
ANTIBIOSE E TOXIDEZ DE EXTRATOS DE CAULE DE *VERNONIA SCORPIOIDES* (Lam.) Pers. (ASTERACEAE).

MARCIA DE FATIMA INACIO FREIRE, M. Sc.
Mestre, Prof. Substituta, DS-IF-UFRRJ

HEBER DO SANTOS ABREU, D. Sc.
Dr., Prof. Adjunto, DPF-IF-UFRRJ

RONALD BASTOS FREIRE, Ph. D.
PhD., Prof. Adjunto, DM-IV-UFRRJ

LUIZ CELSO HIGINO DA CRUZ, M. Sc.
Mestre, Prof. Titular, DM-IV-UFRRJ

RESUMO

As propriedades antifúngicas de 2 extratos, obtidos a partir de caules de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers., foram testadas para *Penicillium citrinum*, produtor de micotoxina nefrotóxica. Os extratos foram utilizados em ensaio de antibios e pelo método de difusão em agar, nas concentrações de 1 mg, 3 mg e 5 mg para cada 100 l de diluente, originando halos de inibição com 40,50 e 80 mm, respectivamente. Tal resultado sugeriu ação fungicida, uma vez que não se conseguiu, a partir dos tratamentos, realizar-se subcultivos em meio Czapeck-Dox isento de inibidores. Foi avaliada a toxidez desses extratos ativos para camundongos albinos, aos quais ministrou-se uma dose cem vezes superior à utilizada *in vitro*. Não houve interferência no estado geral, ou ganho de peso, dos animais tratados durante 6 dias subsequentes a administração oral dos extratos. Através dos espectros no infravermelho dos extratos ativos, observou-se a existência de sinais, característicos do estiramento de carbonilas lactônicas (com absorção entre 1750 cm^{-1} e 1770 cm^{-1}).

Palavras chave: *Penicillium citrinum*, *Vernonia scorpioides*, atividade biológica, lactonas sesquiterpênicas.

ABSTRACT

In order to identify bioactive compounds against the nephrotoxic mycotoxin producer fungi *Penicillium citrinum*, two extracts, obtained from stalks of *Vernonia scorpioides*, were studied. Antibiosis assays were done at the concentrations of 1, 0,3,0 and 5,0 g / 0.1 ml of diluent. It was determined 40,0, 50,0 and 80,0 mm broadness for the inhibition halos of each assayed concentration, respectively. These results are suggestive of a fungicide activity, once neither one subculture could be achieved when the treated materials were cultivated in a freed of inhibitors Czapeck-Dox medium. These active extracts were also assayed for toxicity in albino mice, showing no interference on their general aspects or body-weight gain 6 days after the oral administration. The infrared spectroscopy of the bioactive extracts showed a characteristic absorption of lactone carbonyls (between 1750 cm^{-1} and 1770 cm^{-1}), also suggesting that sesquiterpene lactones were the main product in the bioactive extracts. Key words: *Penicillium citrinum*, *Vernonia scorpioides*, biological activity, sesquiterpene lactones

INTRODUÇÃO

Espécies de fungos tais como alguns do gênero *Penicillium*, quando submetidos a condições favoráveis de temperatura e umidade, produzem metabólitos especiais de efeitos tóxicos extremamente nocivos (micotoxinas). Oportunisticamente, esses microorganismos são dispersados pelo vento, na sua forma reprodutiva (esporos), e infectam as plantas, através de suas inflorescências, penetram através dos estigmas e alojam-se nos ovários. Por ocasião do armazenamento e transporte dos grãos, gerados por essas flores infectadas, os fungos proliferam e produzem as micotoxinas. Os efeitos observados das micotoxinas são devastadores, todas são potencialmente cancerígenas e que mesmo quando ingeridas em concentrações muito baixas podem levar a supressão imunológica, dando origem a falhas vacinais e inúmeras infecções de caráter secundário (SMITH & MOSS, 1985; FREIRE et al, 1994).

É de extrema relevância o desenvolvimento de estratégias para eliminar fungos, assim como seus produtos de secreção e excreção, visando proteger a integridade biológica de homens e animais. Com este intuito, as modalidades de controle, baseadas na utilização de princípios ativos de plantas medicinais, de atividade biológica definida e sem toxidez, teriam grande utilidade prática (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993). Pesquisadores do governo Indiano testaram com sucesso extratos de *Andrographis peniculata* - fam. Acanthaceae para controlar o crescimento de *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas (KUMAR & PRASAD, 1992), assim como o Centro de Pesquisas Vegetais do Canadá, desenvolve intensas investigações sobre a ação de metabólitos especiais, de plantas da família Asteraceae, sobre diferentes espécies de fungos fitopatogênicos (PICMAN & SCHNEIDER, 1993). O presente trabalho foi realizado com o intuito de se verificar a possível utilização dos extratos hexânico e clorofórmico de caules *V. scorpioides* como antifúngicos, se conhecer o grupo de substâncias responsáveis pela atividade, além de se avaliar uma possível toxidez desses extratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material

Os caules de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. foram colhidos no campus da Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro, durante o mês de setembro de 1993. O material foi posto a secar uma temperatura controlada de 411°C. Em seguida foi granulado e padronizado em tamis com 40-80 mesh de diâmetro (Granutex-Brasil).

O material granulado foi submetido a um processo de extração contínua em aparelho de soxhlet com hexano e clorofórmio.

As amostras obtidas foram concentradas em rotavapor (Büchi-Suíça) e evaporadas em capela de exaustão durante 72 horas. A seguir foram pesadas e tiveram o seu rendimento calculado em função da razão entre o peso bruto do material granulado pelo peso dos extratos secos.

Caracterização físico-química

Os extratos de *Vernonia scorpioides* foram caracterizados físico-quimicamente no infravermelho em aparelho Perkin Elmer-EUA no Instituto de Química da UFRRJ, os espectros foram registrados em pastilhas de KBr ou NaCl.

Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO -Vetec-Brasil); e posteriormente diluídos v/v em solução salina tamponada (PBS) (8,00 g/l de NaCl; 0,20 g/l de KCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,20g/l de Na₂H PO₄).

Ensaio de antibiose

Foi realizado segundo metodologia descrita por FREIRE (1995),

Utilizou-se placas de Petri convencionais, contendo 25 ml de meio solidificado, previamente inoculado com *Penicillium citrinum*, para ensaio de difusão em agar, tal como descrito por DAVINO (1989). Foram feitas escavações centralizadas com auxílio de um tubo de vidro ligado a uma linha de vácuo (bomba de vácuo Motors Eletricos - Brasil). Entre o bastão e a bomba foi acoplado um kitasato para recolhimento do agar infectado. Os orifícios resultantes foram padronizados em 1 cm de diâmetro, no seu interior adicionou-se os extratos hexânico e clorofórmico na proporção de 1,0; 3,0 e 5,0 mg por 0,1 ml de diluente por placa. Os halos obtidos foram medidos com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo-Japão). Todo procedimento foi realizado em condições assépticas. Cada tratamento contou com 3 repetições e a cada concentração somaram-se as testemunhas que eram constituídas de placas com inóculo fúngico e adicionadas de solventes utilizados

na extração ou do diluente utilizado, na proporção de 50% com PBS.

Modo de ação dos extratos.

Visando determinar se os extratos ativos de *V. scorpioides* possuíam atividade fungicida ou fungistática, retirou-se alíquotas com alça de platina estéril de cada um dos tratamentos anteriores, com período de incubação de 72 horas, e procedeu-se a semeadura em Czapeck-Dox-agar inclinado, em tubos de ensaio e livres de extratos. Os tubos foram identificados e incubados a temperatura ambiente durante 20 dias. O crescimento fúngico foi verificado visualmente. Todos os tratamentos contaram com três repetições e controle, que consistia em se executar o mesmo procedimento descrito com as placas testemunha (isentas de extratos).

Ensaio de toxidez

Camundongos albinos (Swiss Webstern), machos, pesando 14-16 gramas foram inoculados por via oral, através de canulação, com os extratos hexânico e clorofórmico. Esses mesmos extratos, contendo 100 vezes a concentração utilizada nos testes de antibiose por kg de peso, foram diluídos em DMSO a 50% em solução salina isotônica e administrados aos animais. Os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas forradas com serragem autoclavada, além de ração para roedores comercial (Labina) e água potável a vontade. Os animais foram pesados diariamente e observados durante 6 dias. Formou-se um grupo controle constituído de animais que não receberam extratos. O desenvolvimento ponderal, assim como a sobrevivência dos animais foram observados diariamente.

O delineamento experimental adotado foi um split-split com três repetições por tratamento. Os resultados obtidos foram então submetidos ao teste de médias Dunnet (GILL, 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento obtido nas extrações a partir de 100 gramas de caule de *Vernonia scorpioides* resultou em 1,31 e 0,76 gramas de extratos hexânico e clorofórmico, respectivamente.

Os espectros no infravermelho dos extratos ativos apresentaram sinais (ombros) de estiramento de carbonila lactônica na região entre 1750 e 1770 cm^{-1} , onde se encontram os

sinais das lactonas sesquiterpênicas (WARNING et alii, 1987), substâncias características da família Asteraceae e de atividade biológica descrita (KUPCHAM et al, 1968, ALARCON, 1990, KAIJ et al 1991, LOPES, 1991, PICMAN & SHNEIDER, 1993). Algumas vezes esses sinais foram sobrepostos pela elevada intensidade de outro sinal, provavelmente em decorrência do estiramento de carbonila de éster alifático em 1725 cm^{-1} . (Figura 1)

O extratos hexânico e clorofórmico do caule de *V. scorpioides* mostraram-se potencialmente ativos contra o desenvolvimento de *P. citrinum*. Havendo a formação de halos de inibição do crescimento fúngico de até 80 mm de diâmetro para o cultivo tratado com extrato clorofórmico (Figura 2). A utilização de solventes pouco polares com obtenção satisfatória de extratos ativos, reforça a possibilidade de serem tratadas de lactonas sesquiterpênicas, os princípios ativos que conferem atividade antifúngica à *V. scorpioides*. As placas testemunha não apresentaram qualquer efeito inibidor. Isto significa que as atividades biológicas são, antes de tudo, inerentes ao extrato e não podem ser atribuídas aos solventes.

Os dados relativos ao esse experimento foram submetidos a uma análise fatorial. O efeito da concentração se mostrou altamente significativa em todos nos dois tratamentos, entretanto não se detectou diferença significativa entre extratos. Os testes foram realizados ao nível de 1% de significância para Dunnet (VIEIRA & HOFFMANN, 1989).

Subcultivos, obtidos a partir de fungos previamente tratados com os extratos ativos, foram realizados em meio Czapeck-Dox isento de inibidores, ou antibióticos, mostrando-se sem atividade biológica. Estes dados são indicativos de uma ação biológica fungicida, nas concentrações utilizadas. Resultados semelhantes têm sido obtidos por diferentes pesquisadores, onde nos extratos de plantas pertencentes à família Asteraceae são encontradas lactonas sesquiterpênicas de diferentes tipos, com capacidade de inibir o crescimento de hifas de fungos patogênicos (DAVINO, 1989 e PICMAN & SHNEIDER, 1993).

Ensaio realizado em camundongos albinos, tratados com doses cem vezes superiores àquelas utilizadas nos ensaios "in vitro", demonstraram que os extratos obtidos não apresentaram toxicidade relevante, muito

embora o extrato hexânico tenha provocado irritação, taquicardia e desmaio em alguns animais, os quais recuperaram-se em pouco tempo, sem apresentar seqüelas, ou repetição do quadro. Provavelmente estes sintomas estão relacionados a resíduos de solventes adicionados ao extrato, uma vez que nos extratos clorofórmicos nada se observou de anormal nos animais tratados, quando

comparados com animais do sistema controle, aos quais administrou-se somente o veículo (Figura 3). A análise estatística desses resultados comprovou não haver diferenças significativas entre os tratamentos quando analisados o ganho de peso dos animais, 1% de significância para o teste de Dunnet (GILL, 1978).

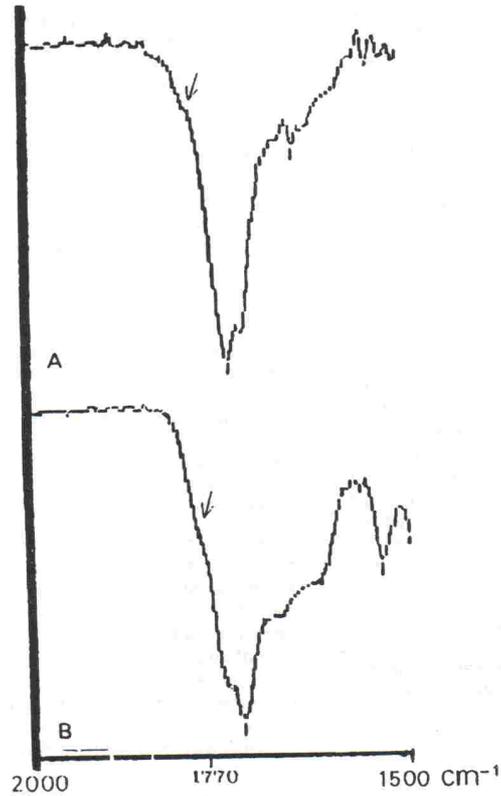


FIGURA 1- Espectros no infravermelho relativos aos extratos hexânico (A) e clorofórmico (B).

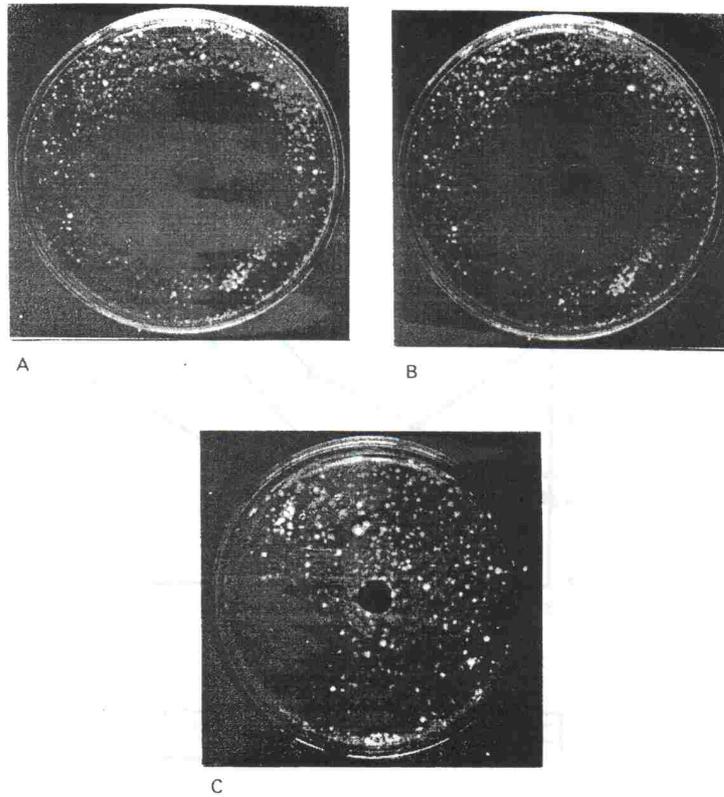


FIGURA 2 - Efeito dos extratos de caule sobre o desenvolvimento de esporos de *Penicillium citrinum* "in vitro" pelo método de difusão em agar, com a concentração de 3 mg de extrato para 0,1 ml de DMSO/PBS (v/v) A - hexânico, B - clorofórmico e C - DMSO/PBS (v/v).

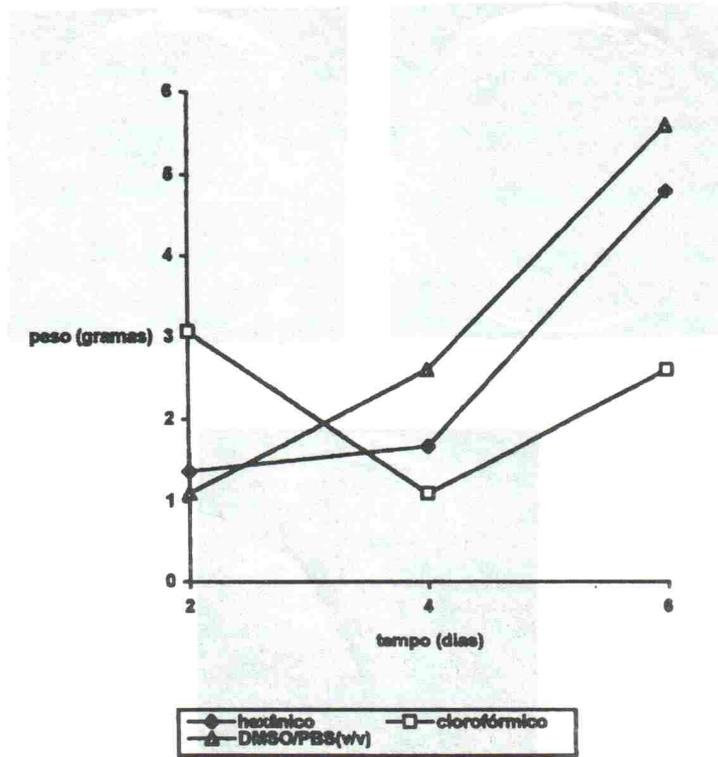


FIGURA 3 - Ganho de peso em gramas de camundongos albinos tratados com 500 mg/kg de extratos ativos de caule de *Vernonia scorpioides*.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que os extratos hexânico e clorofórmico de caules de *Vernonia scorpioides* têm ação fungicida sobre *Penicillium citrinum*. Esses extratos concentram princípio(s) ativo(s) que, provocam a morte fúngica e não apenas a estagnação do seu desenvolvimento, além de não apresentarem toxidez para camundongos albinos.

Embora não se tenha estudado quimicamente os extratos testados, há uma clara indicação de que a atividade observada em *V. scorpioides* se deva, pelo menos em parte, à presença de lactonas sesquiterpênicas, representando uma fonte inesgotável de matéria-prima bioativa, significando um caminho alternativo para produtos antifúngicos de grande potencialidade. Entretanto, há a necessidade de estudos mais profundos para que esta se transforme em um agente fungicida, seguro e atóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON, M. C. B. V., LOPES, J. L. C., HERZ, W. Glaucolide B, molluscicidal sesquiterpene lactone, and other constituents of *Vernonia eremophila*, Ribeirão Preto, planta Medicinal, v. 56, n. 3, p. 271-73, 1990.
- DAVINO, S. C. Estudo *in vitro* da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de plantas brasileiras da família Compositae (Asteraceae) e de alguns de seus constituintes. São Paulo: Universidade de São Paulo. 115 p. Tese M. S. 1989.
- FREIRE, M. F. I. Ação antifúngica de *Vernonia scorpioides*, *Vernonia sericea* e *Vernonia diffusa* (Asteraceae): Ensaio de Antibiose e Toxidez. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 64 p. Tese M. S. 1995.
- FREIRE, R. B., SOUZA, C. C., SOARES, J. D. H., SOUZA, A. L. G. S. Ação de subdoses de citrulina sobre a resposta imune em camundongos. I Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia - VIII Encontro Nacional de Micotoxinas (anais), Rio de Janeiro-RJ, set. 1994.
- GILL, J. Design and analysis of Experiments, in the Animal and Medical Sciences. Iowa, U. S. A. The Iowa University Press, 1978. v. II.
- GOTTLIEB, O. & KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, v. 15, n. 89, p. 51-4, abr. 1993.
- KAIJ, A. K. M., AMOROS, M., CHULIA, A. J., KAOUADJI, M., MARIOTTE, A. M., GIRRE, L. Screening of *in vitro* antiviral activity from Brittany plants, specially from *Centaura nigra* L. (Asteraceae). J. Pharm. Belg., Rennes, v. 46, n. 5, p. 325-6, 1991.
- KUMAR, S. & PRASAD, G. Efficacy of medicinal plant (*Andrographis peniculata*) extract on aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus*. Letters Applied Microbiology, Bhagalpur - India, v. 15, p. 131-2, may. 1992.
- KUPCHAM, S. M., HEMINGWAY, R. J., RICHARD, J., WERNER, D., KARIN, A., MC PHAIE, A. T., SIM, G. A. Vernolepin, a novel elemanolide dilactone tumor inhibitor from *Vernonia*. J. Amer. Chem. Soc., Wisconsin, v. 90, n. 13, p. 3596-7, 1968.
- LOPES, J. L. C. Sesquiterpene lactones from *Vernonia*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. II, p. 277-30, 1991. Special Issue.
- PICMAN, A. K. & SCHNEIDER, E. F. Inhibition of fungal growth by selected sesquiterpene lactones. Biochemical Systematics and Ecology, Canadá, v. 21, n. 3, P. 307-14, 1993.
- SMITH, J. E. & MOSS, M. O. Micotoxynes, formation analysis and significance. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1985.
- VIEIRA, S. & HOFFMANN, R. Estatística Experimental, São Paulo: Atlas, 1989.
- WARNING, V., JAKUPORIC, J., BOHLMANN, F. J. Scorpiolide, a new type of sesquiterpene lactone from *Vernonia scorpioides*. Liebigs Ann. Chem. Berlin, N. 5, p. 467-8, 1987.