
ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO BROTO DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)

PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SUNFLOWER BUD (*Helianthus annuus* L.)

MERCALI, C. A.¹; HIROTA, B. C. K.²; MIYAZAKI, C. M. S.¹; de LIMA, C. P.²;
VERDAM, M. C.²; MIGUEL, M. D.²; MIGUEL, O. G.¹

¹ Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, UFPR, Curitiba-PR.

² Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Farmácia, UFPR, Curitiba-PR.

RESUMO:

O girassol é cultivado especialmente para produção do óleo e, recentemente, o broto de girassol passou a ser consumido por um grupo específico de pessoas, principalmente os vegetarianos. Devido ao aumento do uso destes brotos como alimento, este trabalho teve como objetivo investigar a composição fitoquímica e as atividades biológicas do broto de girassol. Para tanto, o extrato etanólico bruto e frações dos brotos foram submetidos aos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênico, atividade hemolítica e atividade sobre a enzima tirosinase. O ensaio de toxicidade demonstrou que as frações hexano e hidroalcoólica não apresentaram toxicidade. As amostras não causaram hemólise e o extrato etanólico bruto não apresentou atividade sobre a enzima tirosinase. O extrato bruto, a fração clorofórmio e acetato de etila revelaram notável capacidade antioxidante.

Palavras-chave: *Helianthus annuus* L., asteraceae, antioxidante, toxicidade, girassol.

ABSTRACT:

Sunflower is specially cultivated to oil production. Recently sunflower buds are being consumed by a specific group of people, mainly vegetarians. Due to the increase of buds as food, the objective of this work was to investigate the sunflower bud phytochemical composition and biological activities. The ethanolic extract and fractions obtained from the buds were submitted to *Artemia salina* toxicity assay, antioxidant activity by the formation of phosphomolybdenum complex, hemolytic activity and tyrosinase enzyme activity. The toxicity assay demonstrated that hexan and hydroalcoholic fractions were not toxic. The tested samples did not cause hemolysis and the ethanolic extract did not present activity over tyrosinase enzyme. The ethanolic extract, chloroform and ethil acetate fractions revealed significant antioxidant capacity.

Keywords: *Helianthus annuus* L., asteraceae, antioxidant, toxicity, sunflower

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do interesse pela alimentação e nutrição relacionado à busca de hábitos mais saudáveis, os alimentos revelaram-se muito importantes, pois com algumas mudanças de hábitos alimentares é possível viver com mais saúde (BUBNIAK, 2004).

Em toda a história, as plantas e os alimentos são usados como fonte de agentes profiláticos para prevenção e tratamento de doenças em humanos e animais. A compreensão do papel dos alimentos na manutenção da saúde e cura de doenças tem suas origens nas culturas antigas e seus documentos como as escrituras chinesas, a ayurveda indiana, a grega com os conhecimentos de Hipócrates que contextualizou a relação entre o uso apropriado dos alimentos para a saúde e seus benefícios terapêuticos (BAGCHI, 2008; HANINNEN, SEM, 2008).

O girassol é originário do sudoeste dos Estados Unidos e norte do México. Foi primeiramente utilizado como alimento pelos índios americanos e cultivado inicialmente para o consumo de sua semente. A seguir sua farinha começou a ser utilizada na preparação de alimentos e somente no início do século XVII, na Europa, começou a ser utilizado como planta oleaginosa, quando se idealizou um método prático de extração do óleo da semente de girassol (ROSSI, 1997; MANDARINO, 1997).

Alguns alimentos derivados de plantas possuem a capacidade de reduzir o risco de doenças crônicas, sendo esta associada em parte, aos metabólitos secundários (fitoquímicos). Estes metabólitos apresentam uma baixa potência como compostos bioativos quando comparados com drogas farmacêuticas, mas, quando ingeridos regularmente e, em quantidades significativas como parte da dieta podem ter um notável efeito fisiológico. Os metabólitos que estão presentes nas dietas e estão relacionados a benefícios para saúde incluem glucosinolatos, terpenoides (carotenoides, monoterpenos, fitoesteróis) e vários grupos de polifenóis (antocianinas, flavonas, isoflavonas, ácido elágico, entre outros). A atividade destes compostos é em parte associada às propriedades antioxidantes (ESPÍN, GARCIA-CONESA, TOMÁS-BARBERÁN, 2007).

O girassol passou a fazer parte da alimentação por meio também do uso de brotos, os quais são consumidos por um grupo específico de pessoas, principalmente vegetarianos. O alimento é produzido e preparado pelo consumidor, principalmente como suco e acompanhamento de saladas. As sementes depois de plantadas crescem por volta de 10 a 15 dias e os brotos são retirados da terra na hora do consumo. Sugere-se que este é um alimento saudável e com muita vitalidade.

Apesar do aumento de seu consumo, o broto de girassol ainda não foi estudado quimicamente e pouco se sabe sobre suas atividades biológicas. O presente

trabalho visa delinear o perfil fitoquímico dos brotos de girassol e conhecer algumas das atividades biológicas que o mesmo apresenta, sendo ponto de partida para maiores estudos.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os brotos foram plantados e após 12 dias foram coletados. Na investigação fitoquímica, os brotos coletados foram submetidos à seleção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não sadias, atacadas por insetos, fungos ou oxidadas. Em seguida foram fragmentados e secos em estufa a 70 C° por 5 horas. Após a secagem o material foi armazenado em recipiente apropriado e protegido da luz e umidade.

2.2 Preparo dos extratos vegetais

O extrato bruto foi obtido a partir de 400g do material vegetal seco e moído, em sistema fechado, á quente, no aparelho de Soxhlet. O etanol foi o solvente extrator utilizado. O material foi concentrado em evaporador rotatório até 350mL. O extrato bruto etanólico foi fracionado separadamente, por meio de partição líquido-líquido em aparelho de soxhlet com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

2.3 Análise Fitoquímica

A análise da composição fitoquímica foi realizada de acordo como Moreira (1979) adaptada por Miguel (2003).

2.4 Avaliação da atividade antioxidante

Esse ensaio baseia-se na técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Para a reação de formação do complexo preparou-se um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio, molibdato de amônio 0,03M e ácido sulfúrico 3M. O reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a testadas, estavam na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003). Após a adição do reativo às amostras manteve-se os tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Realizou-se a leitura das absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro de UV. Os resultados foram expressos em atividade

antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e Rutina. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.5 Avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado segundo Meyer *et al.* (1982). Após a eclosão dos ovos, 10 náupilos de *Artemia salina* foram transferidos para tubos de ensaio contendo as amostras nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/ml. Os controles negativos consistem de tubos com o solvente solubilizador da fração. Após 24 horas, foi realizada a contagem dos náupilos mortos e vivos com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e foi determinado o valor da CL₅₀ (concentração letal média) com 95% de intervalo de confiança. As amostras foram consideradas ativas quando a CL₅₀ foi menor que 1000 µg/mL.

2.6 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica do extrato e frações foi realizada segundo a metodologia de difusão em Ágar utilizando a técnica descrita por Flach, Karnopp, Corção (2005), com adaptações.

Neste teste, papéis Whatmann n° 1 foram distribuídos sobre as placas de ágar sangue, adquiridas na empresa NEWPROV® e em seguida impregnados com alíquotas de 20 µL das frações anteriormente preparadas, na concentração de 1000 µg/mL. Para controle foram utilizados 20 µL dos respectivos solventes puros, aplicados aos discos. Para o controle positivo foi utilizada uma solução de saponina e para o controle negativo, solução salina 0,9%. Os meios foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm).

2.7 Avaliação de atividade sobre a enzima Tirosinase

O ensaio da avaliação da atividade da enzima tirosinase foi executado de acordo com os métodos descritos previamente por Miyazawa e colaboradores (2003) com algumas modificações.

Testou-se o extrato bruto em várias concentrações (100 – 300 - 1000µg/mL) frente à enzima tirosinase (200 U/mL), em microplaca de 96 poços. Adicionou-se a cada poço 170 µL L-tirosina 1mM ou L-DOPA 1mM, tampão fosfato de potássio 50mM (pH = 6,5), H₂O (10:10:9). Incubou-se a microplaca a 37°C por 30 minutos.

A quantia de dopacromo proveniente da reação da amostra foi determinada baseada na densidade óptica a 490nm usando espectrofotômetro. O efeito inibitório da atividade da tirosinase foi calculado em função da taxa de absorbância *versus* poço controle sem o composto ativo. Como controle positivo foi usado ácido kójico 1mM e controle negativo água destilada. (VIRADOR *et al.*, 1999).

Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância entre grupos (ANOVA - one way) seguidos por teste de Newman-Kewls.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio sistemático fitoquímico foram detectadas as classes de metabólitos secundários apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 – Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica de *Helianthus annuus* L.

Pesquisa	Extrato Alcoólico 20%	Extrato Aquoso 20%	Reação
Leucoantocianidinas	X		-
Alcaloides	X		-
Flavonoides	X		-
Cumarinas	X		+
Antraquinonas	X		-
Esteróis e Triterpenos	X		+
Heterosídeos Antociânicos		X	+
Heterosídeos Saponínicos		X	-
Heterosídeos Cianogenéticos		X	-
Gomas, Taninos e Mucilagens		X	+
Catequinas		X	+++
Aminogrupos		X	+

Observações: (-) Resultado Negativo; (+) Resultado Positivo; (+++) Resultado Fortemente Positivo

Pode-se observar que no extrato alcoólico houve indicação positiva para a presença de cumarinas, esteróis e triterpenos. O resultado da análise do extrato aquoso indicou a presença de taninos, catequinas e aminogrupos.

Os resultados obtidos de alguns grupos fitoquímicos como os esteróis, tripterpenos, cumarinas e aminogrupos coincidem com a composição do girassol descrita na literatura, no entanto, não foram encontradas referências à presença de taninos e catequinas (MACÍAS, *et al.*, 2002; HURTADO, *et al.*, 1998).

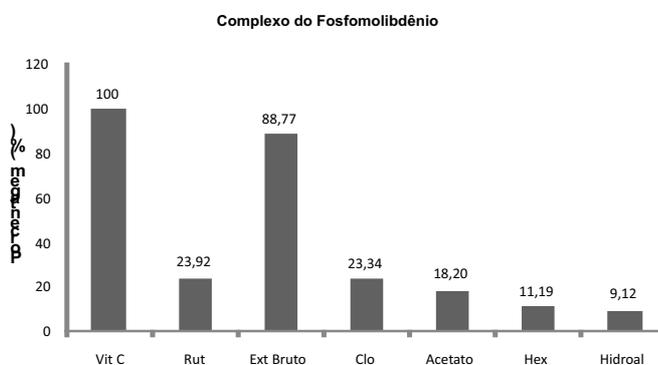
Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante estão apresentados na Tabela 2. A atividade antioxidante de cada amostra foi calculada em relação à vitamina C e rutina consideradas 100%, por serem substâncias de potente ação antioxidante.

TABELA 2 – Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante Em relação à rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)
Extrato Bruto	371,05	88,76
Fração Clorofórmio	97,57	23,34
Fração Acetato de Etila	76,08	18,02
Fração Hexano	46,75	11,18
Fração Hidroalcoólica	38,14	9,12

O extrato e as frações testadas apresentaram atividade antioxidante por este método. Comparando os resultados obtidos com o padrão vitamina C observa-se que o extrato bruto apresentou 88% de atividade antioxidante, um resultado considerado expressivo. Quando comparada à rutina a fração clorofórmio demonstrou atividade semelhante e, a fração acetato mostrou uma atividade de 76%. As frações hexano e hidroalcoólica demonstraram uma atividade baixa em relação às demais chegando próximo a 10% de atividade da vitamina C, portanto podem ser consideradas menos ativas neste teste.

Os resultados também podem ser observados no gráfico 1.

**GRÁFICO 1** – Porcentagem de Inibição do Complexo Fosfomolibdênio em relação aos controles Vitamina C e Rutina

A determinação da toxicidade frente à *Artemia salina* tem sido usada de maneira eficiente para analisar o potencial biológico de extratos de plantas. Vários produtos naturais, especialmente substâncias com atividade antifúngica, antiviral, antibacteriana e tripanosomicida, foram avaliados por este método e demonstraram uma relação significativa. É também um ensaio rápido, simples, prático e de baixo custo (LEITE *et al.*, 2009).

Neste ensaio foram submetidas amostras do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Os resultados das amostras testadas foram

submetidos ao teste estatístico Probitos para o cálculo da CL_{50} . Os resultados estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3 - Mortalidade de *Artemia salina* e DI_{50}

Amostra	Mortalidade/Concentração						Intervalo de Confiança ($\mu\text{g/mL}$) 95%
	C1	C2	10 ($\mu\text{g/mL}$)	100 ($\mu\text{g/mL}$)	1000 ($\mu\text{g/mL}$)	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Fração Hexano	0	0	0	0	0	> 1000	-
Fração Hidroalcoólica	0	0	0	0	0	> 1000	-
Extrato Bruto	0	0	1	4	30	119,03	96,01-147,57
Fração Clorofórmio	0	0	2	3	30	138,76	111,17-173,21
Fração Acetato de Etila	0	0	0	30	30	29,3	25,88-33,18
Sulfato de quinidina	0	0	16	10	18	50,12	35,80-70,16

Nota: CL_{50} = concentração média letal; C1 = controle 1, tubos tratados c/ água salgada; C2 = controle 2, tubos tratados c/ solvente do teste

A fração acetato de etila possui toxicidade significativa frente a este microcrustáceo, pois 29,3 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de provocar a mortalidade de 50% do mesmo, valor que corresponde a 41% do controle positivo sulfato de quinidina. Já o extrato bruto e a fração clorofórmio apresentaram valores semelhantes de CL_{50} que correspondem a aproximadamente 2,5 vezes o valor do controle positivo.

A concentração para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982) é um valor de CL_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$, desta maneira as frações hexano e hidroalcoólica não apresentaram toxicidade. Os controles feitos com os solventes e a água salgada não apresentaram influência sobre os resultados, pois nenhum náupilo morreu nesta análise.

Os resultados para avaliação da atividade hemolítica, em meio de ágar sangue, foram considerados negativos, pois não apresentaram o halo de hemólise ao redor do disco onde as amostras foram aplicadas. Os resultados também foram negativos para os controles com solvente.

Sabe-se que a hemoglobina livre no organismo pode causar sérias complicações a órgãos vitais como rins, coração e fígado (ALVES, 2009). Desta maneira, esse resultado é relevante, pois somado a outros resultados de avaliação de toxicidade pode-se inferir sobre a seguridade quanto ao uso deste alimento.

O excesso de exposição da pele à luz ultravioleta está relacionado com problemas de pigmentação, que estão aumentando conforme a população envelhece. Tanto a hiper quanto a hipopigmentação são tratadas com produtos que contêm substâncias despigmentantes, podendo ser de origem sintética ou natural. Os produtos atualmente utilizados não são totalmente eficazes ou seguros, por este motivo buscam-

se novos agentes com esta ação, principalmente inibidores de enzimas envolvidas na melanogênese, como a tirosinase (MACRINI *et al.*, 2009).

Nas concentrações 100, 300 e 1000 µg/mL avaliadas de extrato bruto, não foi observada interferência sobre a atividade da tirosinase, pois os valores obtidos não foram significativos quando comparados ao controle.

4. CONCLUSÃO

A composição fitoquímica dos brotos de girassol tem muito a revelar quanto ao desempenho dos extratos nos testes realizados e quanto às possíveis atividades biológicas a serem investigadas. A presença de cumarinas, heterosídeos antociânicos e catequinas podem ser a justificativa para a notável atividade antioxidante apresentada pelo extrato etanólico bruto, superando a atividade da Rutina, um flavonoide de reconhecida atividade antioxidante. Apesar do extrato etanólico bruto ter sido considerado tóxico frente à *Artemia salina*, a literatura reporta que amostras que se revelaram tóxicas para este microcrustáceo são potencialmente bioativas em ensaios de atividade antitumoral e atividade pesticida. O extrato bruto e frações dos brotos não danificaram os eritrócitos, sendo um indicativo de segurança para o uso humano.

Este conjunto de resultados demonstra a necessidade de investigações futuras em relação à toxicidade e de novas atividades biológicas pelo potencial antioxidante apresentado, além do isolamento e identificação de substâncias que justifiquem tais atividades e investigações nutricionais que justifiquem o benefício do consumo do broto de girassol.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Araucária, CAPES e UFPR.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, P. C. Z. **Estudos dos polimorfismos genéticos de enzimas antioxidantes associados à suscetibilidade aos danos no DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

BAGCHI, D. Preface. *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World*, p. ix-xii, 2008.

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de Bauhinia**

microstachya (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BUBNIAK, L. T. Nutracêuticos e alimentos funcionais para a obesidade. 2004. 27f. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ESPÍN, C. E.; GARCIA-CONESA T. M.; TOMÁS-BARBERÁN, A. F. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, Murcia, v.68, p.2956-3008, out. 2007.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.291-296, 2005.

HANNINEN, O.; SEM, K. C. Nutritional Supplements and Functional Foods: Functional Significance and Global Regulations. *Nutraceutical and food Regulations*, Columbus, p.11-35, 2008.

HURTADO, F. C. *et al.* Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, Induced Accumulation and Biosynthesis. **Phytochemistry**, v.38, n.3, p.1029-1036, 1998.

LEITE, J. J. G. *et al.* Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.110-113, 2009.

MACÍAS, F. A. *et al.* Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick. **Phytochemistry**, Espanha, v.61, p.687-692, ago. 2002.

MACRINI, D. J. *et al.* Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.2, p. 715-721, 2009.

MANDARINO, G. M. J. **Derivados protéicos do girassol.** In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISADO GIRASSOL, 12., Campinas, 1997. Campinas, p.8–10, 1997.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.45, p.31, 1982.

MIGUEL, O. G. Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

MIYAZAWA, M. *et al.* Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6953-6956, 2003.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

ROSSI, O. R. **Girassol**. Curitiba: Editora Tecnoagro Ltda, 1997.

VIRADOR, V. M. *et al.* A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v.270, p.207-219, 1999.