



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS I – CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AMANDA JUSTINO COSTA**

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CAULE DE**  
***Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE)**

**CAMPINA GRANDE – PB**  
**2015**

AMANDA JUSTINO COSTA

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CAULE DE**  
*Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação **em Farmácia** da Universidade  
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Maria Fechine

Co-orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. MSc. Camila de Albuquerque Montenegro

CAMPINA GRANDE – PB  
2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

C837a Costa, Amanda Justino.

Avaliação fitoquímica e potencial toxicológico do caule de Calotropis Procera (ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE). [manuscrito] / Amanda Justino Costa. - 2015.  
30 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Ivana Maria Fechine, Departamento de Farmácia".

1. Plantas medicinais. 2. Calotropis procera. 3. Citotoxicidade. 4. Screening fitoquímico. I. Título.

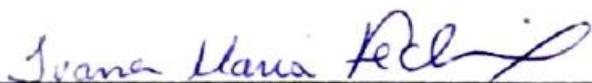
21. ed. CDD 615.321

AMANDA JUSTINO COSTA

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CAULE DE**  
*Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação **em Farmácia** da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

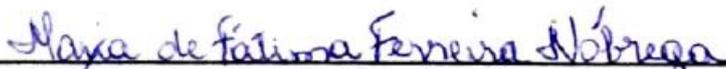
Aprovada em 15/06/2015



---

**Prof. Dr. Ivana Maria Fechine – UEPB/CCBS**

**Orientadora**



---

**Prof.ª. MSc. Maria de Fátima Ferreira Nóbrega – UEPB/CCBS**

**Avaliadora**



---

**Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda – UEPB/CCBS**

**Avaliador**

# AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CAULE DE *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE)

COSTA, Amanda Justino<sup>1</sup>; FECHINE, Ivana Maria<sup>2</sup>

## RESUMO

Estudos realizados anteriormente com a planta *Calotropis procera* (Apocynaceae), conhecida popularmente como “algodão de seda” demonstraram propriedades antitussígena, anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina, ação protetora da mucosa gástrica em úlceras causadas por ácido acetilsalicílico e etanol e ainda atividade antiproliferativa de células tumorais. As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, estes são também a causa de reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contato direto com a mesma. Para estudos de citotoxicidade *in vitro*, os eritrócitos são células muito utilizadas, devido, principalmente, ao fácil acesso e grande disponibilidade, permitindo a investigação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico da espécie *C. procera* e avaliar o potencial citotóxico e citoprotetor do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fração Clorofórmica (FCHCL<sub>3</sub>) do caule desta através do teste de atividade hemolítica e antihemolítica, respectivamente, em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O. Com a realização do *screening* fitoquímico foi possível identificar a presença de duas classes de metabólitos secundários: flavonoides e esteroides no EEB do caule de *C. procera*. Em relação ao estudo da avaliação da citotoxicidade, pode-se afirmar que o EEB e a fração clorofórmica do caule *C. procera*, apenas na concentração de 10 µg/mL não foi capaz de causar a lise estatisticamente significativa nos eritrócitos para os três tipos sanguíneos (ABO), nas demais concentrações foi verificada atividade hemolítica, em comparação ao controle negativo (solução de eritrócitos 0,5 %). Contudo, esta mesma concentração (10 µg/mL), não apresentou atividade antihemolítica, ou seja, não protegeu os eritrócitos ABO do estresse osmótico promovido pelo meio hipotônico (solução NaCl 0,24 %).

**Palavras-Chave:** *Calotropis procera*; citotoxicidade; *screening* fitoquímico.

---

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil.  
[amandajustinocosta@gmail.com](mailto:amandajustinocosta@gmail.com).

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil.  
[Ivana.fechine@gmail.com](mailto:Ivana.fechine@gmail.com)

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade vegetal do mundo, possuindo duas das maiores variedades do planeta, a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica apresentando um valioso arsenal a ser estudado. Deste modo, inúmeras plantas medicinais são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos. Podendo também ser usadas na extração de matérias-primas como extratos, óleos essenciais, substâncias químicas puras, que podem servir de modelos para obtenção de análogos, no preparo de moléculas semi-sintéticas (SOEJARTO, 1996; CARVALHO, 2008).

A utilização de plantas na medicina popular constitui uma prática muito antiga e “o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos”, tornando-se cada vez mais importante a investigação, o estudo sistematizado e científico de diferentes espécies (MACIEL et al., 2002).

Nesse contexto, a espécie vegetal *Calotropis procera* Ait. R. Br., conhecida popularmente como “ciúme”, “ciumeira” ou “algodão de seda”, é um arbusto selvagem pertencente à família Apocynaceae, originária da África, Índia e Pérsia, e se destaca por possuir hoje uma ampla distribuição geográfica, disseminando-se com muita facilidade por regiões áridas e semi-áridas por apresentar sementes aladas envoltas por uma plumagem facilitando seu transporte pelo vento, o que favorece sua ocorrência na região Nordeste do Brasil (JOLY, 1997; SOUTO et al., 2008).

De maneira geral, as plantas dessa família são conhecidas por seus efeitos benéficos à saúde promovidos, na sua maior parte, por seus compostos polifenólicos, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos, que possuem atividade antioxidante contra formas reativas de oxigênio (WILLIAMS et al., 2004).

A diversidade molecular dos vegetais está relacionada ao seu metabolismo secundário, sendo este responsável pela produção de compostos químicos necessários para sobrevivência da planta. A fitoquímica é a área responsável pelo estudo dos princípios ativos de drogas vegetais, ou seja, os metabólitos secundários, os quais se diferenciam em cada espécie para atender uma função ecológica específica. Os diferentes tipos de moléculas produzidas por estas substâncias fazem com que as plantas sejam uma fonte rica de matéria-prima para descoberta de moléculas bioativas e desenvolvimento de novos medicamentos (RATES, 2001; IWU, 2002; HALBERSTEIN, 2005; GURIB-FAKIM, 2006).

Informações advindas da medicina popular são importantes, no intuito de nortear o estudo fitoquímico. No entanto, é válido ressaltar que nem todas as plantas medicinais de uso

tradicional foram investigadas, levando a uma busca incansável do conhecimento dos seus compostos ativos, o que reforça ainda mais a necessidade destes testes, bem como a avaliação da toxicidade das diversas espécies vegetais encontradas na natureza.

Embora os produtos naturais sejam amplamente considerados de menor risco em comparação às drogas sintéticas, eles não são completamente livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos (DE SMET, 2004).

Deste modo, faz-se necessário realizar estudos toxicológicos para determinação de parâmetros de segurança que não são observados durante o uso popular dos derivados de plantas medicinais, ajudando a decidir se uma nova substância deve ser adotada ou não para uso clínico (SARAIVA et al., 2012).

*C. procera* foi escolhida para este estudo devido à facilidade de coleta, bem como pela escassez na literatura de estudos fitoquímicos dessa espécie. De modo que o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico da espécie *C. procera* (Apocynaceae) e avaliar o potencial citotóxico e citoprotetor do extrato etanólico bruto e da fração clorofórmica do caule desta através do teste de atividade hemolítica e anti-hemolítica, respectivamente, em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Calotropis procera*

É uma Apocynaceae conhecida popularmente como “ciúme”, “ciumeira” ou “algodão de seda”, trata-se de um arbusto perene, ereto, pouco ramificado, fortemente lactescente, com casca esponjosa, pode alcançar de 1,5 a 3,5 metros de altura e produz grande quantidade de látex, que é facilmente coletado de suas partes quando a planta sofre algum dano. *C. procera* é provavelmente nativa da Índia e naturalizada em todas as regiões tropicais semi-áridas da América, inclusive no Brasil, onde teve no nordeste uma boa adaptação, principalmente nos locais com baixos níveis de pluviosidade e solos pobres em nutrientes. Suas folhas são grandes, subcoriáceas, com tomento esbranquiçado na face inferior, medindo 15 a 30 cm de comprimento. Possui flores arroxeadas, dispostas em inflorescências fasciculadas terminais. Os frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes envolvidas em painas sedosas brancas. Multiplica-se apenas por sementes que são disseminadas pelo vento (LARHSINI et al, 1997; LORENZI; MATOS, 2002; BRAGA, 2003).

**Figura 1.** *Calotropis procera*



Fonte: [http://faculty.ksu.edu.sa/assaeed/ar/PublishingImages/Range\\_Plants/Calotropis\\_procera\\_3.JPG](http://faculty.ksu.edu.sa/assaeed/ar/PublishingImages/Range_Plants/Calotropis_procera_3.JPG)

O estudo das cascas do tronco de *C. procera* demonstrou propriedades antitussígena, anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina e ação protetora da mucosa gástrica em úlceras causadas por ácido acetilsalicílico e etanol e, ainda, atividade antiproliferativa de células tumorais (DIEYE et al., 1993; MAGALHÃES et al., 2010; TOUR; TALELE, 2011). Testes farmacológicos realizados com as folhas da *C. procera* têm mostrado

atividades do tipo hipotensora, antipirética, analgésica e anti-inflamatória. Atividade Antibacteriana contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Hafnia alvei* e *Staphylococcus aureus*. Atividade anticolinérgica muscarínica, antifúngica e inseticida (TANIRA et al., 1994; MESHARAM, 1995; COSTA, 2002; COSTA, 2003; BARROS et al., 2004; OLIVEIRA, 2004).

Estudos adicionais mostraram que seu látex tem forte atividade proteolítica e que o extrato das raízes possui atividade anti-inflamatória e ação analgésica segundo ensaios realizados com animais de laboratório. Entretanto, há relatos científicos sobre diversos efeitos toxicológicos relacionados ao seu uso. (LORENZI; MATOS, 2002; AGUIAR et al., 2005).

Na medicina tradicional, diversas partes da planta são indicadas no tratamento de úlceras, tumores, doenças hepáticas e leproses (TANIRA et al., 1994).

## 2.2 Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico compreende desde a coleta do material botânico, preparação dos extratos, obtenção de compostos, etapas de isolamento, identificação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, as quais podem estar relacionadas com uma ação biológica (COSTA, 2011).

Estes constituintes podem ser avaliados através da utilização de metodologias simples de cromatografia, associadas a um conjunto de técnicas espectrais como ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e espectrometria de massas e quando agregadas aos ensaios de atividade biológica, permitem caracterizar as frações ou substâncias bioativas e levantar possíveis moléculas novas para o arsenal terapêutico já existente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; BRANDÃO, 2009).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação, que pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

### **2.3 Screening Fitoquímico**

As reações químicas que ocorrem no interior das células de todo ser vivo podem ser divididas em metabolismo primário e secundário. Basicamente, todos os organismos convivem com os mesmos tipos de metabólitos primários. Os metabólitos secundários, por sua vez, são específicos dos seres autotróficos e são produzidos como substâncias de defesa, com função de atração de polinizadores, como agentes de coloração e outras funções (SIMÕES, 2003; GOBBO-NETO, 2007).

Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra predadores. Além das características de proteção, os metabólitos secundários podem possuir efeitos diretos sobre os organismos em contato, podendo ser benéficos, como em uma atividade antimicrobiana ou antiparasitária para um vertebrado, ou mesmo tóxico ou mutagênico, como é o caso de várias plantas que possuem laticíferos (FERREIRA et al., 2006; BRAZ-FILHO, 2010).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Sabe-se que a concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como, por exemplo, fatores climáticos, edáficos, exposições a microrganismos, insetos, outros herbívoros, poluentes, e outros (BRAZ-FILHO, 2010).

Fundamentalmente, o processo de *screening* ou triagem fitoquímica se baseia no princípio de que toda e qualquer substância presente na planta, independente da sua concentração, pode ser um princípio ativo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), o estudo fitoquímico tem como objetivo a extração, isolamento, purificação e determinação da estrutura química dos constituintes presentes em extratos de plantas com atividade biológica.

### **2.4 Avaliação da citotoxicidade**

As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, estes são também a causa de reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contato direto com a mesma (CARVALHO, 2012).

A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Os eritrócitos são células muito utilizadas para estudos de citotoxicidade *in vitro*, devido,

principalmente, ao fácil acesso e grande disponibilidade, permitindo a investigação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular. Após a exposição ao produto teste, a ocorrência ou não de hemólise pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro* (MARIGLIANO, et al., 1999; MAZZANTI et al., 2002; BRANDÃO et al., 2005; GOUVÊA; SILVA, 2006; SRINIVASAN; KEMPAIAH, 2006; BATISTA et al., 2007; FIRMINO, 2007; SCHIAR et al., 2007).

#### **2.4.1 Atividade hemolítica e antihemolítica**

A membrana eritrocitária é ricamente composta de ácidos graxos polinsaturados, o que a torna muito susceptível ao ataque de radicais livres, que nos eritrócitos ocasionam uma série de alterações, como formação de lipoperóxidos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, ligação cruzada, fragmentação de proteínas, alterações no metabolismo intracelular e hemólise (SADHU; WARE; GRISHAN, 1992; SATO et al., 1995; BEGUM; TERAQ, 2002).

A hemólise consiste na lise dos eritrócitos, ocasionando a liberação de hemoglobina no plasma, situação esta que pode gerar danos aos rins (nefrotoxicidade) e ao coração (efeito vasomotor). Processos hemolíticos liberam íons potássio no meio extracelular e um rápido aumento de  $K^+$  pode levar à parada cardíaca e morte (CARVALHO et al., 2007).

Jain (1986), define a Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) ou atividade anti-hemolítica como sendo a resistência dos eritrócitos à hemólise, avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,96% a 0%.

A capacidade de resistência à hemólise pode ser detectada pelo teste de FOE, caracterizando uma atividade anti-hemolítica, pelo fato dos eritrócitos resistirem à lise ao manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, SAUNDERS, 2006; MOUSINHO et al., 2008). De modo, que pode-se dizer que a osmolaridade com que a célula sofre a lise está relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos, tal como a relação entre volume/superfície do glóbulo (CAIRES, 2012).

Segundo Caires (2012), a FOE é um teste que pode ser usado no auxílio da caracterização de diversas anemias, que apresentam como característica principal a diferença de tamanho e forma das hemácias. No entanto, o teste é de difícil padronização, e por esse motivo pouco realizado nos laboratórios.

### 3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

#### 3.1 Coleta e preparo do material vegetal

A planta *C. procera*, "flor-de-seda" da família Apocynaceae, foi coletada na zona litornea no município de Cabedelo - PB (S 7°02'29.9"/ W 34°50'23.6") no dia 30 de abril de 2014. O material vegetal foi processado na cidade de Campina Grande – PB no Laboratório de Fitoquímica (LAFIT) na Universidade Estadual da Paraíba. A exsicata encontra-se no Herbário da Universidade Federal da Paraíba sob a inscrição *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. Brasil: Paraíba: João Pessoa, Freitas, G. B. 6561- 27/03/2009 (JPB 58031).

Os ensaios de citotoxicidade foram desenvolvidos em parceria com o Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiologia (BioGer) do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob a supervisão da Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa e da Profa. Msc. Camila de Albuquerque Montenegro, docente da nossa instituição.

Foram separadas as partes da planta, e o caule, a parte utilizada neste estudo, foi armazenado em estufa de circulação de ar a 50°C por três dias para secagem. Após ser retirado da estufa, o caule foi submetido à trituração em um moinho. Com a moagem foi obtido o pó, utilizado na preparação do extrato etanólico bruto.

#### 3.2 Preparação do extrato etanólico bruto do caule de *C. procera*

Pesou-se aproximadamente 500g do pó seco obtido da moagem do caule, o qual foi submetido ao processo de maceração exaustiva em etanol a 70%. A cada três dias o macerado era filtrado com papel filtro, e o líquido proveniente da maceração era armazenado em frasco âmbar. Esse procedimento foi repetido durante 15 dias, totalizando seis extrações, o que resultou em 6L de solução extrativa etanólica do caule de *C. procera*. Em seguida realizou-se a filtração e evaporação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se um peso seco de 146,17g do extrato bruto, o qual foi acondicionado em refrigeração.

#### 3.3 *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB do caule de *C. Procera*

Para a realização do *screening*, inicialmente utilizou-se três béqueres para a preparação das soluções mãe de metanol, clorofórmio e solução aquosa. Para a solução de

metanol foram pesados 120 mg do extrato bruto, os quais foram dissolvidos em 24 mL de metanol. Para a solução de clorofórmio foram pesados 75 mg do extrato bruto e dissolvido em 15 mL de clorofórmio. Para a solução aquosa pesou-se 140 mg do extrato bruto que foram dissolvidos em 30 mL de água. Para facilitar a dissolução, as preparações foram levadas a banho-maria e ultrassom, segundo a técnica de Matos (1997).

Foram preparadas ainda outras duas soluções, uma de Vanilina e outra de Cloreto Férrico, ambas a 1%.

### 3.3.1 Metabólitos solúveis em metanol

- **Alcalóides** – a pesquisa de alcaloides foi realizada com os reativos gerais para alcaloides: Reativo de Mayer, Reativo de Dragendorff, Reativo de Bouchardat e Reativo de Bertrand. Em quatro tubos de ensaios, foram colocados 2 mL da solução de metanol e em cada um, foi adicionado 1 mL de HCl 1%. Em cada tubo foram adicionadas duas gotas de cada reativo geral para alcaloides e observou-se se o resultado foi positivo ou negativo de acordo com as características específicas para cada reativo.
- **Flavonóis** - Levou-se à banho-maria 10 mL de solução metanólica. Ao resíduo adicionou-se 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou-se e levou-se novamente à banho-maria. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de éter etílico transferindo-se em seguida para um tubo de ensaio para verificação de fluorescência.

### 3.3.2 Metabólitos solúveis em clorofórmio

- **Esteróides** - a identificação deste metabólito foi realizada através da Reação de Liberman-Bouchard. Tomou-se 10 mL da solução clorofórmica a qual foi filtrada sob carvão ativado. O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio totalmente seco e logo após adicionou-se 1 mL de anidrido acético efetuando-se uma leve agitação. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e o tubo de ensaio foi novamente levado a agitação.

### 3.3.3 Metabólitos solúveis em água

- **Taninos** – para a pesquisa de taninos foram utilizados:

Cloreto Férrico: em um tubo de ensaio foram adicionadas 5 mL da solução aquosa e 5 gotas de Cloreto Férrico. Observou-se a reação.

Solução de Gelatina: em tubos de ensaio foram adicionados, respectivamente, 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL de extrato aquoso mais 2 mL da solução aquosa de gelatina 0,5%. Observou-se a reação.

### 3.4 Partição do extrato etanólico bruto (EEB)

O extrato etanólico bruto do caule de *C. procera* foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, visando um fracionamento das substâncias através de suas polaridades. Neste estudo os solventes utilizados foram: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

Inicialmente pesou-se 7,5g do extrato etanólico bruto do caule de *C. procera* o qual foi dissolvido em 60mL de solução hidroalcoólica, metanol-água na proporção de 3:1, a mistura foi então transferida para um funil de separação, neste foi adicionado primeiramente hexano, solvente mais apolar, agitou-se o funil cuidadosamente durante 1 minuto, segurando firmemente a tampa. Para liberar a pressão formada pelo gás, o funil foi ventilado segurando-o na posição invertida e abrindo vagarosamente a torneira. Após a separação total das camadas, a fase superior, correspondente a fase hexânica foi removida e em seguida submetida à evaporação em evaporador rotativo, obtendo-se a fase hexânica do caule de *C. procera*.

Para obtenção da fração clorofórmica, foi adicionado ao funil contendo a solução hidrometanólica, outro solvente, o clorofórmio, de polaridade intermediária. O funil foi homogeneizado durante 1 minuto tomando as devidas precauções. Após a separação das camadas, recolheu-se a camada inferior, correspondente a fase clorofórmica, a qual foi concentrada em evaporador rotativo, resultando na fase clorofórmica do caule de *C. procera*.

O mesmo procedimento foi realizado para obtenção da fase acetato, no qual foi adicionado acetato de etila em quantidade suficiente ao funil contendo a solução

hidrometanólica. Após homogeneização e evaporação do concentrado, obteve-se a fase acetato do caule de *C. procera*.

### 3.5 Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata e para comparação dos grupos experimentais utilizou-se o teste *t*. Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m), analisados com o software GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA, considerando-se o nível de significância mínimo  $p < 0,05$ .

#### 3.5.1 Atividade hemolítica

Foram utilizados eritrócitos humanos dos tipos A, B e O, coletados de três voluntários adultos e aparentemente saudáveis no Laboratório de Análises Clínicas – LAC da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As drogas-testes utilizadas neste experimento foram o extrato etanólico bruto (EEB) do caule da *C. Procera* e a fração clorofórmica (FCHCl<sub>3</sub>) do caule da *C. procera* nas concentrações de 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para cada extrato.

Inicialmente foi realizada a lavagem dos eritrócitos, tendo o sangue (A, B, O) sido diluído em solução salina (NaCl 0,9%), centrifugados durante 5 minutos a 2500 rpm e ressuspensos por 3 vezes. Após isso, preparou-se uma solução de eritrócitos a 0,5% (100 mL NaCl 0,9% + 50  $\mu\text{L}$  do lavado de eritrócitos), que foi distribuída (2 mL) em tubos de Falcon e adicionadas as drogas-teste nas seguintes concentrações: 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Os tubos foram incubados a  $25 \pm 2$  °C por 1 h e decorrido o tempo, realizou-se nova centrifugação a 2500 rpm/5 min para que o sobrenadante fosse submetido à espectrofotometria (540 nm) para quantificar a atividade hemolítica.

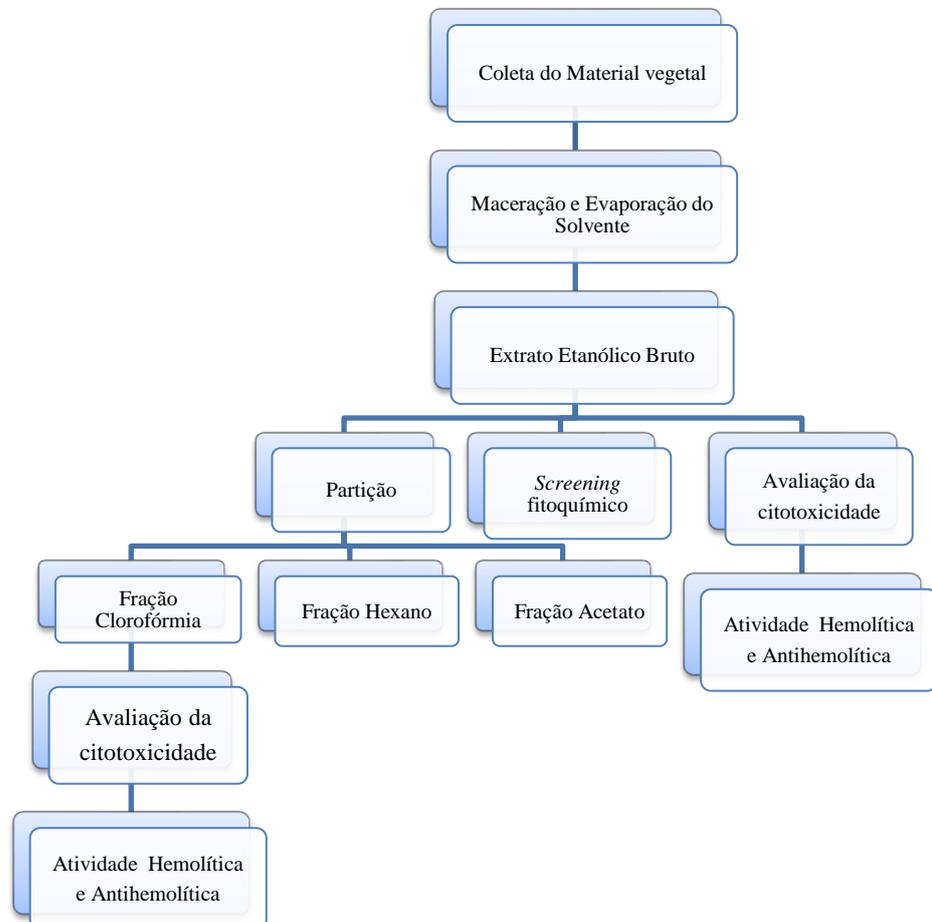
O controle negativo foi utilizado apenas com a solução de eritrócitos a 0,5 % (0 % hemólise) e o controle positivo, a hemólise total (100 %) obtida com Triton X-100, correspondendo ao controle positivo. Este experimento foi realizado em triplicata para os três tipos sanguíneos e os resultados foram expressos como percentual da média aritmética em relação ao controle negativo.

### 3.5.2 Atividade antihemolítica ou fragilidade osmótica eritrocitária

Para o teste de fragilidade osmótica, dando continuidade ao protocolo anterior, após a leitura no espectrofotômetro, retirou-se todo o sobrenadante dos tubos de Falcon, ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL de uma solução hipotônica de NaCl a 0,24%, as quais foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C por 1h e decorrido este tempo foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 2500 rpm. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota e feita a leitura em espectrofotômetro (540 nm).

A hemólise total foi obtida com a solução de sangue a 0,5% em meio hipotônico (NaCl 0,24%), (controle positivo). O controle negativo correspondeu aos valores obtidos no experimento de atividade hemolítica para a solução de sangue em NaCl 0,9%. Este experimento foi realizado em triplicata, igualmente para os três tipos sanguíneos e os resultados foram expressos como percentual da média aritmética em comparação ao controle positivo. Todos os dados da metodologia estão contido no fluxograma da Figura 2.

**Figura 2.** Fluxograma metodológico



## 4 DADOS E ANÁLISE DA PESQUISA

### 4.1 *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB do caule de *C. Procera*

Os resultados obtidos a partir do *screening* fitoquímico do EEB do caule da *C. procera*, podem ser observados a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados do *screening* fitoquímico do EEB do caule de *C.procera*.

Metabólito Secundário	Teste de Identificação
Alcaloides	Bouchardat (-) Mayer (-) Drangendorff (-) Bertrand (-)
Flavonoides	++
Esteroides	Reação de Liberman-Bouchard (+)
Taninos	FeCl <sub>3</sub> (-) Gelatina 0,5% (-)

De acordo com a tabela 1, os testes de identificação utilizando o EEB de *C.procera*, apresentaram-se positivos para os seguintes metabólitos secundários, flavonoides e esteroides, metabólitos solúveis, respectivamente, em metanol e clorofórmio, os quais podem apresentar compostos bioativos com diferentes atividades farmacológicas. Em estudo semelhante, Melo et al, (2001), também constatou a presença destas substâncias nas folhas e galhos da *C. procera*.

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários e têm se destacado por apresentarem diversas propriedades farmacológicas, agindo como antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes, antivirais, fungicidas, antiprotozoários, bem como na redução de riscos de doenças cardiovasculares (ALAVEZ-SOLANO, 2000; MAGALHÃES, 2000).

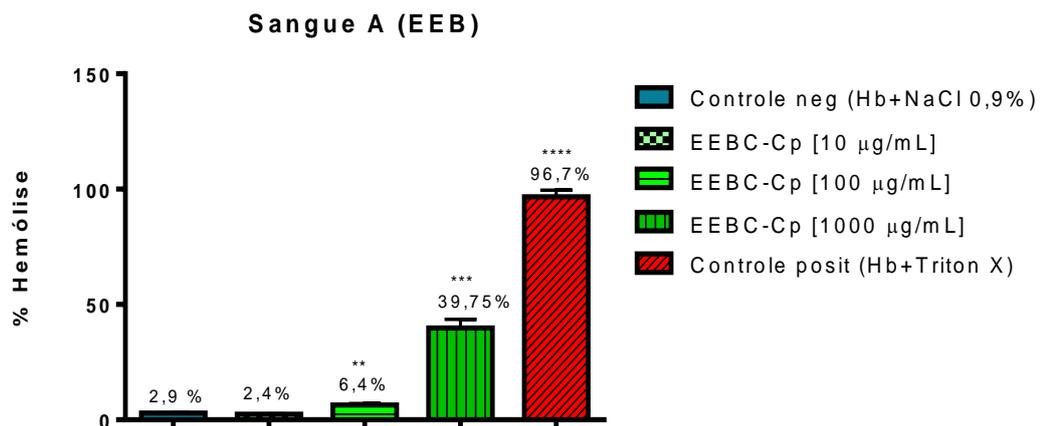
Considerando a ação farmacológica dos flavonoides e tendo sido constatada a presença desta substância no EEB do caule da *C.procera*, torna-se importante a realização de testes futuros no intuito de identificar a dose tóxica deste metabólito e analisar a possibilidade do seu uso como medicamento, seja isolado ou em associação.

## 4.2 Atividade hemolítica

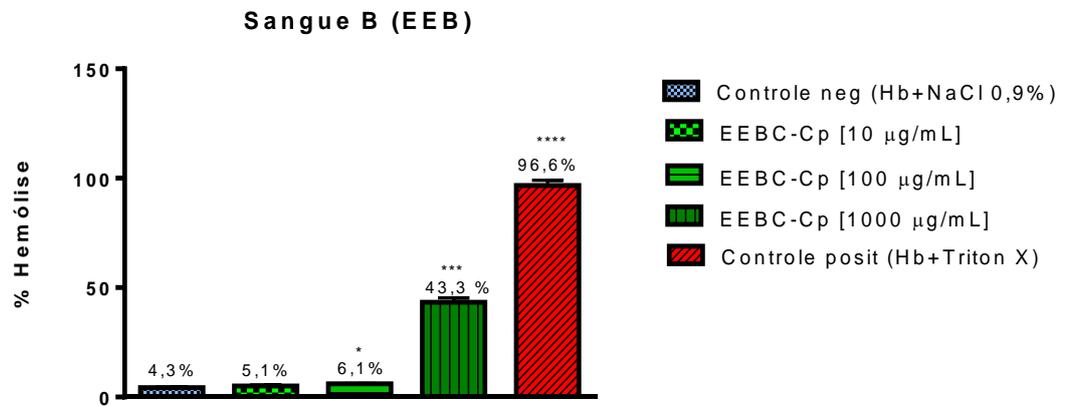
A partir da realização do protocolo de hemólise e comparando-se as três concentrações utilizadas no teste de atividade hemolítica com o grupo controle negativo (Hb + NaCl 0,9%), pode-se afirmar que apenas a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  do EEB e da fração clorofórmica do caule de *C. procera* reduziu a hemólise de forma estatisticamente significativa sobre os 3 tipos sanguíneos. Em contrapartida as demais concentrações (100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) induziram a hemólise das células, como pode ser visto nos gráficos (1 a 6).

Bukowska & Kowalska (2004), afirmam que metabólitos secundários, como por exemplo, os compostos fenólicos, podem levar a hemólise por meio da oxidação da hemoglobina. Solventes como o clorofórmio permitem a extração de flavonoides como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonoides, isoflavonas entre outros compostos, enquanto solventes de maior polaridade, como o etanol, extraem agliconas poli- hidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares (ZUANAZZI; MONTANA (2004). Diante do exposto, pode-se dizer que a composição dos extratos tem influência sobre os eritrócitos favorecendo a lise destas células.

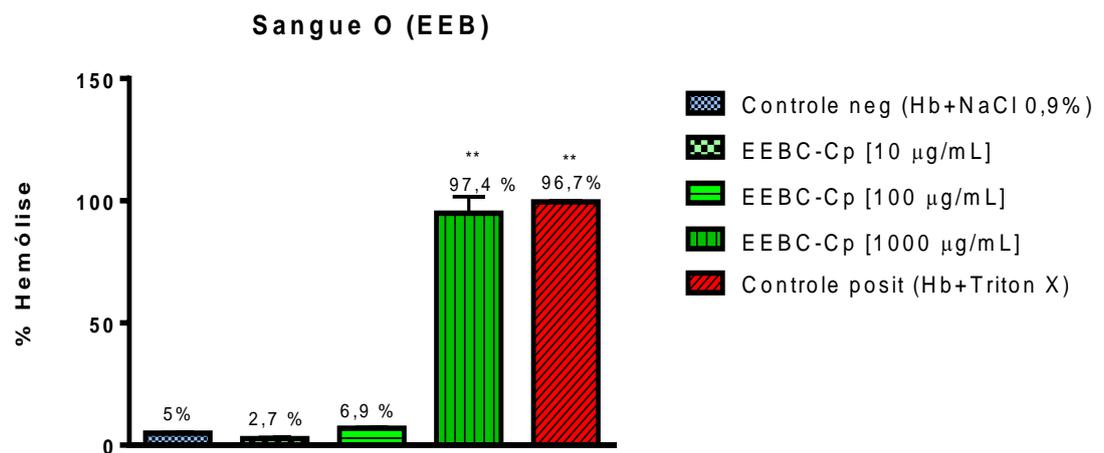
**Figura 3.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo A na presença do extrato etanólico bruto (10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) do caule de *C. procera*



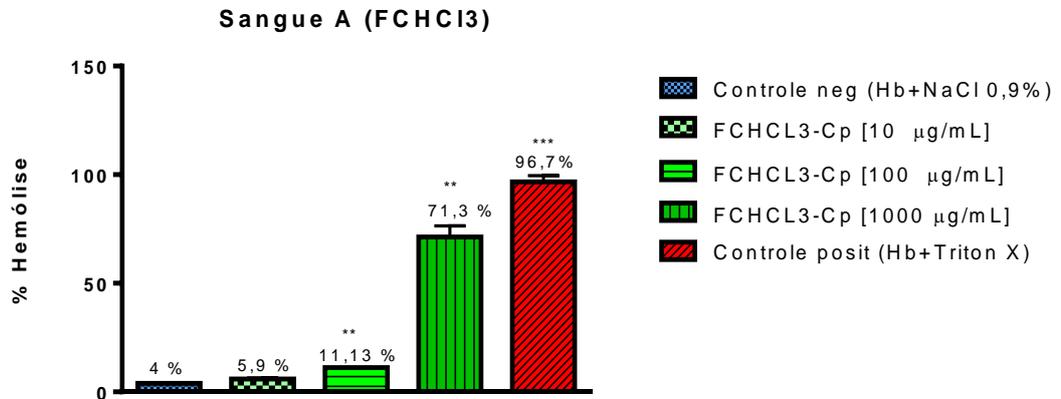
**Figura 4.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo B na presença do extrato etanólico bruto (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



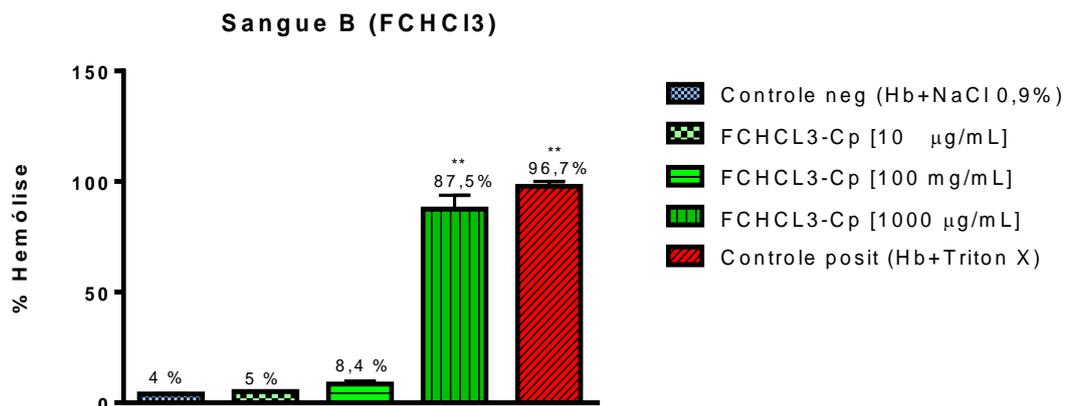
**Figura 5.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo O na presença do extrato etanólico bruto (10, 100 e 1000 µg/mL) do caule de *C. procera*



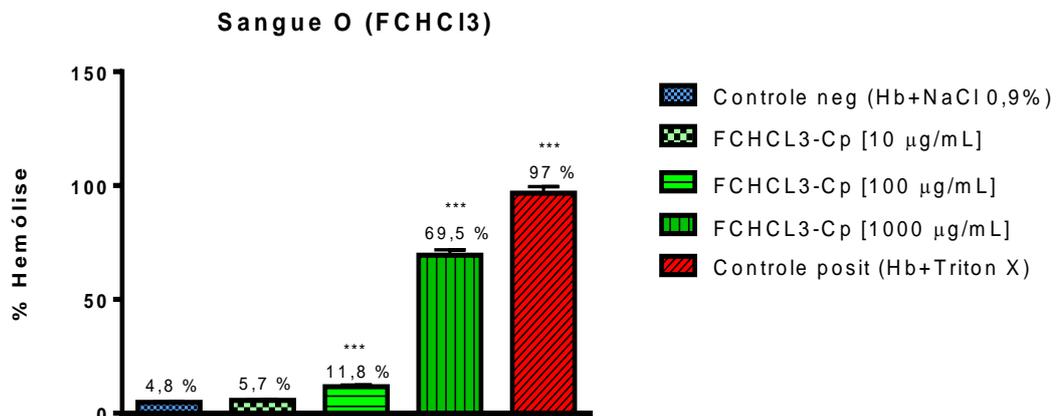
**Figura 6.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo A na presença da fração clorofórmica (10, 100 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do caule de *C. procera*



**Figura 7.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo B na presença da fração clorofórmica (10, 100 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do caule de *C. procera*



**Figura 8.** Porcentagem de hemólise em eritrócitos do tipo sanguíneo O na presença da fração clorofórmica (10, 100 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do caule de *C. procera*



A partir do resultado encontrado para o teste de atividade hemolítica, percebe-se que em baixa concentração, o EEB e a fração clorofórmica do caule de *C. procera* não possuem a capacidade de causar danos na membrana eritrocitária dos três tipos sanguíneos do sistema ABO. Em estudo realizado com as folhas da *C. procera*, Zohra e Fawzia (2014), constatou baixa toxicidade ao testar o extrato metanólico nas concentrações entre 50 e 500 µg/mL, de igual modo, neste estudo as concentrações de 10 e 100 µg/mL mostraram baixa toxicidade.

Cabe lembrar que a composição química de um vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo (Simões & Spitzer, 2003). Em geral, as espécies variam o teor de princípio ativo de acordo com a época, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (Reis et al., 2003).

Outro fato relevante é que os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação, dependendo de diversos fatores, como por exemplo, análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção (BIANCHI et al., 2000). Portanto, um antioxidante pode atuar como protetor e/ou falhar na proteção causando danos (DECKER, 1997; HALLIWELL et al., 1995).

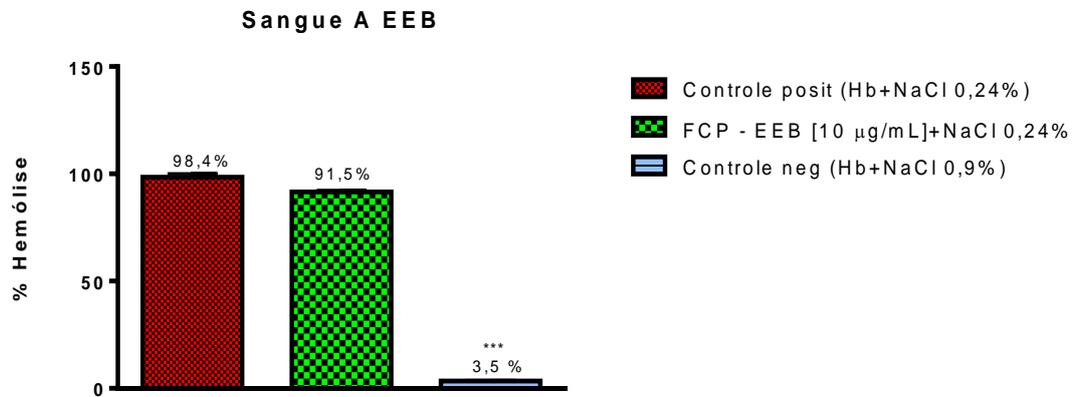
De acordo com Rangel et al (1997), considera-se de baixa toxicidade uma hemólise de até 40%, toxicidade moderada, entre 40 e 80% e de alta toxicidade acima de 80%, assim, de maneira geral, os extratos testados podem ser considerados de toxicidade moderada, uma vez que foi testada também a concentração de 1000 µg/mL, obtendo-se um percentual de hemólise entre 40 e 80%.

### **4.3 Atividade antihemolítica**

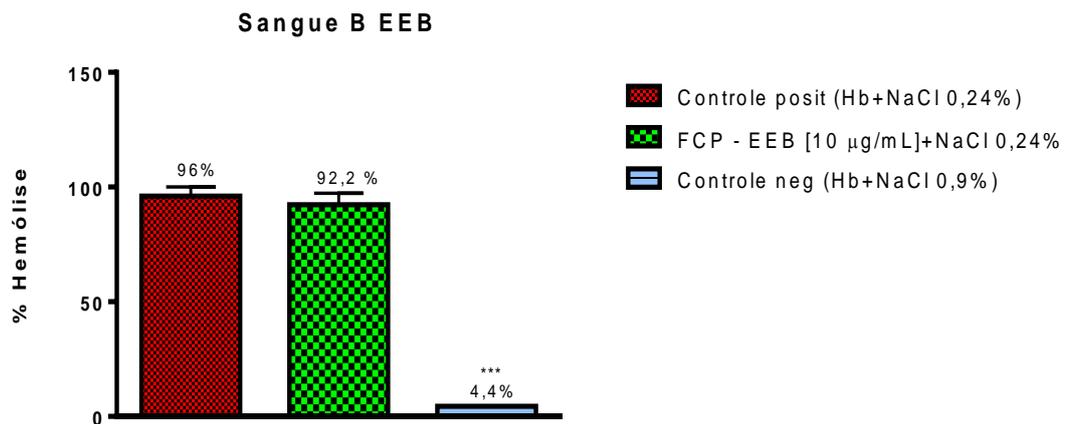
Uma vez que a concentração de 10 µg/mL não foi capaz de induzir a lise dos eritrócitos, partiu-se então para uma segunda etapa, que foi verificar se em um meio hipotônico (solução de NaCl 0,24%) os extratos nesta concentração seriam capazes de proteger o eritrócito da hemólise induzida pela entrada de água na célula, através do ensaio de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE). O teste foi realizado, portanto, com o intuito de avaliar a atividade antihemolítica dos extratos selecionados.

O EEB e a fração clorofórmica do caule de *C. procera* na concentração de 10µg/mL não apresentaram atividade anti-hemolítica quando comparado ao controle positivo, ou seja, não houve proteção dos eritrócitos nos três tipos sanguíneos (ABO) na presença da solução hipotônica (0,24% de NaCl), como pode-se observar nos gráficos (7 a 12).

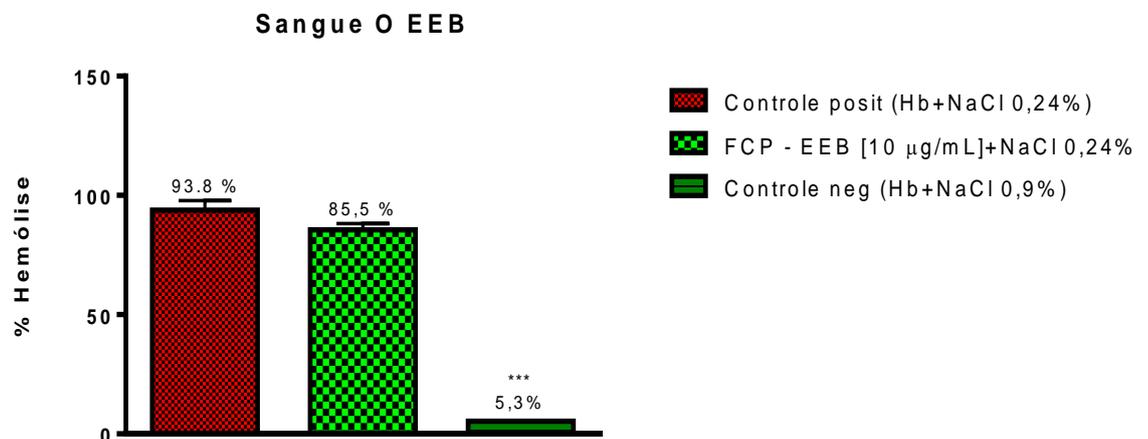
**Figura 9.** Atividade antihemolítica do extrato etanólico bruto (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo A



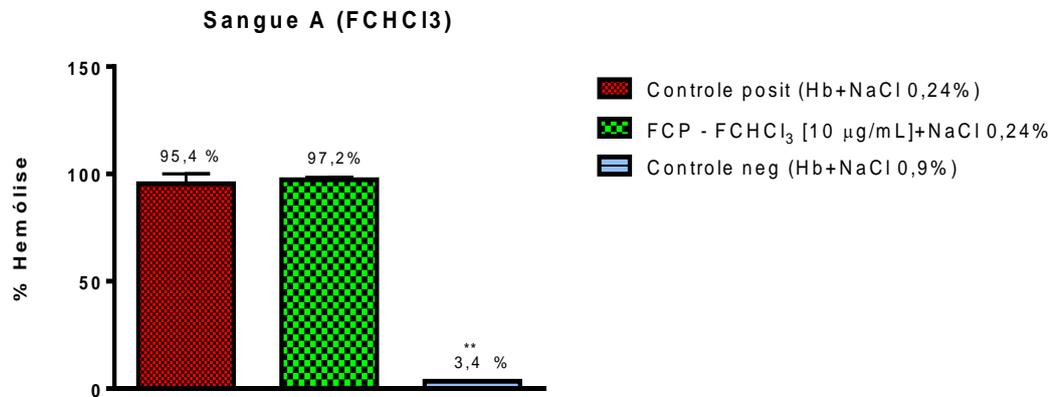
**Figura 10.** Atividade antihemolítica do extrato etanólico bruto (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B



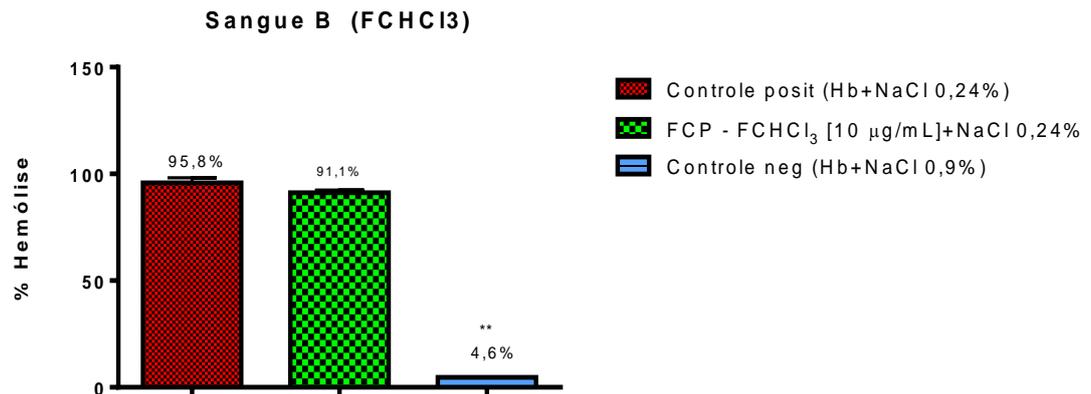
**Figura 11.** Atividade antihemolítica do extrato etanólico bruto (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo O



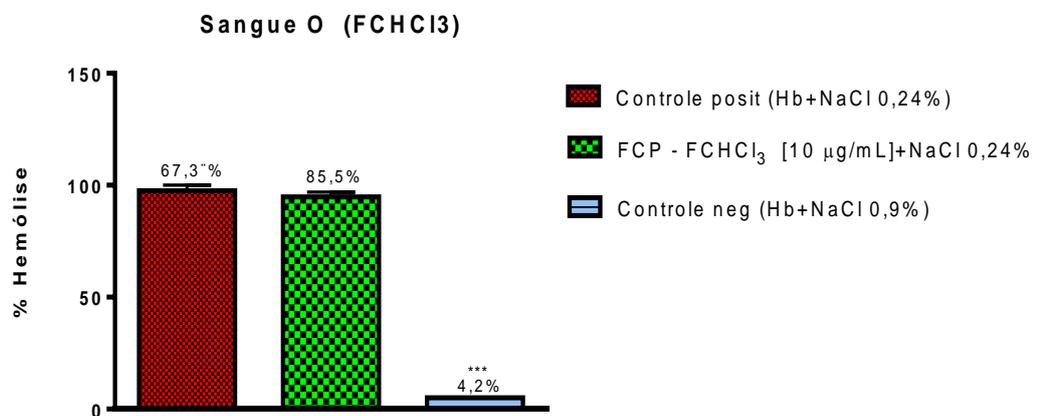
**Figura 12.** Atividade antihemolítica da fração clorofórmica (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo A



**Figura 13.** Atividade antihemolítica da fração clorofórmica (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B



**Figura 14.** Atividade antihemolítica da fração clorofórmica (10 µg/mL) do caule de *C. procera* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo O



## 5 CONCLUSÃO

- Através da realização da prospecção fitoquímica do EEB do caule de *C. procera* foi possível identificar a presença de duas classes de metabólitos secundários: flavonoides e esteroides, constituintes que possuem uma ampla variedade de atividades biológicas.
- O EEB, bem como a fração clorofórmica do caule de *C. procera* não induziu hemólise quando avaliado na concentração a 10 µg/mL, porém nas demais concentrações foi verificada atividade hemolítica frente aos eritrócitos dos tipos sanguíneos ABO.
- No teste de atividade antihemolítica nenhuma amostra foi capaz de proteger o eritrócito, tanto o EEB como a fração clorofórmica do caule de *C. procera* na concentração de 10 µg/mL permitiram a ocorrência de hemólise, mostrando este modo, que não há atividade antihemolítica.
- De acordo com este estudo, foi possível concluir que o EEB e a fração clorofórmica do caule de *C. procera* apresentam toxicidade moderada.

## ABSTRACT

Previous studies with the *Calotropis procera* plant (Apocynaceae), popularly known as “silk cotton” has shown antitussive, anti-inflammatory in paw edema model induced by ethanol and even tumor cell antiproliferative activity. Plants contain active principles responsible for the therapeutic properties attributed to them, these are also the cause of adverse reactions that may occur as a result of misuse or counted direct with it. For in vitro cytotoxicity, allowing the investigation of the toxic effect or protection of active ingredients on the cell membrane. The aim of this study was the phytochemical study of the species *C. procera* and assess the cytotoxic potential hemolytic activity in human erythrocytes types A, B and O. With the completion of phytochemical screening was able to identify the presence of two secondary metabolites: flavonoids and steroids in BSE stem of *C. procera*. Regarding the study of the cytotoxicity evaluation, it can be said that the BSE and chloroform fraction of the stem *C. procera*, only the concentration of 10 $\mu$ L/mL was able to induce red blood cell lysis in the blood for all three types (ABO), in other concentrations was observed hemolytic activity. However, this same concentration (10 L/ml) showed no antihemilitica activity, ie, there was no protection of the front of the there erythrocyte blood types (ABO) sponsored by hypotonic medium ( 0.24% NaCl solution) .

**Keywords:** *Calotropis procera*; cytotoxicity; phytochemical screening

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, V. C. et al. Análise toxicológica parcial de uma fração protéica do látex de *Calotropis procera*. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC**, 2005.
- ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. **Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures**. *Journal of Thermal Biology*, 26, 179 – 182, 2006.
- ALAVEZ-SOLANO, D. et al. Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. **Phytochemistry**, V.55, P.953, 2000.
- BARROS, F.E.V. et al. Avaliação das Atividades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato Metanólico de *Calotropis procera* R. Br. (ciúme). **Infarma**, v.16, n.9-10, p.60-4, 2004.
- BATISTA, M. T. A. et al. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3 (supl.)(2), 22-24, 2007.
- BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. **Biosc. Biothcnol. Biochem.** v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.
- BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 2000.
- BRAGA, L.T. **Atuação da *Momordica charantia* sobre a dermatofitose causada por *Microsporum canis***. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, 2003.
- BRANDÃO, R. et al. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug Chem Toxicol**, v. 28, p. 397-407, 2005.
- BRANDÃO, M.G.L. et al. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian official Pharmacopoeia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 ,p. 478-487, 2009.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.
- BUKOWSKA, B & KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**. 152: 73-84, 2004.
- CAIRES, A.C.; GILENO, M.C. Padronização e aplicação da curva de fragilidade osmótica no auxílio diagnóstico de anemias. **Revista Uniara**, v.15, n.2, p.49-58, dez 2012.

CARVALHO et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.29, n. 2. 149-152, 2007.

CARVALHO, J.L.S. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae**. 160p. Tese (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARVALHO, M.S.; OLIVEIRA, D.A.; VALÉRIO, H.M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon Urundeuva* Fr. Allemão. **BioFar**, v. 08, n.2, p.97-103, 2012.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.1, p.99-105, jan./fev. 1998.

COSTA, E.T. **Atividade farmacológica de *Calotropis procera* R. Br. (ciúme) no sistema digestório de roedores**. 41p. Monografia (Curso de Medicina)- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2003.

COSTA, J.L. **Atividade antibacteriana e triterpeno pentacíclico em *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae)**. 43p. Monografia (Curso de Farmácia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2002.

COSTA, L.L.G. **Screening fitoquímico e estudo biológico de *Synadenium grantii* Hook.f. (EUPHORBIACEAE)**. 69p. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual do Centro-Oeste e Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DE SMET, P. A. G. M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**,76: 1–17, 2004.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um Breve Ensaio Sobre Cromatografia. **Química Nova na Escola**, n 17, maio 1998.

DIEYE, A.M. et al. Senegalese pharmacopeia: study of acute toxicity and antitussive activity os *Calotropis procera* AIT (Asclepiadaceae). **Dakar Med.**, v.38, p.69-72, 1993.

FERREIRA, L. S.; MARSOLA, F. J.; TEIXEIRA, S. P. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Dieffenbachia picta* Schott (Araceae) com ênfase na distribuição de cristais, laticíferos e grãos de amido. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 664-670, 2006.

FIRMINO, C. B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 89pp, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOUVÊA-SILVA, L. F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol. Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 53pp, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, 27:1–93, 2006.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Ann Epidemiol**, 15 (9): 686–699, 2005.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

IWU, M. Ethnobotanical approach to pharmaceutical drug discovery strengths and limitations. **Ethnomedicine and Drug Discovery**, 2002.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1221p, 1986.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 5 ed. São Paulo, Ed Nacional, 1997.

LARHSINI, M. et al. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, 68: 371-373, 1997.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Ed. Instituto Plantarum, 512p. 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Nova Química**, São Paulo, v. 25, n. 3, p.429-438, maio 2002.

MAGALHÃES, A. F., et al. Item Bias in the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale: Effects of Physical Disorders and Disability in an Elderly Community Sample. **Phytochemistry**, v.55, p.787, 2000.

MAGALHÃES, H.F., et al. Vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* atrem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, p.407-416, 2010.

MARIGLIANO, V. et al. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, 34 (1), 47-57, 1999.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza. Editora: UFC, 1997.

MAZZANTI, L. et al. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, 37, 657-663, 2002.

MELO, M.M. et al. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. , sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 2(1): 15-20, 2001.

MESHARAM, P.B. Evaluation of some medicinal and natural plants extracts against Teak Skeletonizer *Eutectone machaeralis* walk. **The Indian Forester**, v.121, n.6, p.528- 32, 1995.

MOUSINHO, K.C. et al. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with technetium-99m and morphology of the cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, p. 1139-1146, 2008.

OLIVEIRA, A.V. **Avaliação da atividade hipotensora de extratos e frações das folhas de *Calotropis procera* R. Br.** 79p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.

RANGEL, M. et al. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**. v. 35, p. 305-309, 1997.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603–613, 2001.

SADHU, I. S.; WARE, K.; GRISHAN, M. B. Peroxyl radical-mediated hemolysis: role of lipid, protein and sulphhydryl oxidation. **Free Radical Research Commun**. v. 16, p. 111-122, 1992.

SARAIVA S.R.G.L. et al. Antioxidant activity and acute toxicity of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **African. Journal. Biotechnology**, 11(75): 13998-14006, 2012.

SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, p. 8940-8949, 1995.

SCHIAR, V. P. P. et al. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 139-145, 2007.

SRINIVASAN, K.; KEMPAIAH, R. K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 17, 471-478, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, VP.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC,2003.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUTO, P.C. et al. Biometria de Frutos e Numero de Sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br no Semi-Arido da Paraíba. **Revista Verde**, 3: 108 113, 2008.

TANIRA, M.O. et al. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**, v.41, n.3, p.201-5, 1994.

TOUR, N.; TALELE, G. Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) stem bark. **Journal of Natural Medicines.**, v.65, p.173-179, 2011.

VILARIM, R.M. **Efeitos biológicos do extrato etanólico das cascas do caule do *Ziziphus joazeiro* Mart.** 47p. Monografia (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2015.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, 36: 838-849, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S; MONTANA, J.A. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel, EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora UFRG, p. 577-614, 2004.