

## **Análise do perfil fitoquímico, da atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato aquoso das folhas de *Gossypium hirsutum* L.**

**\*Sara Marques da Silva (IC)<sup>1</sup>; Lorena Dutra Silva (IC)<sup>1</sup>; Liliane de Sousa Silva (PQ)<sup>2</sup>; Carla Rosane Mendanha da Cunha (PQ)<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Acadêmicas do curso de ciências biológicas da Universidade Estadual de Goiás.

<sup>2</sup> Professora colaboradora do projeto.

<sup>3</sup> Professora coordenadora do projeto.

**\*sarmarqu@gmail.com**

Universidade Estadual José Alves de Assis

Avenida Rio Araguaia Esq. C/ Rio Paranaíba S/ Nº, Setor Milton Camilo de Faria

Resumo: Utilizadas como matéria prima na confecção de medicamentos, as plantas medicinais são uma alternativa terapêutica de uso popular para tratamento de patologias. Considerando a importância de novos estudos sobre o potencial medicinal das plantas, este trabalho teve o objetivo de identificar compostos secundários da espécie *Gossypium hirsutum* L. através da prospecção fitoquímica, assim como sua atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. O perfil fitoquímico foi realizado de acordo com as reações específicas para cada metabólito secundário e foi positivo para digitálicos e cumarinas. Identificou-se atividade citotóxica após 24 e 48 horas de incubação usando leucócitos humanos no teste de exclusão de azul de tripano e MTT na concentração de 2- 0,0625 mg / ml. Para a avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*, e o extrato aquoso das folhas em diferentes concentrações, mas o extrato mostrou-se ineficaz na inibição do crescimento bacteriano para as cepas testadas. A atividade antioxidante foi feita através do método DPPH e concentrações dos extratos de 100 a 3,12% e comprovou-se atividade antioxidante considerável que em determinadas doses não apresenta citotoxicidade aos leucócitos. Porém, testes laboratoriais mais completos e que estejam agregados a análise de solo e sazonalidades se fazem necessários.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Fitoterápicos. Algodão. Prospecção. Toxicidade.

### **Introdução**

Avaliando a história de várias civilizações observa-se diversos relatos do uso de espécies vegetais com potencial terapêutico, que eram aplicadas no tratamento de várias patologias bem como nas prevenções primária, secundária e terciária (VIOLANTE, 2008). Esse uso pode ser justificado pela grande quantidade de compostos orgânicos e fito constituintes que as mesmas apresentam, os quais podem ter eficácia similar ou até mesmo superior aos compostos sintéticos utilizados na medicina tradicional (CECHINEL FILHO *et al.*, 2003). Por esse motivo, essa

alternativa terapêutica tem sido utilizada para o tratamento de várias doenças, podendo se destacar os processos infecciosos, o câncer e doenças cardiovasculares (CALIXTO, 2003).

Levando-se em consideração que o Brasil é um país com uma das maiores biodiversidades do mundo pela presença de diferentes biomas, como o cerrado, o pantanal, caatinga e a região amazônica e que essa biodiversidade vegetal pode originar fitoterápicos, fitofármacos e protótipos de novas drogas com importância econômica diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de caracterizar melhor esses espécimes vegetais e avaliar seu potencial biológico (CALIXTO, 2000; NEWMAN; CRAGG, 2007). Considerando a utilização popular dessa planta com finalidade medicinal esse projeto espera avaliar a viabilidade do uso popular e fornecer os primeiros indícios para o uso racional de plantas na terapêutica medicamentosa através da investigação da atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante do extrato aquoso e frações das folhas de *Gossypium hirsutum L.* em relação a sazonalidade, mediante o preparo de extratos aquosos da planta em estudo em duas épocas distintas do ano, sendo uma coleta na época da seca e outra na época chuvosa. Já a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato aquoso se darão através do método de difusão em ágar e o perfil antioxidante dos extratos serão avaliados pelos métodos DPPH e betacaroteno/ácido linoleico.

Outra vertente que demonstra a contribuição científica dessa proposta leva em consideração que o conhecimento a respeito das propriedades terapêuticas das plantas é um requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Sendo assim, pesquisa de plantas tem sido e continua sendo uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas. Logo, a ampliação da produção científica referente a plantas medicinais é de grande importância, pois desta forma poderá ser criada uma base científica para a produção e prescrição de drogas vegetais em que a eficácia e toxicidade possam ser previstas e posteriormente avaliadas, além da implantação de avaliações farmacológicas e metodologias de controle de qualidade das mesmas.

O material botânico as folhas de *G. hirsutum* foi coletado na cidade de Itapuranga-Go, situada na região centro-oeste do Brasil (IBGE,2010) em Outubro de 2015. Para a preparação do extrato da primeira coleta, as folhas secas foram separadas e maceradas para a preparação do extrato aquoso na véspera da realização do ensaio farmacológico e toxicológico de acordo com a metodologia de Dias e colaboradores (2000).

- Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica do pó das folhas será realizada para investigar a presença de classes de constituintes químicos naturais, tais como: taninos, alcalóides, flavonóides, esteróides, saponinas, mucilagem, cumarinas açúcares redutores, através de técnicas específicas descritas em publicações especializados (COSTA, 2001, MATOS, 1997).

- Teste de atividade antioxidante

O método DPPH consiste na captura do radical livre (2,2-difenil-1-picrilidrazila) DPPH por antioxidantes e produzindo um decréscimo da absorbância à 515nm (RUFINO et al., 2007).

Foi preparado em tubos de ensaio cinco diluições diferentes do extrato (20µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL e 100 µL) em triplicata. Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM). Utilizar 0,1 mL da solução controle (álcool metílico) com 3,9 mL do radical DPPH. Utilizar álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (517 nm) foram monitoradas em 12 min, onde é observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC50 só deve ser feita após a estabilização da absorbância (tempo EC50). O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

- Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *M. parviflora*, foram utilizados microrganismos padrão certificados de *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus*

*epidermidis*. A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando-se discos de papel filtro estéreis umedecidos com os extratos preparados da planta nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 6,25%. Discos comerciais (Labor®) de Vancomicina (30mcg) e Gentamicina (30mcg) foram utilizados como controles específicos para as cepas. O primeiro para bactérias gram-positivas e o segundo para gram-negativas. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

- Citotoxicidade em leucócitos humanos pelo método de exclusão do Azul de Tripiano

Este método avalia a citotoxicidade de produtos químicos por possibilitar verificar a integridade da membrana celular após exposição a produtos químicos (ALLISON & RIDHOLPHO, 1990). O percentual de inibição celular, na presença do extrato em estudo, foi calculado determinando o IC<sub>50</sub> através do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

- Citotoxicidade pelo Método de Redução do MTT

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazana. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado (MOSMANN, 1983).

Foram realizados três experimentos independentes e a determinação do IC<sub>50</sub>, será determinada com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

## Resultados e Discussão

O presente trabalho foi realizado através de um estudo minucioso que exigiu no decorrer do seu planejamento e desenvolvimento, muito tempo, análise e

reflexão para obter os resultados adquiridos para elaboração deste projeto. A *G. hirsutum* L., é uma planta que se encontra em várias regiões do Brasil, inclusive em Itapuranga-GO.

### Prospecção fitoquímica

A triagem padronizada para obtenção das classes de metabólicos secundários tiveram os seguintes resultados:

TABELA 1: TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR DAS FOLHAS DA *GOSSYPIUM HIRSUTUM* L.

#### Classes de compostos

<i>Compostos fenólicos</i>	--
<i>Cumarinas</i>	++
<i>Cardioativos</i>	++
<i>Saponinas</i>	--

FONTE: AUTOR.

Os heterosídeos saponinicos recebem essa denominação por sua característica de formar espuma abundante. Essa espuma produzida pelos vegetais está ligada a atividade antifúgica e antibacteriana por fazer parte do sistema de defesa contra predadores, além de conter atividade depurativa, emulsificante e detergente (LACAILLE-DUBOIS e WAGNER, 1996). A amostra de *Gossypium hirsutum* L. utilizada não apresentou esse grupo de metabólicos.

Segundo Fonsêca (2005) as cumarinas estão associadas a ação anticoagulante e antespasmódica, estando presentes em mais de 700 espécies de vegetais como por exemplo a *Anthoxanthum adorum* L., *Viburnum prunifolium* L. e *Gossypium hirsutum* L.

Caracterizados atuação específica e potente no músculo cardíaco, os heterosídeos cardioativos, também chamados de digitálicos, são indicados para profilaxia de insuficiência cardíaca. Esse grupo de metabólicos atua como tônico cardíaco, mas também podem ocasionar efeitos tóxicos (HOFMAN; BIGGER, 1991). A prospecção fitoquímica foi positiva na reação de Liebermann-Burchard, que procede da desidrogenação do núcleo esteroide e também foi positiva na reação de Keller-Kiliani, que é específica para desoxiaçúcares presentes na parte glicídica do

heterosídeo. Em contrapartida, a reação de Pesez foi negativa durante a observação sob a luz UV.

A presença de água em excesso em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microrganismos, insetos, hidrólise e atividade enzimática, que deterioram os constituintes da droga. Desta forma, o percentual de umidade ideal para a droga vegetal é de 8 a 14%. A análise do teor de umidade apresentada na amostra coletada em 2017 é de 7,39%.

O índice de intumescência foi de aproximadamente 3,3ml e a determinação de cinzas totais, que destina-se a estabelecer a quantidade de cinzas derivadas de tecido vegetal e de materiais estranhos, especialmente areia e terra, obteve o resultado de 12%.

Os resultados da prospecção granulométrica estão contidos na tabela a seguir:

TABELA 2: PESO FINAL DA DROGA VEGETAL OBSERVADO NO TESTE GRANULOMÉTRICO.

<i>Tamises</i>	<i>Peso final (g)</i>
<i>coletor</i>	0,96
125	2,33
180	3,02
250	6,69
355	5,35
710	1,83

FONTE: AUTOR.

### **Atividade antioxidante**

O extrato aquoso demonstrou ótimo poder antioxidante com IC50 9,2 µg/ml e é biocompatível em concentrações abaixo de 50%, demonstrando ter atividade antioxidante significativa por sua capacidade de capturar radicais livres. Esta característica pode ser capaz de proteger as células contra efeitos genotóxicos e cancerígenos, diminuir processos inflamatórios, atuar benéficamente como protetor, em caso de diálise e doenças hematológicas (GIADA; FILHO, 2006).

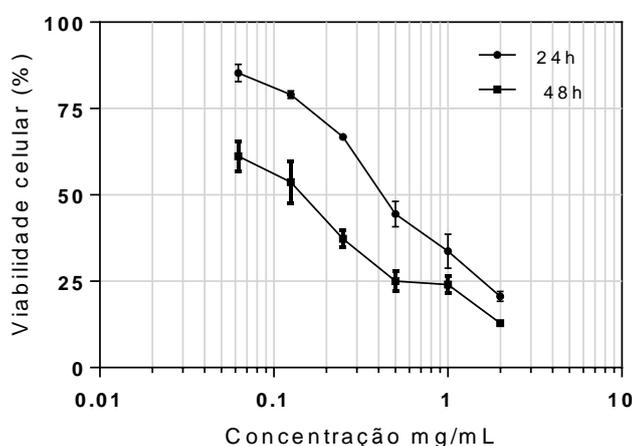
### Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes realizados para verificação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *G. hirsutum* L. não apresentaram inibição do crescimento das cepas testadas. Esse resultado pode ter ocorrido devido à baixa concentração de compostos antimicrobianos presentes nas folhas desta planta. A presença de compostos nas plantas depende de vários fatores como a época da coleta, o tipo de solo e a idade da planta. Outros fatores podem interferir na concentração do extrato como o tempo de maceração das plantas, o solvente utilizado entre outros.

### Análise da citotoxicidade pelo método de exclusão do Azul de Tripiano e MTT

O extrato apresentou atividade citotóxica concentração e tempo dependente em leucócitos humanos pelo método de exclusão do azul de tripiano ( $p < 0.05$ ) como demonstrado na figura 1. Após 24h de exposição foi observada alterações significativa da membrana celular em concentrações superiores a 0.125 mg/mL. Já após 48h de exposição observamos efeitos citotóxicos significativos em todas as concentrações testadas. O IC50 após 24h exposição dos leucócitos humanos ao extrato aquoso de foi de 0.4468 mg/mL e após exposição de 48h foi de 0.1751 mg/mL.

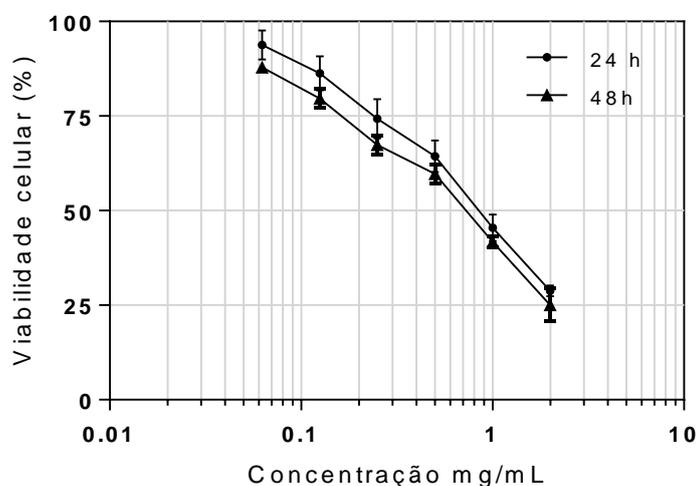
FIGURA 1 : EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *G. HIRSUTUM* EM LEUCÓCITOS HUMANOS ( $1 \times 10^6$  CÉLULAS/ ML) APÓS 24 E 48H DE EXPOSIÇÃO UTILIZANDO O MÉTODO DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPIANO (N=3).



FONTE: AUTOR.

Avaliando a citotoxicidade do extrato aquoso pelo método de redução do MTT (figura 2) somente foi observada atividade citotóxica significativa em leucócitos humanos ( $p < 0.05$ ) em altas concentrações de extrato, tanto no tempo de 24h quanto no tempo de 48h, o que pode ser observado pelos valores estimados de IC50: 0.8641 mg/mL e 0, 8505 mg/mL para 24 e 48h respectivamente.

FIGURA 2: EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *G. HIRSUTUM* EM LEUCÓCITOS HUMANOS ( $1 \times 10^6$  CÉLULAS/ ML) APÓS 24 E 48H DE EXPOSIÇÃO UTILIZANDO O MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT (N=3).



FONTE: AUTOR.

### Considerações Finais

Este trabalho apresenta uma contribuição científica significativa, visto que a espécie *Gossypium hirsutum* L. de algodão tem valor comercial e é amplamente utilizada como planta medicinal. Mais testes laboratoriais se fazem necessários, como a prospecção fitoquímica completa do extrato aquoso e etanólico, assim como a identificação de compostos presentes no óleo essencial e a análise do solo onde as amostras foram coletadas.

### Agradecimentos

## Referências

ANDRIGUETO, J. R, SILVA WETZEL, M.M.V. MAURY, C.M.R.F, FERNANDES, R.C, CORREIA, C.R.M.A. **Guia do observador de árvores no cerrado**. Edifício Finatec, bloco “H” - Campus UnB, Brasília p. 11 e 12, 2011.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

CECHINEL, Filho. V. De. Campos, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas. f 230–241. **Uma revisão da literatura**. *Quimica Nova*. SP, 2003.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed . Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, v. 3, 2001.

DIAS, C. R. *et al*. **Efeitos de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne Incognita***. f 203-210. *Nematologia Brasileira*. Viçosa, 2000.

FONSÊCA, S. G. C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Departamento de Farmácia/UFC, 2005.

GIADA, M. L. R.; FILHO, J. M. **Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana**. *UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, Ponta Grossa, 12 (4): 7-15, dez. 2006.

HOFMAN, B. F./ BIGGER, J. T. **Digital e glicosídeos cardíacos**. In: GILMAN, A. G. *et al*. Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 536-552, 1991.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, v. 2, n.4, p. 363-386, 1996.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years**. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

**VIOLANTE, I. M. P. Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste. p. 1–72, 2008.**