



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

**TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIFÚNGICO E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DE *Calotropis procera*
(Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE)**

CARLOS ARTHUR GOUVEIA VELOSO

CAMPINA GRANDE – PB

2015

CARLOS ARTHUR GOUVEIA VELOSO

**TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIFÚNGICO E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DE *Calotropis procera*
(Ait.) Ait.f. (APOCYNACEAE)**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivana Maria Fchine

Co-orientadora: Prof^a. Dra. 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.

V432t Veloso, Carlos Arthur Gouveia.
Triagem fitoquímica e avaliação do potencial antifúngico e citotóxico das folhas de *Calotropis procera* (Ait.) ait.f. (Apocynaceae) [manuscrito] / Carlos Arthur Gouveia Veloso. - 2015.
56 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 Fachine, Departamento de Farmácia".

1. *Calotropis procera*. 2. Fitoquímica. 3. Citotoxicidade. 4. Antifúngico. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

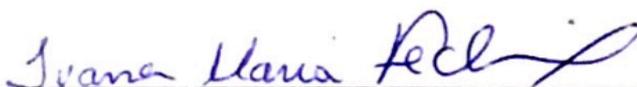
CARLOS ARTHUR GOUVEIA VELOSO

**TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIFÚNGICO E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DE *Calotropis procera* (Ait.)
Ait.f. (APOCYNACEAE)**

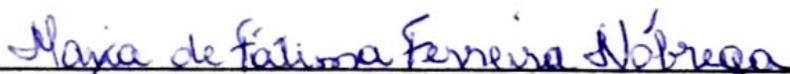
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação de Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

Campina Grande – PB, 2015.

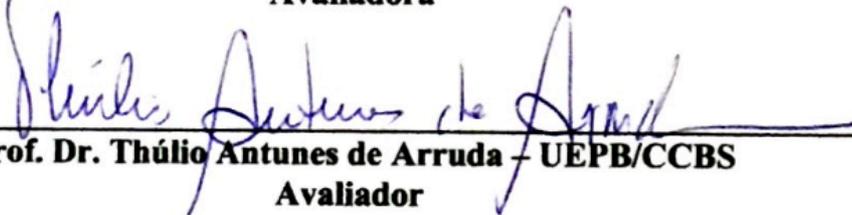
Data da Aprovação: 16/06/2015



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

Dedico este trabalho aos meus pais, Fabíola Oliveira Gouveia e Flávio Veloso Maurício Filho, à minha tia Nelma Maria Oliveira Gouveia e aos meus amigos César, Amanda e Samara.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida.

Agradeço a minha mãe Fabíola Gouveia, heroína que me ajudou e me incentivou nas horas difíceis. Ao meu pai Flávio Veloso, que apesar da distância, foi muito importante para mim.

Aos minhas tios Nelma, Márcia e Fábio, que me deram tanto apoio.

Aos meus amigos César Dantas, Amanda Costa, Samara Lowisi e Fernanda Nóbrega que foram sempre muito fiéis, fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Ivana Fachine e Co-orientadora Prof^a Dra. Camila Montenegro pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Assim como às minhas grandes mestres Prof^a Dr^a Lindomar Belém, Prof^a Dr^a Rossana Miranda, que ajudaram bastante na minha formação científica.

Aos Professores Avaliadores Dr. Thúlio Arruda e MSc. Maria de Fátima, pela grande colaboração em meu trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Na Caatinga, vegetação predominante do semiárido brasileiro, encontram-se exemplares da família Apocynaceae. Uma representante dessa família é a *Calotropis procera*, popularmente conhecida no por “ciúme”, “ciumeira”, “algodão-de-seda”, “leiteiro” ou “queimadeira”, que possui uma ampla distribuição geográfica. Diferentes partes dessa planta são utilizadas para o tratamento de enfermidades na medicina tradicional. O estudo das propriedades antimicrobianas de uma planta medicinal é de grande importância pelo fato do uso constante de antibióticos estar provocando o desequilíbrio da ecologia humana e da resistência microbiológica. Os objetivos deste trabalho foram realizar uma triagem fitoquímica e uma análise citotóxica e antifúngica do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fase Clorofórmica (FCHCl₃) de folhas de *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (Apocynaceae). Inicialmente, foi realizado um *screening* fitoquímico qualitativo no EEB. A partir do EEB obteve-se a sua fase clorofórmica. Em seguida, foi avaliada a citotoxicidade do extrato e da sua fase, através da determinação do potencial hemolítico e da Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE). Com as mesmas amostras do ensaio anterior foram avaliados seus potenciais antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o método da microdiluição em placas. O *screening* fitoquímico indicou a presença de flavonoides no EEB. Através da avaliação citotóxica foi possível determinar uma citotoxicidade moderada, diretamente proporcional à concentração (10 - 1000 µg/mL) e aos compostos presentes no material vegetal testado, já que os resultados variaram entre 2,8 % e hemólise total, comparando com o controle negativo, o qual representava a ausência de hemólise. Somente a concentração de 10 µg/mL não levou a uma hemólise estatisticamente relevante no EEB e FCHCl₃, sendo a única que pôde-nos fornecer resultados para a avaliação da FOE, a qual mostrou que as amostras vegetais não evitaram a lise dos eritrócitos humanos, levando em consideração o controle positivo, representando a hemólise total. O crescimento das cepas de *C. albicans* só foi inibido pelo extrato etanólico (CIM - 4000 µg/mL), enquanto que o crescimento *C. tropicalis* só foi inibido pela fase clorofórmica (CIM - 2000 µg/mL). Foi detectada a necessidade de estudos mais aprofundados para a investigação dos compostos presentes nas folhas de *C. procera* e o isolamento dos mesmos, para devidos testes biológicos.

Palavras-chaves: *Calotropis procera*, Fitoquímica, Citotoxicidade, Antifúngico.

ABSTRACT

In Caatinga, predominant vegetation of the Brazilian semiarid, are copies of the Apocynaceae family. A representative of this family is the *Calotropis procera*, popularly known by the “ciúme”, “ciumeira”, “algodão-de-seda”, “leiteiro” or “queimadeira”, which has a wide geographical distribution. Different parts of this plant are used for the treatment of diseases in traditional medicine. The study of antimicrobial properties of medicinal plants is very important because of the constant use of antibiotics causing the imbalance of human ecology and microbial resistance. The objectives of this study were to conduct a phytochemical screening and a cytotoxic and antifungal analysis of the crude ethanolic extract (CEE) and the chloroformic phase (FCHCl₃) from leaves of *Calotropis procera* (Apocynaceae). Initially, the qualitative phytochemical screening in CEE was made. From the CEE was obtained its chloroformic phase. Then the cytotoxicity of the extracts was evaluated by determining the hemolytic potential and Erythrocyte Osmotic Fragility (EOF). The same samples of the previous test were assessed for their potential antifungal front of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using the microdilution method plates. The phytochemical screening indicated the presence of flavonoids in CEE. Through the cytotoxic evaluation was possible to determine a moderate cytotoxicity that is directly proportional to the concentration (10 - 1000 µg/mL) and compounds presents in the plant tested, the results varied between 2.8% and total hemolysis, compared with the negative control, which represented the absence of hemolysis. Only the concentration of 10 µg/mL did not lead a statistically significant hemolysis in CEE and FCHCl₃, being the only one who could give us results for the evaluation of EOF, which showed that plant samples did not prevent the lysis of human erythrocytes, taking into account the positive control, representing total haemolysis. The growth of *C. albicans* strains was inhibited only by the crude ethanolic extract (CIM - 4000 µg/mL), whereas *C. tropicalis* growth was inhibited only by chloroform phase (CIM - 2000 µg/mL). It has detected the need for further study to investigate compounds present in the leaves of *C. procera* and isolation to biological tests.

Keywords: *Calotropis procera*, Phytochemistry, Cytotoxicity, Antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>Calotropis procera</i> com inflorescência.....	17
Figura 2 - Esquema geral de biossíntese dos flavonoides e isoflavonoides.....	20
Figura 3 - Estrutura básica dos flavonoides.....	20
Figura 4 - Cultura de <i>C. albicans</i> (Esq.) e <i>C. tropicalis</i> (Dir.) em Ágar ChromID™ Candida/ Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2	23
Figura 5 - Esquema metodológico utilizado.....	26
Figura 6 - Esquema da metodologia da utilizada na determinação da CIM do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fase Clorofórmica (FCHCl ₃) das folhas de <i>C. procera</i> através técnica da microdiluição em placa.....	32
Figura 7 - Avaliação da CIM do EEB e da FCHCl ₃ das folhas de <i>C. procera</i> frente à <i>C.</i> <i>albicans</i> pela técnica de microdiluição.....	37
Figura 8 - Avaliação da CIM do EEB e da FCHCl ₃ das folhas de <i>C. procera</i> frente à <i>C.</i> <i>tropicalis</i> pela técnica de microdiluição.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enquadramento taxonômico de <i>C. procera</i>	13
Tabela 2 – Resultados do <i>screening</i> fitoquímico do EEB das folhas de <i>C. procera</i>	33
Tabela 3 – Grau de hemólise provocado pelo extrato EEB de folhas de <i>C. procera</i>	37
Tabela 4 – Grau de hemólise provocado pela FCHCl ₃ de folhas de <i>C. procera</i>	38
Tabela 5 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de <i>C. procera</i> frente às linhagens de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> pela técnica de microdiluição.....	43
Tabela 6 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Fase Clorofórmica do EEB das folhas de <i>C. procera</i> frente às linhagens de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> pela técnica de microdiluição.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Avaliação da citotoxicidade do Extrato Etanólico Bruto de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-EEB) em eritrócitos do tipo A.....	34
Gráfico 2 – Avaliação da citotoxicidade do Extrato Etanólico Bruto de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-EEB) em eritrócitos do tipo B.....	35
Gráfico 3 – Avaliação da citotoxicidade do Extrato Etanólico Bruto de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-EEB) em eritrócitos do tipo O.....	35
Gráfico 4 – Avaliação da citotoxicidade da Fase Clorofórmica de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-FCHCl3) em eritrócitos do tipo A.....	36
Gráfico 5 – Avaliação da citotoxicidade da Fase Clorofórmica de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-FCHCl3) em eritrócitos do tipo B.....	36
Gráfico 6 – Avaliação da citotoxicidade da Fase Clorofórmica de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-FCHCl3) em eritrócitos do tipo O.....	37
Gráfico 7 – Atividade antihemolítica do Extrato Etanólico Bruto de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-EEB) sobre os tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c) quando em solução hipotônica (NaCl 0,24 %).....	39
Gráfico 8 – Atividade antihemolítica da Fase Clorofórmica de folhas de <i>C. procera</i> (FCP-FCHCl3) sobre os tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c) quando em solução hipotônica (NaCl 0,24 %).....	41

LISTA DE SIGLAS

ATCC.....	American Type Culture Collection
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. procera</i>	<i>Calotropis procera</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
EEB.....	Extrato Etanólico Bruto
e.p.m.	Erro padrão da média
et al.	Entre outros autores
FCHCl ₃	Fração Clorofórmica
FOE.....	Fragilidade Osmótica Eritrocitária
LAFIT.....	Laboratório de Fitoquímica
r.p.m.....	Rotações Por Minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Estudo Etnobotânico	13
2.1.1	Enquadramento taxonômico de <i>Calotropis procera</i>	13
2.1.2	Família Apocynaceae, espécie <i>Calotropis procera</i>	14
2.2	Análise fitoquímica de espécies vegetais.....	16
2.3	Compostos fenólicos - Flavonoides	17
2.4	Análises citotóxicas e Avaliação do potencial Hemolítico e Anti-hemolítico	19
2.5	Aspectos gerais de <i>Candida albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	20
2.6	Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários das plantas medicinais.....	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Local da Pesquisa	24
4.2	Coleta e identificação das folhas de <i>C. procera</i>	24
4.3	Preparo do material vegetal	25
4.4	Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de <i>C. procera</i>	25
4.5	Screening fitoquímico qualitativo do EEB das folhas de <i>C. Procera</i>	25
4.5.1	Metabólitos solúveis em metanol.....	26
4.5.2	Metabólitos solúveis em clorofórmio	27
4.5.3	Metabólitos solúveis em água	27
4.6	Obtenção da fase clorofórmica (FCHCl ₃)	28
4.7	Ensaio de citotoxicidade.....	29
4.7.1	Avaliação do potencial hemolítico	29
4.7.2	Avaliação da fragilidade osmótica.....	30
4.8	Análise estatística	30
4.9	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de folhas de <i>C. procera</i>	33
5.2	Screening fitoquímico do EEB de folhas de <i>C. Procera</i>	33

5.3	Obtenção da Fase Clorofórmica (FCHCl ₃) de folhas de <i>C. procera</i>	33
5.4	Ensaio de citotoxicidade	34
5.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	42
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira é uma das mais ricas fontes de novas substâncias bioativas, e a vasta diversidade de tradições a ela associadas é apenas mais um reflexo deste imenso potencial, além de uma valiosa ferramenta no estudo e exploração de seus recursos (NOGUEIRA, 2010).

Segundo Bruschi e colaboradores (2000), as plantas atuam como fontes de agentes terapêuticos, modelos para novos medicamentos sintéticos ou ainda como matéria-prima para a produção semi-sintética de moléculas de alta complexidade, o que justifica os 25% dos fármacos utilizados na atualidade serem de origem vegetal.

Durante a última metade do século XX a prática da fitoterapia tornou-se difundida por todo o mundo. Isto é suficiente, em parte, para a valorização do sistema de medicina tradicional e a identificação de plantas medicinais que têm mostrado um significativo poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (ELVIN-LEWIS, 2001).

Muitos esforços estão sendo empreendidos pelas indústrias nacionais para desenvolver produtos fitoterápicos a partir da flora nacional, mas poucos exemplos de sucesso podem ser mencionados, como o Acheflan®, produzido com o óleo essencial da erva baleeira (*Varronia curassavica*), planta nativa da Floresta Atlântica e usada na medicina tradicional para tratar inflamações. Da flora brasileira, menos de 5% das espécies representam a fitoterapia mundial, significando que um verdadeiro arsenal terapêutico de princípios ativos podem ser extraídos da natureza (CALIXTO, 2005).

Na Caatinga, vegetação predominante do semiárido brasileiro, encontram-se exemplares da família Apocynaceae, dicotiledôneas bem evoluídas. Essa família é encontrada predominantemente nos trópicos e subtropicais e menos frequentes em regiões temperadas (STRUWE, 1994; RIBEIRO, 1999).

A *Calotropis procera*, popularmente conhecida no Brasil por “ciúme”, “ciumeira”, “algodão-de-seda”, “leiteiro” ou “queimadeira” (MELO, 2001), ocorre naturalmente na África e Ásia (BRANDES, 2005), mas possui hoje uma ampla distribuição geográfica, sendo comum na região nordeste do Brasil. Na medicina tradicional, diversas partes da planta são indicadas no tratamento de úlceras, tumores e doenças hepáticas (TANIRA, 1994).

Segundo Gallegos-Olea et al. (2008), vários estudos realizados com as folhas da *C. procera* mostraram diversas atividades biológicas, como do tipo hipotensora; analgésica e anti-inflamatória; atividade antibacteriana contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella*

flexneri, *Hafnia alvei* e *Staphylococcus aureus*; atividade anticolinérgica muscarínica, entre outras.

A importância desses estudos se dá pelo fato que o uso constante de antibióticos vem provocando o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiológica, intensificado em países onde a população tem por hábito a automedicação, utilizando-os de maneira indevida. Existe assim, uma necessidade de tentar elaborar fármacos antimicrobianos modernos, principalmente, devido aos números crescentes de cepas resistentes aos agentes hoje disponíveis, aliado a alta toxicidade e baixa eficácia (RANG et al., 2007).

O estudo da resistência microbiana, geralmente é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos etiológicos (ANTUNES et al., 2006).

Além de testes que comprovem a atividade biológica da planta medicinal, se faz necessário um estudo pré-clínico de segurança, o qual avalia o seu potencial tóxico, determinando assim a sua faixa segura de utilização pelos humanos, atendendo às normas das agências reguladoras de saúde (BRASIL, 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é detentor da maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012). Embora não se tenha muito investimento para pesquisas com plantas medicinais, calcula-se que pelo menos metade das plantas contenham substâncias chamadas de princípios ativos, as quais têm propriedades curativas e preventivas para muitas doenças (LORENZI et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2001), apesar do uso milenar das plantas, apenas um número relativamente pequeno da biodiversidade das espécies presentes no planeta possuem estudos que comprovem sua aplicação terapêutica, eficácia e segurança.

O uso de plantas medicinais pelo homem ocorre há milhares de anos com a finalidade de curar suas enfermidades, o que proporcionou um vasto conhecimento sobre as ações terapêuticas e a toxicidade de determinados espécies. O conhecimento sobre as plantas medicinais inicialmente era adquirido pela transmissão oral de informações e relatos, hoje além das informações empíricas há também as registradas em herbários e as publicações científicas (BALUNAS et al., 2005; VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertados o interesse de vários pesquisadores (BELÉM, 2002; FONTENELLE, 2008).

2.1 Estudo Etnobotânico

2.1.1 Enquadramento taxonômico de *Calotropis procera*

A descrição botânica da *Calotropis procera* segue de acordo com Tabela 1.

Tabela 1: Enquadramento taxonômico de *C. procera*.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta

Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Gênero	<i>Calotropis</i> R. Br.
Espécie	<i>Calotropis procera</i> (Ait) Ait.f.

2.1.2 Família Apocynaceae, espécie *Calotropis procera*

Plantas da família Apocynaceae estão incluídas fitogeneticamente na ordem Gentianales e subclasse Asteridae e são caracterizadas normalmente pela presença de látex (RAPINI, 2000). Essa família contém entre 3700 a 5100 espécies em 250 a 550 gêneros (NICHOLAS, 1994), sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais e são menos frequentes em regiões temperadas. Na flora brasileira são catalogadas como apocináceas mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (RIBEIRO et al., 1999). Plantas do gênero *Calotropis* já tiveram muita importância na indústria têxtil (PÉREZ-ARBELAÉZ, 1978).

No Brasil, a planta *Calotropis procera*, pertencente à família Apocynaceae, foi introduzida como planta ornamental, em época desconhecida, apresentando uma bonita inflorescência no verão (Figura 1). Após sua introdução no país, passou a se comportar como invasoras de áreas de pastagens, sendo encontrada em vários Estados da Região Nordeste e nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Goiás e no Distrito Federal mas é no Nordeste que estão estabelecidas as grandes populações da espécie (FABRICANTE, et al. 2013).

Figura 1. Espécie de *Calotropis procera* com inflorescência



Fonte: Department of Agriculture and Food of Western Australia. Disponível em: <https://www.agric.wa.gov.au>. Acessado em 28/05/2015.

A *Calotropis procera* apresenta vários nomes populares, de acordo com a região onde se desenvolve: Algodão-de-seda, flor-de-seda, algodão-da-praia, leiteiro, paina-de-sapo, saco-de-velho, queimadeira, pé-de-balão, janaúba, ciúme e ciumeira.

A família dessa planta caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de alcaloides e flavonoides. Biologicamente, muitos alcaloides agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, por isso, são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (PEREIRA, 2007).

Os flavonoides são uma classe de substâncias que têm mostrado possuir uma ampla variedade de atividades farmacológicas, dentre as quais encontram-se de maneira destacada a antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, e de alguma forma também a hipotensora (AHMED, 2005; ALI, 2000; ZHANG, 2001).

Popularmente, diferentes partes dessa planta possuem um número variado de propriedades farmacológicas, tais como: caule, frutos, flores, raízes, folhas e o látex. O látex é utilizado via tópica para tratamento de verrugas, suas raízes são utilizadas em maceração em água fria para tratamento de infecções gastrointestinais, renais e de ovários (SILVA, 2015).

Estudos realizados com as suas flores, demonstraram atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas (SMIT et al., 1995), além da atividade hepatoprotetora em

hepatite causada por paracetamol (RAMACHANDRA et al., 2007) e efeito anti-helmíntico *in vivo* e *in vitro* (IQBAL et al., 2005).

Na medicina tradicional indiana, essa planta tem sido utilizada para tratar uma variedade de doenças incluindo lepra, úlceras, tumores, hemorroidas, reumatismo, doenças do baço, fígado e abdômen (WARRIER et al., 1994). No estado do Ceará a planta é usada pela população de baixa renda para doenças de pele causadas por bactérias ou fungos (RABELO, 2014).

De acordo com Colombo e colaboradores (2007), o tecido epidérmico das folhas de *C. procera* é formado por uma camada unisseriada de células epidérmicas, em ambas as faces com a presença de cutícula nas paredes celulares, o que possivelmente reduz a transpiração. A disposição da epiderme, o fechamento dos estômatos entre outras funções, deve reduzir a perda de água por transpiração nas plantas que vivem em ambientes secos, auxiliar na defesa contra insetos predadores e diminuir a incidência luminosa.

2.2 Análise fitoquímica de espécies vegetais

De início, a descoberta das propriedades terapêuticas dos vegetais era meramente intuitivo/empírico ou, às vezes, pela observação dos animais, que buscavam nos vegetais o alívio para suas afecções (ALVES et al., 2001).

A diversidade molecular dos vegetais está relacionada ao seu metabolismo secundário, sendo este responsável pela produção de compostos químicos necessários para sobrevivência da planta. Os metabólitos secundários se diferenciam em cada espécie para atender uma função ecológica específica. Esta diversidade de moléculas produzidas pelo metabolismo secundário faz com que as plantas sejam uma fonte rica de material de partida para descoberta de moléculas bioativas e desenvolvimento de fármacos (IWU, 2002; RATES, 2001; GURIB-FAKIM, 2006; HALBERSTEIN, 2005).

Recentemente, as plantas medicinais passaram a ser estudadas de forma criteriosa e sistemática, do ponto de vista científico, com a finalidade de identificar seus componentes químicos e comprovar as suas ações farmacológicas, bem como detectar efeitos indesejáveis. Neste sentido, o Brasil com sua enorme biodiversidade, apresenta grande potencial para a pesquisa e exploração na área de plantas medicinais, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos (COSTA MARQUES et al., 2014). Apesar da riqueza da flora brasileira, com cerca de 500.000 espécies, existe consenso sobre a

insuficiência de estudos científicos sobre o assunto (FERREIRA, 2002), pois dados anteriores revelam que apenas 15 % foram avaliadas fitoquimicamente (VERPOORTE, 2000).

Para as informações qualitativas acerca dos principais grupos de metabólitos presentes na amostra, é necessário realizar uma triagem fitoquímica preliminar (*screening* fitoquímico). Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundário relevante da mesma (SIMÕES et al., 2011). O *screening* fitoquímico utiliza diversas reações específicas que indicam qualitativamente a presença de determinados metabólitos, seja por mudança de coloração, precipitação, formação de gás ou fluorescência.

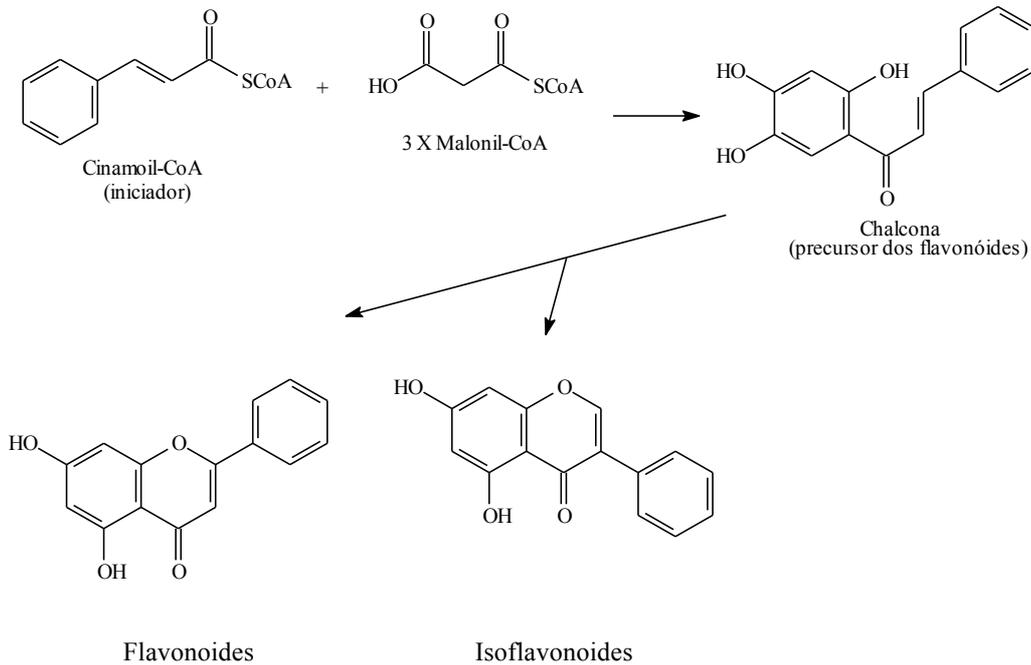
O panorama para a fitoquímica é muito mais importante e decisivo para o Brasil, ao considerarmos sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades para o desenvolvimento de novos medicamentos. Torna-se, portanto, necessária a implantação de um programa comprometido, contínuo e eficiente, como o requerido para qualquer conquista de valor na área científico-tecnológica (YUNES et al., 2001).

Estudos realizados por Melo et al. (2005) e Gallegos-Olea et al. (2008), encontraram através de *screenings* fitoquímicos, principalmente, glicosídeos flavônicos nas folhas de *C. procera*.

2.3 Compostos fenólicos - Flavonoides

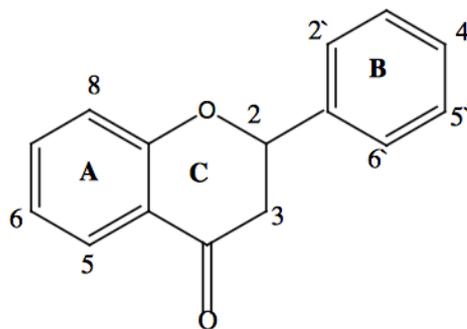
Os flavonoides são compostos fenólicos, onipresentes na fotossíntese celular e responsáveis pela maior parte da coloração amarela, alaranjada, vermelha, violeta e azul de flores e frutos. Comumente, são encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules, flores, vinho, chá, própolis e mel, representando o grupo mais comum de compostos fenólicos na alimentação humana (CUSHNIE et al., 2009; SPENCER et al., 2009).

Os flavonoides são compostos de biossíntese mista derivados a partir dos fenilpropanoides, conhecidos como unidades formadoras de compostos fenólicos de maior complexidade. Especificamente em relação à sua biossíntese (Figura 2), os flavonoides são formados através da condensação de duas rotas: ácido chiquímico e acetil-CoA (ZUANAZZI et al., 2011; ANDERSEN et al., 2006).

Figura 2. Esquema geral de biossíntese dos flavonoides e isoflavonoides

Fonte: Adaptado (SANTOS et al., 2000).

Os flavonoides são compostos constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis, sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um benzopirano ou cromano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A, formando o núcleo fundamental dos flavonoides “fenil-benzopirano” (Figura 3) (DORNAS et al., 2009).

Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: Adaptado (DORNAS et al., 2009).

Dentre os interesses farmacêuticos, os flavonoides têm lugar de destaque devido às propriedades antitumorais, antialérgicos, antiinflamatórios e antivirais, sendo atualmente estudados no combate à AIDS (YAO et al., 2004). Eles têm a capacidade de estabilizar

radicais livres e espécies reativas de oxigênio, sendo considerados potentes antioxidantes naturais. Isto se deve aos grupos hidroxila ligados à estrutura do anel (BALASUNDRAM et al., 2006).

Esses compostos são muito importantes para o sistema circulatório, uma vez que regulam a permeabilidade capilar, impedindo a saída de proteínas e células sanguíneas, permitindo o fluxo constante de oxigênio, dióxido de carbono e de nutrientes essenciais (PEREIRA, 2002).

2.4 Análises citotóxicas e Avaliação do potencial Hemolítico e Anti-hemolítico

A segurança é um dos parâmetros de grande importância no desenvolvimento de diversos fármacos. Os ensaios de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações para os pesquisadores clínicos sobre as doses capazes de provocar efeitos tóxicos em animais de laboratório (ALMEIDA, 2006).

Vários modelos experimentais são utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro*, dentre estes, destaca-se o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos que é utilizado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005; BATISTA, 2013). Este estudo, utilizado na investigação toxicológica preliminar, parte do princípio que a membrana eritrocítica é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas (AKI et al., 1991; BATISTA, 2013).

A hemólise refere-se à lise ou ruptura das membranas das hemácias permitindo a liberação da hemoglobina para o plasma, tendo como consequência a hemoglobinemia. A quantidade de hemoglobina livre no plasma depende da capacidade e da velocidade de remoção do pigmento pelo organismo de cada indivíduo, sendo fisiológica a quantidade de 6 mg%. Quando este valor supera 100 mg% a hemoglobina passa a ser filtrada pelos rins e quando excessivamente alto (superiores a 3.000 mg%), pode promover lesão renal (CARVALHO et al., 2008; KALEGARI et al., 2011; PAULA et al., 2014).

No teste de atividade hemolítica, a hemoglobina liberada no meio após a ruptura de eritrócitos provocada por uma substância tóxica é detectada pela leitura de absorbância do sobrenadante da cultura (MONTAGNER, 2007).

O teste da hemólise é recomendado pela Organização Mundial da Saúde, OMS (1998) no seu manual de controle de qualidade de produtos vegetais. Muitas moléculas promissoras são descartadas logo de início, devido à sua citotoxicidade (FRÖHNER, 2003).

Associado aos efeitos de hemólise, também é abordada em pesquisas a atividade anti-hemolítica, que consiste na capacidade de proteção dos glóbulos vermelhos por determinados metabólitos secundários presentes em algumas plantas, diante de um estresse osmótico.

2.5 Aspectos gerais de *Candida albicans* e *C. tropicalis*

A importância das infecções fúngicas vem crescendo significativamente na prática clínica. Dentre essas infecções, predominam aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* (KONTOYIANNIS et al., 2002), que nos Estados Unidos, causou um aumento em cerca de 200% dos casos de micoses nas últimas três décadas (PFALLER et al., 2007).

A infecção por *Candida* sp. pode ser facilitada por vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos, sendo os mais comuns a imunossupressão por várias causas, como neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica (MALUCHE et al., 2008). O desenvolvimento desta fungemia em pacientes hospitalizados pode aumentar a média de internação hospitalar em 10 dias e elevar a mortalidade em 14,5 a 49% (GIRI et al., 2012).

Essas leveduras, sob determinadas condições, podem comportar-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas, potencialmente fatais (DE REPENTIGNY et al., 2000; LEUNG et al., 2000). Podem também estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais (SUNDQVIST et al., 1998). As espécie mais isoladas dessas infecções são *C. albicans* e *C. tropicalis* (Figura 4) (SANT'ANA et al., 2002).

Importantes variações geográficas vêm sendo observadas na etiologia das infecções por *Candida* sp. Na América do Sul o predomínio é de *C. tropicalis* e *C. albicans* (COLOMBO et al., 2003). O aumento das espécies "*Candida não-albicans*" é evidenciado em alguns estudos, os quais apontam que a emergência dessas espécies está relacionada ao uso profilático ou empírico de drogas antifúngicas (COLOMBO et al., 2006).

Figura 4. Cultura de *C. albicans* (Esq.) e *C. tropicalis* (Dir.) em Ágar ChromID™ Candida/ Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2



Fonte: bioMérieux. Disponível em <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/20-chromid-candida---sabouraud-gentamicin-chloramphenicol-2-agar>. Acessado em 04/06/2015.

Um ponto de diferenciação morfológica entre *C. albicans* e *C. tropicalis* é a presença do tubo germinativo na *C. albicans* que se apresenta como uma extensão filamentososa de uma única célula, descrito como um tubo sem constrição na sua origem (KONEMAN et al., 1997). Outro ponto de diferenciação entre essas espécies é a presença de clamidoconídios (clamidosporos), que são estruturas de resistência encontradas em *C. albicans* e são formadas quando o fungo se encontra em um local onde não há todos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento (WHITEWAY et al., 2007). Entre as espécies existem também diferenças antigênicas e de sequências de DNA (BRENA et al., 2004).

Sob o ponto de vista terapêutico, as espécies de leveduras *não-albicans*, como a *C. tropicalis*, caracterizam-se por apresentar particularidades em relação à sua sensibilidade a diversos antifúngicos. Acredita-se que, em parcela significativa dos casos, os isolados de *Candida "não-albicans"* são menos sensíveis a azólicos quando comparados a amostras de *Candida albicans*, devido ao aumento da expressão do gene ERG11, associada com uma mutação missense nesse gene (VANDEPUTTE et al., 2005).

Devido ao aumento da resistência aos antifúngicos atuais, faz-se necessária a realização de estudos *in vitro* acerca da ação antifúngica de extratos naturais.

2.6 Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários das plantas medicinais

Os produtos secundários têm um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, aumentando a probabilidade de sua sobrevivência, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas (FUMAGALI et al., 2008). Os vegetais superiores produzem substâncias antibióticas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros (VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

Na década de 80, o desenvolvimento da pesquisa científica levou a identificação de mais de 120 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas (ALVES et al., 2001), foi a partir dessa década que o interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais (RAUHA et al., 2000).

Em geral, a atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muuroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (PIETARINEN, 2006). O efeito destes compostos é observado principalmente em fungos causadores de problemas de saúde em humanos, como *Candida* spp (RODRIGUEZ-MATURINO et al., 2015).

Apesar dos mecanismos de ação estarem incipientemente caracterizados, estes parecem ser associados ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células. Não existe um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

Atualmente, estudos sobre atividades de produtos naturais têm sido enfatizados e eles buscam, principalmente, a atividade destes sobre micro-organismos, uma vez que, as drogas existentes se tornam menos eficazes diante dos mecanismos de resistência (COUTINHO et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudos fitoquímicos e biológicos do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da fase clorofórmica (FCHCl₃) de folhas de *Calotropis procera* (Apocynaceae).

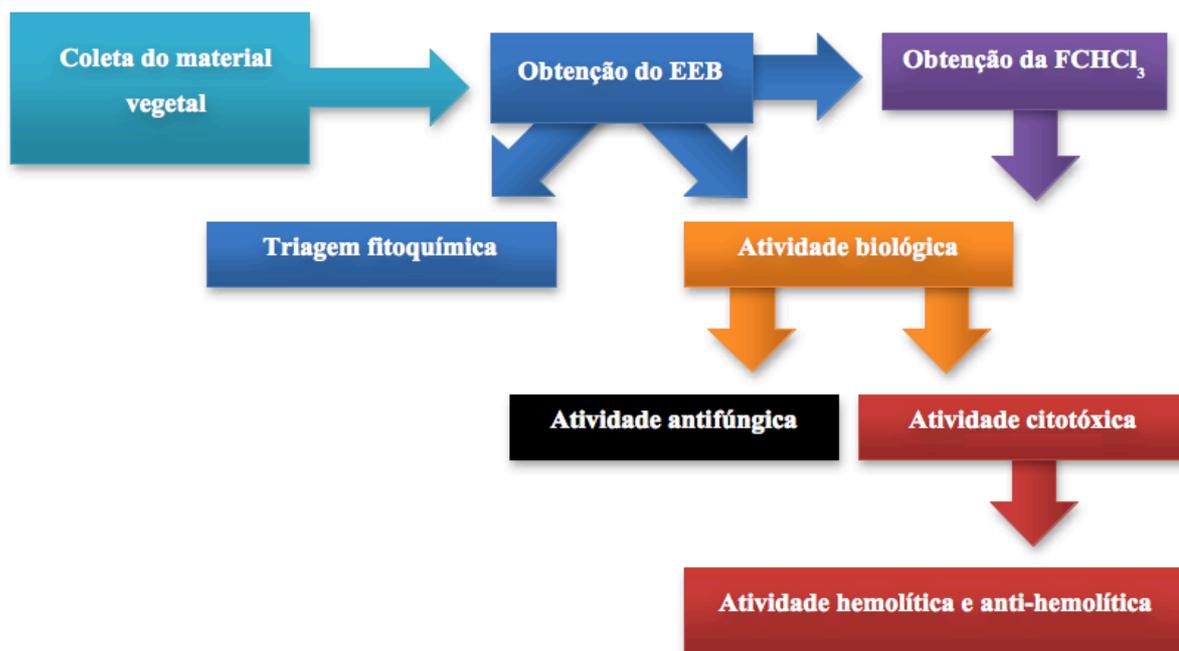
3.2 Objetivos específicos

- Produzir um extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *C. procera*;
- Realizar um *screening* fitoquímico do EEB de folhas de *C. procera*;
- Particionar o EEB de folhas de *C. Procera*;
- Análise do potencial hemolítico e anti-hemolítico do EEB e da fase clorofórmica de folhas de *C. procera* em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O;
- Avaliar o potencial antifúngico e determinar uma possível Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEB e da fase clorofórmica de folhas de *C. Procera* sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

4 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento seguiu-se o esquema metodológico representado resumidamente na Figura 5.

Figura 5. Esquema metodológico utilizado



Fonte: Autor, 2015.

4.1 Local da Pesquisa

As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica - LAFIT e as microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antimicrobiana, ambos localizados no Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, no município de Campina Grande. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BIOGER) na Universidade Federal da Paraíba - UFPB, no município de João Pessoa, em colaboração com as Professoras Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa e MSc. Camila de Albuquerque Montenegro.

4.2 Coleta e identificação das folhas de *C. procera*

A planta *C. procera* (Apocynaceae), foi coletada na zona litorânea 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).

4.3 Preparo do material vegetal

A planta coletada foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar, com temperatura de 40° C, por aproximadamente duas semanas. As folhas secas foram submetidas à trituração em um moinho de facas. Após a moagem foi obtido o pó das folhas que totalizaram-se 625,19 g de massa, que foi direcionado a preparação do Extrato Etanólico Bruto.

4.4 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *C. procera*

O pó seco e pulverizado das folhas pesando 625,19 g foi submetido à maceração exaustiva. A solução alcóolica foi retirada e filtrada a cada 72 horas e o líquido extrativo armazenado em recipientes de vidro âmbar devidamente etiquetado e fechado. O solvente foi retirado em um rotaevaporador à pressão reduzida a uma temperatura de 50° C, nos fornecendo um peso seco do extrato etanólico bruto de 91,96 g.

4.5 Screening fitoquímico qualitativo do EEB das folhas de *C. Procera*

Essa avaliação preliminar foi executada através do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de folhas de *Calotropis procera*, buscando verificar as classes de metabólitos solúveis em metanol, clorofórmio e em água.

Para a realização da triagem foram preparadas três soluções para facilitar a detecção dos metabólitos secundários, dependendo de suas solubilidades:

- **Solução metanólica;**

Pesaram-se 120 mg de extrato em um béquer e logo após realizou a dissolução em 24 mL de metanol.

- **Solução clorofórmica;**

Pesaram-se 75 mg de extrato em um béquer e logo após realizou a dissolução em 15 mL de clorofórmio.

- **Solução aquosa;**

Para a solução aquosa pesaram-se 140 mg de extrato que foram dissolvidos em 30 mL de água.

Para facilitar a dissolução, todas as preparações foram levadas a banho-maria e ultrassom (MATOS, 1997). Foram preparadas ainda outras duas soluções, uma de Vanilina e outra de Cloreto Férrico, ambas a 1%.

4.5.1 Metabólitos solúveis em metanol

4.5.1.1 Alcaloides

A pesquisa qualitativa 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%. A acidificação transforma os alcaloides em sais solúveis em água, capazes de complexar com iodo e metais pesados. Em cada tubo foram adicionadas duas gotas de cada reativo geral para alcaloides e a reação é considerada positiva quando as seguintes características se desenvolveram para cada reativo:

- Mayer (mercúrio tetra-iodeto de potássio): formação de precipitado branco ou leve turvação branca;
- Dragendorff (tetra-iodeto bismuto de potássio): formação de precipitado de coloração tijolo;
- Bouchardat (iodo/iodeto de potássio): formação de precipitado de coloração alaranjada;
- Bertrand (ácido sílico-túngico): formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

4.5.1.2 Heterosídeos flavônicos

Em tubo de ensaio com uma alíquota da solução metanólica, foram adicionados lentamente raspas de magnésio e cinco gotas de HCl concentrado, para observar mudança de

coloração (vermelho à amarelo) em caso positivo.

4.5.1.3 Flavonóis

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL da solução metanólica. Ao resíduo foi adicionado 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 secura. Ao resíduo adicionou-se 5 mL de éter etílico e o transferiu para um tubo de ensaio para verificação de fluorescência. A reação oxalo-bórica determina aparecimento de fluorescência amarela esverdeada para flavonóis; flavanonas e isoflavonas não apresentam fluorescência e os compostos antocianícos coram-se, mas não produzem fluorescência.

4.5.1.4 Catequinas

Foram adicionados 3 mL da solução aquosa de Vanilina a 1% a um tubo contendo uma alíquota de 3 mL da solução mãe de metanol. Posteriormente foi adicionado 1 mL de HCl. A revelação da coloração vermelha intensa indica reação positiva.

4.5.2 Metabólitos solúveis em clorofórmio

4.5.2.1 Esteroides e triterpenos

Para a identificação desses metabólitos, realizou-se a Reação de Liberman-Bouchard.

Uma quantidade de 10 mL da solução clorofórmica foi filtrada sobre carvão ativado. O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio completamente seco e logo após adicionou-se 1 mL de anidrido acético efetuando-se uma leve agitação. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de H₂SO₄ concentrado e o tubo de ensaio foi novamente agitado.

A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito. A Coloração verde indica função hidroxila na posição três e duplo enlace em cinco e seis ou sete e oito. Coloração amarela, possível presença de metila no carbono número cartorze.

4.5.3 Metabólitos solúveis em água

4.5.3.1 Polissacarídeos

Foram transferidos 5 mL da solução aquosa para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica resultado positivo.

4.5.3.2 Fenóis e taninos

Para a pesquisa de taninos os seguintes reagentes foram utilizados:

- Cloreto Férrico: adicionaram-se 5 mL da solução aquosa a um tubo de ensaio e a ele foi acrescido 5 gotas de Cloreto Férrico. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração marrom indica polifenóis.
- Solução de Gelatina: transferiu-se respectivamente 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL de extrato aquoso para tubos de ensaio e adicionou-se 2 mL de solução aquosa de gelatina 0,5% . O desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.

4.5.3.3 Saponinas

Para determinação da pesquisa de heterosídeos saponínicos foi utilizado um tubo de ensaio para com 5 mL da solução aquosa. O tubo foi agitado energicamente por dois minutos. A presença de saponinas é confirmada formação de espuma com altura superior a um centímetro (1 cm).

4.6 Obtenção da fase clorofórmica (FCHCl₃)

A partição é um processo de separação que objetiva a extração de uma substância de uma fase líquida em outra fase líquida.

Para este procedimento foram pesados 79,8 g de extrato etanólico bruto das folhas de *Calotropis procera*, que posteriormente foi dissolvido em 400 ml de solução hidroalcoólica metanol-água na proporção 3:1, em seguida transferiu-se esta mistura para uma ampola de separação, no qual foi adicionado inicialmente hexano em quantidade suficiente para a coloração desaparecer, e homogeneizou-se cuidadosamente por agitação durante 1 minuto. Esperou-se que as camadas se separassem e por fim a fase superior, correspondente ao extrato hexânico foi removida. Este procedimento foi repetido para melhor extração dos componentes

solúveis no hexano, porém foi utilizado uma quantidade menor do solvente, em seguida a fase hexânica obtida foi concentrada em rotaevaporador e reservada.

Para a obtenção do extrato clorofórmico (FCHCl_3), foi adicionada uma quantidade suficiente de clorofórmio à ampola de separação contendo a solução hidrometanólica, posteriormente homogeneizou-se durante 1 minuto. Esperou-se que as camadas se separassem e foi recolhida a camada inferior (clorofórmica). Este procedimento foi repetido para melhor extração dos componentes solúveis em clorofórmio, posteriormente a fase clorofórmica foi concentrada em rotaevaporador e reservada.

4.7 Ensaios de citotoxicidade

Os eritrócitos humanos (A, B e O) foram oriundos de tubos contendo sangue, coletado de três voluntários adultos e aparentemente saudáveis no Laboratório de Análises Clínicas – LAC da UEPB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade.

Foram testadas quatro concentrações (10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) da solução de cada extrato (EEB e FCHCl_3) de folhas de *C. procera*, preparada com DMSO 5%.

4.7.1 Avaliação do potencial hemolítico

Os concentrados de eritrócitos do tipo A, B e O foram obtidos através da coleta de 5 mL de sangue humano em um tubo de ensaio com EDTA. Os eritrócitos foram lavados três vezes consecutivas com solução salina 0,9 % e centrifugados a 2500 r.p.m. por 5 minutos, com posterior separação do plasma.

Com o concentrado de eritrócitos, foi preparada uma suspensão a 0,5 (v/v) com solução salina 0,9 %. Em tubos de Falcon, foram adicionados 2 mL da suspensão de eritrócitos, logo após, uma alíquota de cada amostra foi adicionada nos tubos. Os tubos foram incubados a 25 ± 2 °C por 1 h e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria (540 nm) para verificar provável hemólise. O controle negativo foi utilizado com apenas a suspensão de eritrócitos a 0,5% (0 % de hemólise), a hemólise total (controle positivo – 100 % de hemólise) foi obtida com Triton X-100 e a porcentagem de hemólise foi calculada em relação a esse valor. Este experimento foi realizado em triplicata, igualmente para os três tipos sanguíneos e os resultados foram expressos como percentual da média aritmética simples.

4.7.2 Avaliação da fragilidade osmótica

Dando sequência ao procedimento anterior, desprezou-se o sobrenadante de todos os tubos, ressuspenderam-se os eritrócitos em 2 mL de NaCl na concentração de 0,24 %. Os tubos foram incubados a 25 ± 2 °C por 20 min e centrifugados novamente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria (540 nm) para caracterizar a atividade anti-hemolítica. A hemólise total (controle positivo) foi obtida com solução hipotônica (NaCl 0,24%), foram utilizados os valores obtidos para o controle negativo no protocolo da atividade hemolítica, e a porcentagem de anti-hemólise foi calculada em relação a esse valor. Este experimento foi realizado em triplicata, igualmente para os três tipos sanguíneos e os resultados foram expressos como média aritmética simples

Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em % de hemólise em comparação ao grupo controle positivo.

4.8 Análise estatística

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 $p < 0,05$.

4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

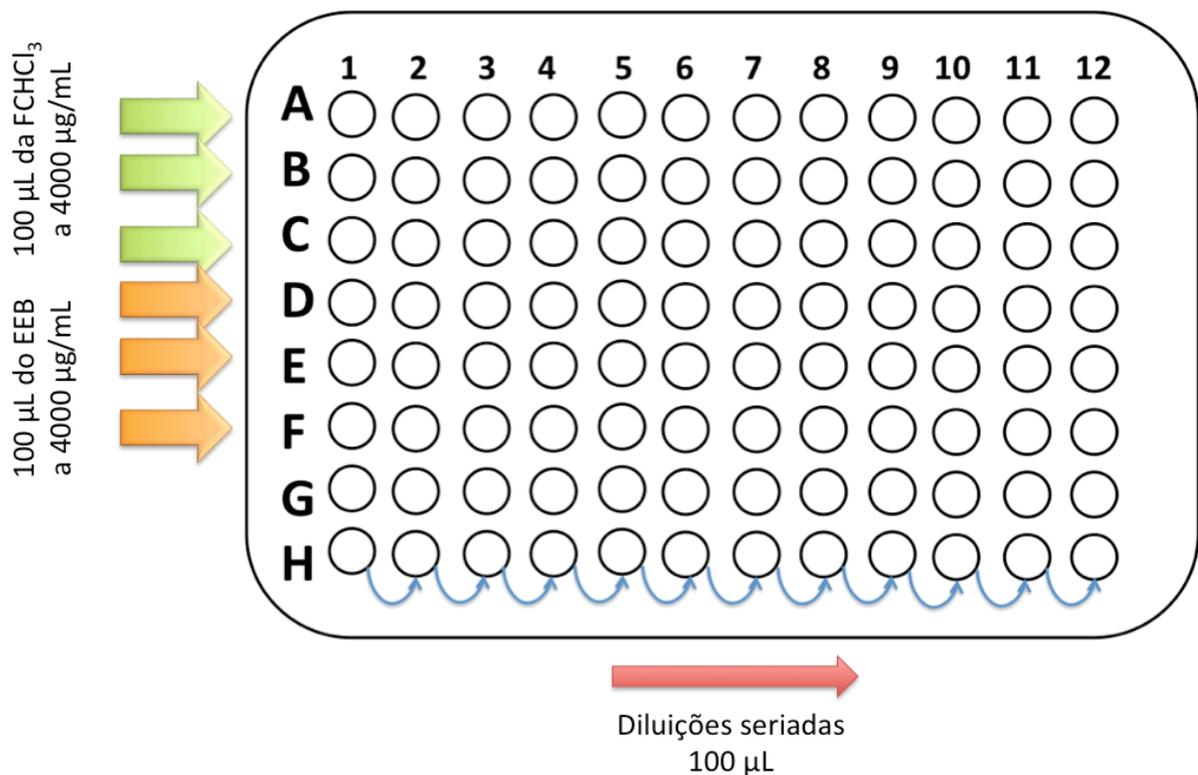
Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizadas cepas de referência do American Type Culture Collection - ATCC[®] *C. albicans* (ATCC 76645) e *C. tropicalis* (ATCC 13803). Para preparação do inóculo foram selecionadas colônias isoladas de cultura jovem (24 – 48 horas) e com auxílio de uma alça de transferência imergidas em 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85%). A turvação do inóculo foi comparada visualmente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

Foram utilizadas duas placas de microdiluição estéreis com cavidades cuja capacidade é de até 500 μ L, dispostas em 8 linhas e 12 colunas, num total de 96 cavidades, onde foram inseridos 100 μ L de Caldo Müeller-Hinton.

Uma alíquota do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fase Clorofórmica (FCHCl₃) foi dissolvida em água destilada de maneira a se obter duas soluções estoque a 8 mg/mL.

Foram adicionados às linhas A, B e C, da primeira coluna, 100 μL da FCHCl_3 e às linhas D, E e F, primeira coluna, 100 μL do EEB e depois, foram homogeneizados e retirados 100 μL de cada poço da coluna 1 para a coluna 2, e assim sucessivamente até a coluna 12, obtendo-se, então, as concentrações do extrato (4000 a 1,953125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 6). Na primeira microplaca, adicionou-se uma alíquota de 10 μL do inóculo de *C. albicans* em cada poço e na segunda microplaca, adicionou-se uma alíquota de 10 μL do inóculo da cepa de *C. tropicalis* em cada poço. Incubaram-se as microplacas fechadas a 37°C por 24 horas.

Figura 6. Esquema da metodologia da utilizada na determinação da CIM do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e da Fase Clorofórmica (FCHCl_3) das folhas de *C. procerca* através técnica da microdiluição em placa



Fonte: Autor, 2015.

Em outra microplaca utilizou-se em toda coluna 1, 100 μL de Caldo Müeller-Hinton e 100 μL de água destilada (diluyente dos extratos), como controle de esterilidade (controle positivo), na coluna 2, utilizou-se 100 μL de Caldo Müeller-Hinton e 10 μL inóculo de *C. albicans* (Linhas A, B e C) e 10 μL inóculo de *C. tropicalis* (Linhas D, E e F), como controle de crescimento (controle negativo). A placa foi fechada e incubada por 37 °C por 24 h.

Após esse período de incubação, foram adicionados 20 μ L da solução aquosa de resazurina a 0,01% em cada cavidade, como indicador colorimétrico de óxido-redução para caracterizar a viabilidade celular. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 2 horas e lidas após esse tempo.

A leitura foi realizada mediante composição visual caracterizada pela mudança de cor nas cavidades, onde a cor rosa indica viabilidade bacteriana e a cor azul indica inviabilidade das células bacterianas. Determinou-se como CIM a menor concentração da substância testada onde não foi visualizado crescimento do microorganismo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de folhas de *C. procera*

Do total de 625,19 g de pó de folhas foi obtido 91,96 g do EEB como um rendimento bruto de aproximado de 14,71 %.

5.2 Screening fitoquímico do EEB de folhas de *C. Procera*

Após a realização da triagem fitoquímica do extrato etanolico bruto de folhas de *Calotropis procera*, obtiveram-se os dados qualitativos mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados do *screening* fitoquímico do EEB das folhas de *C. procera*.

<i>Metabólito Secundário</i>	<i>Teste de Identificação</i>
<i>Alcaloides</i>	Bouchardat (-)/ Mayer (-)/ Drangendorff (-)/ Bertrand (-)
<i>Esteroides e triterpenos</i>	Reação de Liberman-Bouchard (-)
<i>Fenóis e taninos</i>	FCl ₃ (-) /Gelatina 0,5% (-)
<i>Heterosídeo flavônico</i>	++
<i>Flavonóis</i>	++
<i>Saponina – Espuma</i>	-
<i>Catequinas</i>	-
<i>Polissacarídeos</i>	-

Os testes fitoquímicos indicaram a presença de flavonoides no EEB das folhas de *Calotropis procera*, tanto na forma de heterosídeos como de flavonóis, conforme Tabela 2. Resultado semelhante foi obtido por Melo, Gonçalves e Saturnino (2001).

5.3 Obtenção da Fase Clorofórmica (FCHCl₃) de folhas de *C. procera*

A partir da triagem fitoquímica, buscou-se um método para a melhor extração dos flavonoides, nesse caso, fez-se a partição do EEB utilizando solventes em polaridades crescentes, sendo o clorofórmio o solvente final.

Para Zuanazzi e colaboradores (2011), o clorofórmio permite a extração de flavonoides como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonoides, isoflavonas entre outros compostos.

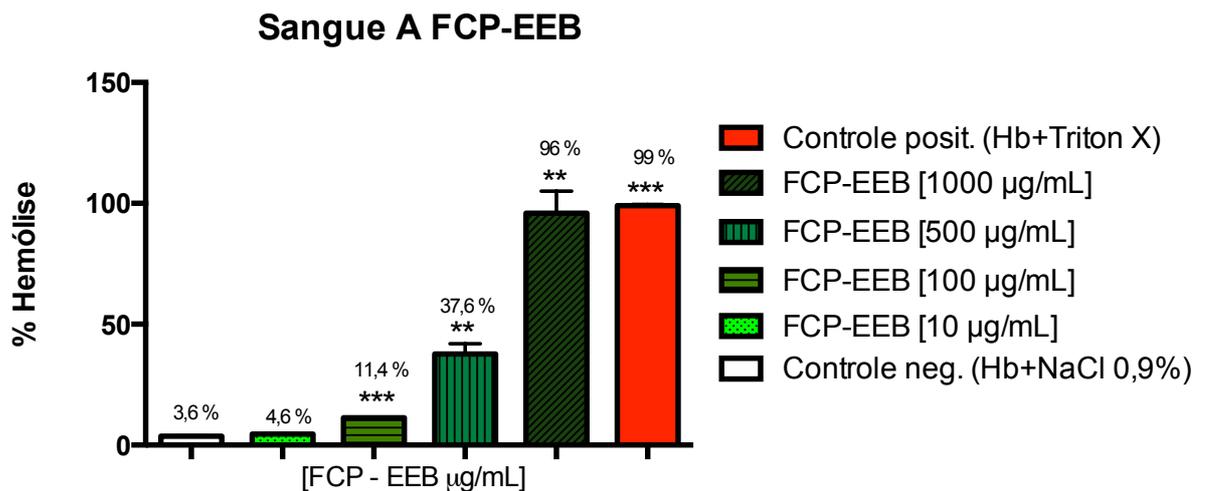
Com a partição de 79,8 g do EEB foram obtidos 4,07 g de Fase Clorofórmica com um rendimento bruto de aproximado de 5,1 %.

5.4 Ensaios de citotoxicidade

5.4.1 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

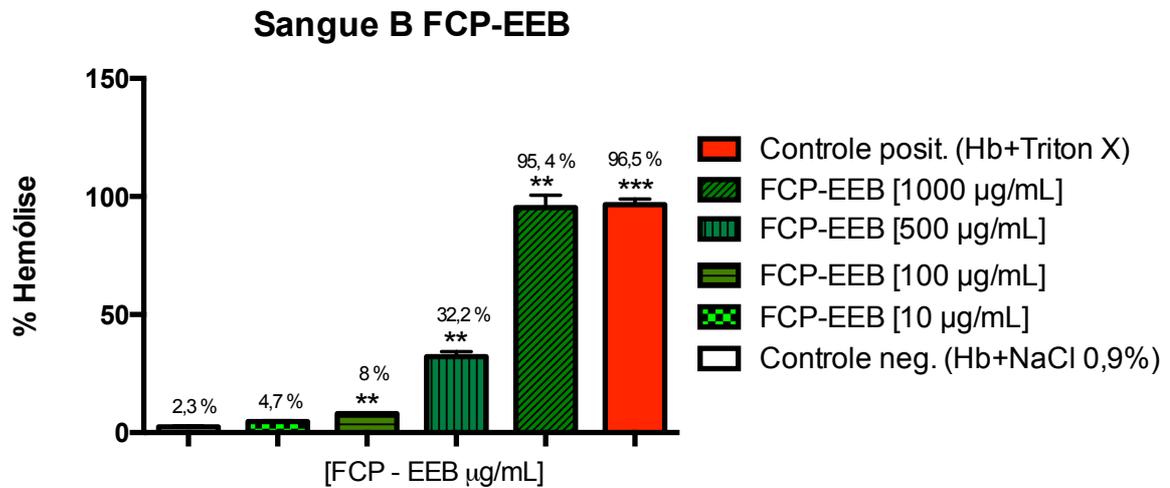
Objetivando a avaliação da atividade citotóxica inicial, foram realizados os ensaios de atividade hemolítica. Nos Gráficos de 1 a 3 estão representados os resultados obtidos com extrato etanólico bruto das folhas de *C. procera* para os tipos sanguíneos (A,B e O). Os resultados demonstraram que o extrato nas concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma atividade hemolítica estatisticamente relevante em comparação ao grupo incubado com solução salina. O extrato etanólico na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ não induziu hemólise, produzindo um resultado com baixo nível de significância.

Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade do Extrato Etanólico Bruto de folhas de *C. procera* (FCP-EEB) em eritrócitos do tipo A



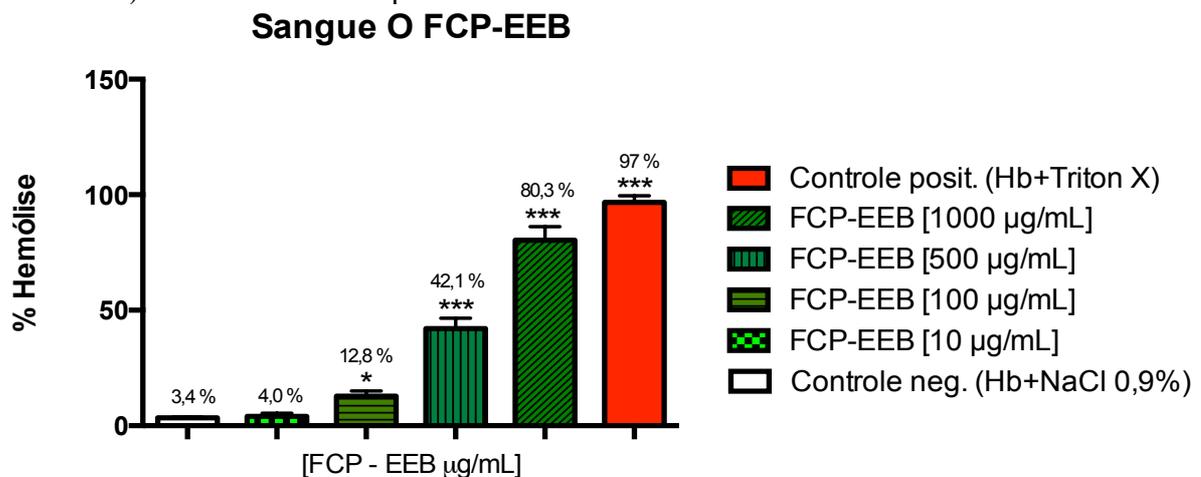
Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

Gráfico 2. Avaliação da citotoxicidade do Extrato Etanólico Bruto de folhas de *C. procera* (FCP-EEB) em eritrócitos do tipo B



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

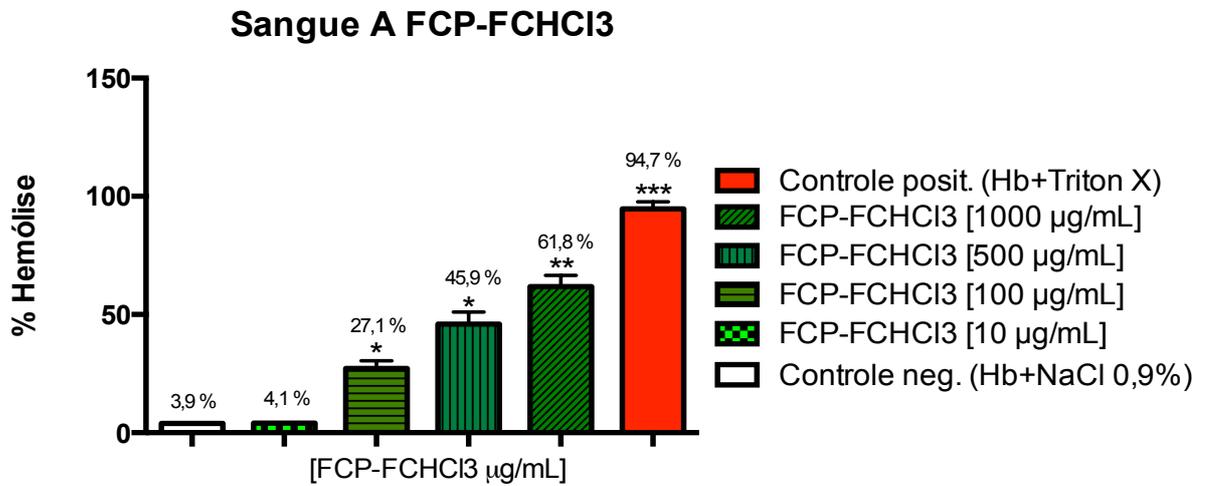
Gráfico 3. Avaliação da citotoxicidade do Extrato Etanólico Bruto de folhas de *C. procera* (FCP-EEB) em eritrócitos do tipo O



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (n=3).

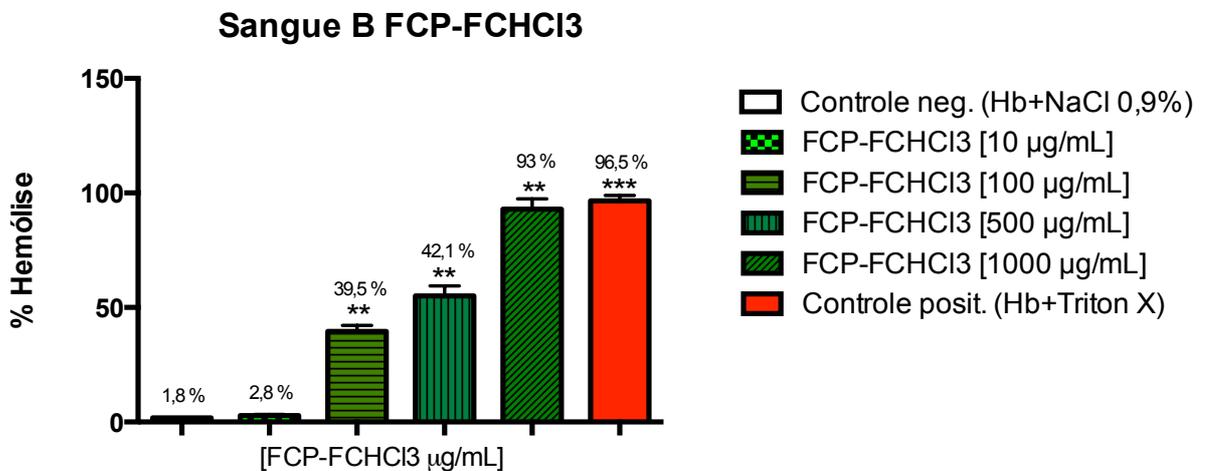
Os Gráficos 4, 5 e 6 representam a avaliação do potencial hemolítico da fase clorofórmica do extrato etanólico bruto das folhas de *C. procera* em eritrócitos humanos de todos os tipos sanguíneos (A, B e O, respectivamente). Da mesma forma dos resultados obtidos nos ensaios hemolíticos do EEB, pôde-se perceber que somente a concentração de 10 µg/mL não induziu hemólise, enquanto todas as outras concentrações testadas obtiveram uma atividade hemolítica estatisticamente relevante em relação ao controle negativo.

Gráfico 4. Avaliação da citotoxicidade da Fase Clorofórmica de folhas de *C. procera* (FCP-FHCI3) em eritrócitos do tipo A



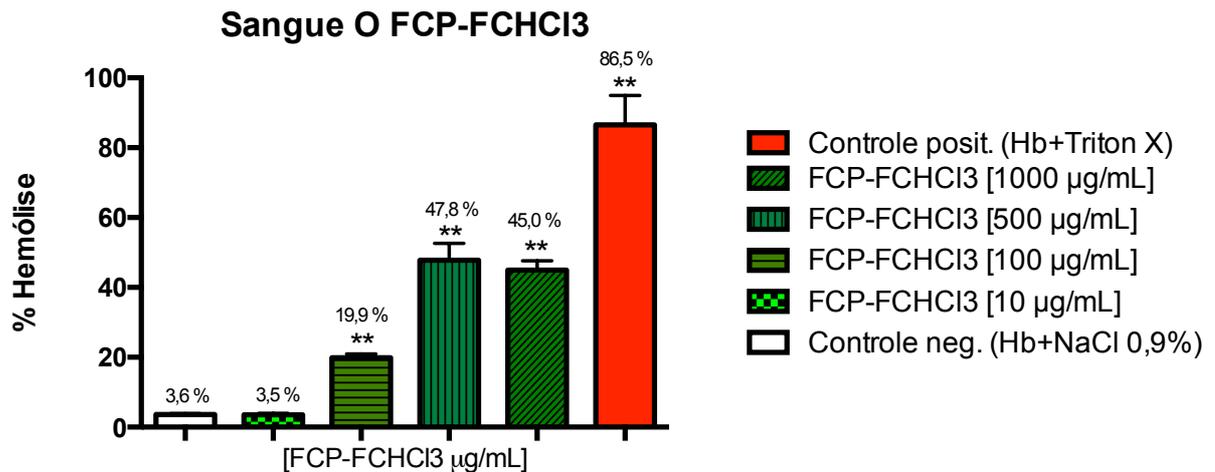
Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

Gráfico 5. Avaliação da citotoxicidade da Fase Clorofórmica de folhas de *C. procera* (FCP-FHCI3) em eritrócitos do tipo B



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

Gráfico 6. Avaliação da citotoxicidade da Fase Clorofórmica de folhas de *C. procera* (FCP-FHCI3) em eritrócitos do tipo O



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t ** $p < 0,01$ (n=3).

Em um estudo, Rangel e colaboradores (1997), concluíram que um percentual de hemólise entre 0 a 40% é considerado baixo, 40 a 80% moderado e maior que 80% alto. Sendo assim, pode-se sugerir o grau de hemólise que cada concentração do Extrato Etanólico Bruto (Tabela 3) e da Fase Clorofórmica (Tabela 4) provocou em eritrócitos de cada tipo sanguíneo.

Tabela 3: Grau de hemólise provocado pelo extrato EEB de folhas de *C. procera*

		TIPO SANGUÍNEO		
		A	B	O
Concentração do extrato (µg/mL)	10	baixo (4,6 %)	baixo (4,7 %)	baixo (4 %)
	100	baixo (11,4 %)	baixo (8 %)	baixo (12,8 %)
	500	baixo (37,6 %)	baixo (32,2 %)	moderado (42,1 %)
	1000	alto (96 %)	alto (95,4 %)	alto (80,3 %)

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 4: Grau de hemólise provocado pela FCHCl₃ de folhas de *C. procera*

		TIPO SANGUÍNEO		
		A	B	O
Concentração do extrato (µg/mL)	10	baixo (4,1 %)	baixo (2,8 %)	baixo (3,5 %)
	100	baixo (27,1 %)	baixo (39,5 %)	baixo (19,9 %)
	500	moderado (45,9 %)	moderado (42,1 %)	moderado (47,8 %)
	1000	moderado (61,8 %)	alto (93 %)	moderado (45 %)

Fonte: Dados do estudo.

Os compostos xenobióticos reduzidos, como, por exemplo, os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando meta-hemoglobina, podendo causar uma anemia hemolítica imunológica (BUKOWSKA et al., 2004; BAIN, 2007).

No EEB estudado, detectou-se a presença de compostos fenólicos e estes, na maioria das vezes podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (BIANCHI et al., 2000). O desempenho dos antioxidantes depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção.

Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos (DECKER, 1997; HALLIWELL et al., 1995).

Na pesquisa de Zohra e Fawzia (2014), foi testada a atividade hemolítica do extrato metanólico das folhas de *C. procera*, nas concentrações de 50 até 500 µg/mL, detectando-se um baixo potencial hemolítico. No presente trabalho, utilizou-se uma concentração mais alta (1000 µg/mL), levando a um aumento considerável da média. Sendo assim, pode-se constatar uma equivalência entre os dois estudos, em todas as concentrações testadas.

A pequena variação nos resultados dos ensaios de hemólise, com a mesma planta, pode ser justificada pela mudança da composição dos compostos extraídos do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, que pode mudar significativamente, de acordo com a região, época de coleta, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo (SIMÕES et al., 2011).

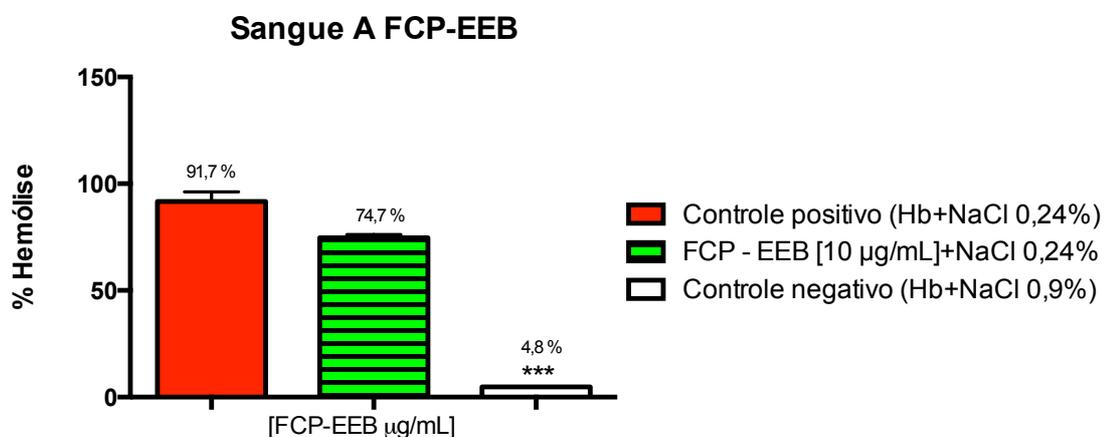
5.4.2 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos (FOE)

A avaliação da fragilidade osmótica foi realizada tanto no EEB quanto da FCHCl₃, somente utilizaram-se os dados das concentrações de 10 µg/mL já que estas não geraram respostas hemolíticas significativas e hipoteticamente poderiam proteger os eritrócitos humanos de uma possível lise celular.

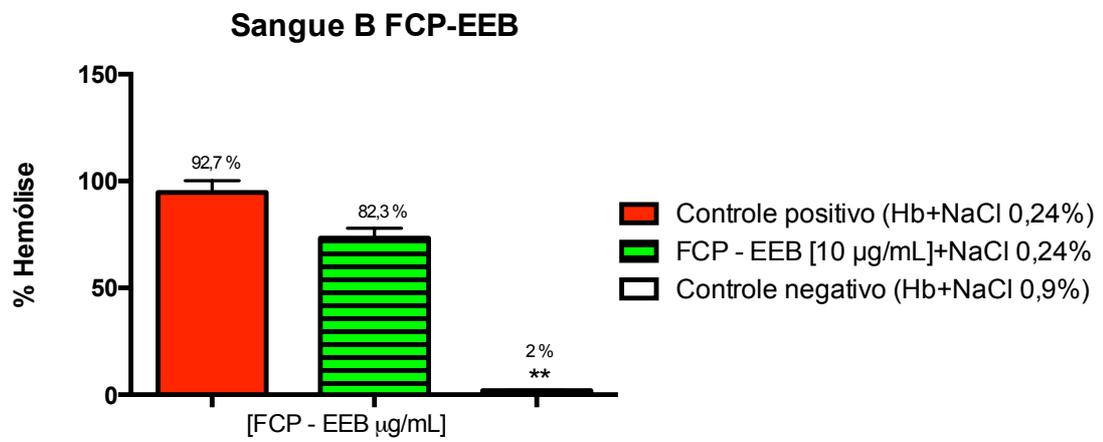
Os Gráficos 7 e 8 mostram os efeitos do material vegetal sobre a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) e estes não protegeram os eritrócitos da fragilidade osmótica da membrana promovida pelo meio hipotônico (NaCl 0,24%) nos três tipos sanguíneos, e portanto não apresentam atividade anti-hemolítica comparando-se ao grupo controle positivo (máximo de hemólise).

Gráfico 7. Atividade anti-hemolítica do Extrato Etanólico Bruto de folhas de *C. procera* (FCP-EEB) sobre os tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c) quando em solução hipotônica (NaCl 0,24 %).

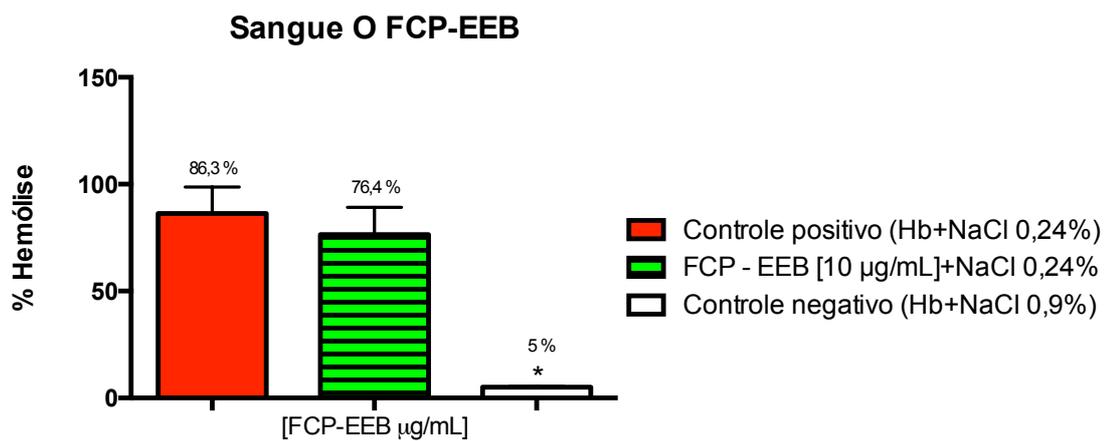
a)



b)



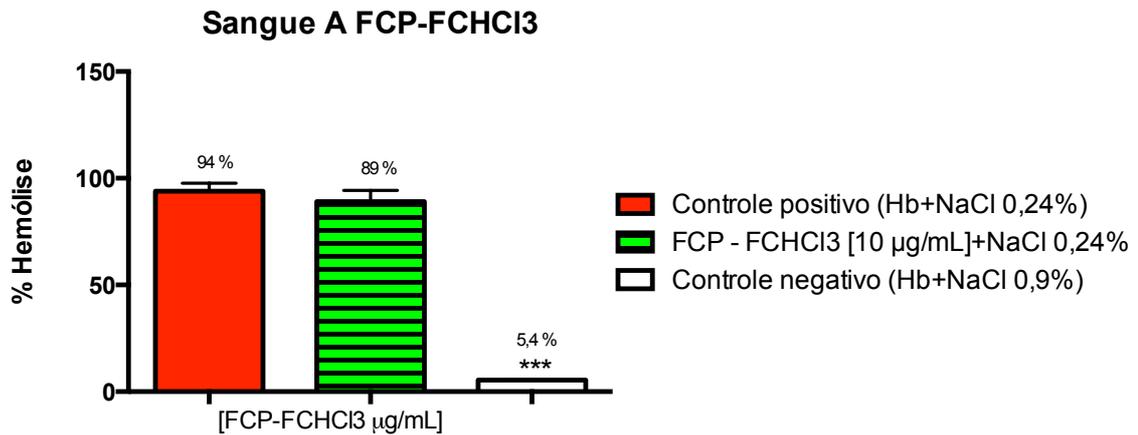
c)



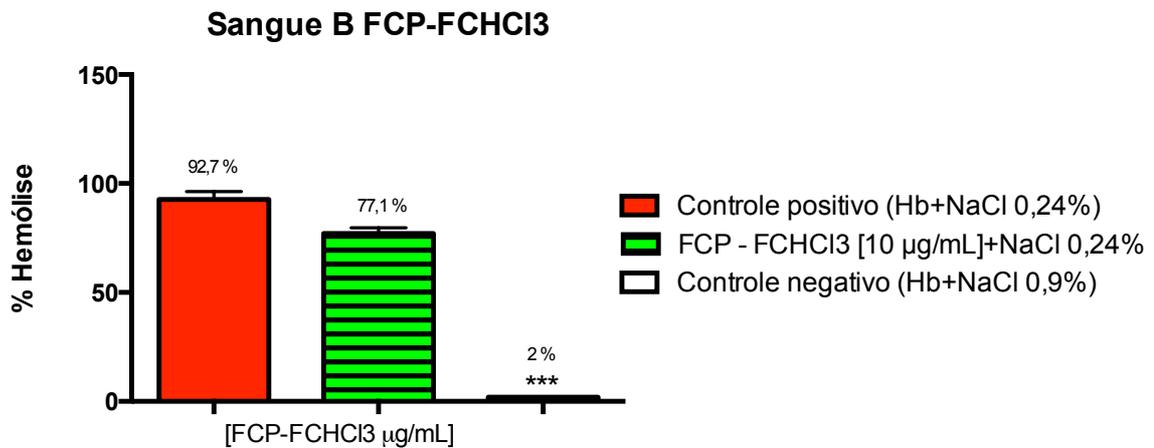
Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

Gráfico 8. Atividade anti-hemolítica da Fase Clorofórmica de folhas de *C. procera* (FCP-FCHCl₃) sobre os tipos sanguíneos A (a), B (b) e O (c) quando em solução hipotônica (NaCl 0,24 %).

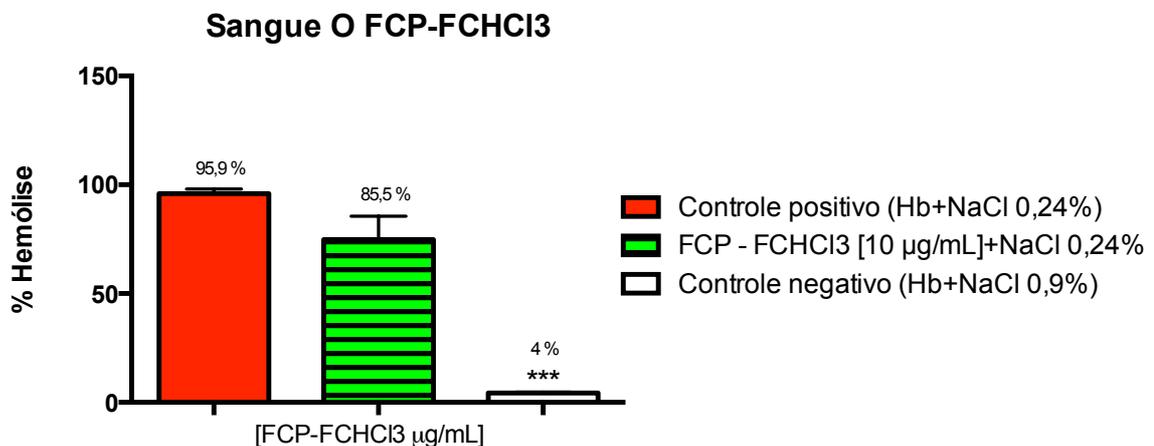
a)



b)



c)



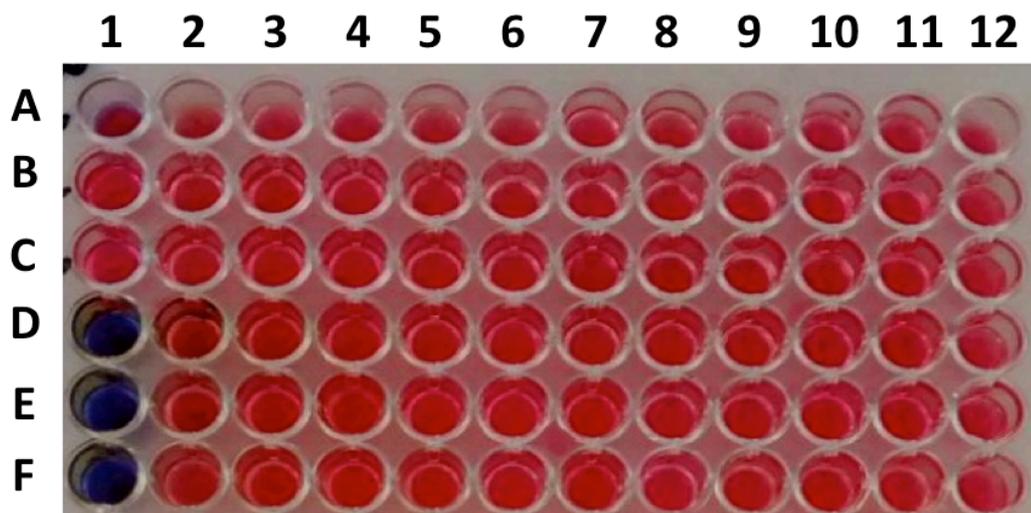
Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por teste t *** $p < 0,001$ (n=3).

A integridade da membrana celular depende do t nus celular e de substâncias que podem interferir na matriz da membrana (MOUSINHO et al.,2008). Várias substâncias podem modificar esse equilíbrio e se torna importante avaliar este potencial quando uma substância   uma possível candidata a aplica es farmacológicas. A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) avalia a influência qualitativa de substâncias sobre os eritrócitos (MOUSINHO et al., 2008) e expressa   habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006). Foi possível perceber a partir dessa avalia o, que tanto o extrato etanólico bruto como sua fase clorofórmica, nas concentra es testadas, não protegeram a membrana dos eritrócitos da lise celular.

5.5 Determina o da Concentra o Inibitória Mínima (CIM)

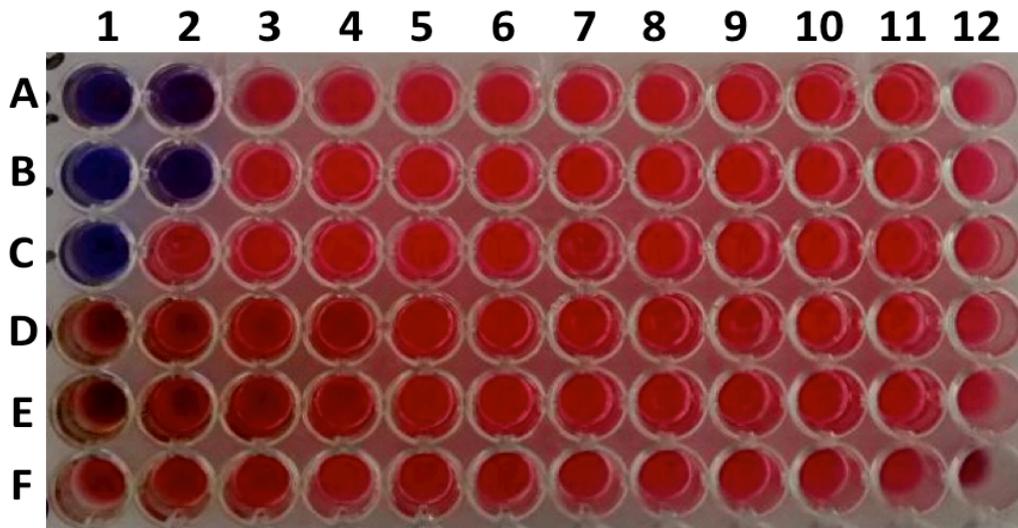
A Concentra o Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Etanólico Bruto (EEB) frente às cepas de *C. albicans* (Figura 7) foi de 4000 $\mu\text{g/mL}$, não sendo possível determinar a CIM desse extrato frente às cepas de *C. tropicalis* (Figura 8). A CIM da Fase Clorofórmica frente às cepas de *C. tropicalis* (Figura 8) foi de 2000 $\mu\text{g/mL}$ não sendo possível determinar a CIM dessa fase frente às cepas de *C. albicans* (Figura 7). Os resultados desses testes estão expostos nas Tabelas 3 e 4.

Figura 7. Avalia o da CIM do EEB e da FCHCl_3 das folhas de *C. procera* frente   *C. albicans* pela técnica de microdilui o



C. albicans ATCC 76645 (Colunas 1-12); FCHCl_3 (Linhas A-C), EEB (Linhas D-F) ambos nas concentra o de 4000 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 1), 2000 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 2); 1000 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 3); 500 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 4); 250 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 5); 125 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 6); 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 7); 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 8); 15,625 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 9); 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 10); 3,90625 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 11); 1,953125 $\mu\text{g/mL}$ (coluna 12).

Figura 8. Avaliação da CIM do EEB e da FCHCl₃ das folhas de *C. procera* frente à *C. tropicalis* pela técnica de microdiluição



C. tropicalis ATCC 13806 (Colunas 1-12); FCHCl₃ (Linhas A, B e C), EEB (Linhas D, E e F) ambos nas concentração de 4000 µg/mL (coluna 1), 2000 µg/mL (coluna 2); 1000 µg/mL (coluna 3); 500 µg/mL (coluna 4); 250 µg/mL (coluna 5); 125 µg/mL (coluna 6); 62,5 µg/mL (coluna 7); 31,25 µg/mL (coluna 8); 15,625 µg/mL (coluna 9); 7,8125 µg/mL (coluna 10); 3,90625 µg/mL (coluna 11); 1,953125 µg/mL (coluna 12).

Tabela 5: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *C. procera* frente às linhagens de *C. albicans* e *C. tropicalis* pela técnica de microdiluição.

Concentrações do Extrato Etanólico Bruto das folhas de <i>C. procera</i> (µg/mL)	Cepas testadas	
	<i>C. albicans</i> (ATCC 76645)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)
4000	-	+
2000	+	+
1000	+	+
500	+	+
250	+	+
125	+	+
62,5	+	+
31,25	+	+
15,625	+	+

7,8125	+	+
3,90625	+	+
1,953125	+	+
Controle de crescimento	+	+
Controle de esterilidade	-	-

Legenda: (+) Crescimento do micro-organismo; (-) Inibição do micro-organismo.

Tabela 6: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Fase Clorofórmica do EEB das folhas de *C. procera* frente às linhagens de *C. albicans* e *C. tropicalis* pela técnica de microdiluição.

Concentrações da Fase Clorofórmica do EEB das folhas de <i>C. procera</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Cepas testadas	
	<i>C. albicans</i> (ATCC 76645)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)
4000	+	-
2000	+	-
1000	+	+
500	+	+
250	+	+
125	+	+
62,5	+	+
31,25	+	+
15,625	+	+
7,8125	+	+
3,90625	+	+
1,953125	+	+
Controle de crescimento	+	+
Controle de esterilidade	-	-

Legenda: (+) Crescimento do micro-organismo; (-) Inibição do micro-organismo.

6 CONCLUSÃO

As conclusões que podem ser deduzidas do presente trabalho são:

- As folhas da espécie *C. procera* possuem flavonoides dentre seus metabólitos;
- Através da avaliação da citotoxicidade do EEB e da FCHCl₃ das folhas de *C. procera*, frente à eritrócitos humanos, foi possível perceber uma citotoxicidade moderada, diretamente proporcional à dose e aos compostos presentes no material vegetal testado;
- Através do ensaio de fragilidade osmótica, conclui-se que as amostras vegetais não protegem os eritrócitos humanos de uma possível hemólise em nenhuma concentração testada;
- O crescimento das cepas de *C. albicans* só foi inibido pelo EEB, resultando em uma CIM de 4000 µg/mL, enquanto que o crescimento *C. tropicalis* só foi inibido pela FCHCl₃ com a CIM de 2000 µg/mL.

Através deste trabalho conclui-se que são necessários estudos mais aprofundados para a verificação dos compostos bioativos presentes nas folhas de *C. procera* e o isolamento dos mesmos, para devidos testes biológicos.

REFERÊNCIAS

- ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46 p. 1739- 1745, 1998.
- AHMED, M. S. Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. Flowers growing in Egypt. **Phytotherapy Research**, v.19, n.9, p. 807-809, 2005.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**. v. 41, p. 133-138, 1991.
- 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.
- ALI, A. A. et al. Chemical and biological studies of *Sinapis arvensis* growing in Egypt. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.2, p.99-109, 2000.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 357, 2006.
- ALVES, T. M. et al. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. M. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. **Boca Raton: CRC Press**, 2006.
- ANTUNES, R. M. P., et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- APARICIO, R. M., et al. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 1063-1067, 2005.
- BAIN, B. **Células sangüíneas: um guia prático**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 359, 2007.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v. 78, p. 431–441, 2008.

BATISTA, T. M. Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico das oartas aéreas de *Zornia brasiliensis* Vog. (Fabaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso**. Graduação em Farmácia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 14, 2013.

BELÉM, L. F. Estudo epidemiológico da *Pitiríase versicolor* no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 178, 2002.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. v. 12, n. 2, p. 123-130, 2000.

BRANDES, D. *Calotropis procera* on Fuerteventura. Germany, **Technical University Braunschweig**, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de Normas da COFID**. Brasília, outubro 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Atenção à Saúde/Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: MS/SAS/DAB, 2012.

BRENA, S.; RUBIO, M. C.; SALESA, R.; IGLESIAS, I.; GIL, J.; REZUSTA, A. et al. Genotipos de *Candida dubliniensis* em aislamientos clínicos. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 21, 20-23, 2004.

BRUSCHI, M.L.; FRANCO, S.L.; NOVELLO, C.R. Projeto de Manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas na disciplina de farmacotécnica. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2000. Recife. Anais ... Recife - UFPE, 2000.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**. v. 152, p. 73-84, 2004.

CALIXTO J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Braz. **Journal of Pharmacognosia**. v.18, p.314-319, 2008.

COLOMBO, A.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, A. S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, R.; MARÍN, O.; IRAZÁBAL, S.; TEZARA, W. Relaciones hídricas, fotosíntesis y anatomía foliar de dos especies del género *Calotropis*. **Interciencia**. v. 32, p. 791-796, 2007.

COUTINHO, H. D. M. et al. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais**. Conceitos, p. 77-85, 2004.

COSTA MARQUES, T. H. et al. Estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, fitoquímicos, toxicológicos y farmacológicos de *Bellis perennis* L.(margarita). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 19, n. 1, p. 85-100, 2014.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, v. 26, p. 343 – 356, 2005.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28(3), 241-249, 2009.

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

DE REPENTIGNY, L.; AUMONT F.; BERNARD, K.; BELHUMEUR, P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 3172-3179, 2000.

DUARTE, M. C. T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil: Construindo a história dos produtos naturais**. *Multiciência*. v.7, 2006.

ELVIN-LEWIS. Should web and concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p.141-164, 2001.

FABRICANTE, J. R.; DE OLIVEIRA, M. N. A.; DE SIQUEIRA-FILHO, J. A. Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 64, n. 3, p. 647-654, 2013.

FERREIRA, S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. **Academia Brasileira de Ciências**. p. 132, 2002.

FONSECA, M. C. M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

FONTENELLE, R. O. S. Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill., e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. isolados de cães. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual do Ceará, 2008.

FRÖHNER, C. R. A. Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *chromobacterium violaceum*. **Dissertação (Mestrado em Farmácia)** - Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALLEGOS-OLEA, R. S.; BORGES, M. O. R.; BORGES, A. C. R.; FREIRE, S. M. F.; SILVEIRA, L. M. S.; VILEGAS, W. et al. Flavonoides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 10, p. 29-33, 2008.

GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 30, p. 270-278, 2012.

GURIB-FAKIM A., Review, Medicine Plants: Traditions yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**. v. 15, p. 686-699, 2005.

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

IQBAL, Z. et al. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 256-261, 2005.

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

KARAM, T. K. et al . Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista brasileira de plantas mediciniais**. v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KONEMAN, E. W ; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Diagnostic microbiology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1395, 1997.

KONTOYIANNIS, D; BODEY, G. Invasive aspergillosis in 2002: an update. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases**. v. 21, p. 161- 172, 2002.

LEUNG, W. K.; DASSANAYAKE, R. S.; YAU, J. Y. Y.; JIN, L. J.; YAM, W. C.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 2219-26, 2000.

LORENZI. H. C.; MATOS, F. J. A. Plantas mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas. **Nova Odessa**: Instituto Plantarum, 2002.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MARQUES, O. C. P. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante. **Dissertação** (Mestrado - Área de Concentração em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. p. 210, 2008.

MATOS, F. J. A. **O Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Mossoró: ESAM. v. 18, p.222, 1997.

MELO, A. S. T. & Silva, N. J. de. O uso do solo e da vegetação atual. **Atlas Geográfico da Paraíba**. p. 32-33. Grafset. João Pessoa. Brasil, 1985.

MELO, M. M.; VAZ, F. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNINO, H. M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. **Revista Brasileira de Saúde Produtiva**. v. 1, p. 15– 20, 2001.

MELO, M.; A VAZ, M.; GONÇALVES, C. A.; SATURNINO, M. H. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 2, p. 10, 2005.

MONTAGNER, C. Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MOUSINHO, K.C.; CORREIA, M. B. L.; SILVA, J. O.; MAGNATA, S. S. L. P.; SOUZA, I. A.; CATANHO, M. T. J. A. 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.

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, H. A consensus classification for the order *Gentianales* with additional details on the suborder *Apocynineae*. **Botanical Review**. v. 60. p. 440- 482, 1994.

NOGUEIRA, R.C.; CERQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 20, p. 1-13, 2010.

OMS, Organización Mundial de la Salud. **Situación reglamentaria de los medicamentos herbáricos: una reseña mundial**. Ginebra, 1998.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16, p. 189-195, 2014.

PEREIRA, Cíntia Alessandra Matiucci. Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LC- MS) e análise microscópica das folhas de espécies de *Passiflora* L. **Tese (Doutorado)**. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

PÉREZ-ARBELÁEZ, E. **Plantas Útiles de Colombia**. Editora Arco, Bogotá, Colombia. ed. 4, p. 210, 1978

PFALLER, P.; NEOFYTOS, D.; DIEKEMA, D.; AZIE, N.; MEIER-KRIESCHE, H.; QUAN, S.; HORN, D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 74, p. 323–331, 2012.

PIETARINEN, S. P.; WILLFÖR, S. M.; VIKSTRÖM, F. A.; HOLMBOM, B. R. Aspen knots, a rich source of flavonoids. **Journal of Wood Chemistry and Technology**. v. 26, p. 245-58, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Fármacos Antifúngicos. In: RANG, H. P. et al. Rang & Dale Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 48. p. 692-697, 2007.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. 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**. v. 39, p. 603–613, 2001.

RAPINI, A. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C.; **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**, INPA, Manaus, 1999.

PEREIRA, MARIA de M. et al. **Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)**. *Quim Nova*. v. 30, p. 970-983, 2007.

RABELO, A. F. L. Caracterização *in vivo* e *in vitro* da resposta inflamatória aguda induzida por uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. 2014. 117 f. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

RAMACHANDRA, S.S.; AHMED, A.Q.; VISWANATH, A.H.M.S.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; VEERAN, A.G. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 451-454, 2007.

RAUHA, J. P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC. p. 43-74, 2003.

RODRIGUEZ-MATURINO, A.; TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum*

var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 47, p. 72–77, 2015.

SANT'ANA, P. L. et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 253-257, 2002.

SCHREIER, H. et al. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 72, p. 215-223, 1997.

SILVA, C. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6a. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC; 2011.

SMIT, H.F.; WOERDENBAG, H.J.; SINGH, R.H.; MEULENBELD, G.L.; LABADIE, R.P.; ZWAVING, J.H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytoatatic activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.47, p.75-84, 1995.

SPENCER, J. P. E.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C. Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 492, p. 1-9, 2009.

STRUWE, L.; ALBERT, V. A.; BREMER, B. **Cladistics**. v. 10, p. 175, 1994.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJOGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v. 85, p. 86-93, 1998.

TANIRA, M.O.M. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 41, p. 201- 205, 1994.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÉS, T.; RENIER, G.; CHABAISE, D.; BOUCHARA, J. P. Mechanisms of azole resistance in clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, p. 4608-4615, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. v. 28, p. 519-528, 2005.

VERPOORTE R. Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 52, p. 253-262, 2000.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. *Calotropis gigantea*. **Indian Medicinal Plants**, v.1, p. 341-345, 1994.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**. v. 61, p. 529-553, 2007.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC. Editora Argus, 523 p., 2001.

ZHANG, C. et al. Studies of flavonoids from leaves of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. **Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi**. v.11, n.5, p. 274-276, 2001.

ZOHRA, M.; FAWZIA, A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. **International Journal of Pharma Science and Research**. v. 5, p. 8495-494, 2014.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL; E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011.