
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND PRELIMINARY ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEAVES AND STEM BARK EXTRACTS OF *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera

Cristiane da Silva Paula^{1,3}, Maria Christina dos Santos Verdam¹, Angela Maria de Souza^{1,2}, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota¹, Obdúlio Gomes Miguel², Marilis Dallarmi Miguel¹.

¹Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacotécnica, Curitiba, PR, Brasil

²Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Fitoquímica, Curitiba, PR, Brasil

³Autor para correspondência: crisspaula@onda.com.br

RESUMO:

Dasyphyllum tomentosum (Spreng) Cabrera é conhecida popularmente por açúcará, agulheira, espinho-de-agulha e goiapá, pertence à família Asteraceae cujos representantes destacam-se principalmente pelas propriedades terapêuticas. O objetivo deste estudo foi uma investigação qualitativa do perfil químico da planta a fim de se identificar as principais classes de constituintes presentes nas folhas e casca do caule, além da avaliação preliminar da atividade antibacteriana, tendo em vista a inexistência de estudos na espécie. Para a análise fitoquímica o extrato hidro alcoólico 20% e extrato aquoso foram submetidos reações clássicas de caracterização dos grupamentos químicos, e para avaliação da atividade antibacteriana, o extrato etanólico bruto foi submetido ao ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima. A análise fitoquímica apontou a presença de triterpenos e/ou esteroides, flavonoides, alcaloides, heterosídeos antociânicos e taninos. Os extratos etanólicos das folhas e casca do caule de *Dasyphyllum tomentosum* mostraram ausência de atividade inibitória frente aos microorganismos testados.

PALAVRAS CHAVE: Asteraceae, CIM, espinho de agulha

ABSTRACT:

Dasyphyllum tomentosum (Spreng) Cabrera is popularly known by açúcará, agulheira, thorn-in-needle and goiapá, belongs to the Asteraceae family whose representatives stands mainly by therapeutic properties. This study was a qualitative investigation of the chemical profile of the plant in order to identify the main classes of constituents present in the leaves and stem bark, besides the preliminary assessment of the antibacterial

activity in view the lack of studies in this specie. For phytochemical analysis hydro alcoholic s20extract and aqueous extract 20% were submitted by classical reactions characterization of chemical groups, and the ethanol extract was subjected to the test for determining the antibacterial activity by the Minimum Inhibitory Concentration. The phytochemical analysis indicated the presence of triterpenes and/or steroids, flavonoids, alkaloids\pard f1, tannins and anthocyanin glycosides. The ethanol extracts of the leaves and stem bark of *Dasyphyllum tomentosum* showed no inhibitory activity against the tested microorganisms.

KEY WORDS: Asteraceae, MIC, thorn needle

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos fármacos empregados atualmente são provenientes direta ou indiretamente de plantas (YUNES, CECHINEL FILHO, 2001) tradicionalmente utilizadas pela população no controle de doenças e pragas (FRANÇA, 2003).

Dasyphyllum tomentosum (Spreng) Cabrera, encontrada no Sudeste e Sul do Brasil, é conhecida popularmente por açúcará, agulheira, espinho-de-agulha e goiapá (FERNANDES & RITTER, 2009). Ainda não existem relatos científicos sobre o potencial terapêutico desta espécie, no entanto, é de grande importância a quantidade de informações existentes sobre as atividades farmacológicas de outras espécies de Asteraceae, família a qual pertence, no tratamento de várias doenças (FABRI *et al.*, 2011). Acrescenta-se a isso, o fato de que plantas pertencentes a esta família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química, fato ainda não observado com esta espécie (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Neste contexto, este estudo teve o objetivo de realizar uma avaliação fitoquímica dos extratos obtidos de folhas e casca do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera a fim de se identificar as principais classes de constituintes químicos presentes com o objetivo de servirem de guias para o isolamento de substâncias (FALKENBERG *et al.*, 2003), além de avaliar o potencial antibacteriano da espécie em busca de novos compostos que possam ser utilizados na terapêutica medicamentosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera foram coletadas no município de Curitiba (coordenadas 25°26'48.08" S e 49°14' 25.95" W), estado do Paraná, em agosto e setembro de 2010. A identificação botânica da espécie foi

realizada no Museu Botânico Municipal (MBM) por comparação com exsicata catalogada no herbário sob o número 54772.

As folhas e casca do caule de *D.tomentosum* foram secas separadamente em temperatura ambiente e posteriormente reduzidas a fragmentos de pequenas dimensões em moinho de facas.

2.2 EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

O extrato etanólico bruto foi obtido a partir de 1 kg das folhas e 3,5 Kg de casca do caule, secas e moídas, em etanol, com a utilização do aparelho de Soxhlet até esgotamento. Este foi filtrado e concentrado por destilação e mantido em banho maria (65 °C) até remoção total do solvente.

2.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A identificação qualitativa dos grupos químicos presentes nas folhas da espécie *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003), utilizando o extrato hidro alcoólico 20% e extrato aquoso. Reações de caracterização de grupamentos químicos foram utilizadas, com desenvolvimento de coloração ou precipitação característicos.

Para o extrato aquoso realizou-se reações de caracterização para pesquisa de heterosídeos antociânicos (cores diferentes pela variação do pH), heterosídeos saponínicos (índice de espuma), heterosídeos cianogênicos (reação de ácido sulfúrico e papel picrossódico), aminogrupos (nebulização com ninhidrina) e taninos (reação com cloreto férrico e reação com formol-clorídrico).

Para o extrato hidro alcólico 20% foram realizadas reações para pesquisa de flavonoides (reação de Taubock, ensaio de Pacheco, reação de Shinoda), leucoantocianidinas (coloração da amostra após acidificação e aquecimento), esteroides e triterpenoides (reação de Liebermann-Burchard), cumarinas (extração com éter e verificação em câmara de luz ultravioleta), alcaloides (reativos de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand), antraquinonas (reação de Borntraeger).

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os ensaios da atividade antibacteriana foram realizados com as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os valores da concentração inibitória mínima foram determinados pelo método da microdiluição em caldo (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, 2009). O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, contendo 12 colunas e 8 linhas, identificadas de A a H. Os extratos foram preparados na concentração de 100 mg/mL, diluídos em etanol a 10% e DMSO a 2% e filtrados em membrana milipore 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Suíça). Após a filtração foi preparada uma solução na concentração de 10.000 µg/mL de cada extrato a ser testado. Em seguida foram transferidos 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha) na linha A das colunas 1 a 8. Na coluna 1 foram inoculados 100 µL de extrato e transferido 100 µL após homogeneização para o orifício da coluna 2, repetindo-se o procedimento até a coluna 8, obtendo-se assim concentrações em um intervalo de 5.000 a 39 µg/mL.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland e em seguida inoculados em um volume de 5 µL nos orifícios das colunas de 1 a 8, permanecendo uma concentração final de 10^4 UFC/mL. Os orifícios das colunas 9, 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. A coluna 9 foi reservada para o controle de esterilidade, adicionando-se 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de extrato. A coluna 10 e 11 para o controle negativo da atividade inibitória do diluente etanol e DMSO, adicionando-se 100 µL de solução de etanol 10% e 100 µL de solução de DMSO 2% em 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL dos inóculos bacterianos. O orifício da coluna 12 para controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL dos inóculos bacterianos.

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 16 a 20 horas e posteriormente foram adicionados 20 µL de solução aquosa de Cloreto de Trifenil Tetrazolium (TTC – Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,5%. As microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C, e após este período foi realizada a leitura dos resultados. A formação de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como ausência de atividade antibacteriana, enquanto que a não formação da coloração vermelha foi considerada como presença de atividade antibacteriana. Cada teste foi realizado em duplicata (AYRES *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da prospecção fitoquímica preliminar para a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários presentes nas folhas e casca do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera.

TABELA 1 – ENSAIO FITOQUÍMICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20% DAS FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *D.tomentosum* (Spreng.) Cabrera

METABÓLITO SECUNDÁRIO	ANÁLISE	FH		FCL		FAE		FR	
		Folha	CC	Folha	CC	Folha	CC	Folha	CC
CUMARINAS	Tubo	--	--	--	--	--	--	--	--
	Papel	--	--	--	--	--	--	--	--
FLAVONÓIDES	Leucoantocianidinas	--	--	--	--	--	--	--	--
	Heterosídeos flavônicos	++	--	+	--	+++	++	+	--
	Oxálico Bórico	--	--	--	--	--	--	--	--
	Pacheco	--	--	--	--	--	--	--	--
ANTRAQUINONAS		--	--	--	--	--	--	--	--
ALCALÓIDES	Reativo de Mayer	--	--	--	--	--	--	--	--
	Reativo de Dragendorff	--	--	--	+++	--	--	+++	--
	Reativo Bouchardat	--	--	--	+++	--	--	--	--
	Reativo Bertrand	--	--	--	--	--	--	--	--
TRITEPENOS/ ESTERÓIDES	Reação Liberman - Bouchard	am	rosa	am	am	am	am	rosa	am

Legenda: -- = Negativo/ Não detectado; + = Fraco positivo; ++ = Moderado positivo; +++ = Forte positivo. CC (casca do caule), FH (fração hexano), FCL (fração clorofórmio), FAE (fração acetato de etila), FR (fração hidro alcoólica residual), am (amarelo), viol (violácea)

Conforme resultados da análise preliminar do extrato hidro alcoólico 20% (TABELA 1), ao pesquisar alcaloides nos caules e folhas de *D. tomentosum*, foi observada reação positiva com a utilização do Reativo de Dragendorff que resultou no aparecimento de precipitado de coloração tijolo na FCL da casca do caule e FR das folhas. Com o Reativo de Bouchardat houve o desenvolvimento de precipitado de coloração alaranjado também na FCL da casca do caule, confirmando o resultado obtido com o outro reativo. Alcaloides também foram observados em triagem fitoquímica preliminar realizada com outras plantas da família Asteraceae (COSTA *et al.*, 2009; FABRI *et al.*, 2011), com exemplo a *Eremanthus erythropappus*, *Eremanthus glomerulatus* e *Eremanthus incanus* (RIBEIRO *et al.*, 2010).

O aparecimento de coloração amarela na pesquisa por heterosídeos flavônicos, indicou a presença de Flavona na FAE das folhas e casca do caule, e FH, FCL e FR das folhas, também encontrados em prospecções fitoquímicas de outras asteraceae (ARANTES *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2009; FABRI *et al.*, 2011).

Na pesquisa por esteroides e/ou triterpenos, as características apresentadas

pela reação de Liberman – Bouchard indicaram a presença de triterpenos, o que foi observado nitidamente em todas as frações analisadas. A coloração amarela, observada para a FH, FCL e FAE das folhas e casca do caule são indicativas da presença de grupamento metila no carbono 14, enquanto que a coloração rósea, observada na FR da folha e FH da casca do caule indicam presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8, sendo ambas características de estruturas terpenóides. Esteroides foram anteriormente encontrados em prospecção fitoquímica de *Acanthospermum australe*, *Achillea millefolium*, *Baccharis trimera*, *Bidens segetum*, *Eupatorium laevigatum*, *Vernonia condensata*, *Taraxacum officinale* todos pertencentes à família Asteraceae (FABRI *et al.* , 2011).

TABELA 2 - ENSAIOS FITOQUÍMICOS COM O EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E DO CAULE DE *D.tomentosum*

METABÓLITO SECUNDÁRIO	FOLHA	CAULE
HETEROSÍDEOS ANTOCIÂNICOS	+	--
HETEROSÍDEOS SAPONÍNICOS	--	--
HETEROSÍDEOS CIANOGENÉTICOS	--	--
TANINOS HIDROLISÁVEIS	++	++
TANINOS CONDENSADOS	+++	++
AMINOGRUPOS	++	++
ÁCIDOS FIXOS	--	--
ÁCIDOS VOLÁTEIS	--	--

Legenda: -- = Negativo/Não detectado; + = Fraco positivo; ++ = Moderado positivo; +++ = Forte positivo

No extrato aquoso obtido das folhas, de acordo com a Tabela 2, foram encontrados os seguintes grupamentos químicos, heterosídeos antociânicos, taninos condensados e aminogrupos de acordo com a coloração característica para cada reação. Na pesquisa por heterosídeos antociânicos, pigmentos hidrossolúveis das plantas, foi observado o aparecimento de coloração vermelho com o extrato obtido das folhas, quando houve acidificação do meio, característico da liberação de antocianidinas. O mesmo resultado não foi observado para o extrato obtido das cascas do caule. Na pesquisa por taninos, houve desenvolvimento de coloração verde com o cloreto férrico 1%, indicando a presença de taninos condensados nas folhas e casca do

caule, já relatados na literatura em prospecções fitoquímicas de outras asteraceae (ARANTES *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009; PERES *et al.*, 2009.). A presença de amino grupos nas folhas e casca do caule foi confirmada com o aparecimento de coloração violácea. Este resultado positivo pode ser um indicativo para um resultado falso positivo na pesquisa de alcaloides.

Na avaliação da atividade antibacteriana, é possível observar na Tabela 3 os resultados obtidos com a Técnica de Microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Dasyphyllum tomentosum*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 5922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
EXTRATO BRUTO FOLHA	2.500 µg/mL	5.000 µg/mL	5.000 µg/mL	5.000 µg/mL
EXTRATO BRUTO CASCA DO CAULE	2.500 µg/mL	5.000 µg/mL	5.000 µg/mL	5.000 µg/mL

Legenda: ATCC- *American Type Culture Collection*; CIM - Concentração Inibitória mínima (µg/mL). Interpretação da atividade: CMI ≤ 100 µg/mL (boa atividade); 100 ≤ CMI ≤ 500 µg/mL (atividade inibitória moderada); 500 < CMI ≤ 1.000 µg/mL (atividade inibitória fraca); > 1.000 µg/mL (sem atividade).

Extratos de plantas são considerados com bom potencial inibitório se demonstram atividade em concentrações de até 100 µg/mL, atividade inibitória moderada de 100-500 µg/mL, atividade fraca de 500-1.000 µg/mL e inativos maiores que 1.000 µg/mL (Aires *et al.*, 2008). Portanto, de acordo com este padrão estabelecido e os resultados obtidos no experimento, é possível afirmar que o extrato bruto etanólico obtido das folhas e casca do caule de *D. tomentosum* mostraram ausência de atividade inibitória frente aos microorganismos testados, tendo em vista que os resultados obtidos demonstraram CIM superior a 1.000 µg/mL. Uma suposição para esta falta de atividade pode estar relacionada a ausência de metabólitos potencialmente ativos contra os microorganismos testados ou estarem presentes em concentrações muito baixas.

4. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica preliminar apontou a presença de triterpenos e/ou esteroides, flavonoides, alcaloides, heterosídeos antociânicos e taninos. Os extratos brutos das folhas e casca do caule de *Dasyphyllum tomentosum* mostraram ausência de atividade inibitória frente aos microorganismos testados.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES/REUNI pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudos, e ao Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal.

6. REFERÊNCIAS

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.1, p.90-97, Jan/Mar. 2008.

ARANTES, M. C. B.; SIMON, F.P.; RIBEIRO, P. A. M.; REZENDE, M. H.; PAULA, J.R.; BARA, M. T.F. Caracterização Farmacognóstica de *Eclipta alba* (L.) HASSK, Asteraceae (AGRIÃO DO BREJO). **Revista Eletrônica de Farmácia**. V. 2, n. 2, p. 21-24, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Table M100-S19**. Wayne, PA, USA, 2009.

COSTA, E.S.S.; DOLABELA, M.F.; PÓVOA, M.M.; OLIVEIRA, D.J.; ADOLFO H. MÜLLER, A.H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Rev. bras. farmacogn.** v. 19, n. 4, p. 834-838, 2009.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; DUTRA, L.B.; BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Rev. bras. plantas med.**, v.13, n.2, p. 183-189, 2011.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: Simões *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis : Ed da UFRGS e UFSC 2003. 1101p.

FERNANDES, A.C.; RITTER, M.R. A família Asteraceae no Morro Santaba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **R.bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 7, n.4, p. 395-439, out/dez. 2009.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: Simões *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre/Florianópolis : Ed da UFRGS e UFSC 2003. 1101p.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb. E *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p.13-39, 1979.

PERES, R.L.; MORAES, S.C.S.; CARVALHO, C.A.; NASCIMENTO, P.C.; CARVALHO, L.M.; SILVA, M.B.S.; RAMPELOTTO, P.H.; , ROSA, M.B.; ACHILLEA MILLEFOLIUM – Asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 6, n. 3, p. 81-93, 2009.

RIBEIRO, A.O.; SILVA, A.F.; CASTRO, A.H.F. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.4, p.456-465, 2010.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, Feb. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13/09/2010.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. 500p.