pelo método de determinação da CIM, bem como da avaliação da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical DPPH de frações obtidas. Este estudo poderá contribuir para a obtenção de novos compostos bioativos mais eficazes no tratamento de doenças infecciosas e na redução do risco a doenças.

## METODOLOGIA

As frações HPFH 10-18 e HPFH 8-9 (do extrato hexânico de folhas, HPFH) e o extrato diclorometano de folhas (HPFD) de *H. platanifolia* foram submetidos à separação cromatográfica por adsorção em sílica em coluna aberta utilizando-se gradiente de polaridade. As frações obtidas foram submetidas à triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD). As soluções (5mg/mL) foram aplicadas em placas cromatográficas de gel de sílica GF<sub>254</sub> e eluídas em fases móveis previamente selecionadas. As placas foram reveladas com luz UV 365 nm e 254 nm e com Anisaldeído-Ácido Sulfúrico (AS), Dragendorff (DRG),

Liebermann-Burchard (LB), Hidróxido de Potássio (KOH) e Produtos Naturais-Polietilenoglicol (NP/PEG) (Wagner e Bladt, 1995). Foram feitos controles negativos.

A avaliação da atividade antioxidante foi baseada no ensaio do DPPH por CCD (Silva, 2005). As amostras foram solubilizadas em solvente adequado (5mg/mL) e aplicados 10 µL, 20 µL e 30 µL sobre placas cromatográficas GF<sub>254</sub>. Como padrão positivo, utilizou-se 0,7 µL de rutina (5mg/mL). Após eluição, as placas foram reveladas com solução metanólica de DPPH a 0,004%. O surgimento de bandas amarelas, em até 45 minutos, foi considerado resultado positivo para atividade antioxidante. O grau de resposta ao DPPH foi avaliado em função do tempo de reação em minutos, assim classificado: início da reação < 5 min. (rápido), entre 5-30 min. (intermediário) e > 30 min. (lento) (HUANG et al, 2005).

Para a realização dos ensaios da atividade antimicrobiana pelo método da CIM, foram selecionadas as amostras HPFD 17-19, HPFD 20-21, HPFD 22-26, HPFH 10-18/43-59, HPFH 10-18/60-110 e HPFH 8-9/68-106, utilizando-se como critério de escolha a massa disponível e a resolução dos cromatogramas em CCD. Os micro-organismos testados foram *Escherichia coli* CCMB261, *Staphylococcus aureus* CCMB 263, *Candida albicans* CCMB 286 e *Candida parapsilosis* CCMB 288, todos cedidos pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB/UEFS). As bactérias e leveduras foram repicadas a partir de culturas estoques e incubadas a 37°C/16-18 h e 28°C/48 h, respectivamente. A metodologia utilizada foi a descrita na CLSI (2002) para as leveduras e na CLSI (2003a) para as bactérias, com adaptações. O método consiste em microdiluição seriada e as amostras foram solubilizadas em sulfóxido de dimetila (DMSO) em uma concentração de 42 mg/mL. O teste foi realizado em triplicata e foram feitos controles com DMSO, de esterilidade do meio CMH, da esterilidade dos extratos e da efetividade dos micro-organismos. Os antibióticos estreptomicina e nistatina foram utilizados como controle positivo. As concentrações iniciais foram de 21 mg/mL (Linha 1) e 0,01 mg/mL (Linha 12). As suspensões de micro-organismos tinham concentrações de  $9 \times 10^6$  UFC/mL para bactérias e  $5 \times 10^5$  UFC/mL para leveduras. As placas com as bactérias foram incubadas a 37°C/18-24 h e com as leveduras, a 28°C/48 h. A revelação das placas foi feita com o corante resazurina, considerando-se que a alteração da coloração azul para uma coloração rosa indica crescimento microbiano.

No teste da Concentração Bactericida Mínima (CBM), adicionaram-se a diferentes quadrantes na placa de petri, com meio Ágar Mueller Hinton, 5 µL das amostras retiradas dos poços onde houve inibição microbiana e do primeiro poço, no qual houve crescimento microbiano. Os quadrantes que apresentaram crescimento microbiano indicam ação bacteriostática e aqueles que não apresentaram crescimento, indicam ação bactericida na concentração testada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fracionamentos do extrato HPFD e das frações HPFH 8-9 e HPFH 10-18 de *H. platanifolia* apresentaram rendimentos de 57,0%, 84,1 % e 97,3%, respectivamente, o primeiro indicando perdas por adsorção na fase estacionária pela natureza relativamente polar do extrato. Das frações e sub-frações obtidas, algumas foram selecionadas para a triagem fitoquímica e para os testes antioxidantes e antimicrobianos.

A triagem fitoquímica mostrou reatividade de todas as amostras ao AS e LB, sugerindo a presença de terpenos, triterpenos e esteróides. As frações HPFD/4-7, HPFD/20-21 e HPFD/22-26 mostraram reatividade a NP/PEG, indicando a presença de flavonóides. As frações HPFH-10-18/29-42, HPFH-10-18/43-59 e HPFD/4-7 reagiram com KOH, indicando a presença de cumarinas. Apenas HPFD/8-13 apresentou resultado positivo para DRG, sugerindo a presença de alcalóides. Os resultados são compatíveis com a presença significativa de terpenos em várias espécies do gênero *Hyptis*, bem como flavonóides e a rara ocorrência de alcalóides (FALCÃO; MENEZES, 2003). Até o momento, não foram

encontrados relatos de cumarinas no gênero *Hyptis*.

Todas as amostras testadas apresentaram atividade antioxidante no ensaio do DPPH por CCD, a exceção de HPFH 10-18. Em geral, houve aumento da atividade com o aumento da quantidade de amostra testada. Todas as sub-frações HPFH apresentaram reação rápida com o DPPH. A ausência de atividade antioxidante de HPFH 10-18, bem como a constatação desta atividade em todas as sub-frações de HPFH 10-18, podem ser explicadas pela variação da concentração de compostos antioxidantes após o fracionamento cromatográfico de HPFH 10-18. A purificação parcial da amostra pode ter resultado no aumento da concentração relativa de compostos estruturalmente similares e/ou de polaridade comparável, favorecendo a sua detecção na triagem fitoquímica e a cinética da reação de compostos antioxidantes com o DPPH. Compostos fenólicos como os flavonóides e taninos, além de triterpenos, são substâncias polares e/ou doadoras de elétrons com excelente potencial antioxidante (GAO et al.,1999). Isso pode explicar os resultados de atividade antioxidante das frações reativas para AS e LB. Contudo, os flavonóides podem ter contribuído para a atividade antioxidante de HPFD/20-21 e HPFD/22-26, pois os fatores de retenção das bandas detectadas com NP/PEG corresponderam aqueles das bandas detectadas com DPPH para estas amostras.

Os resultados da prospecção da atividade antimicrobiana pelo método da determinação da CIM das frações HPFD 17-19, HPFD 20-21, HPFD 22-26, e sub-frações HPFH 10-18/ 43-59, HPFH 10-18/60-110 e HPFH 8-9/68-106 estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. CIM de frações do extrato diclorometano de folhas (HPFD) e de sub-frações do extrato hexânico de folhas (HPFH) de *H. platanifolia* em mg/mL.

Amostra	Micro-organismos			
	<i>E. coli</i> CCMB261	<i>S. aureus</i> CCMB 263	<i>C. albicans</i> CCMB 286	<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288
HPFD 17-19	2,625	1,313	-	5,250
HPFD 20-21	2,625	0,656	-	5,250
HPFD 22-26	5,250	2,625	-	5,250
HPFH 10-18/ 43-59	2,625	0,041	5,250	-
HPFH 10-18/ 60-110	5,250	2,625	2,625	-
HPFH 8-9/68-106	2,625	0,656	5,250	-
DMSO	2,625	5,250	10,500	5,250
Estreptomicina	1,250	0,030	-	-
Nistatina	-	-	1,250	2,500

Legenda: (-) teste não realizado

As amostras testadas contra *E. coli* CCMB261 apresentaram CIM igual ou superior ao CIM do controle do solvente DMSO. Dessa forma, não é possível afirmar que estas amostras promovam inibição do crescimento de *E. coli* CCMB261 nas concentrações testadas, pois o valor de CIM pode ser resultante apenas do efeito antimicrobiano do solvente. No entanto, todas as amostras testadas foram ativas contra *S. aureus* CCMB 263, em especial HPFH 10-18/43-59. Para as leveduras, foram selecionadas as sub-frações HPFH 10-18/43-59, HPFH 10-18/ 60-110 e HPFH 8-9/68-106 para serem testadas contra *C. albicans* CCMB 286 e as frações HPFD 17-19, HPFD 20-21 e HPFD 22-26 contra *C. parapsilosis* CCMB 288. Todas as amostras testadas foram ativas contra *C. albicans* CCMB 286, mas não podem ser consideradas ativas contra *C. parapsilosis* CCMB 288, visto que apresentaram CIM iguais ao controle do solvente. Comparando-se os resultados de CIM das frações HPFD e sub-frações HPFH com o estudo realizado por Pinto et al. (2008) da ação antimicrobiana do extrato diclorometano e frações do extrato hexânico de folhas de *H. platanifolia* para *E. coli* CCMB261, *S. aureus* CCMB 263, *C. albicans* CCMB 286 e *C. parapsilosis* CCMB 288, o

fracionamento cromatográfico não aumentou a atividade antimicrobiana, sendo diminuída ou inalterada, com exceção de HPFH 10-18/43-59, que mostrou um aumento significativo da atividade antimicrobiana para *S. aureus* CCMB 263. Alguns compostos podem apresentar efeitos sinérgicos quando em misturas complexas, potencializando a atividade biológica, ou efeitos antagônicos, diminuindo a atividade. Isso pode explicar a variação da atividade antimicrobiana quando a amostra é fracionada. No teste de CBM frente *E. coli* CCMB261, HPFD 20-21 e HPFH 10-18/60-110 mostraram crescimento microbiano em todos os poços, dessa forma, indicando um efeito bacteriostático, inibindo o crescimento e a multiplicação das bactérias, sem causar morte. As demais amostras testadas contra *E. coli* CCMB261 e todas testadas contra *S. aureus* CCMB 263 apresentaram efeito bactericida, destacando-se a fração HPFH 10-18/43-59 contra *S. aureus* CCMB 263, com CBM de 0,041mg/mL.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo preliminar do perfil químico das frações do extrato diclorometano e sub-frações do extrato hexânico de folhas de *H. platanifolia*, através da triagem fitoquímica, indicou predominância de compostos terpênicos, sendo um resultado esperado devido aos dados reportados na literatura sobre a química do gênero *Hyptis*. A prospecção da atividade antioxidante mostrou um promissor potencial antioxidante dessas frações, que pode estar relacionado à presença significativa destes compostos. As frações do extrato diclorometano e sub-frações do extrato hexânico mostraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* CCMB 263, o que mostra a relevância do fracionamento na busca dos compostos de fontes vegetais com possível ação terapêutica. Diante dos resultados obtidos, pode-se constatar que a espécie *H. platanifolia* é uma fonte promissora de metabólitos ativos, sendo de grande importância a investigação da atividade biológica de espécies vegetais que ainda não foram estudadas farmacologicamente e que são representantes de gêneros botânicos com relevância etnofarmacológica e econômica, como é o caso do gênero *Hyptis*.

## REFERÊNCIAS

- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003a. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 6.ed. Pennsylvania, 19087-1898.
- CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute . 2002. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**. 2. ed. Pennsylvania, 19087-1898.
- COUTINHO, H. D. M. et al. **Rev. Conceitos**, [S.l.], v. 6, p. 77-85, 2004.
- FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. **Rev. Bras.de Farm.**, [S.l] v.84, p. 68-74, 2003.
- GAO, Z. et al, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1999.
- HUANG, D. et al. **J. Agric. Food Chem**. 2005, v. 53.
- MOLYNEUX, P. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 211-219. 2004.
- OSTROSKY, E. A. et al. **Rev. Bras. Farmacogn**. [online]. 2008, vol.18, nº2, pp. 301-307.
- PINTO, R. P. et al, 2008. **Atividade antimicrobiana de *Hyptis platanifolia***. In: XII Seminário de Iniciação Científica da UEFS, Feira de Santana.
- PINTO, R. P. et al, 2009. **Estudo do perfil químico e da atividade biológica de *Hyptis platanifolia***. In: XIII Seminário de Iniciação Científica da UEFS, Feira de Santana.
- SILVA, A. F. S. 2005. ***Hippeastrum vittatum* (L'Hér) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore**: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese.
- SOUZA, T. J. T. et al. **Rev. Bras. Farmacogn**. 2007, v.17, nº.3, p.368-372.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1995.