

Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

Diógenes Aparício Garcia Cortez^{1*}, Lúcia Elaine Ranieri Cortez², Tânia Ueda Nakamura³ e Celso Vataru Nakamura³

¹ Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. ² Departamento de Farmácia, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, C.P. 224, 87502-210, Umuarama-Paraná, Brazil. ³ Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. *Author for correspondence.

RESUMO. *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) é uma árvore nativa das florestas do Paraná, Brasil, utilizada na medicina popular como adstringente, emética, no combate à leucorréia e na lavagem de úlceras e feridas. Extratos de diferentes polaridades, obtidos do caule, foram utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Do extrato hexânico foi isolada uma mistura de sitosterol (50,40%), estigmasterol (21,70%) e campesterol (22,80%), que apresentou uma concentração mínima inibitória (CIM) de 0,5mg/mL sobre *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: antimicrobiano, campesterol, *Cedrela fissilis* Vell., estigmasterol, Meliaceae, sitosterol.

ABSTRACT. **Antibacterial activity of extracts from wood of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae).** *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) is a native tree found in forests of the state of Paraná, Brazil, and used in folk medicine as astringent and emetic substance against leukorrhea and in the washing of ulcers and wounds. Extracts of different polarity obtained from the stem were used to evaluate its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Hexane extract yielded a mixture of sitosterol (50,40%), stigmaterol (21,70%) and campesterol (22,80%) which showed minimal inhibitory concentration (MIC) of 0,5mg/mL against *Staphylococcus aureus*.

Key words: antimicrobial, campesterol, *Cedrela fissilis* Vell., Meliaceae, sitosterol, stigmaterol.

A *Cedrela fissilis* Vell. é uma arbórea conhecida popularmente como cedro batata, nativa do Brasil e de ocorrência do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, encontrada nas florestas semidecídua e pluvial atlântica (Lorenzi 1992). Sua madeira é muito utilizada pela indústria na fabricação de móveis, e na medicina popular o chá do caule dessa espécie é empregado como adstringente, emético, no combate à leucorréia e na lavagem de feridas e úlceras (Corrêa, 1931). Das sementes de *Cedrela fissilis* foram isolados dois limonóides, o mexicanolídeo e o fissinolídeo (Zelnik e Rosito, 1966), sendo as outras partes do vegetal ainda não estudadas. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antibacteriana dos extratos brutos obtidos das diversas partes do vegetal e isolar e identificar os compostos responsáveis por essa atividade.

Material e métodos

Procedimentos experimentais gerais. O espectro no IV foi registrado em um espectrômetro Bomen modelo MB-102, utilizando-se filmes depositados em janelas de KBr.

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C foram obtidos em CDCl₃, utilizando-se como padrão interno o TMS, em um espectrômetro Bruker AC 200 (¹H, 200 MHz; ¹³C, 50 MHz).

Os espectros de massas e cromatogramas em fase gasosa foram obtidos em cromatógrafo a gás HP-5890-GC, acoplado a um espectrômetro de massas HP-5780-MS, através de ionização por impacto eletrônico (IE), coluna capilar HP-1 de 25 metros e diâmetro interno de 0,2mm, espessura do filme 0,33μ, gás de arraste H₂, com uma temperatura inicial de 150°C, temperatura final de 280°C, com uma programação de 6°C/min, temperatura do injetor de 280°C e do detector a 280°C.

Para as separações por cromatografia de coluna (CC) foram utilizados sílica gel 60 de 70-230 e, para coluna flash, sílica gel 60 de 230-400 “mesh-ASTM” (Merck). Para análise por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se placas de sílica gel G 60 (5X10cm), com 0,25mm de espessura e indicador de fluorescência UV₂₅₄. A revelação foi feita com vapores de iodo e revelador vanilina/ácido sulfúrico (Stahl 1969).

Coleta e identificação do material botânico. As folhas e o caule da planta (*Cedrela fissilis* Vell.) foram coletadas no câmpus da Universidade Estadual de Maringá, em setembro de 1995; o material botânico foi identificado pela profa. Maria Conceição de Souza, da Universidade Estadual de Maringá, e uma exsicata (n°4.707) está depositada no herbário do Departamento de Biologia da UEM.

Obtenção dos extratos brutos. As partes aéreas do vegetal (folhas e caule) foram secas ao ar livre e pulverizadas em moinho de martelo. Os extratos brutos foram extraídos com solventes de polaridade crescente (hexano, metanol) em extrator de “soxhlet” e concentrados em evaporador rotativo, até a eliminação do solvente orgânico, liofilizados e armazenados em freezer.

Avaliação da atividade antibacteriana. A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos obtidos da *Cedrela fissilis* Vell., foi realizada pelo método de difusão em ágar (Bauer et al., 1966). Discos de papéis de filtro (Whatman n°2 de 6,35mm de diâmetro) saturados com diferentes concentrações dos extratos brutos (200, 400 e 800µg), foram aplicados em duplicata na superfície do meio de Ágar Mueller Hinton (Difco) previamente semeado com uma suspensão padronizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ou *Escherichia coli* ATCC 25922. A placa de Petri semeada foi então pré-incubada na geladeira a 4°C durante 12 horas e após esse período incubada na estufa a 37°C durante 24 horas. A presença de um halo de inibição de crescimento na superfície da placa ao redor dos discos de papel foi indicativa de uma atividade antibacteriana. Como controle foram utilizados cloranfenicol e tetraciclina (Biolab) na concentração de 30µg cada. O mesmo procedimento foi efetuado para orientar o fracionamento cromatográfico do extrato ativo.

Isolamento dos compostos bioativos. O extrato hexânico (10g) com atividade antibacteriana foi fracionado em CC empacotada com sílica 60 (70-230 mesh-ASTM), utilizando a fase móvel **A** [Hexano; Hexano/CHCl₃ (98:2; 95:5; 90:10; 80:20; 50:50); CHCl₃; CHCl₃/AcOEt (98:2; 95:5; 90:10; 80:20; 50:50); AcOEt; MeOH]. Obtiveram-se 54 frações, as quais foram impregnadas em discos de papel na concentração de 1,5mg e submetidas aos testes de atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Para a purificação da fração F18 (95mg), que inibiu o crescimento de *S. aureus*, foi ela recromatografada em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM), utilizando-se a fase móvel **A**. As análises das 45 frações obtidas foram feitas através de CCD. Obteve-se a fração F18.40 (40mg), que foi purificada em CC flash, com uma fase móvel **B** [CHCl₃/AcOEt (95:5; 90:10; 80:20; 50:50); AcOEt;

MeOH], obtendo-se a fração F18.40.12 (20mg) (Esquema 1).

Reação de acetilação da fração F18.40.12. À fração F18.40.12 (20mg) foram adicionados volumes de 0,5mL de anidrido acético e 0,5mL de piridina, e foi deixada em repouso por uma noite à temperatura ambiente. A mistura foi extraída com diclorometano e o excesso de piridina da fase orgânica foi neutralizado com ácido clorídrico 0,1 N. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente orgânico evaporado a pressão reduzida, obtendo-se a fração acetilada F18.40.12A.

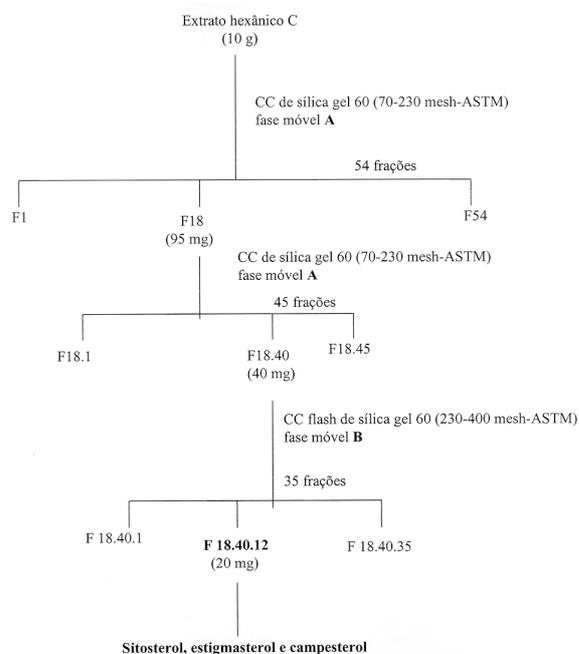
Determinação da concentração mínima inibitória (MIC). A concentração mínima inibitória da fração F18.40.12 foi determinada através do método da diluição em caldo em duplicata. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque com a fração F18.40.12 (concentração de 10mg/mL) em dimetilsulfóxido (DMSO). Um volume de 200µL de cada diluição foi adicionado aos tubos de ensaio 13x100mm contendo 3,8mL de caldo Mueller-Hinton estéril. A todos os tubos foram adicionados 10µL da suspensão padronizada de microrganismos (tubo n°5 da escala de McFarland) e em seguida incubados a 37°C durante 24-48 horas. A inibição foi evidenciada pela ausência de crescimento microbiano no meio, sendo assim possível determinar a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro* (Murray et al., 1995).

Mistura de sitosterol, estigmasterol e campesterol (F18.40.12). Os dados espectrais de IV, RMN de ¹H e ¹³C e massas revelaram-se idênticos aos valores registrados da literatura (Wright et al., 1978).

Resultados e discussão

Os extratos brutos de folha e caule da *Cedrela fissilis* obtidos (Tabela 1) foram analisados quanto à atividade antibacteriana. Apenas o extrato hexânico do caule (C) apresentou atividade ante a *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 200, 400 e 800µg (Tabela 2). Sucessivos fracionamentos cromatográficos em coluna de sílica gel do extrato hexânico direcionados pela atividade antibacteriana levaram à obtenção da fração F18.40.12 (20mg). Através dos dados espectrais espectrais de IV, RMN¹H e RMN¹³C da fração bioativa (F18.40.12) foi identificada uma mistura de esteróides (campesterol, estigmasterol e sitosterol) através da comparação com os dados obtidos na literatura (Wright et al., 1978). A análise por CG/EM da fração acetilada (F18.40.12 A) confirmou ser uma mistura de acetato de sitosterol (50,40%), acetato de estigmasterol (21,70%) e acetato de campesterol (22,80%) e os espectros de massa obtidos estão de

acordo com os dados da literatura (Wright *et al.*, 1978) (Tabelas 3 e 4). Estudos anteriores com outras espécies vegetais demonstraram que a presença desses esteróides é muito comum e está relacionada com a atividade antimicrobiana (Goyal e Gupta, 1988; Hess *et al.*, 1995).



Esquema 1. Fracionamento do extrato hexânico do caule de *Cedrela fissilis* Vell.

Tabela 1. Extratos brutos obtidos a partir das partes aéreas de *Cedrela fissilis* Vell.

Parte utilizada	Peso seco	Código	Extrato bruto	Quantidade obtida
Folhas	391,00g	A	Hexano	3,40g
		B	Metanol	31,00g
Caulé	523,00g	C	Hexano	10,00g
		D	Metanol	53,00g

Tabela 2. Atividade antibacteriana dos extratos hexânicos e metanólicos do caule e folhas de *Cedrela fissilis* Vell.

Extratos brutos	Quantidade (µg)	Staphylococcus aureus		Escherichia coli	
		halo de inibição (mm)		halo de inibição (mm)	
C	200	11	0		
	400	14	0		
	800	16	0		
A	200	0	0		
	400	0	0		
	800	0	0		
B	200	0	0		
	400	0	0		
	800	0	0		
D	200	0	0		
	400	0	0		
	800	0	0		
Cloranfenicol	30	21	23		
Tetraciclina	30	28	21		

No presente trabalho o valor do MIC determinado para a fração F18.40.12 foi de 0,5mg/mL, sugerindo uma seletividade para o *Staphylococcus aureus*.

Fase Móvel **A**: Hexano; Hexano/CHCl₃ (98:2; 95:5; 90:10; 80:20; 50:50); CHCl₃; CHCl₃/AcOEt (98:2; 95:5; 90:10; 80:20; 50:50); AcOEt; MeOH

Fase Móvel **B**: CHCl₃/AcOEt (95:5; 90:10; 80:20; 50:50); AcOEt; MeOH

Tabela 3. Determinação da composição da fração F18.40.12A através de CG/EM

Esteróides	%	Tempo de retenção (minutos)
Acetato de campesterol	22,80	30,95
Acetato de estigmasterol	21,70	31,74
Acetato de sitosterol	50,40	33,88

Tabela 4. Fragmentos dos espectros de massa dos esteróides acetilados (campesterol, estigmasterol e sitosterol), obtidos por CG/EM

Esteróides	EM: m/z (intensidade relativa)		
Acetato de campesterol	383 [M-C ₂ H ₅ O] ⁺ (30), 382 (100), 367 (23), 274 (13), 261 (15), 255 (19), 213 (16), 147 (45), 135 (18), 133 (24), 131 (22), 121 (23), 107 (32), 105 (44), 95 (32), 93 (30), 91 (40), 81 (47), 79 (29), 71 (22), 67 (32), 57 (28), 55 (49).		
	Acetato de estigmasterol	395 [M-C ₂ H ₅ O] ⁺ (31), 394 (94), 351 (10), 282 (8), 255 (42), 213 (15), 145 (35) 105 (45), 55 (100).	
		Acetato de sitosterol	397 [M-C ₂ H ₅ O] ⁺ (31), 396 (100), 354 (3), 255 (17), 213 (10), 159 (17), 147 (37), 55 (39).

Coluna capilar HP-1 (25 metros x diâmetro interno de 0,2mm, espessura do filme 0,33µ), temperatura inicial de 150°C, temperatura final de 280°C, com uma programação de 6°C/min, temperatura do injetor de 280°C e do detector a 280°C

Referências bibliográficas

Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.

Corrêa, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, 1931. v.1, p.63.

Goyal, M.M.; Gupta, A. Wax composition and antibacterial activity of *Kochia scoparia*. *Fitoterapia*, 59:145-147, 1988.

Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Cruz, A.B.; Moretto, E.; Cruz, R.B.; Messana, I.; Ferrari, F.; Cechnel Filho, V.; Yunes, R.A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vodhysia divergens* (Vochysiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 47:97-100, 1995.

Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarium, 1992. p.241.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p.1482.

Stahl, E. *Thin-Layer chromatography*, New York: Springer-Verlag, 1969. p.904.

Zelnik, R.; Rosito, C. The occurrence of mexicanolide and 3 β-hydroxysomexicanolide in the seeds of *Cedrela fissilis* was recorded. *Tetrahedron Lett.*, 52:6441-6444, 1966.

Wright, M.; McInnes, A.G.; Shimizu, S.; Smith, D.G.; Walter, J.A.; Idler, D.; Khalil, W. Identification of C-24 Alkyl Epimers of Marine Sterols by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Can. J. Chem.*, 56:1893-1903, 1978.

Received 16 December 1997.

Accepted 27 April 1998.

