

---

---

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE)

Phytochemical Investigation and Antimicrobial Activity Evaluation of the *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE)

SILVA, R. Z. da<sup>1</sup>; RIOS, E. de M.<sup>2</sup>; SILVA, M. Z. da<sup>3</sup>; LEAL, L. de F.<sup>4</sup>; YUNES, R. A.<sup>5</sup>; MIGUEL, O. G.<sup>6</sup>; CECHINEL FILHO, V.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG – Ponta Grossa, Paraná

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral da UEPG – Ponta Grossa, Paraná/PUCPR – Curitiba, Paraná

<sup>3</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia da UEPG – Ponta Grossa, Paraná

<sup>4</sup>CDTG – Guarapuava, Paraná

<sup>5</sup>Departamento de Química da UFSC – Florianópolis, Santa Catarina

<sup>6</sup>Departamento de Farmácia da UFPR – Curitiba, Paraná

<sup>7</sup>NIQFAR/CCS/UNIVALI – Itajaí, Santa Catarina

## RESUMO

O presente trabalho envolveu extração, isolamento, purificação e identificação dos constituintes químicos das partes aéreas da *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE). No processo de extração ocorreu a formação de um precipitado, no qual foi isolado e purificado um composto majoritário, que por análises espectroscópicas de IV, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e por comparação com os dados existentes na literatura, foi identificado como sendo o diterpeno ácido caurenóico. Foram realizados ensaios biológicos para avaliar a ação antimicrobiana com o precipitado, extrato etanólico bruto, as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica e o diterpeno ácido caurenóico contra as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus cereus*, pela técnica da difusão em meio sólido por cavidade e posteriormente pelo método de diluição em placa. Os resultados demonstraram que as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica e o ácido caurenóico obtidos da *M. lanuginosa*, apresentaram atividade antimicrobiana moderada frente as bactérias Gram positivas e foram inativos contra as bactérias Gram negativas.

Palavras Chave: *Mikania lanuginosa*, ácido caurenóico, atividade antimicrobiana

## ABSTRACT

The present study investigated the extraction, isolation and purification the chemical compounds of the aerial parts of *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE). In the process of extraction it occurred the formation of a precipitate, it which was isolated and purified a ruling compound, and by spectroscopic analysis of the IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and comparison with reported data in the literature it was identified as being the diterpene kaurenoic acid. It were performed biological assays to estimate the antimicrobial action with the precipitated, crude etanolic extract, hexane, dichoromethane, acetate ethyl, butane fractions and diterpene kaurenoic acid contrasting with strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus cereus*, by technique of the diffusion in solid mean by cavity and afterwards by the plaque dilution method. The results showed that the hexane, dichoromethane, acetate ethyl, butane fractions and the kaurenoic acid obtained from the *Mikania lanuginosa* DC presented a moderate antimicrobial activity face to Gram positives bacteria and got inert against the Gram negatives bacteria.

Key words: *Mikania lanuginosa*, caurenoic acid, antimicrobial activity.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mikania* Willdenow. pertence a família Asteraceae e possui cerca de 300 espécies das quais 152 ocorrem no Brasil. As *Mikánias* produzem com freqüência resinas, que apresentam altas concentrações de diterpenos, principalmente os derivados do esqueleto caurano, pimarano e labdano (OLIVEIRA et al, 1994; RODRIGUES, 1996). Muitas espécies de *Mikánias* tem demonstrado efeito antimicrobiano contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (ESQUICI, et al., 1989; SANTOS et al., 1998).

Dentre as inúmeras espécies deste gênero encontra-se a *Mikania lanuginosa* DC, uma

---

---

planta trepadeira e conhecida popularmente por Cipó-cabeludo, devido a grande quantidade de pêlos presentes nos caules e folhas. É amplamente distribuída na região sudeste e sul do Brasil, especialmente nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (OLIVEIRA et al., 1994).

Esta espécie vegetal, costuma ser confundida pelo povo com a *Mikania hirsutissima* DC, o Cipó-cabeludo oficial da Farmacopéia Brasileira, em virtude das suas semelhanças botânicas, sendo freqüentemente empregada para adulterá-la (RODRIGUES et al. 1996).

*Mikania lanuginosa* e *Mikania hirsutissima* são muito utilizadas pela população na forma de chás e como matéria-prima para a indústria de fitoterápicos, pelas propriedades terapêuticas que apresentam, tais como antisséptica das vias respiratórias, expectorante, antiinflamatória, analgésica, antireumática e antisséptica das vias urinárias (SANTOS et al, 1998; ESQUICI et al, 1989).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivos: Extrair, fracionar, isolar, purificar e identificar os constituintes químicos das frações obtidas das partes aéreas de *Mikania lanuginosa* DC, além de avaliar a atividade antibacteriana do extrato bruto, precipitado, frações: diclorometano, acetato de etila, butanólica e ácido caurenóico isolado da *Mikania lanuginosa* DC.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A espécie vegetal, *Mikania lanuginosa* DC foi coletada no mês de setembro de 1998, na Vila Estrela, Bairro de Ponta Grossa, estado do Paraná. A identificação botânica do material vegetal foi realizada pelo botânico Dr. Gert HatschBach, do Museu Botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba, por comparação com a exsicata depositada no herbário, onde recebeu o número de referência 190376.

### 2.2 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

As partes aéreas da *Mikania lanuginosa* DC foram fragmentadas (2.260 kg) e submetidas à extração por maceração em um percolador por 7 dias, em presença de etanol a 80%. Neste processo de extração ocorreu a formação de um precipitado (PREC), o qual foi filtrado a vácuo. O extrato foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo a temperatura de 55°C até a eliminação do solvente, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EXT) (MATOS, 1988).

### 2.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DO EXTRATO BRUTO

O fracionamento do extrato bruto foi realizado por partição líquido/líquido com solventes de polaridades crescentes, obtendo-se as frações: hexânica (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AE) e butanólica (BUT) (CEQUINEL FILHO; YUNES, 1998).

### 2.4 ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO PRECIPITADO

O precipitado foi submetido a uma análise cromatográfica por CC, utilizando-se solventes de polaridades crescentes: hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. Coletou-se 117 frações, as quais foram monitoradas por CCD e conforme perfil

---

---

cromatográfico foram agrupadas em 4 subfrações. As subfrações 2 e 3 foram purificadas por refractionamento em CC e eluidas com hexano 100% e hexano/acetato de etila 98%. Após a evaporação do solvente, ocorreu a formação de cristais incolores e alongados, os quais foram analisados por CCD comparativa, utilizando-se padrão autêntico do ácido caurenóico. Posteriormente, o composto puro foi submetido à análises espectroscópicas de IV, CG/MS, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H, as quais possibilitaram a sua identificação, como sendo o diterpeno ácido caurenóico (Figura 1).

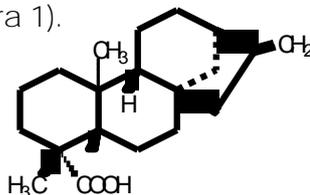


FIGURA 1 - Ácido ent-caur-16-en-19-óico (ácido caurenóico).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As frações obtidas da *Mikania lanuginosa* submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana, foram: o precipitado (PREC), fração diclorometano (DCM), fração acetato de etila (AE), fração butanólica (BUT) e o ácido caurenóico (AC), as quais foram dissolvidas em dimetilsulfoxido e filtradas em milipore.

Para os testes de sensibilidade foram utilizadas as seguintes estirpes: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 e *Bacillus cereus*, isolado da clínica. As bactérias foram ativadas em meio trypticase soy broth (TSB) e a densidade determinada pelo tubo 0,5 da escala de McFarland.

O potencial antimicrobiano do extrato bruto, precipitado e das frações foi inicialmente avaliado pela técnica da difusão em meio trypticase soy ágar (TSA) por cavidade – placa (CLEELAND; SQUIRES, 1991). Um volume de 50 ul de cada fração foi colocado em pequenos orifícios realizados no centro do meio de cultura inoculado com 100 ml da suspensão. As placas foram incubadas a 5°C por 5 horas, para permitir a difusão das frações no meio de cultura antes do crescimento das bactérias, e depois a 37°C por 24 horas. Após incubação, mediu-se o diâmetro do halo de inibição do crescimento quando presente.

A concentração mínima inibitória (MIC) do AC foi avaliada por diluição em ágar (TSA). Para avaliar a possível atividade bactericida do AC em *S. aureus*, procedeu-se a análise do MIC em meio TSB, e a partir dos tubos que não apresentaram crescimento visível após 24 horas, realizou-se o sub-cultivo e contagem do número de colônias sobreviventes em meio TSA.

Os experimentos foram realizados em triplicata e foram utilizados como controle, amicacina e volumes equivalentes de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente das frações.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações DCM e AE (1,5 mg) produziram halos de inibição contra *B. cereus*. Foram necessárias concentrações mais elevadas destas frações (2,2 mg) para que fossem formados halos em *S. aureus* e *S. epidermidis*, sendo *S. epidermidis* a mais resistente. O EXT, o PREC e a fração BUT (3,0 mg) formaram halos apenas contra *B. cereus*. As frações testadas foram

inativas contra as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 1).

TABELA 1 - ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES DA *Mikania lanuginosa* CONTRA BACTÉRIAS PELO MÉTODO DA DIFUSÃO RADIAL EM ÁGAR. DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MM.

Bactéria	Extratos e frações de <i>Mikania lanuginosa</i> – 3 mg/cavidade								
	AE 0,6	AE 1,5	AE 2,2	DCM 0,6	DCM 1,5	DCM 2,2	BUT 3,0	EXT 3,0	FILT 3,0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	12	0	0	14	0	0	0
<i>B. cereus</i>	8	11-12	—	8-10	12-16	—	13-15	13	12
<i>S. faecalis</i>	0	0	—	0	0	—	—	—	—
<i>S. epidermidis</i>	—	—	10	—	—	10	0	0	0

—: não testado

Concentrações de até 100 mg/ml de AC diluídos em meio sólido não inibiram o crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa*. A concentração mínima inibitória do ácido caurenóico (AC), determinada em meio sólido após 24 e 48 horas de incubação, foi de 75 mg/ml para *S. aureus* e *S. epidermidis* e de 60 mg/ml para *B. cereus* (Tabela 2).

TABELA 2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DO AC. CAURENÓICO (AC) EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, POR DILUIÇÃO EM ÁGAR, APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO.

AC (µg/ml)	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
20	0	++	—	—	—	—
30	—	—	—	—	0	++
35	0	++	—	—	—	—
40	0	++	0	+++	0	+++
50	0	+	0	++	0	+
60	0	0	0	++	0	+
70	—	—	—	—	0	+
75	—	—	0	0	0	0
100	—	—	0	0	—	—
125	—	—	0	0	—	—
150	—	—	0	0	—	—
DMSO	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Controle	+++	+++	+++	+++	+++	+++

0: < 3 colônias, +: 3 a 150 colônias, ++: 150 a 300 colônias, +++: Crescimento confluyente

O efeito bactericida do AC, correspondente a um número de sobreviventes igual ou inferior a 0,01%, não foi observado em concentrações de até 150 mg/ml. Sub-cultivos demonstraram redução entre 97 a 99% da população inicial de *S. aureus* em concentrações de 75 a 150 mg/ml de AC (tabela 3).

TABELA 3 - ATIVIDADE INIBITÓRIA DO AC EM *S. aureus* POR DILUIÇÃO EM CALDO APÓS 24 E 48 HORAS A 37°C.

ÁC (mg/ml)	24 h	% da população inicial após subcultivo	48 h
150	0	0,8 %	0
100	0	0,6 %	0
75	0	2,4 %	0
37,5	+	---	++
18,8	+++	---	+++
DMSO	+++	---	+++
<i>S. aureus</i>	+++	---	+++

0: ausência de crescimento; +, ++, +++: turvação crescente do meio

#### 4 CONCLUSÕES

A presente pesquisa permitiu o isolamento e a identificação do composto ácido caurenóico presente na fração precipitado da espécie vegetal *Mikania lanuginosa* DC.

O ácido caurenóico e as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica obtidos da *M. lanuginosa*, apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. cereus* e foram inativos contra as bactérias gram-negativas testadas.

#### 5 REFERÊNCIAS

- OLIVEIRA, F.; SAITO, M.L.; GARCIA, L.O. Morfologia Externa das Partes Aéreas e Anatomia Foliar das Espécies Brasileiras de *Mikania* Willdenow secção Globo sae Robinson – visão farmacognóstica. *Lecta - USF, Bragança Paulista*, 12 (1): 23 - 65 (1994).
- RODRIGUES, R.F.O.; ALVARENGA, M.A.; KATO, E.T.M. Constituintes químicos de *Mikania malacolepsis* Robinson. *LECTA - USF, Bragança Paulista* vol. 14, n°1, jan./jun. 1996, p. 29 – 47.
- ESQUICI, R. N. et al. Investigação Comparativa da Atividade Antimicrobiana de *Mikania hirsutissima* DC (Compositae) e *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. et.Fisch ) Copel ( Polypodiaceae ). *Rev. Bras. Farm.*, 70 (3): 74 – 76 , (1989).
- SANTOS, T.C.; TOMASSINI, T.C.B.; CABRAL, L.M. Estudos Preliminares Sobre a Constituição Química e Atividade Antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev. Bras. Farm.*, 1998, 79 (3/4): 54-55.
- MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza, Edições UFC, 1988.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. *Quim. Nova*, 21 (1): 99 – 103, (1998).
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, ed. 3, edited by V. LORIAN, Williams & Wilkins, Baltimore, ch. 21. 1991.