



Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae)

Luciana da Silva¹, Glaucia H. Oniki¹, Débora G. Agripino¹, Paulo R. H. Moreno³, Maria Claudia M. Young¹, Marco Aurélio S. Mayworm², Angela M. Ladeira^{1*}

¹Seção de Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica, Av. Miguel Stefano 3687, Água funda, Caixa Postal 3005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil,

²Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Biologia, UNISA, Rua Prof. Eneas de Siqueira Neto 340, Jardim das Embuias, 04829-300, São Paulo, SP, Brasil,

³Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bl 11T, sala 1112, Cidade Universitária, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae) tem sido empregada popularmente como anti-diabética. Nessa espécie foi também detectada atividade fungitóxica. O objetivo do presente trabalho foi realizar a identificação dos compostos fungitóxicos em extratos de folhas. O extrato etanólico foi submetido a fracionamento com solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol) e seu efeito antifúngico foi analisado frente a *Cladosporium sphaerospermum*. Os extratos em clorofórmio e acetato de etila mostraram atividade, e foram fracionados por cromatografia em coluna e cromatografia preparativa em placas de sílica, respectivamente. Três terpenóides foram isolados do extrato em clorofórmio; um deles foi identificado, por análise em CG-EM, como um sesquiterpeno, o biciclogermacreno. O composto ativo do extrato em acetato de etila foi identificado, por análises em CLAE, como o estilbeno resveratrol.

Unitermos: *Cissus verticillata*, Vitaceae, atividade fungitóxica, sesquiterpeno, estilbeno.

ABSTRACTS: "Bicyclogermacrene, resveratrol and fungitoxic activity on leaves extracts of *Cissus verticillata* L. Nicolson & Jarvis (Vitaceae)". *Cissus verticillata* L. (Vitaceae) is popularly employed as hypoglycemic and it shows fungitoxic activity. This work aims at identification of fungitoxic compounds on extracts of leaves. The ethanol extract was partitioned using solvents of different polarities (hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol) and its fungitoxic activity was analysed upon *Cladosporium sphaerospermum*. The chloroform and ethyl acetate extracts showed activity and they were fractionated by column chromatography and preparative TLC, respectively. Three terpenoids were isolated from the chloroform extract, one of them identified by GLC-MS analysis as sesquiterpene bicyclogermacrene. The active compound of the ethyl acetate extract was identified by HPLC analyses as stilbene resveratrol.

Keywords: *Cissus verticillata*, Vitaceae, fungitoxic activity, sesquiterpene, stilbene.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca de compostos com atividades antifúngicas, antitumorais e antioxidantes tem sido intensificada por levar à identificação de novos fármacos que possam ser empregados no tratamento da AIDS e do câncer, e suas complicações (Grayer; Harborne, 1994; Gordon, 1996).

Cissus verticillata, pertencente à família Vitaceae, é nativa da região norte do Brasil, tem hábito herbáceo, escandente ou trepador, perene, com gavinhas opostas às folhas (Van den Berg, 1993). Popularmente é empregada no tratamento de diabetes, sendo conhecida como "insulina vegetal" e "parreira brava" (Agra et al., 2007), porém estudos farmacológicos ainda são contraditórios (Beltrame et al., 2002). Outros trabalhos

têm comprovado atividades anti-convulsivantes (Elizabetsky, 1988) e antimicrobianas (Beltrame et al., 2002).

Estudos químicos realizados com *Cissus verticillata* mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e sais de magnésio, manganês, silício, cálcio, fósforo e potássio (Silva, 1996).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial antifúngico, e isolar e identificar compostos fungitóxicos de folhas de *Cissus verticillata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cissus verticillata (L.) Nicolson & Jarvis J.S.Silva 273 (SP). O material foi identificado pela

Dra. Lúcia Rossi, da Seção de Herbário do Instituto de Botânica. Local de coleta: Viveiro Manequinho Lopes, no Parque Ibirapuera, São Paulo.

Preparo do material

Folhas (115,9 g) foram lavadas e secas à 60 °C por dez dias, em seguida pulverizadas, e submetidas à extração com etanol (93%) à temperatura ambiente, por três dias, trocando-se o solvente a cada 24 horas. O extrato etanólico obtido foi concentrado a 40 °C, sob pressão reduzida, em rotaevaporador.

O extrato etanólico obtido (2,25 g) foi suspenso em etanol 50% e submetido à partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades (n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol), produzindo novos extratos, os quais foram submetidos aos bioensaios de atividade antifúngica, conforme descrito no esquema.

O extrato clorofórmico (454 mg), que apresentou atividade antifúngica, foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, usando como eluentes clorofórmio : metanol (1:1) V/V. Cinco frações foram coletadas. Bioensaios de atividade antifúngica revelaram compostos inibidores nas frações 2 (198 mg) e 3 (40 mg). Essas duas frações foram submetidas novamente à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 usando na eluição um gradiente de clorofórmio : metanol (1:1; 4:6; 1:9 e 0:1)V/V.

Novas frações contendo compostos ativos obtidos da fração 2 (198 mg), do extrato clorofórmico, foram submetidas a cromatografia preparativa em camada delgada empregando como solventes clorofórmio e clorofórmio : metanol (3:7) V/V. As cromatoplasmas foram observadas sob luz UV e submetidas ao bioensaio de atividade antifúngica. Os compostos ativos eluídos foram submetidos à análises em CLAE e aplicados em placas de sílica para caracterização de sua natureza química. Para isto as placas foram reveladas com reagentes para detecção de alcalóides (Draggendorf), compostos fenólicos (reagente de Godin), compostos terpênicos (solução de vanilina sulfúrica) e flavonóides (solução etanólica de cloreto de alumínio) (Harborne, 1988). As análises em CLAE foram realizadas em aparelho Varian ProStar com coluna C 18, Reselut de 5 µC, 1890 A, (150 x 4,6 mm), e detector de luz UV em 254 nm. Foram injetados 20 µL das soluções metanólicas das amostras. O fluxo foi de 1 mL/min. A Tabela 1 apresenta o gradiente de solventes utilizado.

Os compostos da fração 3 (40 mg), do extrato clorofórmico, semi-purificados por cromatografia em camada delgada preparativa, foram analisados por cromatografia a gás, acoplada a espectrometria de massa, usando aparelho Agilent 6890, modelo CP 3800 com coluna HP-5 MS Agilent, diâmetro de 0,25 mm e filme de 0,25 µM, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 mL/min. A temperatura foi programada mantendo

80 °C por um minuto, seguida de aumento de 10 °C por minuto até 290 °C, temperatura mantida por mais um minuto. Foi injetado um volume de 1 µL de uma solução do composto (1 mg.mL⁻¹), que foi identificado através da comparação de seu espectro de massa com espectros existentes no banco de dados (Wiley 275) do equipamento.

O extrato acetato de etila (5 mg) foi submetido a cromatografia preparativa em camada delgada em sílica gel G com clorofórmio:metanol(1:1) V/V como eluente, e as cromatoplasmas foram submetidas ao bioensaio de atividade antifúngica. O composto ativo eluído foi analisado em CLAE. Utilizou-se aparelho da Varian e coluna descritas acima, detector a 320 nm, fluxo 1 mL/min. e o eluente descrito na Tabela 2.

A amostra (1 mg/mL) do composto eluído foi diluída em metanol, e 20 µL dessa solução foram injetados, utilizando-se Resveratrol (1 mg/mL) como padrão.

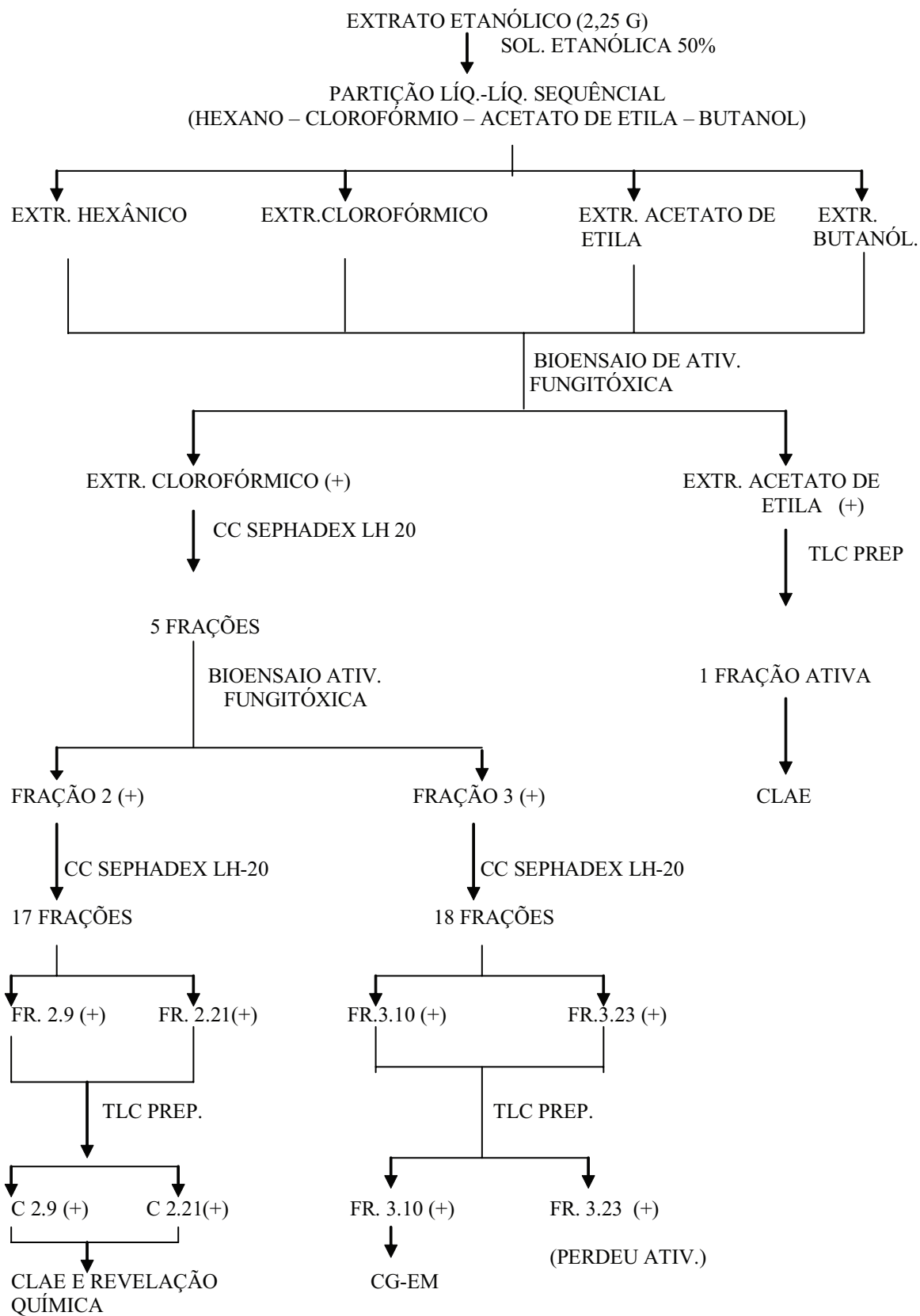
Bioensaio de atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi analisada através do método de bioautografia direta (Homans; Fuchs, 1970). O fungo filamentosso *Cladosporium sphaerospermum* foi empregado como detector dos compostos tóxicos. Extratos brutos (400 µg) e frações (100 µg) obtidas após cromatografia em coluna, ou cromatografias preparativas em camadas delgadas, foram analisadas em placas de sílica gel desenvolvidas em solventes adequados. Após completa evaporação dos solventes todas as placas foram borrifadas com uma suspensão de esporos (> 2 x 10⁶ esporos/mL) de *C. sphaerospermum* em solução de glucose e sal, e incubadas por 72 horas, no escuro, em câmara úmida a 25 °C. Zonas de inibição claras são formadas contra um fundo escuro quando os compostos inibidores estão presentes. Define-se por atividade forte a inibição total do crescimento do fungo, moderada a inibição parcial do desenvolvimento deste, e fraca quando há pouca alteração no desenvolvimento. A quantificação da atividade fungitóxica foi feita a partir de comparação com padrão de Nistatina, cujo limite de detecção é de 1 µg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos em clorofórmio e acetato de etila mostraram atividade antifúngica moderada, enquanto os demais extratos não foram efetivos (Figuras 1 e 2).

O fracionamento por cromatografia em coluna da fração 2 do extrato clorofórmico produziu duas sub-frações ativas (7,3 mg e 6,1 mg), que após purificação por cromatografia preparativa em placa de sílica mostraram natureza terpenoídica, de acordo com a revelação com o reagente de vanilina. O perfil cromatográfico das análises dessas sub-frações mostrou compostos com tempos de retenção 32,821 e 36,946, porém não foi



Esquema dos métodos de fracionamentos utilizados, (+) atividade fungitóxica frente a *Cladosporium sphaerospermum*

possível identificá-las devido a falta de padrões.

A partir da fração 3 do extrato clorofórmico obteve-se uma sub-fração (1,6 mg) identificada como biciclogermacreno (Figura 3), dado obtido por comparação dos espectros de massa do composto com o do padrão na análise em CG-EM.

O composto biciclogermacreno, um sesquiterpenóide, e outros terpenóides com atividade antifúngica têm sido identificados em extratos de outras espécies. O óleo essencial de *Piper cernuum* e *P. regnellii* cuja composição contém entre outros compostos, biciclogermacreno, mostrou atividade antimicrobiana (Constantin et al., 2001; Cysne et al., 2005). O óleo essencial de *Calea clematidea*, contendo o composto germacreno B também mostrou atividade fungitóxica (Fach et al., 2002).

O composto ativo (1 mg) do extrato em acetato de etila mostrou tempo de retenção 20,242 e foi identificado como resveratrol nas análises realizadas em cromatografia em CLAE (Figuras 4 e 5).

O resveratrol é um composto pertencente à classe dos estilbenos, isolado em 1974 pela primeira vez de uma leguminosa Peruviana, a *Cassia quinquagulata*. Os estilbenos são comuns em Gnetaceae, Dipterocarpaceae e Vitaceae (Khan et al., 1986). O resveratrol é encontrado em várias plantas (Hart, 1981), mas uvas e produtos relacionados são consideradas as

fontes mais importantes, e nelas o teor desse composto depende da variedade e das condições ecológicas do cultivo (Kallithraka et al., 2001; Sun et al., 2006). São precursores das viniferinas, fitoalexinas produzidas em folhas de *Vitis vinifera* L. (Stecher et al., 2001).

Adrian et al. (2000) observaram que o resveratrol é um componente com atividade antifúngica em *Vitis vinifera* (Vitaceae), e segundo Langcake e Pryce (1976) e Domingo e Lopes-Brea (2003) funciona como fitoalexina, após uma infecção por patógenos como *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola*. Chan, (2002) observou que o resveratrol tem atividade contra dermatófitos e bactérias da pele em humanos. Jung et al. (2005) sugeriram que o resveratrol poderia ser utilizado como agente terapêutico no combate a algumas infecções fúngicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio concedido ao Biota Proc. Nº 05074/98, e ao MS Rodrigo S. Dourado pela edição das figuras.

Tabela 1. Gradiente dos solventes para análise em CLAE, das sub-frações obtidas da fração 2 (clorofórmio). A: ácido fosfórico 0,3%; B: acetonitrila; C: metanol.

Solventes (%)	Tempo (min.)
100 A	0 - 10
80 A + 20 B	11 - 20
60 A + 40 B	21 - 30
40 A + 60 B	31 - 40
20 A + 80 B	41 - 50
100 B	51 - 60
80 B + 20 C	61 - 70
100 C	71 - 80

Tabela 2. Gradiente dos solventes para análise da fração ativa do extratos em acetato de etila. A: ácido fosfórico 0,3%; B: acetonitrila; C: metanol.

Solventes (%)	Tempo (min.)
100 A	0 - 10
85 A + 15 B	10 - 30
75 B + 15 C	30 - 40
5 A + 80 B + 15 C	40 - 55
100 A	55 - 60

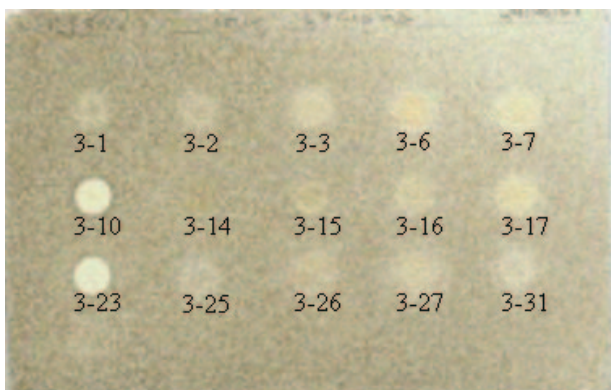


Figura 1. Atividade de sub-frações fungitóxicas obtidas da fração 3 do extrato de folhas de *C. verticillata* em clorofórmio. Amostras (100 µg) aplicadas em uma placa de sílica e reveladas frente a *Cladosporium sphaerospermum* com o método da bioautografia.



Figura 2. Atividade anti-fúngica do composto purificado do extrato de folhas de *C. verticillata* em acetato de etila. Cromatoplaça desenvolvida em clorofórmio: metanol (1:1). Rf do composto ativo 0,53.

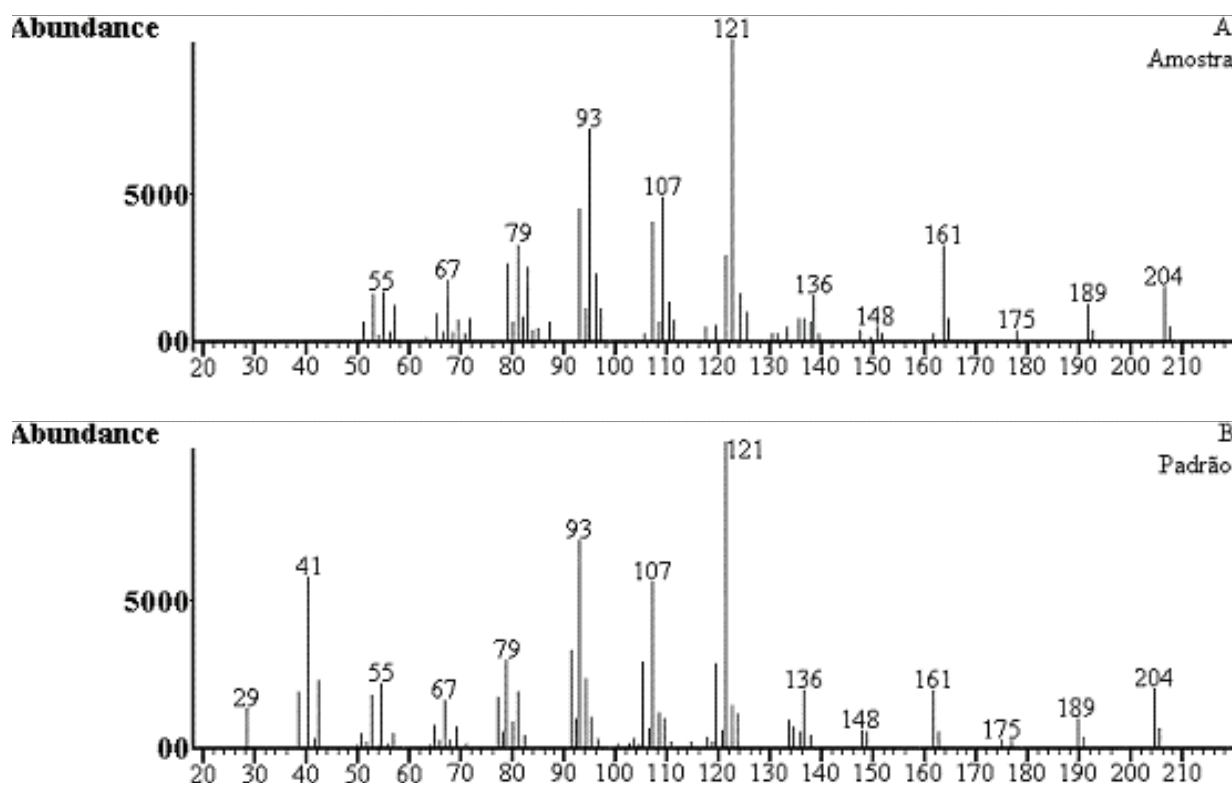


Figura 3. Espectro de massa da sub-fração 3.10 do extrato clorofórmico de folhas de *Cissus verticillata* (A) comparado com o espectro de massa do biciclogermacreno (B).

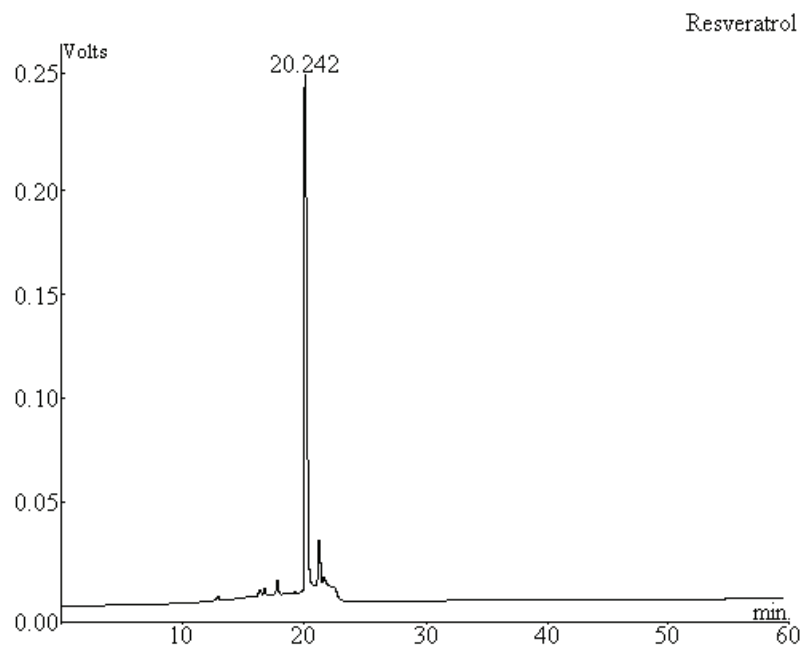


Figura 4. Perfil cromatográfico do padrão resveratrol na análise realizada em CLAE.

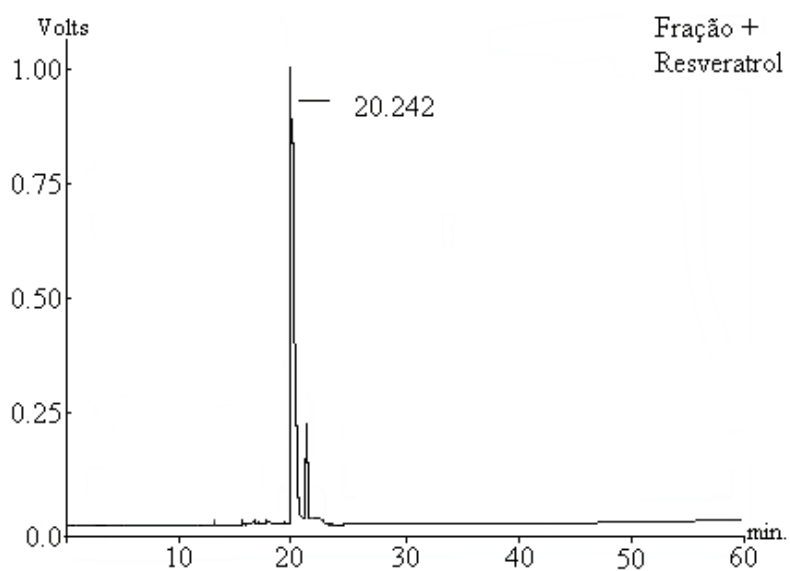


Figura 5. Perfil cromatográfico de uma mistura da amostra do composto purificado do extrato em acetato de etila com o padrão resveratrol, na análise realizada em CLAE.

REFERÊNCIAS

- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J Agric Food Chem* 48: 6103-6105.
- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Beltrame FL, Pessini GL, Doro DL, Dias Filho BP, Bazotte RB, Cortez DAG 2002. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Braz Arch Biol Techn* 45: 21-25.
- Chan MMY 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol* 63: 99-104.
- Constantin MB, Sartorelli P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJP, Ohara MT, Emerenciano VP, Kato MJ 2001. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. *Planta Med* 63: 771-773.
- Cysne JB, Canuto KM, Pessoa ODL, Nunes EP, Silveira ER 2005. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil *J Braz Chem Soc* 16(6B): 1378-1381.
- Domingo D, Lopes-Brea M 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap* 16: 385-393.
- Elizabetsky E. 1988. Ação anticonvulsivante de *Cissus sicyoides*, cipó-puca. *Cienc Cult* 40(Supl.): 985.
- Fach A, Gregel B, Simionatto E, Da Silva UF, Zanatta N, Morel AF, Linares CE, Alves SH 2002. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. *Planta Med* 68: 836-839.
- Gordon MH 1996. Dietary antioxidants in disease prevention *Nat Prod Rep* 13: 265-273.
- Grayer MJ, Harborne JB 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982 - 1993. *Phytochemistry* 37: 19-42.
- Hart JH 1981. Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 19: 437-458.
- Homans AL, Fuchs A 1970. Direct bioautography on thin layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. *J Chromatogr* 51: 327-329.
- Harborne JB 1988. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. 288p.
- Jung HJ, Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, Lee DG 2005. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch Pharmacol Res* 28: 557-560.
- Kallithraka S, Arvanitoyannis I, El-Zajouli A, Kefalas P 2001. The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chem* 75: 355-363.
- Khan MA, Nabi SG, Prakash S, Zaman A 1986. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. *Phytochemistry* 25: 1945-1948.
- Langcake P, Pryce RJ 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 9: 77-86.
- Sun B, Ribes AM, Leandro MC, Belchior AP, Spranger MI 2006. Stilbenes quantitative extraction from grape skins contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal Chim Acta* 563(1-2): 382-390.
- Silva GA1996. Estudo toxicológico e farmacológico dos extratos de *Cissus sicyoides* L. *Rev Bras Farmacogn* 5: 143-155.
- Stecher G, Huck CW, Popp M, Bonn GK 2001. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *J Anal Chem* 371: 73-80.
- Van Den Berg ME 1993. *Plantas medicinais na Amazônia - contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém. 206 p.