124/428 Farmacologia – Pesquisa

Efeito de extratos hidroetanólicos de *Vernonia tweedieana* e *Vernonia cognata* sobre imunidade de camundongos

Vernonia tweedieana and *Vernonia cognata*'s hydroethanolic extracts effect on mice immunity

Raquel Denise Petri[1], Marilei Uecker Pletsch[1], Micheli Zeifert[2] & Ingrid Dalira Schweigert[1]

RESUMO – Espécies do gênero *Vernonia* como a *V. tweedieana* e *cognata* são abundantes no sul do Brasil e utilizadas popularmente em doenças relacionadas ao sistema imune. Nesse estudo foi avaliada a ação de macerados hidroetanólicos sobre esse sistema em camundongos. As drogas vegetais foram extraídas por maceração com etanol, os macerados concentrados até a secura e realizada avaliação fitoquímica preliminar para flavonóides e saponinas. Foram utilizados 4 grupos experimentais: nativo, imunizado, tweedieana e cognata, tratados por via oral com salina ou 500 mg/kg de extrato e imunizados por via retro-orbital. Quatro dias após a imunização e tratamento, foi determinada a massa corporal, do fígado, rins, baço e timo, e avaliada a celularidade do baço. Em relação à massa do fígado, rins e baço, não houve di ferença estatística entre os grupos experimentais e os grupos controle, sugerindo que os extratos na concentração testada, não causam toxicidade a estes órgãos. Para a celularidade do baço houve diferença estatística entre os grupos expressa como efeito imunossupressor dos extratos. Estes resultados preliminares sugerem que maiores estudos sobre o uso dessas espécies em doenças alérgicas se fazem necessários, considerando os efeitos sobre estes parâmetros do sistema imune e sua baixa toxicidade.

PALAVRAS-CHAVE – *Vernonia tweedieana, Vernonia cognata,* sistema imune.

SUMMARY – *Species from the genus* Vernonia*, among them,* V. tweedieana *and* cognata*, are abundant in the south of Brazil and used by the population in diseases related to the immune system. In this study, the action of hydroethanolic extracts in the immune system of mice was evaluated. The vegetable drugs were extracted by maceration with ethanol, the obtained macerated were concentrated until dryness and preliminary evaluated for flavonoids and saponins. Four experimental groups were investigated: native; immunized; tweedieana; and cognate, treated p.o. with saline or 500mg/kg of extract and immunized by retro-orbital route. Four days after the immunization and treatment, the body mass and kidney, spleen and thymus mass was determined and spleen's cellularity evaluation was performed. Focusing the liver, kidneys' and spleen masses, there was no statistical difference among the experimental groups and the control groups, suggesting that the extracts of* V. tweedieana *and* V. cognata *in the tested concentration do not cause toxicity to these organs. The cellularity of the spleen presented a statistical difference in the groups expressing immunosuppressant effect of extracts. The preliminary results suggest that more studies are needed in allergic diseases, considering the effects on these parameters from the immune system and its low toxicity.*

KEYWORDS – Vernonia tweedieana*,* Vernonia cognata*, immune system*

INTRODUÇÃO

Apesar da pesquisa com plantas medicinais ter sido intensa nas últimas décadas, vários autores chamam a atenção quanto à dicotomia entre o pequeno número de estudos com espécies nativas do Brasil e a nossa imensa biodiversidade (Ribeiro, 2005; Veiga Jr., 2005). Várias plantas medicinais popularmente utilizadas podem ter atividades relacionadas ao sistema imune, estimulando-o ou suprimindo-o em níveis terapêuticos ou tóxicos (Sohni e Bhatt, 1996; Nergard *et al.,* 2004; Zhang, 2004). A avaliação dos órgãos linfóides, do fígado e rins tem sido utilizada como indicadora de imunotoxicidade tendo em vista a vulnerabilidade destes órgãos a estressores, substâncias tóxicas e outros agentes (Koller, 2001), sendo que esta propriedade foi pouco estudada em relação às plantas medicinais.

Considerando o exposto acima, foram estudadas as espécies *Vernonia tweedieana* e *Vernonia cognata,* conhecidas como assa-peixe, língua-de-vaca, chamarrita, erva-de-mula, orelha-de-mula, mata-pasto, laguneira (Martins *et al.,* 2005; Sausen, 2001; Zanon, 2006),

Recebido em 01/11/2007
[1]Professoras do Departamento de Ciências da Saúde, UNIJUÍ, Ijuí/RS
[2]Acadêmica de Farmácia, Bolsista PIBIC/CNPq, UNIJUÍ, Ijuí/RS
Apoio: CNPq/ UNIJUÍ

espécies comuns na região sul do Brasil, Paraguai e nas províncias de Missiones, Formosa e Corrientes, na Argentina (Cabrera e Klein, 1980). Essas espécies são empregadas popularmente para tratar doenças respiratórias alérgicas, as quais apresentam interação com o sistema imune (Iwalewa, 2003; Gupta, 2003). Por fim, destaca-se o potencial das espécies sul-americanas do gênero *Vernonia*, pouco estudadas, para as quais é estratégica a pesquisa na busca de compostos potencialmente ativos no sistema imune (Martins *et al,* 2005; Zanon, 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foi realizada uma análise fitoquímica preliminar e analisado o efeito de extratos hidroetanólicos de *Vernonia tweedieana* e *Vernonia cognata* sobre alguns parâmetros do sistema imune de camundongos *Swiss*. Para tanto, estas drogas vegetais foram coletadas em Ijuí, RS, secas por 10 dias à sombra e embaladas. A seguir foram extraídas por maceração com etanol 80°GL por 7 dias, sendo a torta remacerada pelo mesmo período, reunindo os extratos. Os macerados obtidos foram concentrados com auxílio do evaporador rotatório até a secura. A seguir, foram analisados por cromatografia em camada delgada, em placas de gel de sílica F254 Merck, empregando 20 sistemas cromatográficos para flavonóides e saponinas (Falkenberg *et al.,* 2004; Wagner, Bladt, 2001). Destes, dois sistemas para flavonóides e 2 para saponinas foram selecionados por apresentarem melhor separação das substâncias. Na visualização dos flavonóides foi empregada solução metanólica de reagente Natural A 0,5 %, seguida da aspersão de solução etanólica de PEG 5000 a 5 % e observação sob luz UV em 365 nm. No caso das saponinas foi utilizado o reagente anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento e observação sob luz visível. Para avaliação da atividade sobre o sistema imune os extratos concentrados foram ressuspensos em solução de DMSO 1 % e administrados por gavagem a camundongos machos *Swiss* com peso médio de 31 ± 5,25g, obtidos do Biotério do Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB-RS). Os animais receberam uma dieta padrão, água *ad libitum* e tiveram temperatura e luminosidade ambiente regulada (20-22°C, 12h de claro/escuro), sendo todos os procedimentos realizados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados 4 grupos experimentais: nativo (n=6, salina por via retro-orbital e vo); imunizado (n=8, hemáceas de carneiro por via retro-orbital e salina vo); tweedieana (n=8, hemáceas de carneiro por via retro-orbital e 500mg/kg de extrato de *V. tweedieana* vo) e cognata (n=8, hemáceas de carneiro por via retro-orbital e 500mg/kg de extrato de *V. cognata* vo). Quatro dias após a imunização e tratamento, os animais foram anestesiados com éter e eutanasiados por deslocamento cervical, para a determinação da massa corporal, retirada de órgãos (fígado, rins, baço e timo) e avaliação da celularidade do baço. Este último ensaio foi realizado após divulsão do órgão, lavagem das células e tratamento com tampão de lise, lavagem subseqüente, por duas vezes no mesmo meio e contagem em câmara de Neubauer (Uecker, 2003). Os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA/Duncan), utilizando um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica dos extratos evidenciou a presença de compostos fenólicos e terpenóides. Para flavonóides, o sistema com melhor resolução para a *Vernonia tweedieana* foi o constituído por acetato de etila: metanol: água (77:13:10); enquanto que para a *Vernonia cognata* foi n-butanol: ácido acético: água (4:1:5). Os resulta dos evidenciam maior número de compostos fenólicos na *V. tweedieana*. Em relação às saponinas, para a *V. tweedieana* o sistema cromatográfico selecionado foi n-butanol saturado com água e para a *V. cognata* foi escolhida a fase móvel clorofórmio: acetato de etila (1:1). A partir destes dados, fica evidente a presença de saponinas em maior número na *V. cognata*. Entretanto, observando os resultados para flavonóides e saponinas em conjunto, é possível observar a presença de substâncias de menor polaridade na *V. cognata*, inclusive de fenólicos juntamente com as saponinas.

Os resultados obtidos quanto à massa dos órgãos são apresentados na Figura 1. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e os grupos controle, quanto à massa do fígado e rins (Figura 1 A e B), sugerindo que os extratos de *V. tweedieana* e *V. cognata* na concentração testada, não causam toxicidade a estes órgãos vitais de intenso metabolismo. Quanto à massa dos órgãos linfóides (Figura 1C e D), para o baço também não foi verificada diferença estatística. Já na análise da massa do timo, houve diferença o que poderia significar uma supressão da imunidade celular. No entanto, essa variação provavelmente é determinada pelas limitações da técnica de dissecação deste órgão (Uecker, 2003). A celularidade do baço é indicativa de ativação do sistema imune humoral e complementa a análise da massa dos órgãos linfóides. A Figura 2 apresenta o resultado da análise desse parâmetro, para o qual houve diferença estatística entre os grupos. Para ambos os extratos houve imunossupressão, já que estes ocasionaram redução estatisticamente significativa da contagem de células esplênicas. Esta supressão parece mais intensa para a *V. cognata* cuja contagem de células aproximou-se do grupo controle não imunizado, embora

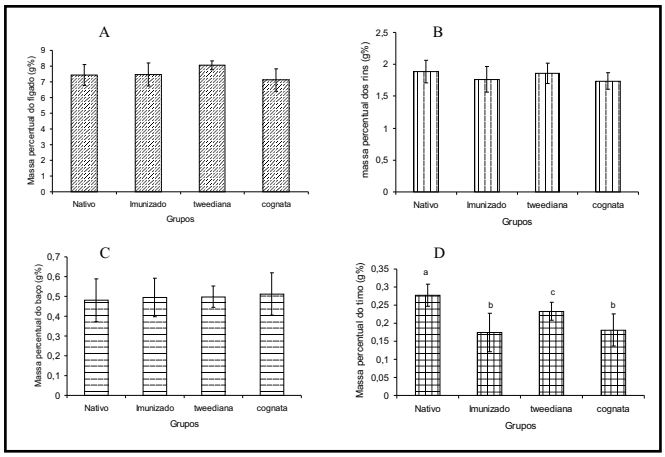

FIG. 1 - Efeito dos extratos (macerado etanólico 80 ºGL) de *V. tweedieana* e *V. cognata* sobre a massa percentual do fígado (A), rins (B), baço (C) e timo (D) de camundongos. Cada coluna representa a média ± desvio padrão, para seis animais no grupo nativo e oito nos demais. (NS para A, B e C e *p*<0,05 para D; Anova/Duncan)

OBS.: Nativo: animais tratados com salina; Imunizado: animais imunizados com hemáceas de carneiro e tratados com salina vo; tweedieana: animais imunizados com hemáceas de carneiro e tratados com dose única de extrato de* V. tweedieana *500 mg/kg, vo; cognata: animais imunizados com hemáceas de carneiro e tratados com dose única de extrato de* V. cognata *500 mg/kg, vo.

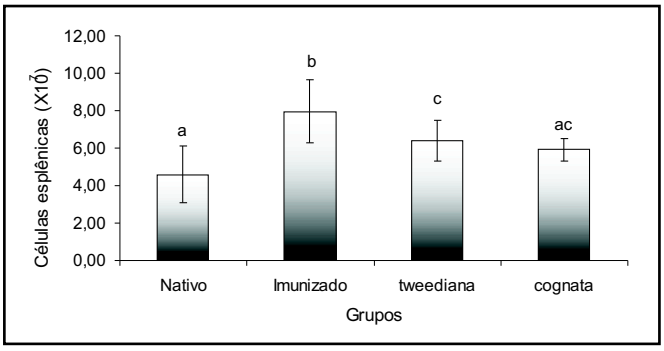

FIG. 2 - Efeito dos extratos (macerado etanólico 80 ºGL) de *V. tweedieana* e *V. cognata* sobre a celularidade do baço de camundongos. Cada coluna representa a média ± desvio padrão, para 6 animais no grupo nativo e 8 nos demais. Sobrescritos de letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05 – Anova/Duncan)

OBS.: Nativo: animais tratados com salina; Imunizado: animais imunizados com hemáceas de carneiro e tratados com salina vo; tweedieana: animais imunizados com hemáceas de carneiro e tratados com dose única de extrato de* V. tweedieana *500 mg/kg, vo; cognata: animais imunizados com hemáceas de carneiro e tratados com dose única de extrato de* V. cognata *500 mg/kg, vo.

não haja diferença estatística entre as duas espécies. Comparando a celularidade do baço (Figura 2) e a massa deste órgão (Figura 1C), observou-se diferença estatística para o primeiro parâmetro o que não se verificou para o segundo. Esta aparente discrepância pode ser explicada pela maior sensibilidade da contagem de células frente ao tratamento agudo. É possível que, utilizando outros esquemas de tratamento de caráter crônico, a supressão também fosse verificada na massa do baço.

CONCLUSÃO

A atividade de ambas as espécies sobre o sistema imune observada, precisa ser avaliada com outros esquemas de administração, bem como com o fracionamento do extrato bruto. Considerando o conjunto dos dados a análise fitoquímica preliminar dos extratos evidenciou a presença de flavonóides e saponinas em ambas as espécies estudadas, com significativas diferenças no perfil de constituintes destas, inclusive no que diz respeito à sua polaridade. O fato dos extratos suprimirem o sistema imunológico pode indicar sua utilidade no tratamento de patologias em que há exacerbação patológica desse sistema, tais como doenças reumáticas, alergias, incluindo aquelas ligadas ao trato respiratório como asma e bronquite. Os resultados obtidos na avaliação da atividade imunomoduladora, sugerem que a referida utilização popular dessas espécies, em doenças alérgicas do trato respiratório merece aprofundamento, tendo em vista estes resultados preliminares.

REFERÊNCIAS

1. Cabrera, A.L.; Klein, R.M. Fascículo Compostas. Tribo *Vernoniae In:* Reitz, R. Flora Ilustrada Catarinense. Parte I. As plantas. Itajaí, 1980.
2. Falkenberg, M. de B.; Santos, R.I. dos; Simões, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 229-245.
3. Gupta, M. et al. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. Fitoterapia. 2003 74 (1/2):148-50.
4. Iwalewa, E.O. *et al.* Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. J Ethnopharmacol . 2003 86 (2/3):229-34.
5. Koller, L.D.A perspective on the progression of immunotoxicology. Toxicology. 2001 (160): 105-110.
6. Martins, B.P.; Meinerz, P.C.; Petry, R.P.; Uecker, M. Avaliação comparativa de extratos de duas espécies de *Vernonia. In:* VI Encontro de Estudos Farmacêuticos, II Concurso de Pesquisa Científica. UNIJUI, 2005, Ijuí. Anais... Ijuí: UNIJUI, 2005, p.13.
7. Nergard, C.S. *et al.* Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana*Sch. Bip. ex Walp. J Ethnopharmacol. 2004 91(1): 141-52.
8. Ribeiro, A.Q.; Leite, J.P.V.; Dantas-Barros, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. Rev. Bras. Farmacog. 2005 15 (1): 65-70.
9. Sausen, T.R. Screening fitoquímico do extrato de folhas de *Vernonia tweedieana* Baker . Ijuí. 50p. 2001. Trabalho de Conclusão do Curso – Univ. Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.
10. Sohni Y.R.; Bhatt, R.M. Activity of a crude extract formulation in experimental hepatic amoebiasis and in immunomodulation studies. J Ethnopharmacol. 1996 534 (2-3): 119-24.
11. Uecker, M. Avaliação do potencial imunomodulatório de extratos e flavonóides isolados de *Alternanthera marítima (Amaranthaceae).* Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2003, p.110.
12. Veiga, Jr., V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova: v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
13. Wagner, H.; Bladt, S. 2001. Plant Drug Analysis: a thin later chromatography atlas. 2nd. ed. New York: Springer.
14. Zanon, R.B. Metabólitos secundários em *Vernonia Tweedieana* Baker. Santa Maria. 180p. 2006. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria.
15. Zhang L; Wang Y; Wang Lz; Gao X.M. Immunopotentiating effect of a 'Yang'-promoting formula of traditional chinese medicine on aged female BALB/c mice. Phytother Res; v.18, n, 10, p. 857-861, 2004.

Endereço para correspondência
Raquel Denise Petry
E-mail: rdpetry@hotmail.com.br.
Departamento de Ciências da Saúde – UNIJUÍ
Rua do Comércio, 3000 - 98700-000
Bairro Universitário - Ijuí/RS