

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Dilodendron bipinnatum* (SAPINDACEAE)***Josiane Cristina dos Santos, Carlos Alberto Nastally de Oliveira, Larissa Varella e Andréia Pereira Matos**

Faculdade de Farmácia, Centro Universitário Central Paulista, 13563-470 São Carlos - SP, Brasil

Ana Paula Terezan, Ana Cristina Leite, João Batista Fernandes*, Paulo Cezar Vieira e Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos-SP, Brasil

José Rubens Pirani

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CP 11461, 05508-900 São Paulo-SP, Brasil

Recebido em 16/6/10; aceito em 1/10/10; publicado na web 27/10/10

CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *Dilodendron bipinnatum* (SAPINDACEAE). The phytochemical investigation of ethanolic extracts from leaves, branches and stems of *D. bipinnatum* afforded the steroids β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, sitostenone and sitosterol-3-O- β -D-glycopyranoside, along with two cycloartane triterpenes: cycloeucaleanol and 24-methylenecycloartenol. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) and *Candida albicans* (ATCC 10231). The extracts of the leaves and branches showed moderate activity against *Candida albicans*. The extract of the branches was active against *Micrococcus luteus*. This is the first report on the phytochemical study of *D. bipinnatum*.

Keywords: Sapindaceae; *Dilodendron bipinnatum*; antimicrobial activities.**INTRODUÇÃO**

O gênero *Dilodendron* é constituído por apenas três espécies: *D. bipinnatum*, *D. costaricense* e *D. elegans*, sendo que a primeira tem ocorrência restrita a regiões secas do Brasil.¹ Espécies da família Sapindaceae têm sido usadas na medicina tradicional como diuréticas, estimulantes, expectorantes, sedativas, vermífugas e no tratamento de dermatites.² Saponinas, sesquiterpenos acíclicos e diterpenos oligoglicosídicos são os principais metabólitos secundários presentes em diversas espécies de Sapindaceae usadas na medicina oriental.³ Das atividades biológicas descritas para espécies de Sapindaceae, destaca-se a atividade antimicrobiana.⁴ Um dos primeiros relatos sobre o potencial antimicrobiano das sapindáceas foi descrito por Lemos *et al.*,⁵ que avaliaram a atividade da saponina hederagenina 3-O- β -[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosídeo], isolada de *Sapindus saponaria*, sobre os microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Cryptococcus neoformans*. Além disso, quatro saponinas triterpênicas foram isoladas do extrato metanólico do pericarpo de *Sapindus rarak* que apresentou atividade moluscicida.⁶ Um estudo semelhante mostrou a atividade de extratos brutos de *S. saponaria* e de duas saponinas frente a várias espécies de *Candida* isoladas da secreção vaginal de pacientes que sofriam de candidíase vulvovaginal.³ Recentemente, foi relatada a atividade antimicrobiana de várias espécies de Sapindaceae, como *Hippobromus pauciflorus*,⁷ *Lecaniodiscus cupanoides*⁸ e *Dodonaea viscosa*.⁹

O presente trabalho descreve o isolamento e caracterização estrutural dos esteroides β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, sistotenona e sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo e dos triterpenos cicloartânicos: cicloeucaleanol (**1**) e 24-metilenocicloartanol (**2**). As atividades antimicrobianas dos extratos de folhas, galhos e caule de *D. bipinnatum* e triterpenos foram avaliadas.

PARTE EXPERIMENTAL**Procedimentos experimentais gerais**

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX 400, observando ¹H a 400 MHz e ¹³C a 100 MHz; utilizou-se CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno. Os espectros de massas foram obtidos em aparelho da Micromass, modelo Micromass Quattro LC.

Para identificação dos esteroides foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo QP-5000, com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm), utilizando as seguintes condições: temperatura do injetor: 250 °C, gás de arraste: He, temperatura inicial do forno: 150 °C por 1 min, velocidade de aquecimento a 6 °C/min até 280 °C, permanecendo nessa temperatura por 15 min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV.

As separações cromatográficas em colunas foram realizadas utilizando-se gel de sílica 230-400 mesh. As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em condições preparativas, foram realizadas em coluna Asahipak GS-310 2G (2,15 x 50,0 cm), utilizando-se equipamento Shimadzu LC-8A com válvula de reciclo, injetor Rheodyne 7123 com loop 500 μ L e detector UV/VIS Shimadzu SPD-6AV.

As análises cromatográficas em camada fina foram realizadas em cromatoplacas de gel de sílica F₂₅₄ sobre placa de alumínio Merck, de 0,2 mm de espessura, empregando-se uma solução de vanilina/ácido sulfúrico como revelador.

Material vegetal

As folhas, galhos e caules de *D. bipinnatum* Radlk foram coletados e identificados pelo Prof. Dr. J. R. Pirani, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da USP, no dia 21/01/2001 na cidade de Bom Jesus do Goiás (GO). A exsiccata da espécie encontra-se depositada no herbário do IB-USP, sob o número 4764.

*e-mail: djbf@power.ufscar.br

#Em homenagem aos 70 anos do Dr. Hans Viertler

Preparação dos extratos

As folhas (1482,2 g), galhos (543,7 g) e caules (1262,2 g) de *D. bipinnatum* foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 48 h e moídos em liquidificador. As partes vegetais da planta foram submetidas separadamente à extração com etanol por 7 dias, em temperatura ambiente e em repouso. Após este período, o solvente foi evaporado em evaporadores rotativos, obtendo-se os respectivos extratos brutos.

Isolamento das substâncias de *D. bipinnatum*

O extrato etanólico dos galhos de *D. bipinnatum* (4,1 g) foi submetido à cromatografia em coluna (28 cm de diâmetro x 17,3 cm de comprimento, 390 g de gel de sílica), utilizando-se hexano, hexano/AcOEt 9:1, hexano/AcOEt 1:1, AcOEt e MeOH em eluição gradiente (700 mL cada fração), levando a seis sub-frações: Dbge1 Dbge6. A sub-fração Dbge3 (21,0 mg) foi submetida a fracionamento em coluna de gel de sílica (28 g, 2 cm de diâmetro x 35 cm de comprimento) com eluição gradiente, utilizando-se hexano/AcOEt (10 a 100%) e MeOH (100%) (14 frações de 10 mL), fornecendo a mistura de β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e sistotenona (sub-fração Dbge3.8, 5,2 mg).

O extrato etanólico das folhas de *D. bipinnatum* (12,3 g) foi fracionado através de cromatografia em coluna de gel de sílica (500 g, 17,2 cm de diâmetro x 35 cm de comprimento) utilizando-se hexano/AcOEt (10 a 100%) e MeOH (100%) como eluentes, obtendo-se 38 sub-frações (10 mL cada): Dbfe1 a Dbfe38. Utilizando-se estas mesmas condições cromatográficas, os fracionamentos das sub-frações Dbfe5 (82,5 mg) e Dbfe6 (129,6 mg) levaram ao isolamento de **1** (7,0 mg) e do sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo (6,5 mg), respectivamente.

Visando o isolamento de substâncias em maiores quantidades, uma nova porção de extrato etanólico de folhas de *D. bipinnatum* (11,1 g) foi fracionada, utilizando-se os mesmos parâmetros aplicados no fracionamento anterior, obtendo-se 162 sub-frações (Dbfe1-1 a Dbfe1-162). A sub-fração Dbfe1-29 (102,3 mg) foi submetida a fracionamento através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se hexano/AcOEt (10-100%) e MeOH (100%) como eluentes, obtendo-se 12 sub-frações de 10 mL: Dbfe1-29-1 a Dbfe1-29-12. A sub-fração Dbfe1-29-12 (9,7 mg) foi submetida à CLAE preparativa com hexano/AcOEt (85:15) como eluente, levando ao isolamento da substância **2** (2,8 mg).

Ensaio antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo proposta pelo *National Commite for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) M7-A6¹⁰ e adaptação do M27-A2,¹¹ para determinação do CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo avaliado). As determinações de CIM foram realizadas em triplicata em microplacas com 96 poços. Os micro-organismos utilizados da *American Type Culture Collection* foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Candida albicans* (ATCC 10231). As soluções-estoque das amostras testadas foram preparadas em frasco tipo Eppendorf, solubilizando-se 1 mg de amostra em 40 μ L de DMSO. Essas soluções foram diluídas em 960 μ L do caldo Mueller-Hinton para bactérias ou caldo Sabouraud para o ensaio com a levedura. A partir dessa solução as concentrações finais variaram de 7,81 a 500 μ g/mL. Os inóculos foram padronizados utilizando-se a escala de 0,5 de Mc Farland de turbidez padrão (10⁸ UFC/mL) e diluídos na razão 1:10 no caldo para o procedimento de microdiluição. Após a micropipetagem, as microplacas foram tampadas e incubadas a 37 °C

por 18-24 h sem agitação. Terminado o período de incubação, os resultados foram visualizados e os poços que não apresentaram crescimento aparente foram selecionados para determinar a atividade microbiana (CBM ou CFM) ou microbiostática das amostras. Essa determinação foi realizada através de subculturas em placas de Petri utilizando-se ágar Mueller-Hinton para o crescimento de bactérias e ágar Sabouraud para o crescimento do fungo. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 48 h e verificou-se a presença/ausência de colônias microbianas. Após o preparo das subculturas foram adicionados em cada orifício das placas 15 μ L de resazurina a 0,01% em solução aquosa esterilizada onde, após 4 h de reincubação, a leitura foi realizada.¹²

Dessa maneira foi possível determinar a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos através de indicadores diluídos na solução. Todos os ensaios foram realizados com controle negativo (DMSO), controle positivo (cloridrato de tetraciclina, cloridrato de vancomicina e nistatina), controle do crescimento do micro-organismo e controle de precipitação da amostra, evitando possibilidade de resultado falso-negativo ou falso-positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico do extrato etanólico de galhos e folhas de *D. bipinnatum* resultou na identificação dos esteroides β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, sistotenona (em mistura)¹³ e sitosterol¹⁴ e dos triterpenos: cicloeucalenol (**1**)^{15,16} e 24-metilenocicloartanol (**2**)¹⁵ (Figura 1). Estes compostos foram caracterizados através de experimentos de RMN ¹H e ¹³C e pela comparação com os respectivos dados relatados na literatura. A mistura dos esteroides foi também caracterizada via CG-EM. Este é o primeiro relato de metabólitos secundários isolados de *D. bipinnatum*.

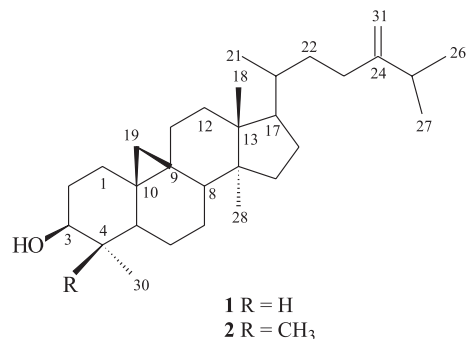


Figura 1

A mistura dos esteroides foi identificada através de análises por CG-EM, comparando-se os espectros de massas obtidos com os espectros existentes no banco de dados do equipamento, por RMN ¹H e ¹³C e também por comparação com dados da literatura.¹³ O cromatograma de íons totais da análise por CG-EM apresentou 4 picos. Os espectros de massas dos picos apresentaram íons moleculares *m/z* 414, 412, 400 e 412 e fragmentos concordantes com aqueles de sitosterol, estigmasterol, campesterol e sistotenona, respectivamente.

Os extratos de folhas (Dbfe), galhos (Dbge) e caule (Dbce) de *D. bipinnatum* foram submetidos aos ensaios antimicrobianos (Tabela 1), obtendo-se os dados de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). Os resultados foram analisados seguindo o modelo proposto por Aligianis *et al.*¹⁷ que classifica os materiais vegetais de acordo com a CIM apresentada, sendo considerada como forte inibição 500 μ g/mL, moderada 600 a 1500 μ g/mL e fraca acima de 1600 μ g/mL. Os extratos etanólicos dos galhos (Dbge) e das folhas (Dbfe) apresentaram a CIM igual a 250 μ g/mL e CFM igual a 500 μ g/

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *Dilodendron bipinnatum* e de cicloeucaenol e 24-metilenocicloartenol

Amostras	Concentração Mínima (µg/mL)							
	S. aureus CIM	E. coli CIM	B. subtilis CIM	P. aeruginosa CIM	M. luteus CIM CBM		C. albicans CIM CFM	
Dbfe	*	*	*	*	*	*	250	500
Dbge	*	*	*	*	250	500	250	500
Dbce	*	*	*	*	*	*	*	*
Cicloeucaenol	*	*	*	*	*	*	*	*
24-metileno cicloartenol	*	*	*	*	*	*	*	*
Controle positivo								
CT	0,75	3,125		1,5625	0,1875			
N							6,25	
CV			0,0046					

(*) sem atividade nas concentrações entre o intervalo de 7,81 a 500 µg/mL. CT: Cloridrato de tetraciclina; N: Nistatina; CV: Cloridrato de vancomicina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima

mL sobre *C. albicans*. Na bactéria Gram-positiva *M. luteus* o extrato etanólico dos galhos apresentou a CIM igual a 250 µg/mL e CBM igual a 500 µg/mL. O extrato etanólico das folhas (Dbfe) não apresentou nenhuma atividade sobre as bactérias. O extrato etanólico dos caules e os triterpenos cicloartanos (**1** e **2**) não apresentaram atividade em nenhum dos organismos testados (Tabela 1). As atividades antimicrobianas dos extratos de folhas e galhos podem estar relacionadas à alta quantidade de compostos lipofílicos presentes nos extratos, visto que a lipofilicidade está intimamente ligada à permeação através da camada lipídica dos micro-organismos.¹⁸

Considerando-se que os extratos de plantas geralmente possuem composições muito complexas e que as substâncias ativas podem estar presentes em concentrações muito pequenas, aquele de galhos (Dbge), segundo o modelo proposto por Aligianis *et al.*,¹⁷ apresentou uma ótima atividade sobre *C. albicans* e sobre a bactéria *M. luteus*. Na literatura não são encontrados relatos de atividade antimicrobiana significativa para os compostos identificados nos extratos estudados. Sitosterol, que está presente no extrato dos galhos de *D. bipinnatum*, segundo Sanches *et al.*,¹⁹ apresentou atividade sobre *S. aureus* com CIM de 100 µg/mL, valor considerado pouco ativo para substâncias puras. Estes resultados sugerem novos estudos em modelos animais *in vitro*, visando conhecer a eficácia e toxicidade, e a utilização dos extratos Dbge e Dbfe como bactericida e/ou fungicida, assim como caracterizar os compostos responsáveis pelas atividades.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas e FAPESP, pelas bolsas e apoios financeiros.

REFERÊNCIAS

- Gentry, A. H.; Steyermark, J.; *Annals Ann. Mo. Bot. Gard.* **1987**, *74*, 533.
- Hegnauer, W.; *Chemotaxonomie der Pflanzen, Sapindaceae*, Springer Verlag: Berlin, 1970; Martinez, M.; *Las Plantas Medicinales de Mexico*, Editorial Botas: México, 1992; Sastri, B. N.; *The Wealth of India, Raw Materials*, CSIR: New Delhi, 1962; Kimata, H.; Nakashima, T.; Kokubun, S.; Nakayama, K.; Mitoma, Y.; Kitahara, T.; Yata, N.; Tanaka, O.; *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 1998.
- Tsuzuki, J. K.; Svidzinski, T. I. E.; Shinobu, C. S.; Silva, L. F. A.; Rodrigues-Filho, E.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, I. C. P.; *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2007**, *79*, 577.
- Pendota, S. C.; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J.; *Pharm. Biol.* **2009**, *47*, 309; Khurram, M.; Khan, M. A.; Hameed, A.; Abbas, N.; Qayum, A.; Inayat, H.; *Molecules* **2009**, *14*, 1332; Pelegrini, D. D.; Tsuzuki, J. K.; Amado, C. A. B.; Cortez, D. A. G.; Ferreira, I. C. P.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 922.
- Lemos, T. L. G.; Mendes, A. L.; Sousa, M. P.; Braz-Filho, R.; *Fitoterapia* **1992**, *63*, 515.
- Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 229.
- Pendota, S. C.; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J.; *Pharm. Biol.* **2009**, *47*, 309.
- Oboh, I. E.; Obasuyi, O.; Akerele, J. O.; *Acta Pol. Pharm.* **2008**, *65*, 565.
- Teffo, L. S.; Aderogba, M. A.; Eloff, J. N.; *S. Afr. J. Bot.* **2010**, *76*, 25.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard – M7-A6*, 6th ed., NCCLS/CLSI: Wayne, 2003, vol. 23.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard; *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras*, 2nd ed., Norma Aprovada (M27-A2), NCCLS/CLSI: Wayne, 2002.
- Alves, G. E.; Vinholis, A. H. C.; Casemiro, L. A.; Furtado, N. A. J. C.; Andrade e Silva, M. L.; Cunha, W. R.; Martins, C. H. G.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1226.
- Müller, A. H.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F. da; Fernandes, J. B.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1797.
- Matida, A. K.; Rossi, M.; Almeida Blumenthal, E. E.; Schuquel, I. T. A.; Malheiros, A.; Vidotti, G. J.; *An. Ass. Brasil. Quim.* **1996**, *45*, 147.
- Kawai, S.; Takada, Y.; Tsuchida, S.; Kado, R.; Kimura, J.; *Fish. Sci.* **2007**, *73*, 902.
- Chang, C. W. J.; Flament, I.; Matson, J. A.; Nishida, T.; Ohloff, G.; Wehrli, F. W.; Weinheimer, A. J.; *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Wien Spring-Verlag: New York, 1979, vol. 36, p. 93.
- Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4168.
- Tokuyama, R.; Takahashi, Y.; Tomita, Y.; Tsubouchi, M.; Yoshida, T.; Iwasaky, N.; Kado, N.; Okezaki, E.; Nagata, O.; *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 353.
- Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Schiavini, M. S.; Nakamura, C. V.; Dias-Filho, B. P.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2005**, *48*, 429.