

## Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Trembleya phlogiformis* DC

FERNANDES, S.R.<sup>1</sup>; FERREIRA, H.D.<sup>2</sup>; CHAUL, L.T.<sup>1</sup>; SÁ, S.<sup>1</sup>; ALVES, V.F.<sup>1</sup>; TRESVENZOL, L.M.F.<sup>1</sup>; FERRI, P.H.<sup>3</sup>; SANTOS, P.A.<sup>1</sup>; PAULA, J.R.<sup>1</sup>; FIUZA, T.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO; <sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO; <sup>3</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO  
\*E-mail: pjrpaula@gmail.com

**RESUMO:** A *Trembleya phlogiformis* é uma espécie do Cerrado utilizada como corante vegetal para lã e algodão, empregados nos teares manuais, em comunidades mineiras. Nesse trabalho realizou-se a caracterização físico-química da droga vegetal, determinou-se a composição química do óleo essencial e avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial, dos extratos e frações das folhas. O material botânico foi coletado na Serra dos Pireneus, Pirenópolis, no estado de Goiás. Foram determinados os teores de: umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição. O óleo essencial foi extraído em aparelho de Clevenger e analisado por CG/EM. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. O teor de umidade para o pó das folhas foi de 6,52% ± 0,38%; o teor de cinzas totais 7,01% ± 2,64 e de cinzas insolúveis em ácido de 1,65% ± 1,28%. Os compostos majoritários do óleo essencial foram: álcool oleico (7,76%), ácido dodecanoico (4,01%), neril acetona (3,92%),  $\alpha$ -santaleno (3,72%). Verificou-se a atividade antimicrobiana do extrato hexânico obtido da superfície foliar (CIM 31,25-62,50  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a *Bacillus cereus* e *B. subtilis*, da fração acetato de etila (CIM 31,25-62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) contra *B. cereus*, *B. subtilis* e *Micrococcus luteus*. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade (CIM 15,52-62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a algumas cepas de *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton mentagrophytes*. Esses resultados se constituem no primeiro estudo dos constituintes químicos do óleo essencial e da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, óleo essencial e frações das folhas de *T. phlogiformis* e contribuem com dados padrão para droga vegetal constituída por folhas desta espécie.

**Palavras-chave:** Cerrado, Melastomataceae, *Trembleya*, óleo essencial.

**ABSTRACT:** Chemical composition of the essential oil and evaluation of the antimicrobial activity of *Trembleya phlogiformis* DC leaves. *Trembleya phlogiformis* is a plant species from Cerrado used as a vegetable dye in communities of Minas Gerais to dye wool and cotton in handlooms. The aims of this study were to perform the physicochemical characterization of the plant drug, to study the chemical compounds of the essential oil and to evaluate the antimicrobial activity of essential oils, extracts and fractions of leaves. The moisture content, total ash and acid insoluble ash were determined in accordance with the Brazilian Pharmacopoeia, 5th edition. The essential oil was extracted in Clevenger apparatus and its compounds evaluated by GC/MS. The antimicrobial activity was performed by the microdilution broth method. The moisture content was 6.52%. The total ash content was 7.08% and the insoluble ash in acid, 1.95%. The major compounds of the essential oil were oleic alcohol (7.76%), dodecanoic acid (4.01%), neril acetone (3.92%),  $\alpha$ -santalene (3.72%). It was verified the antimicrobial activity of hexane extract obtained from the leaf surface against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, the ethyl acetate fraction against *B. cereus*, *B. subtilis* and *Micrococcus luteus* and the butanol fraction against *M. luteus*. Ethyl acetate and butanol fractions showed activity against strains of *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* and *Trichophyton mentagrophytes*. These results constitute the first study of the antimicrobial activity of crude extracts, essential oil and fractions of *T. phlogiformis* leaves and chemical constituents of essential oil and it contributes with standard data to the plant drug composed of leaves of this species.

**Keywords:** Cerrado, Melastomataceae, *Trembleya*, essential oil

## INTRODUÇÃO

A família Melastomataceae conta com cerca de 4.570 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Renner, 1993; Clausen & Renner, 2001). Espécies de Melastomataceae são utilizadas popularmente para tratamento de erisipela, escabiose, dermatoses, ulcerações, parasitoses intestinais, leucorreia, infecções vaginais, resfriado, febre (Cruz & Kaplan, 2004), como cicatrizantes e antissépticas (Fenner *et al.*, 2006). Estudos fitoquímicos de espécies da família Melastomataceae identificaram principalmente flavonoides, antocianinas, triterpenos, esteroides e taninos hidrolisáveis (Leite, 2009).

O gênero *Trembleya* DC pertence à tribo Microlicieae (Almeida & Martins, 2001; Fritsch *et al.*, 2004). Estudos com espécies de *Trembleya* (*T. chamissoana* Naud., *T. laniflora*, *T. parviflora* (D. Don) Cogn., *T. pentagona* Naud) identificaram, do ponto de vista químico, vários grupos de flavonoides (Bomfim-Patricio *et al.*, 2001).

Em relação à atividade antimicrobiana, Ventura *et al.* (2007) verificaram atividade do extrato bruto e frações *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa dos caules e extrato bruto e frações das folhas de *T. laniflora* contra *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*.

O uso abusivo e indiscriminado de compostos antimicrobianos ao longo de muitos anos é o principal fator responsável pelo aparecimento do fenômeno de resistência bacteriana. Isso estimula a busca de novos fármacos, inclusive a partir de plantas medicinais (Iwu *et al.*, 1999; Essawi & Srour, 2000; Andremont, 2001; Farr *et al.*, 2001; Seddon & Bhagani, 2011).

A *Trembleya phlogiformis* DC. é uma espécie típica do Cerrado (Martins, 1997) e suas folhas são utilizadas nas comunidades mineiras como corante vegetal (cor amarela) para tingir lã e algodão nos teares manuais (Sá *et al.*, 2007).

Tendo em vista a busca de novas plantas com atividade antimicrobiana, este trabalho se propôs realizar a caracterização física da droga vegetal, estudar a composição química do óleo essencial das folhas e avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações hexano, butanol, acetato de etila e aquosa, e do óleo essencial das folhas e do extrato hexano da superfície foliar de *T. phlogiformis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico, constituído por folhas de *Trembleya phlogiformis* DC., foi coletado na Serra dos Pireneus, Pirenópolis - GO (latitude 15° 48' 15" sul, longitude 48° 52' 48" oeste, altitude 1295 m), região de solo pedregoso e arenoso. O material

foi identificado pelo Professor Doutor Heleno Dias Ferreira da Universidade Federal de Goiás e uma exsicata depositada no Herbário da UFG, Unidade de Conservação PRPPG da UFG, sob registro nº 47868.

### Caracterização físico-química da droga vegetal

A determinação do teor de umidade foi realizada em um analisador de umidade que produz radiação na região do infravermelho por meio de uma lâmpada de halogênio (Ohaus modelo MB35) (Brasil, 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata e calculou-se a média e o coeficiente de variação (CV).

Os teores de cinzas totais e insolúveis em ácidos foram realizados de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010).

Para obtenção do extrato etanólico bruto (EET), as folhas foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 35°C e moídas em moinho de facas. Para a preparação do EET, o pó das folhas foi macerado com etanol 95% na proporção de 1:3 à temperatura ambiente, por três vezes, e concentrado em evaporador rotativo à temperatura ≤ 40°C. Para a obtenção das frações, o EET foi solubilizado em metanol/água 7:3 e a mistura resultante extraída sucessivamente com hexano, butanol e acetato de etila (Ferri, 1996). As frações hexano (FHT), butanol (FBUT) e acetato de etila (FACT) foram concentradas em evaporador rotativo a 40° C e a fração aquosa (FAQT) liofilizada.

Para obtenção do extrato da superfície foliar (EHST), as folhas intactas (100g) foram imersas em hexano e submetidas a ultrassom por três vezes em ciclos de 10 minutos cada. As soluções extrativas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório.

Para pesquisar algumas classes químicas por cromatografia em camada delgada (CCD), o EHST, o EET e as frações FHT, FBUT, FACT, FAQT foram redissolvidos em seus respectivos solventes e aplicados em cromatoplaça contendo silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). As análises cromatográficas foram realizadas tendo como fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5) para análise de taninos condensados (Brasil, 2003); acetona/tolueno/ácido fórmico (3:3:1) para análise de taninos condensados e hidrolisáveis, flavonoides, terpenos e saponinas; acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:27) para análise de flavonoides; acetato de etila/metanol/água (100:13,5:10) para análise de antraquinonas; tolueno/éter (1:1, saturado com 10% de ácido acético) para análise de cumarinas e clorofórmio/ácido acético glacial/metanol/água (16:8:3:2) para análise de saponinas (Wagner & Bladt, 2001). Para a revelação dos cromatogramas empregou-se FeCl<sub>3</sub>/HCl para

detecção de flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis; vanilina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para terpenos, flavonoides, saponinas, taninos condensados e hidrolisáveis; KOH a 10% para antraquinonas, antronas, antrol e cumarinas; NP 1% (ácido difenilbórico 1% em metanol)/ PEG (polietilenoglicol) 4000 a 5% em etanol para flavonoides, cumarinas, aloína; anisaldeído ácido sulfúrico para lignanas. Após aplicação dos reveladores, as cromatoplasmas foram observadas em luz visível e UV 365 nm e analisadas de acordo com Wagner & Bladt (2001).

As folhas de *T. phlogiformis* foram secas à temperatura ambiente, trituradas e submetidas à hidrodestilação em um aparelho de Clevenger modificado, por duas horas para obtenção do óleo essencial (Adams, 2007; Van Den Dool & Kratz, 1963). O volume de óleo essencial foi medido no tubo graduado do próprio aparelho e o rendimento, em porcentagem, calculado em relação à quantidade inicial de material botânico empregado na extração.

O óleo essencial foi analisado por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), em aparelho Shimadzu modelo QP505A equipado com coluna capilar de sílica fundida (SBP-5, 30m x 0,25mm x 0,25µm), mantendo-se um fluxo de 1 mL/min de hélio, como gás de arraste, e aquecimento com temperatura programada (60-240°C a 3°C/min; 280°C a 10°C/min e 10 min a 280°C), volume de injeção de 1mL (amostras diluídas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) no modo Split com uma razão de 1:5 e temperatura do injetor de 225°C. O espectrômetro de massa operou com os seguintes parâmetros: detector de ionização de chama com temperatura de 250°C; energia de ionização de 70 eV, com intervalo de massa entre 40-350 m/z.

A identificação dos componentes do óleo

foi baseada no índice de retenção linear (Índice de Kovats) calculado em relação ao tempo de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>) (Van Den Dool & Kratz, 1963) e no padrão de fragmentação observados nos espectros de massa, por comparação com amostras autênticas, dados retirados da literatura (Adams, 2007) ou por comparação com uma base de dados-MS computadorizada utilizando a biblioteca NIST.

#### Avaliação da atividade antimicrobiana

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos OET, EHST, EET, FHT, FBUT, FACT, FAQT das folhas utilizou-se o método de microdiluição em caldo, como recomendado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008, 2012). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Os microrganismos utilizados foram cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos, cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG) (Tabela 1).

Inicialmente as bactérias foram cultivadas em caldo Casoy (Himedia, Índia) por 24 h a 35°C, seguidas de cultivo em Agar Casoy inclinado por 24 h a 35°C. Os fungos foram cultivados em Agar Sabourad Dextrose (Himedia, Índia) a 25°C por 24-48 h (leveduras) e 48-72 h para as outras espécies de fungos.

As amostras (EHST, EET e frações) foram solubilizadas em 10% (p/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e o óleo essencial em 10% de DMSO e 0,02% de Tween 80® e posteriormente diluídas em caldo Mueller Hinton (MH) (Himedia, Índia) para

**TABELA 1.** Microrganismos utilizados nos ensaios de microdiluição em caldo.

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas	Leveduras e fungos filamentosos
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	<i>Candida albicans</i> (isolado clínico) 63U
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Enterobacter cloacae</i> (isolado clínico) HMA: FTA 502	<i>C. krusei</i> ATCC 34135
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> ATCC 10749	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ATCC 8957
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> (CT) ATCC 19430	<i>C. neoformans</i> var. <i>gatti</i> L3
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 1480
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	<i>T. rubrum</i> ATCC 28189
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	

obter a concentração de 2.000 µg/mL ou em Roswell Park Memorial Institute 1640 broth (RPMI) (Himedia, Índia) para obter a concentração de 1.000 µg/mL.

Para determinação da CIM frente às bactérias foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços com fundo em U, preenchidas com 100 µL de caldo MH. Em seguida, adicionaram-se alíquotas de 200 µL das amostras a serem avaliadas e realizaram-se diluições decimais até a obtenção de uma concentração de 1,95 µg/mL das mesmas. Os inóculos bacterianos foram preparados diluindo-se as culturas provenientes de Ágar Casoy em solução de cloreto de sódio 0,85% (p/v), com ajuste da concentração bacteriana para a escala 0,5 de MacFarland, no intervalo de transmitância de 79,4% a 83,2% (espectrofotômetro UV/VIS Marca Hinotek, Modelo SP-2000UV). Em seguida, realizou-se diluição seriada em solução de cloreto de sódio 0,85% para obtenção de 10<sup>7</sup> UFC/mL. 5 µL das suspensões bacterianas foram acrescentadas a cada orifício da placa, obtendo-se concentração final de 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Foram feitos controles negativos com DMSO 10% (p/v), 0,02% de tween 80, OET, EHST, EET, FHT, FBUT, FACT, FAQT e crescimento bacteriano sem inóculo das amostras. Foi também realizada a avaliação da atividade dos antimicrobianos vancomicina (32 µg/mL) (Sigma-Aldrich) e gentamicina (128 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Após as inoculações, as placas foram incubadas a 35°C ± 2°C por 18-24 h. A leitura foi realizada após adição de 20 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (p/v), seguido de nova incubação por 30 min. O aparecimento de coloração avermelhada foi indicativo de crescimento bacteriano.

Para os testes antifúngicos, adicionaram-se 100 µL de caldo RPMI em todos os poços das colunas 2 a 12, seguido de 200 µL das amostras a serem testadas nos poços de A a G na coluna 1, procedendo-se diluições seriadas até obtenção de concentração final de 0,97 µg/mL. Os inóculos fúngicos foram preparados em solução de cloreto de sódio 0,85%, formando uma suspensão correspondente à escala 0,5 de McFarland (leitura em espectrofotômetro a 530 nm com 83,2% a 85% de transmitância). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em RPMI, de forma a obter uma concentração de células entre 1 a 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. A concentração final dos inóculos nos poços foi de 0,5-0,25 x 10<sup>5</sup> UFC. Utilizou-se como controle Itraconazol (Sigma) em concentração inicial de 500 µg/mL.

Após a inoculação, as microplacas foram tampadas e incubadas à temperatura ambiente por 48 h. A ocorrência de crescimento fúngico foi verificada à vista desarmada.

A CIM foi definida como a menor concentração da amostra (em µg/mL) capaz de inibir de forma visível totalmente o crescimento

bacteriano/fúngico. A classificação proposta por Holetz *et al.* (2002) foi utilizada para interpretar os resultados dos testes de atividade antimicrobiana. De acordo com esta classificação, CIM abaixo de 100 µg/mL indica boa atividade inibitória; CIM de 100 a 500 µg/mL indica moderada atividade inibitória; CIM de 500 a 1000 µg/mL indica fraca atividade inibitória; acima de 1.000 µg/mL indica ausência de atividade antimicrobiana.

## RESULTADOS

### Caracterização físico-química da droga vegetal

O teor de umidade para o pó das folhas foi de 6,52% ± 0,38%; o teor de cinzas totais 7,01% ± 2,64 e o de cinzas insolúveis em ácido de 1,65% ± 1,28%.

Por meio da CCD, verificou-se no EET a presença de terpenos, flavonoides e clorofila. Na fração FACT observaram-se flavonoides glicosilados, terpenos, clorofila, furano e pirano, cumarinas, taninos hidrolisáveis, derivados antracenos e lignanas. Na fração FHT encontrou-se terpenos e clorofila. A fração FBUT apresentou terpenos, flavonoides glicosilados, saponinas, taninos hidrolisáveis, furano, pirano e cumarinas e na fração FAQT encontrou-se clorofila, antraquinonas, saponinas e taninos. O EHST apresentou clorofila e cumarinas.

### Óleo essencial

O rendimento do óleo essencial foi de 0,016%. Foram identificados 36 compostos químicos, sendo majoritários: o álcool oleico (7,76%), o ácido dodecanoico (4,01%), neril acetone (3,92%), α-santaleno (3,72%) (Tabela 2).

### Avaliação da atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas encontram-se detalhadas na Tabela 3. Verificou-se atividade antibacteriana moderada do EET contra *B. cereus* ATCC 14579 (CIM= 250 µg/mL), *B. subtilis* ATCC 6633 e *M. luteus* ATCC 10240 (CIM= 125 µg/mL); atividade antifúngica boa contra *C. tropicalis* ATCC 28707 (CIM= 62,5 µg/mL), atividade antifúngica moderada contra *C. albicans* 63U, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. neoformans* var. *gatti* L3 (CIM= 250 µg/mL); *C. krusei* ATCC 34135 e *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957 (CIM= 125 µg/mL) (Tabela 3).

O EHST apresentou boa atividade inibitória contra *B. cereus* ATCC 14579 (CIM= 31,25 µg/mL), *B. subtilis* ATCC 6633 (CIM= 62,5 µg/mL) e atividade moderada contra *M. luteus* ATCC 10240 (CIM= 1000 µg/mL) (Tabela 3).

A FACT mostrou boa atividade inibitória

**TABELA 2.** Percentagem dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *Trembleya phlogiformis* coletadas em Pirenópolis, Goiás.

Constituintes	KI	Folhas
octen-1-al	1054	2,69
n-octanol	1068	2,20
óxido de linalool B	1072	1,71
linalool	1096	2,83
n-nonanal	1100	2,84
2Z-nonenal	1149	0,72
α-Terpineol	1188	1,65
Safranal	1196	1,50
n-decanal	1201	1,53
β-ciclocitral	1219	2,86
2E-decenal	1263	2,04
Undecan-2-ona	1294	0,71
Undecanal	1306	1,56
1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	1355	2,69
(E)-2-undecenal	1360	0,69
β-(2Z)-damascenona	1364	1,58
α-santaleno	1417	3,72
β-cariofileno	1419	1,61
acetato de β-ment-1-en-9-ol	1423	3,09
neril acetone	1436	3,92
6-demotoxi-ageratocromeno	1463	0,68
trans-β-Ionona	1488	1,46
β-selineno	1490	1,12
tridecanal	1510	2,45
δ-cadineno	1523	1,34
ácido dodecanoico	1566	4,01
n-hexadecano	1600	0,88
pentadeca-2-nona	1697	0,91
n-heptadecano	1700	2,04
n-octadecano	1800	2,11
n-nonadecano	1900	1,36
5E,9E,13E-farnesil-2-ona	1913	1,55
fitol	1943	1,24
ácido hexadecoico	1960	3,13
n-heneicosano	2100	1,03
álcool oléico	2101	7,76
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0
Monoterpênicos oxigenados		17,56
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		10,48
Sesquiterpênicos oxigenados		3,13
Outros		44,04
Total identificado		75,21
Rendimento		0,016

frente a: *B. cereus* ATCC 14579 e *B. subtilis* ATCC 6633 (CIM= 31,25 µg/mL), *M. luteus* ATCC 10240 (CIM= 62,5 µg/mL); atividade moderada contra *M. luteus* ATCC 9341 e *S. aureus* ATCC 6538 (CIM= 500 µg/mL); boa atividade antifúngica inibitória frente a: *C. albicans* 63U, *C. krusei* ATCC 34135 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CIM= 62,5 µg/mL), *C. tropicalis* ATCC 28707 (CIM= 31,25 µg/mL), *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957 (CIM= 15,62 µg/mL), *T. mentagrophytes* ATCC 11480 (CIM= 31,25 µg/mL), *T. rubrum* ATCC 28189 (CIM= 62,5 µg/mL) e atividade moderada contra *C. neoformans* var. *gatti* L3 (CIM= 125 µg/mL) (Tabela 3).

A FBUT apresentou boa atividade inibitória contra *M. luteus* ATCC 10240 (CIM= 62,5 µg/mL), moderada contra *M. luteus* ATCC 9341 (CIM= 500 µg/mL); Atividade inibitória boa contra *C. albicans* 63U (CIM= 62,5 µg/mL), *C. krusei* ATCC 34135 (CIM= 62,5 µg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CIM= 62,5 µg/mL), *C. tropicalis* ATCC 28707 (CIM= 31,25 µg/ml), *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957 (CIM= 31,25 µg/ml), *C. neoformans* var. *gatti* L3 (CIM= 62,5 µg/ml) e moderada contra *T. mentagrophytes* ATCC 11480 (CIM= 125 µg/mL), *T. rubrum* ATCC 28189 (CIM= 250 µg/mL) (Tabela 3).

A FAQT mostrou moderada atividade inibitória contra *M. luteus* ATCC 10240 (CIM= 250 µg/mL) e boa atividade inibitória contra *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957 (CIM= 62,5 µg/mL), *C. neoformans* var. *gatti* L3 (CIM= 62,5 µg/mL), atividade inibitória moderada contra *C. albicans* 63U (CIM= 125 µg/mL), *C. tropicalis* ATCC 28707 (CIM= 125 µg/mL), *C. krusei* ATCC 34135 (CIM= 250 µg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CIM= 250 µg/mL), *T. mentagrophytes* ATCC 11480 (CIM= 125 µg/mL) (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Na análise das CCD do extrato bruto e frações de *T. phlogiformis* foram evidenciados terpenos, flavonoides, clorofila, furano e pirano cumarinas, taninos hidrolisáveis, derivados antracênicos, lignanas, saponinas e antraquinonas. No extrato hexânico da superfície foliar observaram-se clorofila e cumarinas. Flavonoides, do grupo das flavonas, são comuns em espécies do gênero *Trembleya* (Bomfim-Patricio *et al.*, 2001; Leite, 2009), como em *T. laniflora* (Ventura *et al.*, 2006) e têm sido relatados para espécies de *Miconia* (Li *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Foram isolados em espécies de *Miconia*, triterpenos (Chan *et al.*, 1992; Macari *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001), flavanonas e derivados de quinona (Bernays *et al.*, 1984). Rodrigues *et al.* (2007) isolaram, purificaram e elucidaram a estrutura de um grupo C6-C600 flavona

**TABELA 3.** Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) dos EET, FHT, EHST, FACT, FBUT, FAQT, OET de *Trembleya phlogiformis* frente a diferentes micro-organismos.

Micro-organismos testados	EET	FHT	EHST	FACT	FBUT	FAQT	OET	GEN	CIP	VAN	IT
<b>Bactérias</b>											
Bactérias Gram-positivas											
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	250	1000	31,25	31,25	1000	2000	1000	<0,97	<1,95	<0,24	NR
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	125	1000	62,50	31,25	2000	>2000	1000	31,25	<1,95	<0,24	NR
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	1000	2000	>2000	500	500	2000	2000	250	31,25	0,975	NR
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	125	2000	1000	62,50	62,5	250	1000	250	<1,95	<0,24	NR
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2000	>2000	>2000	1000	1000	>2000	2000	125	<1,95	0,48	NR
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	<1,95	<1,95	0,48	NR
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2000	2000	>2000	500	2000	2000	2000	<1,95	<1,95	<0,24	NR
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2000	>2000	>2000	1000	2000	>2000	2000	250	<1,95	0,97	NR
Bactérias Gram-negativas											
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>E. cloacae</i> HMA:FTA 502	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000	>2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2000	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2000	2000	>2000	2000	2000	>2000	2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	2000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	62,5	<1,95	NR	NR
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 10749	2000	2000	>2000	2000	2000	2000	2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	>2000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	500	500	NR	NR
<i>S. enterica</i> (CT) ATCC 19430	1000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>S. enterica</i> ATCC 10708	>2000	>2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	2000	2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	2000	2000	1000	2000	>2000	2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	2000	2000	>2000	1000	2000	2000	2000	<1,95	<1,95	NR	NR
<b>Fungos</b>											
Fungos leveduriformes											
<i>Candida albicans</i> 63U	250	>2000	NR	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	125	NR	NR	NR	NR	NR
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	125	>2000	NR	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	250	NR	NR	NR	NR	NR
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	250	>2000	NR	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	250	NR	NR	NR	NR	NR
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	62,5	>2000	NR	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	125	NR	NR	NR	NR	NR

Continua...

TABELA 3. Continuação

Micro-organismos testados	EET	FHT	EHST	FACT	FBUT	FAQT	OET	GEN	CIP	VAN	IT
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 28957	125	>2000	NR	15,62	31,25	62,5	NR	NR	NR	NR	NR
<i>C. neoformans</i> L3	250	>2000	NR	125	62,5	62,5	NR	NR	NR	NR	NR
Fungos filamentosos											
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11480	>2000	1000	NR	31,25	125	125	NR	NR	NR	NR	NR
<i>T. rubrum</i> ATCC 28189	>2000	1000	NR	62,5	250	500	NR	NR	NR	NR	NR

**Nota:** EET: extrato etanólico bruto; FHT: fração hexano; EHST: extrato de superfície foliar; FACT: fração acetato de etila; FBUT: fração butanólica; FAQT: fração aquosa; OET: óleo essencial; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; VAN: vancomicina; IT: itraconazol; NR: Teste não realizado.

dímero ligado, além de glicosídeos flavonoides e ácido gálico a partir das folhas de *Miconia cabucu*. Mimura *et al.* (2004) isolaram do extrato metanólico das folhas de *Huberia* (Melastomataceae), gliconas livres, glicosídeos de flavonas (apigenina e luteolina) e flavonóis (kaempferol e quercetina).

A atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto das folhas de *Trembleya phlogiformis* foi relevante para *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 6633 e *M. luteus* ATCC 9341. Ao se analisar as frações, verificou-se que a atividade antibacteriana se deve a compostos presentes na fração acetato de etila e para *M. luteus* também a fração butanólica. Também se observou boa atividade do extrato hexânico da superfície foliar contra as bactérias citadas anteriormente.

Em relação à atividade antifúngica, o estudo das frações mostrou que ela se concentra principalmente nos compostos presentes nas frações acetato de etila e butanol para a maioria dos fungos testados.

A atividade antimicrobiana verificada para a *T. phlogiformis* também foi observada em outras espécie do gênero, a *T. laniflora* contra *M. luteus* e *S. aureus* (extrato etanólico bruto das folhas e caules) (Ventura *et al.*, 2007) e contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *S. aureus* (extratos metanólicos de diferentes partes da planta) (Cota *et al.*, 2002).

Os flavonoides encontrados nas frações acetato de etila e butanólica das folhas de *T. phlogiformis* são uma classe ampla de compostos fenólicos, conhecida por possuir atividade antimicrobiana, essencialmente, por inibição da enzima de DNA-girase (Cushnie & Lamb, 2005). Já os taninos encontrados também observados nestas duas frações podem estar relacionados com a capacidade para inativar aderências microbianas, enzimas, proteínas de transporte do envelope celular. Eles também formam

complexos com polissacarídeos (Ya *et al.*, 1988). Tem sido relatado que taninos condensados ligam-se as paredes celulares das bactérias ruminais, impedindo o crescimento e a atividade da protease (Jones *et al.*, 1994). As saponinas, encontradas nas frações aquosa e butanólica, são conhecidas por interagirem com as membranas celulares, aumentando a permeabilidade e produzindo danos celulares (Francis *et al.*, 2002). Neste sentido, as saponinas podem estar envolvidas nas propriedades antimicrobianas.

Foram identificados em *T. phlogiformis* como compostos majoritários o álcool oleico, o ácido dodecanoico, a neril acetona, o  $\alpha$ -santaleno. Compostos diferentes foram descritos nos óleos essenciais de outras espécies de Melastomataceae utilizando várias partes da planta (folhas, madeira, casca, frutas, flores): *Bellucia grossularioides* (L.) o pentadecanona (10%), ácido palmítico (13,1 %),  $\delta$ -cadineno (7%); *Miconia ciliata* (Rich.) DC- hexyl acetato (8,4 %), *p*-cimeno (10,3 %), butil hexanoato (7,3 %), (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene (14,7 %); *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC-  $\alpha$ -copaeno (22,8 %),  $\beta$ -caryophylleno (14,5 %), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (6,5 %),  $\alpha$ -humulene (12,2 %),  $\beta$ -curcumene (7,9 %); *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC- nonanal (18,5 %),  $\alpha$ -copaeno (32,9 %); *Tibouchina stenocarpa* (DC.) - type A: terpinen-4-ol (11,2 %), germacrene D (7,9 %), palmitic acid (22,9 %); type B: (*E*)- $\beta$ -ionone (17,2 %), ácido palmítico (22,9 %) (Maya & Andrade, 2009).

## CONCLUSÕES

Os compostos majoritários encontrados em *T. phlogiformis* foram diferentes dos encontrados em outras espécies de Melastomataceae. Boa atividade antifúngica foi observada nas frações acetato de etila e butanólica para as leveduras e os fungos filamentosos testados e boa atividade antibacteriana do extrato hexânico da superfície foliar e da fração

acetato de etila. Esses resultados constituem o primeiro estudo da composição química do óleo essencial das folhas e da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, óleo essencial e frações das folhas de *T. phlogiformis* e contribuem com dados para o controle de qualidade da droga vegetal.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup>. ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation; 2007.
- ALMEIDA, F.; MARTINS, A.B. New combinations and new names in some Brazilian *Microlicieae* (Melastomataceae), with notes on the delimitation of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya*. **Novon**, v.11, p.1–7, 2001.
- ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal Infect Control**, v.29, n.4, p.256-8, 2001.
- BERNAYS, E. et al. Antifeedant nature of the quinone primin and its quinol miconidin from *Miconia* spp. **Experientia**, v.40, p.1010-11, 1984.
- BOMFIM-PATRÍCIO, M.C. et al. Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya* (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. **Biochemistry System Ecology**, v.29, p.711-26, 2001.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.
- CHAN, W.R. et al. Triterpenes from *Miconia stenostachya*. **Journal of Natural Products**, v.55, p.963–66, 1992.
- CLAUSING, G.; RENNER, S.S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, v.88, p.486-98, 2001.
- CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast*. In: Approved standard, document M27-A3, 2008.
- CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. In: Approved standard, document M07-A8, 2012. Disponível em: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf> Acesso em: 29/09/2015.
- COTA, B.B. et al. Antimicrobial activity of plant species from a Brazilian hotspot for conservation priority. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.7, p.542-47, 2002.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, n.5, p.343-56, 2005.
- CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae. **Revista Floresta e Ambiente**, v.11, n.1, p.47-52, 2004.
- ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medical plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.343-9, 2000.
- FARR B. M. et al. Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.38–45, 2001.
- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.42, p.369-94, 2006.
- FERRI, P.H. Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais. In: DI STASI, L.C. (Ed.) **Plantas Medicinais Arte e Ciências. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 1996. p.129-56.
- FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.6, p. 587-605, 2002.
- FRITSCH, P.W. et al. Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe *Microlicieae* (Melastomataceae). **American Journal of Botany**, v.91, n.7, p.1105–14, 2004.
- HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-31, 2002.
- IWU, M.W.; DUNCAN, A.R.; OKUNJI, C.O. New antimicrobials of plant origin. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on New Crops and New Uses**. Alexandria, VA: ASHS Press, 1999. p.457-62.
- JONES, G.A. et al. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.4, p.1374-78, 1994.
- LEITE, C.C.T. **Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero *Marcetia* (Melastomataceae)**. 2009. 131p. Dissertação de Mestrado - Área de Concentração em Biotecnologia - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA.
- LI, X.C. et al. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida aspartic* proteases. **Journal of Natural Products**, v.64, n.10, p.1282-5, 2001.
- MACARI, P.A.T.; EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, Z.M.G.S. Identification of triterpenes from *Miconia albicans* through analysis by microcomputer. **Química Nova**, v.13, p.260–62, 1990.
- MAIA, S. G. J.; ANDRADE, A. H. E. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.
- MARTINS, E. **Revisão taxonômica do gênero *Trembleya* DC. (Melastomataceae)**. 1997, 162 p. Tese de Doutorado - Área de Concentração em Biologia Vegetal - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- MIMURA, M.R.M.; SALATINO, A.; SALATINO, F.L.M. Distribution of flavonoids and the taxonomy of *Huberia* (Melastomataceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p. 27–34, 2004.
- RENNER, S.S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany**, v.13, p.519-40, 1993.
- RODRIGUES, J. et al. An unusual C6–C600 linked flavonoid from *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**, v.68, p.1781-84, 2007.
- SÁ, M.I.; SENNA-VALLE, L.; ALMEIDA, S.G.A. Tradição do uso de plantas tintórias da comunidade rural de Santo Antônio do Rio Grande. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.1, p. 276-78, 2007.



- SEDDON, J.; BHAGANI, S. Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. **HIV AIDS (Auckl)**, v.3, p.19–33, 2011.
- VENTURA, P.C. et al. A flavanone and other constituents of the Brazilian endemic species *Trembleya laniflora* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, n.1, p.40-1, 2006.
- VENTURA, P.C.; OLIVEIRA, B.A.; BRAGA, C.F. Antimicrobial activity of *Trembleya laniflora*, *Xyris platystachia* and *Xyris pterygoblephara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p.17-22, 2007.
- WAGNER, H.; BLAD, S. **Plant drug analysis**. A thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlim: Springer, 2001.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, n. 1, p.463-71, 1963.
- YA, C.; GAFFNEY, T.H.; HASLAM, E. Carbohydrate-polyphenol complexation. In: HEMINGWAY, R.M.; KARCHESY, J.J (Eds.) **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York, USA: Plenum Press, 1988. 553p
- ZHANG, Z. et al. Phenolic compounds from *Nymphaea odorata*. **Journal of Natural Products**, v.66, p. 548-50, 2003.