

Análises antimicrobiana, toxicológica e fitoquímica do extrato das folhas e caule da
***Argemone mexicana* L.**

SILVA, I.C.L.^{1*}; SILVA, M.J.T.¹; NEVES, S.T.O.¹; CABRAL, A.G.S¹

¹*Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico - Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), 1119 - Avenida Portugal, Caruaru – PE/Brasil, CEP: 55016 - 400.*

**Autor para correspondência: italoaio_17@hotmail.com*

RESUMO: *Argemone mexicana* L., conhecida popularmente como cardo-santo, é uma planta medicinal, originária do México e naturalizada no Brasil, usada de forma caseira em todo o mundo contra diversas doenças, mas principalmente para doenças de pele tais como feridas, infecções de pele, coceira e lepra. Objetivou-se avaliar a presença de alcalóides, a atividade antimicrobiana e toxicidade do extrato das folhas e caule do cardo-santo. O método de extração ocorreu por maceração da droga vegetal em álcool absoluto por sete dias seguido de filtração e rotaevaporação do líquido extrator, com retirada máxima de humidade em dessecador. O ensaio toxicológico foi realizado pela determinação da CL₅₀, pelo método de *Artemia salina*, e avaliação da capacidade hemolítica pelo método de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE). O ensaio microbiológico foi realizado com cepas, de bactérias e um fungo, causadoras de doenças infecciosas de pele, pelo método de poço-difusão em ágar. A análise fitoquímica ocorreu pelo teste qualitativo para alcalóides utilizando os reagentes de Meyer e Bouchardat. Os resultados obtidos demonstram que o extrato do cardo-santo, nas condições apresentadas, é atóxico para ambos os ensaios toxicológicos, mas também não apresentou atividade antimicrobiana nem presença significativa de alcalóides, divergindo

de resultados obtidos por outros pesquisadores, mostrando a baixa ou ausência dos metabólitos secundários necessários para tal ação. Pode-se concluir que existem fatores que influenciam na produção dos metabólitos secundários das plantas, podendo lhe conferir ou não atividade farmacológica ou toxicológica, sendo sugeridos ensaios com o extrato da planta cultivada em condições controladas para a confirmação.

Palavras chaves: *Argemone mexicana*, Teste de Toxicidade, Doença de Pele, Compostos Fitoquímicos, Análise Microbiológica.

ABSTRACT: *Argemone mexicana* L., popularly known as cardo-santo, is a medicinal plant, originally from Mexico and naturalized in Brazil, used in a homemade way around the world against various diseases, but mainly for skin diseases such as wounds, skin infections, itching and leprosy. The objective of this study was to evaluate the presence of alkaloids, antimicrobial activity and toxicity of the leaves and stem extract of the cardo-santo. The extraction method was by maceration of the vegetal drug in absolute alcohol for seven days followed by filtration and rotavapor of the extractor liquid, with maximum removal of moisture in a desiccator. The toxicological test was carried out by determination of the LC₅₀ by the *Artemia salina* method and evaluation of hemolytic capacity by the Erythrocyte Osmotic Fragility (EOF) method. The microbiological assay was performed with strains of bacteria and a fungus, causing infectious skin diseases, by the well-diffusion method in agar. The phytochemical analysis was performed by the qualitative test for alkaloids using the Meyer and Bouchardat reagents. The results obtained demonstrate that the extract of the cardo-santo, under the presented conditions, is atoxic for both toxicological tests, but also did not present antimicrobial activity nor a significant presence of alkaloids, diverging from results obtained by other researchers, showing the low or absence of secondary metabolites necessary for such action. It can be

concluded that there are factors that influence the production of the secondary metabolites of the plants, which may or may not confer pharmacological or toxicological activity, and trials with the extract of the cultivated plant under controlled conditions for confirmation are suggested.

Keywords: *Argemone mexicana*, Toxicity Tests, Skin Diseases, Phytochemicals, Microbiological Analysis.

INTRODUÇÃO

A caatinga é uma região semiárida, exclusive do nordeste brasileiro, sendo um bioma com grande biodiversidade, principalmente destacado por sua vegetação contendo uma variedade de plantas, principalmente as espinhosas, muitas delas apresentando potencial medicinal, pelo qual são utilizadas pela população local com essa finalidade (Albuquerque & Andrade, 2002; Silva et al., 2004; Albuquerque et al., 2007; Cartaxo et al., 2010)

As plantas medicinais são material de estudo, pela indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de novas drogas à partir de seus princípios ativos, mas também são muito utilizadas de forma caseira (Tiwari & Joshi, 1990).

Uma das plantas medicinais presentes no bioma caatinga, utilizada de forma caseira pela população é a *Argemone mexicana* L., planta de porte herbáceo, medindo cerca de 1 m de altura, ereto espinhosa, de caráter anual, exsuda um látex amarelo, quando suas partes são feridas, usado no Paraguai como sucedâneo do ópio. Originária do México, comum em todos os lugares ao longo das estradas e campos das índias ocidentais, naturalizada em países tropicais e subtropicais, considerada como erva daninha grave da Austrália, e países da América Latina, África e Ásia, apresentando comportamento competitivo em solo cultivado ou não (Bhardwaj et al., 1982; Ubreti et al.,

1989; Lorenzi & Matos, 2002; Karlsson, 2003; Babu et al., 2008; Brahmachari et al., 2013, Grandi, 2014).

Possui folhas alternas, lobadas, sésseis, sinuosas, semiamplexicaules, peninérveas, medindo habitualmente de 5 a 11 cm de comprimento, glauca, variegada (verde e branco), largas na base, haste proeminente e espinhoso, inflorescência solitária, terminal ou axial, flores grandes e muito vistosas, de 4 a 5 cm de diâmetro, terminais, andróginas, trímeras, com pétalas de cor amarela-brilhante e sem cheiro, seu fruto é uma cápsula angulosa fortemente aculeada, de formato elíptico-oblonga ou obovate, mede cerca de 3 cm de comprimento, de cor verde quando nova e pardacenta quando maduras, abrindo-se em 5 fendas longitudinais liberando do seu interior numerosas sementes oleaginosas esféricas brilhantes de coloração preta e sem caroço, rugosas, pequenas e escavadas semelhante às sementes de mostarda preta (Ureti et al., 1989; Lorenzi & Matos, 2002; Brahmachari et al., 2013; Grandi, 2014).

Popularmente é conhecida, no Brasil, como cardo-santo e tem por sinonímia científica *Argemone leiocarpa* Greene, *Argemone mexicana* var. *leiocarpa* (Greene) G. B. Ownbey, *Argemone mexicana* var. *lutea* Kuntze, *Argemone spinosa* Moench., *Argemone versicolor* Salisb., *Argemone vulgares* Spach e *Argemone achoroloeuca* Sweet (Grandi, 2014).

Utilizada na medicina popular de todo o mundo contra diversos males, como calmante, tratamento de afecções das vias respiratórias, febre, pneumonia, enxaqueca, dor de cabeça, asma, inflamações, malária, hidropsia, icterícia, tumores, reumatismo, atua como expectorante, antihelmintico, sedativo, afrodisíaco, antídoto para picada de cobra, antiespasmódica, analgésica, mas é usada principalmente para doenças de pele, tais como verrugas, feridas, infecções de pele, coceira e lepra (Willcox et al., 2007; Bhattachaerjee et al., 2010; Sahu et al., 2012; Arokiyaraj et al., 2013; Brahmachari et al., 2013; Grandi, 2014; Asuntha et al., 2014).

Os compostos isolados da planta, até recentemente, pertencem à classe dos terpenóides, flavonóides, compostos alifáticos de cadeia longa e compostos aromáticos, mas sua maioria pertence à classe dos alcalóides, pela qual, tais componentes isolados são isocoridina, berberina, deidrocheilanthifolina, deidrocoridalmina, jatrorrizina, columbamina, coptisina, (+)-reticulina, protopina, allocriptopina, criptopina, muramina, argemexicina A, argemexicina B, protomexicina, 13-oxoprotopina, (-)-cheilantifolina, (+)-cheilantifolina, (-)-scoulerina, (-)-stilopina, nor-sanguinarina, cheleritrina, sanguinarina, oxi-hidrastinina, talifolina, argemexirina, (+)-argenaxina, (+)-higenamina, (±)-tetraidrocoptisina, (-)-tetraidroberberina, di-hidrocoptisina, oxiberberina, *N*-demetiloxisanguinarina, pancorina, *O*-metilzantoxilina, nor-chelerithrina, arnottianamida, (±)-6-acetonil, di-hidrocheleritrina, di-hidrosanguinarina, angolina, 8-acetildihidrosanguinarina, 8-metoxidihidrosanguinarina, hidróxido de dihidropalmatina e (-)-argemonina (Brahmachari et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade do extrato do cardo-santo, bem como a análise qualitativa dos metabólitos secundários, já que se trata de uma planta muito utilizada pela população em geral para várias finalidades medicinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Um exemplar da espécie foi coletado e encaminhado ao Herbário IPA – Dárdano De Andrade Lima para a produção da exsicata, pelo qual foi identificada como *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) e foi registrada, com o Nº 91173. Após identificação foram coletados os exemplares da espécie em sua fase adulta no sítio Malhada de Pedra, zona rural de Caruaru – PE, em quantidade suficiente para obtenção de extrato hidroalcoólico de suas folhas e caule.

Preparação do Extrato

Para a obtenção do extrato bruto seco da *Argemone mexicana* L. as folhas e caules frescos, após a limpeza, foram deixado por um dia secando à temperatura ambiente e levadas, para finalização da secagem, à estufa de fluxo de ar contínuo (45-48 °C). Foi obtido 252,77 g do material vegetal seco, a qual foi reduzido à pó em moinho industrial, posteriormente submetido à maceração em solução extrativa hidroalcoólica 95% v/v por sete dias. A solução extrativa foi filtrada e armazenada em frasco de vidro âmbar. O filtrado resultante foi rotaevaporado à 60 °C, em evaporador rotativo, até a evaporação total do solvente. O concentrado foi seco em estufa por 24h a 50 °C obtendo-se, por fim, o extrato bruto seco do material vegetal.

Micro-organismos Utilizados

Foram testadas cepas das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (selvagem), das Gram-negativas *Escherichia coli* (selvagem), *Klebsiella pneumoniae* (selvagem), *Pseudomonas aeruginosa* (selvagem) e do fungo leveduriforme *Candida albicans* (selvagem). Todas as cepas selvagens e ATCC fazem parte do banco do laboratório de microbiologia do Grupo de Pesquisa em Fitoterapia (GPFITO) do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita).

Preparo dos Inóculos

Os inóculos foram preparados tomando-se de três a quatro colônias das cepas isoladas em ágar Müller-Hinton e diluídos em solução salina a 0,9% até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Realizou-se através da técnica de poços, pelo qual os micro-organismos anteriormente referidos, foram inoculados em solução salina. A escala 0,5 Marc-Farland foi utilizada para controle das concentrações das cepas bacterianas testadas que, em seguida, com auxílio do swab, foram semeadas por toda extensão da placa de Petri

contendo Ágar Müeller- Hinton. Em cada placa semeada foram feitos quatro poços de 6 mm de diâmetro, inserindo 50µL de extrato bruto seco em diferentes concentrações, a partir de diluições em 50%, 25%, 12,50% e 6,25% com relação à amostra inicial do extrato bruto seco obtido, realizando-se o procedimento em duplicata. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior mensuração dos halos em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Koneman et al., 2008).

Avaliação Toxicológica (CL₅₀)

O teste para a determinação da CL₅₀ seguiu o método descrito por Meyer et al. (1982). Os ovos de *A. salina* Leach foram incubados em solução marinha em um recipiente de plástico, mantido sob iluminação artificial (lâmpada de 40 W) à temperatura constante de 28°C, por um período de 48 horas que, após este procedimento, se obteve o estágio de metanúplio, modelo padrão para testes de toxicidade devido a sua maior sensibilidade.

Foram utilizados 50 mg do extrato bruto seco da *Argemone mexicana* L. solubilizado com 1 mL de Tween 80 a 5% para formação de solução que foi, posteriormente, homogeneizada e o volume completado para 5mL com água salinizada a pH = 8,0. Desta solução foi retirada alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25µL e transferidas para tubos de ensaio e completados com solução salina, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50µg/mL para cada extrato. O teste realizado em triplicata teve suas amostras submetidas à iluminação artificial durante 24 horas e, após esse período, realizada contagem do número de larvas vivas e mortas e os dados tabulados utilizando o programa MicrocalOrigin 4.1.

Avaliação Toxicológica - FOE (Fragilidade Osmótica Eritrocitária)

O teste de fragilidade osmótica de eritrócito tem por objetivo mensurar a resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, frente a extratos de plantas da caatinga (Rodrigues, 2009; Sant'ana, 2001). O teste foi baseado na técnica descrita por Darcie & Lewis, em

1975, onde o sangue de carneiro foi mantido sobre refrigeração e recipiente com esferas, para evitar coagulação.

Foram utilizados 50mg do extrato bruto seco da *Argemone mexicana* L., diluída com soro fisiológico 0,9 %, homogeneizada e o volume completado para 5mL com soro fisiológico 0,9%. Dessas soluções retirou-se alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25µL que foram transferidos para tubos de e completados para 5mL com soro fisiológico 0,9%, obtendo-se as concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50µg/mL para cada extrato e adicionou-se em todos os tubos 25µL de sangue de carneiro. As amostras foram submetidas à centrifugação 3300G durante 15min em temperatura ambiente, após o processo a absorvância do sobrenadante de cada tubo foi mensurada em espectrofotômetro Bioplus 545nm. A obtenção da curva do percentual de fragilidade osmótica baseou-se no valor de absorvância da hemoglobina do sobrenadante multiplicado pelo percentual total e dividido pelo valor de absorvância médio da hemólise completa dos eritrócitos

Preparação dos Reagentes para Identificação de Alcaloides

Reagente de Meyer

Preperou-se uma solução de 1,36 g de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) em 60 mL de água destilada. Em seguida preparou-se uma solução de 5 g de Iodeto de Potássio (KI) em 10 mL de água destilada. Misturou-se as duas soluções, tranferiu-a para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume (Bessa et al., 2007).

Reagente de Bouchardat

Dissolveu-se, em um Becker, 1,27 g de iodo (I) e 2 g de Iodeto de Potássio (KI) em 5 mL de água destilada. Trasferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume (Bessa et al., 2007).

Teste Qualitativo Para Alcalóides

Foi duliudo uma porção do extrato bruto da *Argemone mexicana* L. em metanol. O

diluído foi filtrado, em papel filtro, e em quatro tubos de ensaio foi colocado cerca de 2 mL do diluído. O ensaio foi feito em duplicata onde dois tubos se destinaram ao ensaio com o reagente de Meyer e dois para o reagente de Bouchardat. Foi adicionado gotas do reagente de Meyer nos dois primeiros tubos e do reagente de Bouchardat nos outros dois tubos. A reação se dá pela formação de precipitado esbranquiçado e amarelado para cada reagente respectivamente, quando se tem uma reação positiva (Bessa et al., 2007; Simões et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Antimicrobiana

Os resultados obtidos com os testes microbiológicos, apresentados na *Tabela 1*, mostram que o extrato, mesmo em concentrações mais altas, não apresenta ação antimicrobiana para nenhuma das cepas testadas. Isso difere dos resultados obtidos em vários trabalhos realizados envolvendo o extrato das folhas e caule da planta, em diferentes tipos de líquidos extratores, demonstrando atividade antimicrobiana significativa em vários micro-organismos.

TABELA 1. Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto seco do cardo-santo, em diferentes concentrações, frente às cepas de micro-organismos.

.Cepas Testadas	Diferentes Concentrações do Extrato e Formação de Halo Inibitório			
	50%	25%	12,5%	6,25%
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	-

-: ausência de ação antimicrobiana

Rahman et al. (2011), prepararam um extrato único de caule e folhas em acetona, etil acetona e éter de petróleo, separadamente, com o objetivo de determinar a MIC de cada extrato em cepas de *Escherichia coli*, *Shygella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Salmonella* sp. O extrato obtido por acetona não exerceu ação antimicrobiana. O extrato obtido por

etil acetato teve um MIC de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, com halo de inibição de 8 mm para *Staphylococcus* sp., 9 mm para *E. coli* e 10 mm para *Salmonella* sp. O extrato obtido por éter de petróleo com o mesmo MIC anterior, com halo de inibição de 10 mm para *Salmonella* sp., 12 mm para *Shyggella* sp., 15 mm para *E. coli* e 16 mm para *Staphylococcus* sp. O autor, e sua equipe, concluiu que os diferentes extratos da *Argemone mexicana* L. apresentaram significativa atividade antimicrobiana atribuída, provavelmente, aos alcaloides (principalmente berberina), compostos fenólicos e ácidos graxos, compostos bioativos da planta, e sugeriu o estudos para a preparação de formas farmacêuticas utilizando esse extrato.

O extrato etanólico das folhas da *Argemone mexicana* L. preparado por Rosas-piñón et al., 2012, foi testado em *Streptococcus mutans* e *Phorphyromonas gengivalis*, apresentando uma MIC de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Sahu et al. (2012), prepararam extratos das folhas da *Argemone mexicana* L. em acetona, metanol e etanol para determinar atividade antimicrobiana em 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes, além de que determinaram as classes de metabólitos secundários em cada extrato testado. O resultado foi MIC de 10 mg/mL para o extrato por acetona, com halo de inibição variando entre 10,0 a 13,0 mm, 8 mg/mL para o extrato etanólico, com halo de inibição variando entre 12,0 a 14,0 mm e 8mg/mL para o extrato metanólico, com halo de inibição de 16,5 a 19,0 mm. Os metabólitos secundários encontrados foram flavonóides, saponinas, taninos, esteroides/terpenos, alcalóides e glicosídeos no extrato de acetona; açúcares redutores, flavonoides, taninos, esteroides/terpenos, alcalóides e glicosídeos no extrato etanólico; e antraquinonas, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides/terpenos, alcalóides e glicosídeos no extrato metanólico.

Extratos preparados separadamente das folhas, caule e raízes, em água, acetona, metanol e clorofórmio, testados em *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e

Staphylococcus aureus, na concentração mínima de 5 mg/mL, todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas, porém as partes da planta com potencial significativo foram o caule e as folhas. O extrato etanólico e com acetona do caule apresentaram o maior potencial inibitório para *Klebsiella pneumoniae*, com halo inibitório de 22,86 mm e 17,35 mm respectivamente. Já o extrato etanólico das folhas apresentou o maior potencial inibitório para *Staphylococcus aureus*, com halo inibitório de 19,12 mm. Os autores sugerem a produção de produtos naturais e descobertas de agentes antimicrobianos a base da planta (Alagesaboopathi & Kalaiselvi, 2012).

Doss et al. (2012), prepararam extrato metanólico das folhas da *Argemone mexicana* L. e testaram sua atividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus* sp. e *Klebsiella pneumoniae*. A MIC de 100 mg/mL apresentou um halo inibitório de 10 mm para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. Já o MIC de 200 mg/mL apresentou halo inibitório de 10 mm para *E. coli*, 12 mm para *Streptococcus* sp. e *Klebsiella pneumoniae*, e 15 mm para *Staphylococcus aureus*. O extrato metanólico da *Argemone mexicana* L., também apresentou eficácia para vários tipos de fungos e tal ação foi atribuída aos alcaloides deidrocoridalmina e oxiberberina (Singh et al., 2009).

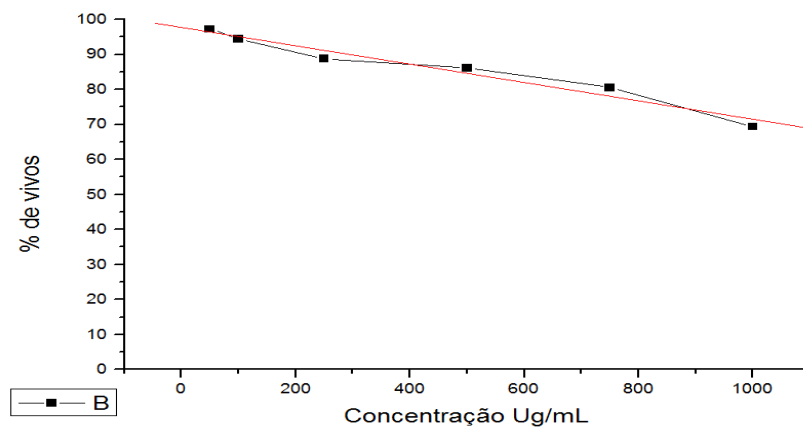
As mais diversas atividades antimicrobianas, e o potencial dessa ação, estão atribuídos aos extratos das folhas e caule da planta extraídos com solventes apolares (clorofórmio e éter de petróleo) ou polares (etanol, metanol, etil acetato), assim como o extrator utilizado nesse trabalho (etanol). O extrato com solvente de alta polaridade (acetona) apresentou o menor potencial, ou nenhum potencial antimicrobiano.

Avaliação Toxicológica (CL₅₀)

No ensaio *in vitro* para determinar a concentração letal que mata 50% da população de microcrustáceos da espécie *Artemia salina*, os resultados apresentaram-se proporcionais, pois à medida que a concentração do extrato foi aumentando, o número de

indivíduos mortos também aumentou. No gráfico, mostra-se o eixo X representando a concentração do extrato da *Argemone mexicana* L. em diferentes concentrações ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e o eixo Y representando o percentual de micro-organismos vivos. A reta linear indica que quanto maior a concentração do extrato, maior será a quantidade de indivíduos mortos (Gráfico 1).

GRÁFICO 1: Relação de organismos vivos em diferentes concentrações do extrato da *Argemone mexicana* L. representando sua CL_{50} .



A contagem de microcrustáceos mortos, representado pela linha B do *Gráfico 1*, apresentou-se proporcional ao aumento das concentrações testadas, semelhante à reta linear controle, mantendo-se constante e proporcional.

A amostra apresentou CL_{50} de 1820,8875 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou seja, a essa concentração houve a morte de 50% dos microcrustáceos. De acordo com a escala de toxicidade, proposta por Meyer et al. (1982), concentrações acima de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ atribui característica atóxica ao extrato e que, abaixo dessa concentração, quanto mais próxima de zero for a concentração letal, mais tóxico é o extrato. De acordo com esses parâmetros, já estabelecidos da técnica, o valor de 1820,8875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato lhe confere característica praticamente atóxica.

Avaliação Toxicológica - FOE (Fragilidade Osmótica Eritrocitária)

A determinação da Fragilidade Osmótica Eritrocitária se dá pela avaliação da concentração, de extrato bruto seco, necessária para que ocorra hemólise. O Eritrócito

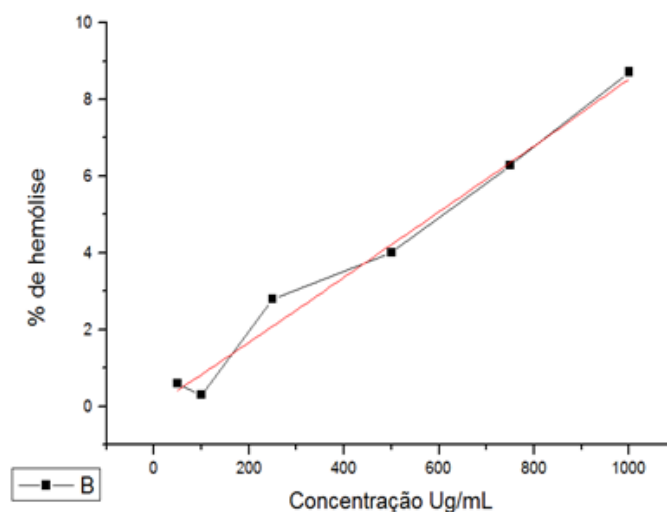
tem a função de transportar oxigênio, dióxido de carbono e íons de hidrogênio para os tecidos através de uma estrutura proteica intracelular denominada de hemoglobina e esse transporte ocorre através da corrente sanguínea. A exposição das hemácias a um meio de concentração diferente poderá provocar a ruptura celular. A *Tabela 2*, apresenta as diferentes concentrações dos extratos pelo qual a absorvância de cada um foi medida por espectrofotometria, obtendo-se o percentual do grau de hemólise em cada uma das concentrações.

TABELA 2. Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto seco do cardo-santo, em diferentes concentrações, frente às cepas de micro-organismos.

Concentrações	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância Média	Percentual de Hemólise
1000 µm	0,125	0,105	0,115	8,71%
750 µm	0,079	0,088	0,083	6,28%
500 µm	0,063	0,044	0,053	4,01%
250 µm	0,028	0,047	0,037	2,80%
100 µm	0,001	0,007	0,004	0,30%
50 µm	0,003	0,013	0,008	0,60%

Os dados da *Tabela 2* foram transformados graficamente, como mostra o *Gráfico 2*, onde é possível notar que o percentual de hemólise sofrido é diretamente proporcional ao aumento da concentração, atingindo a faixa de 8,71% com a maior concentração (1000 µg/mL).

GRÁFICO 2. Percentual de hemólise causada pelo extrato da *Argemone mexicana* L em diferentes concentrações.



A reta linear, gerada com o pequeno desvio padrão, demonstra a proporcionalidade

entre a relação das concentrações do extrato do Cardo-santo pelo percentual de hemólise. O percentual de hemólise é determinado pelo grau de hemólise gerada pela solução de cloreto de sódio à 0,9%, utilizada como padrão mediante seu uso hospitalar intravenoso, determinados por Darcie & Lewis (1975), como mostra a *Tabela 3*.

TABELA 3. Padrão comparativo para Fragilidade Osmótica Eritrocitária, determinada por Darcie & Lewis (1975).

	Tipo/Grau de hemólise				
	Mínima Hemólise	Moderada Hemólise	Considerável Hemólise	Alta Hemólise	Hemólise Muito Alta
Percentual de Hemólise	Até 10%	10-25%	25-45%	45-75%	75-100%

Comparados os valores da *Tabela 2* e da *Tabela 3* podemos verificar que o extrato das folhas e caule do cardo-santo apresentou, neste presente trabalho, mínima hemólise, mesmo na maior concentração de 1000 µg/mL.

As análises toxicológicas, tanto CL₅₀ quanto FOE, caracterizam o extrato da *Argemone mexicana* L. com um potencial que varia de mínima toxicidade à atóxica, diferindo também de testes toxicológicos realizados por outros autores.

Apesar da maioria dos estudos sobre o potencial toxicológico da *Argemone mexicana* L. estar mais relacionados aos componentes do extrato de suas sementes, alguns estudos relatam sua toxicidade, nas diferentes partes da planta. Um estudo realizado por Ibrahim & Ibrahim (2009), avaliou a concentração letal em 50 % dos indivíduos (DL₅₀) do extrato das folhas da *Argemone mexicana* L. em camundongos, com idade entre 4-6 semanas e pesando 18-25 g. O resultado foi uma DL₅₀ de 400mg/Kg, sendo administrado por via intraperitoneal, caracterizando como uma toxicidade aguda. Chang et al. (2003), realizaram um estudo para determinar quais os compostos responsáveis pelo potencial citotóxico da planta e determinaram que os alcaloides *N*-demeiloxisanguinarina, pancorina, (+)-argenaxina, (+)-higenamina, (+)-reticulina (presente nas partes aéreas da planta), angolina e chelerythrina (presentes em todas as partes da planta) possuem esse potencial.

Teste Qualitativo Para Alcalóides

O teste qualitativo de alcaloides, utilizando o reagente de Meyer (iodo mercurato de potássio) e Bouchardat (iodo-iodeto de potássio), demonstra a presença de alcaloides, porém com mínima reação de precipitação (Tabela 4). Com isso pode-se inferir que a quantidade de alcaloides presente nesse extrato é mínima. Como a concentração de alcaloides é baixa e não houve resultado satisfatório da ação do extrato sobre as cepas nas análises microbiológicas, subentende-se que os alcaloides específicos com tal ação farmacológica se encontram em quantidades abaixo das satisfatórias.

TABELA 4: Resultados para reação de análise qualitativa de alcaloides.

Reagentes Utilizados	Intensidade da Reação de Precipitação
Meyer	+
Bouchardat	+

+: baixa reação; ++: média reação; +++: alta reação; -: ausência de reação

Fatores de influenciam a produção dos metabólitos secundários das plantas:

Existem vários fatores que podem influenciar na produção dos metabólitos secundários de uma planta. Gobbo-neto & Lopes (2007), relataram com bastante clareza que as condições ambientais que circundam a planta, afetam diretamente na produção de seus metabólitos secundários. Eles determinam sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos e ou ataque de patógenos, como sendo os tais fatores influentes, atuando sempre em conjunto, um ou mais desses fatores, para uma modificação metabólica da planta.

Simões et al. (2007), citam que a matéria prima vegetal pode ser obtida por cultivo, propriamente dito, ou por extrativismo, retirando o produto diretamente do seu ambiente natural. As plantas obtidas por extrativismo, por ser uma coleta aleatória, podem apresentar variações na produção de seus metabólitos secundários, seja por uma questão de variabilidade genética, seja por condicionantes ambientais do seu local de

origem. O cultivo propriamente dito é uma forma de padronização do material vegetal, com a finalidade de diminuição de erros relacionados. Além disso, falam que certas substâncias podem ocorrer em quantidades não detectáveis em função de condições edáficas e climáticas e, como os compostos apresentam uma função ecológica, verificam-se variações de acordo com o período vegetativo da planta.

A *Argemone mexicana* L. é considerada como erva daninha grave da Austrália, e países da América Latina, África e Ásia, apresentando comportamento competitivo em solo cultivado ou não (Bhardwaj et al., 1982; Ubreti et al., 1989; Lorenzi & Matos, 2002; Karlsson, 2003; Babu, et al., 2008; Brahmachari et al., 2013, Grandi, 2014). A planta utilizada nasceu espontaneamente (comportamento daninho) em meio à uma plantação de sorgo, plantado como experimento do Instituto de Agrônomo de Pernambuco (IPA), da estação experimental José Nilson de Melo. Simões et al. (2007), também ressaltam que o local de cultivo deve ser isolado de aplicação de adubos químicos e agrotóxicos. Nas plantações dos experimentos geralmente são aplicados aditivos como sulfato de amônio. Em solo de pH ácido, o amônio tem sua conversão em nitratos diminuída, podendo haver a inibição de incorporação de nitrogênio, tendo como consequência a diminuição da produção de compostos nitrogenados pela planta, tais como os alcaloides e taninos (Gobbo-neto & Lopes, 2007).

Como mencionado, a altitude é outro fator que influi na produção nos metabólitos secundários. Alguns dos estudos realizados para a determinação da atividade antimicrobiana, citados nesse trabalho, mencionam a localidade pelo qual foi coletada a droga vegetal. Foi realizada uma pesquisa dessas localidades para o conhecimento de suas altitudes, utilizando a ferramenta livre da internet “Google Maps”. Os resultados foram: Varanasi District, Uttar Pradesh, Índia, 81 m (Singh et al., 2009); Kushtia District, Khulna, Bangladesh, Índia, 18 m (Rahman et al., 2011); Altiplano, Tijuana, México, 173 m (Rosas-pinon et al., 2012); Coimbatore, Tamil Nadu, Índia, 432 m (Doss et al., 2012). O

local de coleta do material vegetal deste trabalho foi no IPA, Malhada de Pedra, zona rural de Caruaru – PE, e possui uma altitude de 690 m, relativamente elevado comparado às outras localidades. O aumento da altitude promoveu a diminuição na produção dos alcaloides e dos diterpenos da *Aconitum napellus* e piperidínicos de *Lobelia inflata* e no óleo essencial de tomilho e hortelã pimenta (Gobbo-neto & Norberto, 2007), mostrando que pode ter ocorrido a diminuição dos alcaloides da *Argemone mexinaca* L utilizada nesse estudo devido a altitude da localidade em que foi extraída.

Tanto os resultados dos testes microbiológicos quanto os toxicológicos e fitoquímicos deste trabalho, diferem claramente dos resultados obtidos por outros autores, porém são justificados mediante os fatores apontados como influenciadores da produção dos metabólitos secundários do cardo-santo, tendo em vista que os metabólitos secundários estão relacionados as atividades farmacológicas e toxicológicas.

CONCLUSÃO

O cardo-santo, sob as condições apresentadas nesse trabalho, pode ser utilizado de forma medicinal pela população sem que haja o risco de intoxicação, já que não apresenta potencial tóxico. No entanto, assim como não apresentou toxicidade, também não apresentou atividade antimicrobiana, sendo seu uso inválido para essa finalidade. Esse fato não exclui a possibilidade de apresentar outras ações farmacológicas pelo qual é utilizada de forma caseira, como agente anestésico e antiinflamatório por exemplo. Sugere-se novos estudos do extrato do cardo-santo cultivado de forma controlada com temperatura, irrigação, pH e nutrição do solo, entre outros, criando um ambiente mais parecido possível com o de sua localidade de origem (México e Egito), para que se possa ter certeza de que tais fatores são os influenciadores de na produção de seus metabólitos secundários e conseqüentemente nas ações farmacológicas e toxicológicas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U.P. & ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e

conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Acta Botanica Brasilica. v.16, n.3, p.273-285, 2002.

ALGESABOOPATHI, C. & KALAISELVI, N. Antimicrobial activities of the root and leaf extracts of *Argemone mexicana* L. **International Journal of Biosciences.** v.2, n.5, p.61-68, 2012.

AROKIYARAJ, S. et al., Enhanced antibacterial activity of iron oxide magnetic nanoparticles treated with *Argemone mexicana* L. leaf extract: An in vitro study. **Materials Research Bulletin.** v.48, p.3323-3327, 2013.

ASUNTHA, G. et al., Pharmacological profiling of *Argemone mexicana* for its aphrodisiac potentials in male Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Reproduction.** v.3, n.2, p.110-115, 2014.

BESSA, T. TERRONES, M.G.H. & SANTOS, D.Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **HORIZONTE CIENTÍFICO.** v.1, n.1, p.1-17, 2007.

BHARDWAJ, D.K. et al., PHENOLICS FROM THE SEEDS OF *ARGEMONE MEXICANA*. **Pergamo.** v.21, n.8, p.2154-2156, 1982.

BHATTACHARJEE, I. et al., Isolation and identification of antibacterial components in seed extracts of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.** P.547-551, 2010.

BRAHMACHARI, G. et al., *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.22, n.3, p.559-575, 2013.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology.** v.131, p.326-342, 2010.

CHANG, Y. C. et al. Cytotoxic benzophenanthridine and benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. **Zeitschrift für Naturforschung.** p.521-526, 2003.

- DACIE J.V. & LEWIS S.M. **Practical Hematology**. 5. ed. Churchill Livingstone: London. 1975. 629p.
- DOSS, A. et al. IN-VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CERTAIN WILD MEDICINAL PLANTS AGAINST BOVINE MASTITIS ISOLATED CONTAGIOUS PATHOGENS. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v.5, n.2, p.92-93, 2012.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**. v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- GRANDI, T.S.M. **TRATADO DAS PLANTAS MEDICINAIS: MINEIRAS, NATIVAS E CULTIVADAS**. 1 ed. Belo Horizonte: Adaequation Estúdio, 2014. 1204p.
- IBRAHIM, H.A. & IBRAHIM, H. Phytochemical screening and toxicity evaluation on the leaves of *Argemone mexicana* Linn. (Papaveraceae). **International Journal of Applied Sciences**. v.3, p.39-43, 2009.
- KARLSSON, L.M. et al., Seed dormancy pattern of the annuals *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Papaveraceae). **Flora**. v.198, p.329-339, 2003.
- KONEMAN, E. W., et al. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: NATIVAS E EXÓTICAS**. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 544p.
- MEYER, B.N.; et al. Brineshrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, [s.n.], p. 31, 1982.
- RAHMAN, S. et al. Antibacterial Activity of *Argemone mexicana* L. against Water Borne Microbes. **JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH**. v.5, n.5, p.621-626, 2011.
- RODRIGUES, H.G.; et al. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**. n.22, v.1, p.7-16, 2009.
- ROSAS-PIÑÓN, Y. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in

- the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. **Journal of Ethnopharmacology**. v.141, p.860-865, 2012.
- SAHU, M.C. et al., Antibacterial activity of *Argemone mexicana* L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p.800-807, 2012.
- SANT'ANA, V.A.C.; et al. FRAGILIDADE OSMÓTICA DOS ERITRÓCITOS DE BOVINOS DAS RAÇAS HOLANDESA, GIROLANDO E GIR, CRIADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.4, p.609-614, 2001.
- SILVA, E.C. et al. Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de caatinga no município de Cabaceiras, Paraíba, Brasil. **Série Botânica**. v.59, n.2, p.201-205, 2004.
- SIMÕES, C.M.O. et al. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1102p.
- SINGH, A. et al. FUNGAL SPORE GERMINATION INHIBITION BY ALKALOIDS DEHYDROCORYDALMINE AND OXYBERBERINE. **JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH**. v.49, n.3, p.287-289, 2009.
- TIWARI, N.N.; JOSH, M.P. MEDICINAL PLANTS OF NEPAL, VOLUMES I, II & III. **Journal of Nepal Medical association**, 1990.
- UGAZ, O. L., **Investigación Fitoquímica - Métodos en el Estudio de Productos Naturales**, 1. ed. Fondo editorial: Peru, 1988. 287p.
- UPRETI, K.K. et al., Biochemical toxicology of argemone oil. IV Short-term oral feeding response in rats. **Elsevier Scientific Publishers Ireland Limited**. v.58, p.285-298, 1989.
- WILLCOX, M.L. et al., *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.101, p.1190-1198, 2007.