



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

PEDRO HENRIQUE SOUSA LOPES

**TRIAGEM FITOQUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Calotropis procera* (AITON) W.T. AITON
(Apocynaceae)**

São Luís

2020

PEDRO HENRIQUE SOUSA LOPES

**TRIAGEM FITOQUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Calotropis procera* (AITON) W.T. AITON
(Apocynaceae)**

Monografia apresentada ao curso de
Química Licenciatura da Universidade
Federal do Maranhão como requisito para a
obtenção do grau de Licenciatura em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto
Sigfrido Gallegos Olea.

São Luís

2020

Lopes, Pedro Henrique Sousa.

TRIAGEM FITOQUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Calotropis*
procera AITON W.T. AITON Apocynaceae / Pedro Henrique
Sousa Lopes. - 2020.

36 f.

Orientador(a): Roberto Sigfrido Gallegos Olea.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade
Federal do Maranhão, São Luis, 2020.

1. Atividade antioxidante. 2. *Calotropis*
procera. 3. Compostos fenólicos. I. Olea, Roberto
Sigfrido Gallegos.
II. Título.

PEDRO HENRIQUE SOUSA LOPES

**TRIAGEM FITOQUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Calotropis procera* (AITON) W.T. AITON
(Apocynaceae)**

Monografia apresentada ao curso de
Química Licenciatura da Universidade
Federal do Maranhão como requisito para a
obtenção do grau de Licenciatura em
Química.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea - Orientador

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof.º Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias - 1º Avaliador

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Dra. Aldilene da Silva Lima - 2ª Avaliadora

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

**Aos meus pais, José Coimbra e
Maria do Carmo, a minha irmã,
Ana Luiza, por todo apoio,
incentivo, confiança e amor.**

AGRADECIMENTOS

Muita dedicação foi necessária para a conclusão desse trabalho e desse curso, minha e de pessoas que foram fundamentais nessa conquista, por isso agradeço.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus pelo dom da vida e por ser fonte de força e auxílio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por terem acreditado em mim todos esses anos, confiando que daria certo, mesmo nos momentos em que nem eu acreditava. Obrigado, por todos os valores e ensinamentos que me passaram. Por essas razões vocês merecem tanto quanto eu ver esse sonho realizado.

A minha irmã, que sempre esteve do meu lado me apoiando e mesmo com meu problema de concentração me ajudando a focar nas minhas atividades e estudos.

Aos meus amigos de graduação: Bianca, Emília, Mateus, Gustavo e Rick que estiveram comigo todos esses anos, por todos os momentos, risadas, estudos e conversas compartilhadas. Verdadeiras amizades tornam qualquer caminhada menos árdua.

Agradeço a minha companheira Andressa Carvalho, que me acompanhou durante esse trabalho e durante grande parte da graduação, sempre me deu forças nos momentos mais exaustivos e difíceis. Obrigado por todas as conversas, todo amor, apoio, carinho, dedicação e compreensão.

A meu grande mestre e orientador Prof. Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea sem o qual este trabalho não teria ocorrido. Muita gratidão por ter me apoiado, acreditado no meu potencial e contribuído para minha formação como professor e pessoa ao longo desse tempo.

Por fim, agradeço também a todos os colaboradores dessa pesquisa, ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQN) , ao Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental (NCCA) e ao Laboratório do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água (PCQA), que sem suas contribuições esse trabalho não teria sido realizado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Calotropis procera</i> (Aiton) W. T Aiton.....	19
Figura 2: Resultados dos testes fitoquímicos.....	24
Figura 3: Curva padrão de ácido gálico utilizada para quantificação dos compostos fenólicos totais.....	27
Figura 4 - Curva padrão de ácido gálico utilizada para quantificação dos compostos fenólicos totais.....	28
Figura 5: Curva da porcentagem de atividade antioxidante das amostras Extrato pelo método DPPH.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação da coloração das amostras (em diferentes concentrações de pH) com os constituintes.....	18
Tabela 2: Resultados do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico da <i>Calotropis procera</i>	23
Tabela 3: Teor total de fenóis e teor de flavonoides no extrato.....	27
Tabela 4: Percentual de inibição do Radical DPPH dos extratos.....	28
Tabela 5: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a ação dos extratos vegetais frente às cepas de bactérias.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Meio de cultura Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bacteriana Mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EtOH – Etanol

HCL – Ácido clorídrico

H₂O – Água

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

PH – Potencial hidrogeniônico

RL – Radical livre

UFC – Unida de formação de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Obtenção do extrato.....	18
3.2. Triagem fitoquímica.....	18
3.2.1 Identificação de taninos e fenóis.....	19
3.2.2 Identificação de alcaloides.....	19
3.2.3 Identificação de flavonoides, antocianinas e antocianidinas.....	19
3.2.4 Identificação de saponinas.....	19
3.2.5 Identificação de esteroides e triterpenóides.....	20
3.2.6 Identificação de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	20
3.2.7 Identificação de flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas.....	20
3.3. Quantificação de compostos fenólicos	20
3.4. Quantificação de flavonoides.....	21
3.5. Potencial antioxidante ao radical DPPH.....	21
3.6. Atividade antimicrobiana.....	22
3.6.1. Microrganismos testados.....	22
3.6.2. Padronização do inóculo.....	22
3.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima.....	22
3.6.4. Determinação da concentração bactericida mínima.....	23
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Análise da triagem fitoquímica.....	24
4.2. Controle analítico.....	25
4.2.1. Curva padrão de ácido gálico.....	25
4.2.2. Curva padrão de quercetina.....	26
4.3. Compostos fenólicos totais e flavonoides totais.....	26
4.4. Potencial antioxidante.....	27
4.5. Atividade antimicrobiana.....	28
5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

A espécie *Calotropis procera* (Aiton) W. T Aiton (Apocynaceae), planta cujo nome usual “ciúme”, é uma erva daninha comum em terrenos baldios e é comumente utilizada como ferramenta terapêutica alternativa para o tratamento ou prevenção de doenças hepáticas, úlceras e até tumores. O presente estudo teve como principal objetivo realizar uma triagem fitoquímica, avaliar a atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e os teores de fenólicos e de flavonoides totais presentes no extrato hidroalcoólico obtido do caule da espécie *C. procera*. A extração hidroalcoólica do caule foi feita por maceração com solução de etanol e água (7:3). A análise preliminar da composição química (triagem fitoquímica) foi feita por testes *in vitro* com reagentes específicos para as diferentes classes de constituintes químicos. A quantificação dos fenólicos e flavonoides totais foi feita por espectrofotometria na região do visível. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de sequestro de radicais livres DPPH. A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita *in vitro* com o extrato hidroetanólico. Foi realizada também a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais. Os resultados da prospecção química demonstraram a presença de fenóis, flavonas, flavonóis, esteroides e saponinas no extrato hidroalcoólico. Os resultados obtidos demonstraram que *C. procera* é rica em compostos fenólicos com uma concentração de 54,21 µg/ml e possui uma atividade antioxidante de um CE₅₀ de 432,531 µg.mL⁻¹. A análise da atividade antimicrobiana revelou que o extrato hidroetanólico de *C. procera* apresenta moderada atividade aos microrganismos testados em relação a concentração inibitória mínima e apresentou baixa atividade para *Pseudomona aeruginosa* e moderada atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. em relação a concentração bactericida mínima. O extrato hidroalcoólico do caule de *C. procera* mostrou grande potencial para sua aplicação como antioxidante, antimicrobiano natural e fonte de estudos posteriores com finalidades fitoquímica e farmacológica.

Palavras-chave: *Calotropis procera*. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

The species *Calotropis procera* (Aiton) W. T Aiton (Apocynaceae), a plant whose usual name “jealousy”, is a common weed in wasteland and is commonly used as an alternative therapeutic tool for the treatment or prevention of liver diseases, ulcers and even tumors. The present study had as main objective to perform a phytochemical screening, to evaluate the antioxidant activity, antimicrobial activity and the contents of phenolic and total flavonoids present in the hydroalcoholic extract obtained from the stem of the species *C. procera*. The hydroalcoholic extraction of the stem was done by maceration with a solution of ethanol and water (7: 3). The preliminary analysis of the chemical composition (phytochemical screening) was done by in vitro tests with specific reagents for the different classes of chemical constituents. The quantification of phenolics and total flavonoids was performed by spectrophotometry in the visible region. The evaluation of antioxidant activity was carried out using the DPPH free radical scavenging method. The evaluation of the antimicrobial activity was done in vitro with the hydroethanolic extract. The quantification of phenolic compounds and total flavonoids was also performed. The results of chemical prospecting demonstrated the presence of phenols, flavones, flavonols, steroids and saponins in the hydroalcoholic extract. The results obtained showed that *C. procera* is rich in phenolic compounds with a concentration of 54.21 µg / ml and has an antioxidant activity of an EC₅₀ of 432.531 µg.mL⁻¹. The analysis of antimicrobial activity revealed that the hydroethanolic extract of *C. procera* presents moderate activity to the microorganisms tested in relation to the minimum inhibitory concentration and presented low activity for *Pseudomona aeruginosa* and moderate activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* in relation to the minimum bactericidal concentration. The hydroalcoholic extract of the stem of *C. procera* showed great potential for its application as an antioxidant, natural antimicrobial and a source of further studies for phytochemical and pharmacological purposes.

Keywords: *Calotropis procera*. Antioxidant activity. Phenolic compounds.

1. INTRODUÇÃO

A *Calotropis procera* (Aiton) W. T Aiton, durante muito tempo pertenceu à família Asclepiadaceae *sensu strictu*, mas atualmente pertence à família Apocynaceae, subfamília Asclepiadoideae. Também é conhecida popularmente como flor de seda, ciúme, algodão de seda, lã de seda, algodão da praia, leiteira, paina-de-sapo, paina-de-seda, saco-de-velho, queimadeira, pé-de-balão e janaúba. O nome do gênero, *Calotropis*, vem do latim "kalos" que significa bonito e "tropis" que significa quilha, relativo às cinco partes que irradiam uma estrutura pentagonal central de cada flor. Possui uma ampla distribuição geográfica, se espalhando pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. É nativa da África tropical, Índia, Pérsia, Madagascar, Península Arábica e Sudoeste da Ásia. Encontra-se atualmente naturalizada no norte da Austrália, Tailândia, Vietnã, em muitas ilhas do Pacífico, no México, nas Ilhas do Caribe, na América Central e do Sul (MOREIRA FILHO;VIANA, 2007; TABATINGA FILHO, 2008; OLIVEIRA; SOUTO, 2009; COSTA et al., 2009; OLIVEIRA BENTO, 2012). Introduzida no Brasil com fins ornamentais em 1900, em Recife (INSTITUTO HÓRUS, 2013), encontra-se aclimatada, inclusive na Caatinga do sertão nordestino, podendo ser encontrada em muitos estados da região Nordeste e nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Goiás e Distrito Federal (MOREIRA FILHO; VIANA, 2007).

Em relação às características botânicas, *C. procera* pode atingir de 2,5 a 6,0 metros de altura, possuindo uma ou poucas hastes e poucos galhos, seu caule corticiforme parece ser uma grande adaptação morfofisiológica que reduz a perda de água excessiva para o meio, funcionando também como isolante térmico e ação direta dos ventos, apresenta fissuras ou sulcos que pode permitir a troca controlada com o meio, além de caule seroso que reduz o ataque de insetos. O sistema radicular é bastante desenvolvido, com raiz principal pivotante que pode atingir de 1,7 a 3,0 metros de comprimento em solos arenosos de deserto (KISSMAN; GROTH, 1992).

Estudos fitoquímicos de folhas de *Calotropis procera* apresentaram ocorrência de glicosídeos flavônicos, glicosídeos cardiotônicos, esteroides, triterpenos e polifenóis (A VAZ, A. et al, 2001), corroborando com os estudos de Khan e Malik (1989); Basu et al. (1992); Hussein et al. (1994) e Tanira et al. (1994) que detectaram nas folhas com látex, glicosídeos flavônicos, glicosídeos cardiotônicos e esteroides / triterpenos (procesterol).

A parte aérea de *C. procera* tem sido largamente utilizada, principalmente no Oriente, para tratar muitas doenças como, por exemplo, artrite, diabetes, hepatotoxicidade e câncer incluindo a hanseníase (SINGHAL; KUMAR, 2009) além de ser utilizada para distúrbios do sono, epilepsia e úlceras (RASIK et al., 1999).

O estudo das cascas do tronco de *C. procera* demonstrou propriedades antitussígena, anti-inflamatória e ação protetora da mucosa gástrica em úlceras causadas por ácido acetilsalicílico, etanol, e ainda, atividade antiproliferativa de células tumorais (DIEYE et al., 1993; MAGALHÃES et al., 2010; TOUR; TABELLE, 2011). Testes farmacológicos realizados com as folhas da *C. procera* têm mostrado atividades do tipo hipotensora, antipirética, analgésica e anti-inflamatória. Atividade antibacteriana contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Hafnia alvei* e *staphylococcus aureus*. Atividade anticolinérgica muscarínica, antifúngica e inseticida (TANIRA et al., 1994; MESHRAM, 1995; COSTA, 2002; COSTA, 2003; OLIVERIA, 2004; BARROS et al.; 2013).

De acordo com Basu e Nag Chaudhuri (1991) a atividade de extratos clorofórmicos das raízes mostrou que estes possuem potencial anti-inflamatório em doses menores (de 5 e 15 mg/kg por via i.p.) que a aspirina. Além disso, Setty e colaboradores (2007) constataram o efeito hepatoprotetor e antioxidante do extrato hidroalcolico das flores do algodão-de-seda, efeito este conseguido com doses menores para o paracetamol (2g/kg), enquanto que do algodão de seda foram utilizadas doses de 200 e 400 mg/kg por via oral.

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora contra os danos causados pelos processos oxidativos celulares (SHARMA, 2013). Dessa forma, pesquisas que visam à substituição dos antioxidantes comerciais, através da aplicação de substâncias naturais vegetais, vem ganhando espaço em estudos acadêmicos (SOUSA et al., 2007), devido o interesse de desenvolvimento de produtos mais eficazes e menos tóxicos à saúde e ao ambiente.

Muitas das funções fisiológicas humanas podem ser alteradas principalmente devido aos radicais livres e outros oxidantes, evidências tem indicado o papel chave dessas substâncias como sendo os principais responsáveis pelos processos de envelhecimento e também associação com doenças degenerativas como o câncer, declínio do sistema imune e doenças cardiovasculares (SOUSA et al., 2007).

Radicais livres (RLs) são espécies compostas de um ou uma associação de átomos, possuindo um elétron desemparelhado em sua camada de valência. Esse desemparelhamento

traz uma alta instabilidade, sendo que, para manter a estabilidade precisam doar ou retirar um átomo de outra molécula (HIRATA et al., 2004). Os RLs podem ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias e o alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está diretamente relacionado com o seu sítio de formação, sendo a geração de RL um processo contínuo e fisiológico. Se os RLs não reagem entre si, na intenção de obter estabilidade, eles captam um átomo de uma molécula saudável, formando um novo RL. Com isso, inicia-se uma reação em cadeia, que irá danificar muitas células, podendo ser ilimitado, caso não haja o auxílio dos antioxidantes (SANTOS et al., 2014).

Atualmente, existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas do efeito dos radicais livres no organismo. As substâncias antioxidantes retardam ou inibem a velocidade de oxidação de maneira eficaz e, conseqüentemente, reduzem os danos celulares causados pelas ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio), combatendo as doenças causadas por esses danos. Assim, o sucesso das investigações de plantas com potencial antioxidante está diretamente relacionado com a melhoria da qualidade de vida do ser humano (VASCONCELOS et al., 2015).

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Sendo os mais populares o 2,2-Azinobis-3-23 etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), Oxygen Radical Absorbancy Capacity (ORAC) e o Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de ação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos. Não existe um procedimento metodológico universal, este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (OLIVEIRA et al. 2009).

O DPPH é rotineiramente utilizado para avaliar o potencial de eliminação de radicais livres de uma molécula antioxidante e considerado como padrão entre os métodos colorimétricos. Comumente é usado para medir atividade antioxidante de grãos e farelo de trigo, vegetais, ácidos linoleicos, ervas, óleos de sementes em diferentes sistemas de solventes, incluindo etanol, acetona, metanol e benzeno (CHENG et al., 2006). DPPH é um radical estável em solução de cor roxa com absorção a 515 nm em metanol. Este ensaio baseia-se no princípio de que o DPPH recebe um átomo de hidrogênio (H) da molécula doadora, isto é, antioxidante,

resultando na redução do DPPH para DPPH₂, a cor roxa muda para amarelo com concomitante diminuição da absorção. A mudança de cor é monitorada por espectrofotometria e utilizada para a determinação de parâmetros para propriedades antioxidantes (MISHARA et al., 2011).

As plantas produzem uma grande diversidade de produtos secundários, e aqueles que contêm um grupo fenol, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático são chamados de compostos fenólicos. Estão quase inteiramente presentes nas plantas e são conhecidos por acumularem-se em diferentes partes das plantas (LIU; QI; CHEN, 2019). Dentre os fenóis existentes, podemos destacar os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis como os mais abundantes antioxidantes fenólicos de fonte natural (ANGELO et al., 2007). Esses compostos atuam como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar elétrons ou hidrogênio, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, principalmente de lipídios (BRAND WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Os compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (ALMEIDA et al., 2006).

A classe dos flavonoides constitui a maior classe de fenólicos vegetais e apresenta grande diversidade estrutural, principalmente no grupo das angiospermas. Sua quantidade varia dependendo do órgão que se encontra na planta, os flavonoides de flores podem ser diferentes dos que estão em frutos, folhas e galhos (SIMÕES et al., 2000), além de ocorrer variação entre diferentes espécies.

A formação dos flavonoides é acelerada pela luz, sendo que uma de suas atividades é a de proteção contra os raios ultravioleta (UV). A atividade antioxidante designada aos flavonoides se deve às suas propriedades redutoras, pela sua estrutura química. Essa estrutura é importante no sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo assim, tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (REZENDE, 2008).

De acordo com Taiz e Zeiger (2009) existem quatro grupos principais de flavonoides: as antocianinas, flavonas, flavonóis e as isoflavonas. As antocianinas são os pigmentos encontrados nos vegetais, responsáveis principalmente pelas cores roxa, vermelha, rosa e azul, enquanto que flavonas e flavonóis atuam protegendo muitas espécies da luz ultravioleta (UV). Dentre os flavonoides já estudados, uma grande diversidade apresenta efeitos biologicamente importantes à saúde como ações antioxidantes, anticarcinogênica, anti-ulcerativa, anti-

trombótica, anti-inflamatória, antimicrobiana, imunomoduladora, vasodilatadora e analgésica (REZENDE, 2008).

Com o aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas surge a preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas, como fonte importante para obtenção destes medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (NOVAIS et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde – OMS os remédios extraídos de plantas são utilizados por 80% da população mundial, em especial nas áreas rurais dos países em desenvolvimento ou em locais em que a população não tem acesso ou condições de adquirir medicamentos. No Brasil, um número significativo de plantas é usado na forma de extratos brutos para o tratamento de infecções comuns embora, poucas evidências científicas sejam relatadas comprovando a eficácia desse tratamento (LIMA et al., 2006).

As plantas que constituem o gênero *Calotropis* contêm compostos com uma variedade muito grande de efeitos biológicos. Entretanto, existem poucos dados na literatura sobre o potencial dos efeitos antioxidantes e antimicrobianos de extratos do caule da espécie *C. procera*. Considerando a importância dos compostos fenólicos como fármacos com atividade antioxidante, objetivou-se neste trabalho identificar a presença de compostos fenólicos em *C. procera*, além de verificar a atividade antioxidante através do método de DPPH e atividade antimicrobiana do extrato.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o perfil fitoquímico, a quantidade de compostos fenólicos e flavonoides e as atividades antioxidante e antimicrobiana de extrato de caule de *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Realizar triagem fitoquímica do extrato hidroalcolico de *Calotropis procera* para avaliar qualitativamente sua composição;
- b) Quantificar os compostos fenólicos: fenóis totais e flavonoides totais;
- c) Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcolico do caule da *Calotropis procera* por meio do método de DPPH;
- d) Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto hidroalcolico do caule da *Calotropis procera*.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O caule da *C. procera* (Figura 1) foi coletado no Aterro do Bacanga em São Luís – Maranhão, a espécie vegetal encontra-se incorporada ao acervo do Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão. O caule coletado foi cortado em pedaços, triturado com o auxílio de moinho de facas para obtenção de um material com pedaços menores e em seguida foram secos em estufa a 50° por 48 horas. O extrato foi obtido através do processo de maceração com etanol e água, EtOH:H₂O (7:3), de acordo com a Farmacopeia Brasileira. Com auxílio de um evaporador rotativo o mesmo foi concentrado para a obtenção do extrato bruto do caule da *Calotropis procera*. Em seguida, o extrato passou pelo processo de liofilização com o objetivo de se obter um extrato seco a partir da retirada da água, conservando suas propriedades sem causar danos em sua integridade.

Figura 1: *Calotropis procera* (Aiton) W. T Aiton.



Fonte: Próprio autor

3.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA (MATOS, ABREU 1997)

Na triagem fitoquímica foram realizados testes qualitativos para identificação dos principais metabólitos presentes no extrato hidroalcoólico do caule da *C. procera*.

3.2.1 IDENTIFICAÇÃO DE TANINOS E FENÓIS

A identificação de taninos e fenóis foi realizada a partir da reação com sais de ferro. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml da amostra solubilizada, 10 ml de água deionizada e 3 gotas de uma solução alcóolica de cloreto férrico. O ensaio é positivo para fenóis quando há o aparecimento de uma coloração variável entre o azul e o vermelho é positivo quando há o aparecimento de um precipitado de coloração azul para taninos hidrolisáveis ou verde para taninos condensados.

3.2.2 IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES (COSTA, 2000)

A identificação de alcaloides foi feita através de teste preliminar com o reagente de Dragendorff. Foram adicionados 10 ml de ácido clorídrico diluído em cerca de 200 mg de amostra, com posterior aquecimento até a fervura. A mistura foi filtrada a quente e em tubo de ensaio foram adicionados aproximadamente 3 ml do filtrado obtido, acrescentando-se 3 gotas do reagente de Dragendorff. O teste é positivo quando há a formação de precipitado ou turvação da solução.

3.2.3 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES, ANTOCIANINAS E ANTOCIANIDINAS

A identificação de flavonoides foi realizada utilizando-se três tubos de ensaio com as amostras e acidificando uma delas a pH 3, alcalinizando outra a pH 8,5 e a terceira a pH 11. A tabela a seguir apresenta os resultados possíveis de acordo com a coloração que a amostra terá após o teste.

Tabela 1: Relação da coloração das amostras (em diferentes concentrações de pH) com os constituintes.

Constituintes	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Verm. púrpura
Flavanonóis	-	-	Verm. laranja

Fonte: Matos, adaptada (1997)

3.2.4 IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS

Para identificação de saponinas foi preparada uma solução extrativa 1% (m/v), aquecendo-se a amostra juntamente com água durante 30 minutos (decoção). Posteriormente,

a mistura foi filtrada e o filtrado foi transferido para um tubo de ensaio, e foi agitado vigorosamente. Após esse procedimento, o tubo permaneceu em repouso durante 15 minutos. O teste é positivo quando há a formação de anel de espuma (1 a 2 cm de altura) e essa espuma permanece após transcorrer o tempo de repouso.

3.2.5 IDENTIFICAÇÃO DE ESTEROIDES E TRITERPENÓIDES

O extrato seco foi diluído em 2 ml de clorofórmio, depois foi filtrado em um funil fechado com um algodão no fundo coberto com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidrido, a amostra foi passada para um tubo de ensaio seco e adicionado 1 ml de anidrido acético e logo em seguida três gotas de H_2SO_4 . A presença de uma coloração azul evanescente seguida de verde indica presença de esteroides livres, já a coloração vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

3.2.6 IDENTIFICAÇÃO DE LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVONONAS

Foram utilizados dois tubos de ensaio no primeiro foi acidificado com HCl até o pH 3 e o outro foi alcalinizado com NaOH até o pH 11, em seguida os dois tubos foram aquecidos. O aparecimento da cor vermelha ou pardo-amarelada na amostra acidificada indica a presença de leucoantocianidinas e catequinas, respectivamente, já o aparecimento da cor vermelha laranja indica a presença de flavonas.

3.2.7 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIS, FLAVANONAS, FLAVONONÓIS E XANTONAS

Foi adicionado ao extrato diluído em água uma fita de magnésio e em seguida 0,5 ml de HCl. A presença de uma efervescência seguida do aparecimento de uma coloração cinza indica a presença das substâncias em questão.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A quantificação de compostos fenólicos do extrato hidroalcolico da *C. procera* foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965). Do extrato foi dissolvido 1 mg em metanol e analisado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A quantidade total de fenóis de cada amostra foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico e expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE). Para a reação calorimétrica, uma alíquota de 0,1 ml da solução metanólica do extrato

(concentração 2,0 mg.sólidos.ml⁻¹) foi adicionada de 3,9 ml de água destilada, 1,0 ml de solução de carbonato de sódio a 5% e 0,1 ml do reagente Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada e incubada por 2 horas em ambiente escuro, posteriormente, a leitura da absorbância foi medida em comprimento de onda de 760 nm em um espectrofotômetro UV1800 (Shimadzu®). A quantificação dos compostos fenólicos do extrato hidroalcolico foi realizada em triplicata.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES

A concentração de flavonoides totais foi determinada utilizando uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 5% (AlCl₃) por espectrofotometria (espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®) a 415nm (KALIA et al., 2008; DUTRA et al., 2014). O conteúdo de flavonoides do extrato foi calculado usando a equação linear obtida na curva de calibração de quercetina padrão e expresso em mg equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ / g). O conteúdo total de fenóis e flavonoides do extrato será realizado em triplicata e expresso como média ± desvio padrão.

3.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH

Este ensaio baseia-se na capacidade de sequestradora do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) do meio de reação pela ação dos antioxidantes presentes na amostra, de acordo com a metodologia descrita por Brand-Willians e Berset (1995). Uma alíquota (100µL) da amostra, nas concentrações 25, 75, 125, 150, 250, 500 e 1000 µg.ml⁻¹, foram misturadas com 3,0 ml de solução de DPPH na concentração de 40 µg.ml⁻¹. Procedeu-se da mesma forma para preparação da solução denominada controle, porém substituindo-se 500µL da amostra por etanol. A solução denominada Branco foi utilizada solvente etanol PA. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, o grau de descoloração do radical DPPH foi medido através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro UV1800 (Shimadzu®) no comprimento de onda de 517 nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) através da equação 1 descrita abaixo (MENSOR et al, 2001):

$$\% AA = \frac{(ADPPH - AAMOSTRA) \times 100}{ADPPH} \quad (1)$$

Sendo:

% AA: Porcentagem de atividade antioxidante

ADPPH: Absorbância do DPPH sem a amostra e o padrão

AAMOSTRA: Absorbância do antioxidante a amostra

As médias dos percentuais da atividade antioxidante da amostra e do padrão (catequina) foram calculadas e o gráfico da porcentagem de atividade antioxidante versus concentração foi construído para se obter a concentração eficiente em 50% (IC50) por regressão linear.

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.6.1 MICRORGANISMOS TESTADOS

Foram utilizadas cepas microbianas provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) doadas pelo Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* sp. (ATCC 14028) *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), esses microrganismos foram escolhidos por apresentarem bactérias patogênicas que são mais comuns aos organismos e por apresentarem perfil de resistência aos antimicrobianos atuais. A identificação das cepas foi confirmada pelo uso de ensaios bioquímicos, seguindo as recomendações do manual de microbiologia clínica (MURRAY, 2003).

3.6.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As cepas microbianas utilizadas foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma suspensão microbiana com a turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (NCLSI, 2003).

3.6.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pela National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS, 2003). Inicialmente uma alíquota do extrato na concentração de 1000 µg/ml preparados numa solução de dimetilsufóxido (DMSO) a 1,0% foi transferida para tubo de ensaio contendo caldo MH. Em seguida foram realizadas diluições seriadas resultando nas concentrações de 1000 a 50 µg/ml. A suspensão microbiana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/ml das bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) foram adicionadas a cada concentração. Realizou-se o controle constituído apenas da solução de DMSO. Foram reservados tubos para controle de esterilidade do caldo e de crescimento bacteriano. Logo após os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas (TELES, 2015). Após o período de incubação,

foi verificada a concentração inibitória mínima do extrato, sendo definida como a menor concentração que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (ausência de turvação visível).

3.6.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM), em contraste com a CIM, é a menor concentração necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a bactéria, expressa em µg/ml, que produz a morte de 99,9% das células microbianas avaliadas. A determinação da CBM foi realizada pelo método de Pour-Plate. Essa técnica consiste na semeadura de inóculo microbiano na superfície de ágar Plate-Count (TELES, 2015). De forma asséptica, foi semeado inóculo (50µl) obtido dos tubos de macro diluição usadas para determinação da CIM, que não apresentarem turvação visível. O inóculo foi espalhado em toda a superfície do meio com o auxílio da alça de Drigauski, os ensaios foram realizados em triplicata. Após incubação a 35°C durante 24h, foi feita a contagem das colônias crescidas na superfície do ágar, onde foram considerados seguintes critérios:

- Ausência de crescimento do microrganismo no meio de cultura ou detecção de crescimento até 20 UFC, igual à ação bactericida.
- Crescimento do microrganismo no meio de cultura acima de 20 UFC, igual à ação bacteriostática.
- O surgimento de colônias em uma concentração indica que a mesma não conseguiu inibir ou eliminar 99.9% ou mais do inóculo utilizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA TRIAGEM QUÍMICA

Por meio das reações de triagem fitoquímica (Figura 2) foi possível detectar a presença de fenóis, taninos, esteroides, flavonas, flavonóis, xantonas e saponinas nas quais estão dispostas na tabela 2.

Na reação de detecção de fenóis e taninos houve o aparecimento de uma coloração avermelhada com um precipitado verde indicando a presença dos mesmos.

Na reação de detecção das flavonas, flavonóis e xantonas houve o aparecimento da coloração amarela no tubo com amostra alcalina de pH 11 identificando a presença das substâncias.

No teste de Liebermann-Burchard para esteroides e triterpenóides o resultado foi positivo, com o final da reação a solução apresentando uma coloração esverdeada indicando a presença dos compostos.

Tabela 2 - Resultados do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico da *Calotropis procera*.

*Forte:+++ Médio:++ Fraco:+ Ausente:O

CONSTITUINTES	RESULTADOS	INTENSIDADE*
Fenóis	Positivo	++
Taninos hidrolisáveis	Negativo	O
Taninos condensados	Positivo	++
Antocianinas e antocianidinas	Negativo	O
Flavonas, flavonóis e xantonas	Positivo	++
Chaconas e auronas	Negativo	O
Leucoantocianidinas	Negativo	O
Catequinas	Negativo	O
Flavanonas	Negativo	O
Esteroides	Positivo	+++
Triterpenoides	Negativo	O
Saponinas	Positivo	++
Alcaloides	Negativo	O

Fonte: Próprio autor.

Figura 2: Resultados dos testes fitoquímicos (B) teste em branco (água e cloreto férrico), (1) fenóis e taninos condensados, (2,3,4) antocianinas, antocianidinas e flavonoides, (5) flavonóis, flavonas, e xantonas, (6) esteroides e triterpenóides, (7) saponinas e o (8) alcaloides.



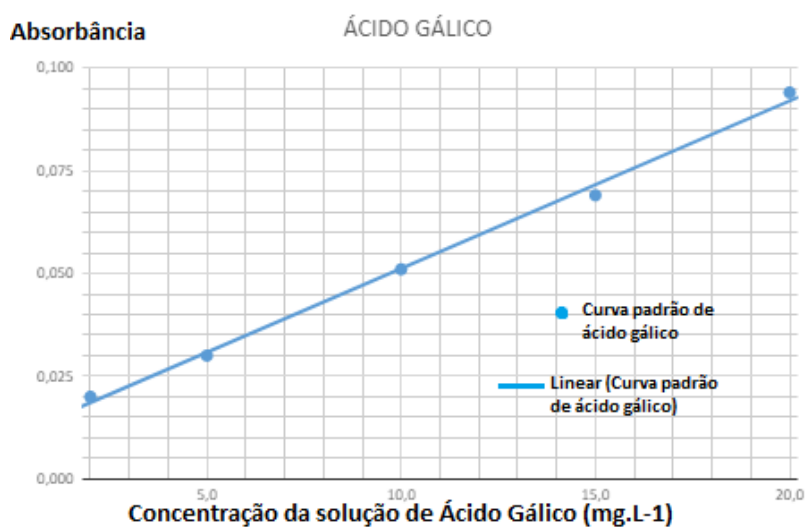
Fonte: Próprio autor.

4.2 CONTROLE ANALÍTICO

4.2.1 CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Na determinação de compostos fenólicos totais, elaborou-se uma curva padrão de ácido gálico (Figura 3), com ajuste linear (R) de 0,9981 e a equação da reta conforme apresentada na Equação (2).

Figura 3: Curva padrão de ácido gálico utilizada para quantificação dos compostos fenólicos totais.



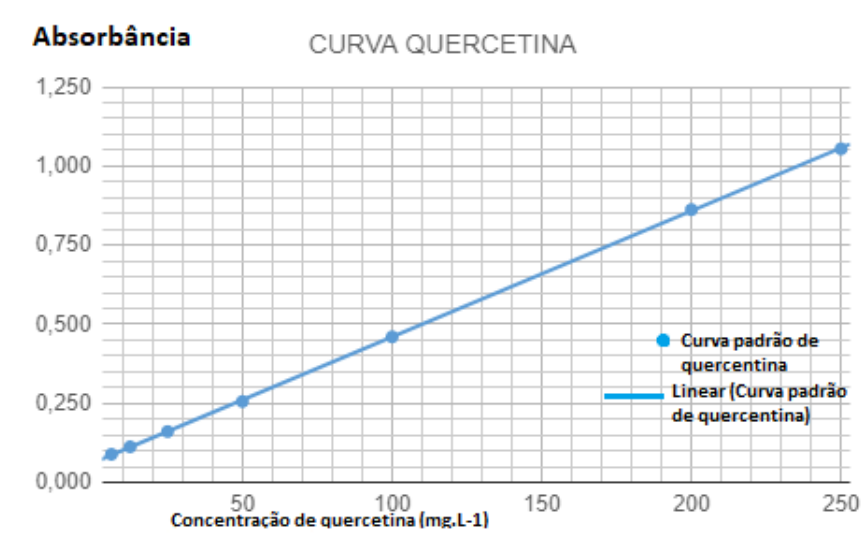
Fonte: Próprio autor.

$$y = 0,0041x + 0,0104 \quad (2)$$

4.2.2 CURVA PADRÃO DE QUERCETINA

A curva padrão de catequina (Figura 4), obtida para quantificação de flavonoides totais, apresentou a Equação (3) como equação da reta e um ajuste linear (R²) de 0,9999.

Figura 4- Curva padrão de quercetina utilizada para quantificação dos flavonoides totais



Fonte: Próprio autor.

$$Y = 0,004x + 0,062 \quad (3)$$

4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

As médias das triplicatas do conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, extraídos da amostra são observadas na Tabela 3. A concentração de fenólicos totais de 54,21 µg/ml é um resultado muito significativo já que a concentração de compostos fenólicos totais encontrados em outras partes da planta, como por exemplo das folhas 87,44 µg / ml realizado no trabalho de Mehmood et al., (2020), são ligeiramente maiores, portanto a utilização do extrato hidroalcolico do caule da *C. procera* tem grande potencial de ser uma fonte considerável de compostos fenólicos.

A concentração de flavonoides de 23,25 µg/ml por sua vez mostra-se bem menor do que as encontradas em outras partes da planta como das folhas realizado no trabalho de Usman, A. et al., (2020) no qual apresentou uma concentração de 96,90 µg/ml. O etanol é um solvente com polaridade média, em vista de que o flavonoide ser um composto com alta polaridade, um solvente com essas características poderia proporcionar melhor capacidade de extração do conteúdo de flavonoides de *C. procera*.

Tabela 3: Teor total de fenóis e teor de flavonoides no extrato.

Análise Química	Extrato
Fenol Total (µg/ml)	54,21
Teor de flavonoides (µg/ml)	23,25

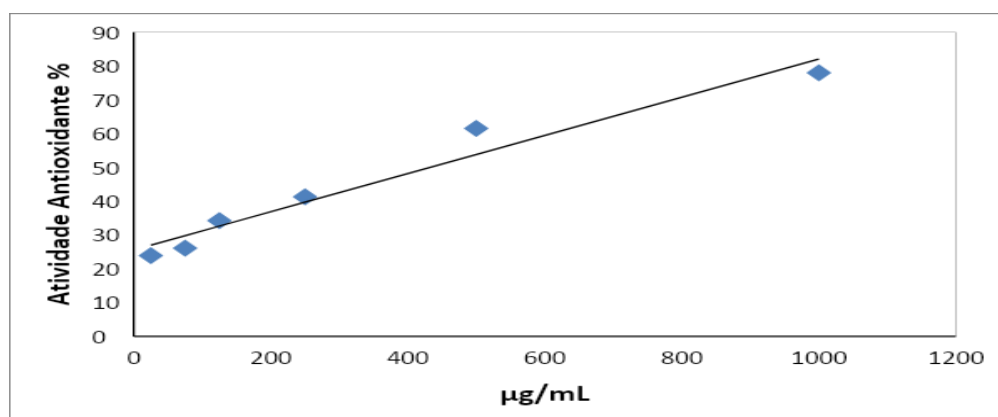
Fonte: Próprio autor (2019).

4.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O ensaio do sequestro do radical do DPPH está baseado no princípio de que ao aceitar um átomo de hidrogênio a partir da molécula antioxidante, há redução do DPPH para DPPH₂, ocorrendo à alteração da cor púrpura da solução para amarelo, com uma concomitante diminuição na absorvância a 518 nm. A mudança de cor é monitorada por espectrofotometria e utilizada para a determinação de parâmetros de propriedades antioxidantes (MISHRA OJHA; CHAUDHURY, 2012), sendo assim, a pesquisa da atividade sequestrante do DPPH estima o poder redutor de um composto antioxidante, que ao doar elétron para um radical livre, oxidasse (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A relação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração das amostras utilizadas apresentou a equação da reta do Extrato ($y = 0,0565x + 25,562$), com um $R^2 = 0.9542$ conforme pode ser observado no gráfico da figura 5, os resultados demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração de amostra adicionada, atingindo o valor de 77,95% para Extrato para a concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fornecendo um CE_{50} de $432,531 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que é a concentração de extrato necessária para atingir 50% de atividade.

Figura 5: Curva da porcentagem de atividade antioxidante das amostras Extrato pelo método DPPH.



Fonte: Próprio autor

O presente estudo mostrou valores menores de atividade de eliminação do radical DPPH em comparação com os relatados por Mehmood et al. (2020) que encontrou um valor de 525,65 mg.mL para a atividade antioxidante *in vitro* do extrato de folhas de *C. procera*. Valores mais baixos foram relatados para extratos etanólicos das cascas de *C. procera* de 24,24 mg.mL por Tsala et al, (2015). Essas diferenças em atividade de eliminação do radical DPPH pode estar relacionada à natureza variável das espécies de plantas *C. procera* e também pela diferença da composição química das partes anatômica da planta.

Tabela 4: Percentual de inibição do Radical DPPH dos extratos.

Concentrações testadas (µg/ml)	Percentual de inibição
25	23,87871
75	26,0897
125	34,23879
250	41,25079
500	61,52874
1000	77,95325

Fonte: Próprio autor.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De acordo com Holetz et al (2002), amostras com altas atividades antimicrobiana apresentam CIM < 100 µg/ml; com atividade moderada, entre 100 a 500 µg/ml.; com baixa atividade, entre 500 a 1000 µg/ml e são consideradas inativas quando a CIM é > 1000 µg/ml. Com base nessa classificação, o extrato hidroetanólico de *C. procera* apresentou atividade moderada parada todas as cepas, com 150 µg/ml para *Escherichia coli*, 100 µg/ml para *Staphylococcus aureus*, 350 µg/ml para *Salmonella sp.* e 500 µg/ml para *P. aeruginosa* como mostrado na tabela. De acordo com Almeida et al. (2018) em seu trabalho encontrou valores maiores de CIM, com 500 µg/ml para *Escherichia coli* e 1000µg/ml para *P. aeruginosa*, essa diferença pode ter se dado pela diferença das concentrações dos constituintes químicos das plantas ocasionado pela diferença da localidade das coletas realizadas pelos trabalhos.

Em relação a atividade antibacteriana o extrato apresentou um CBM moderado para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e baixa atividade para *P. aeruginosa* (tabela 5). Estudos realizados por Pattnaik et al. (2017), obteve atividade antibacteriana contra

todas as bactérias com o extrato hidroetanólico das folhas de *Calotropis procera*, evidenciando assim que além das folhas, o caule também apresenta um agente antimicrobiano promissor.

Tabela 5: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a ação dos extratos vegetais frente às cepas de bactérias.

		Bactérias			
Compostos		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	Extrato	150.00±0.00	100.00±0.00	350.00±0.00	500.00±0.00
MIC (µg/ml)	Cloroanficol	15.5±0.5	n.d	n.d	n.d
	Gentamicina	n.d	20.5±0.00	14.00±0.00	17.00±0.00
	Extrato	250±0.00	200.00±0.00	150.00±0.00	750.00±0.00
CBM (µg/ml)	Gentamina	n.d	2.0±0.00	n.d	n.d
	Amoxilina	n.d	8.0±0.00	16±0.00	n.d

Fonte: Próprio autor.

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o extrato bruto hidroalcolico de *C. procera* apresenta substâncias fenólicas, as quais são responsáveis pela atividade antioxidante, analisada através do modelo experimental de DPPH. De acordo com os testes realizados, o extrato hidroalcolico do caule de *C. procera* apresenta moderada atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, já a atividade antibacteriana foi considerada moderada em relação a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e baixa para *P. aeruginosa*. Tomados juntos, os resultados deste trabalho abrem muitas perspectivas para o estudo e investigação do extrato hidroalcolico do caule de *C. procera* como fonte de compostos com atividades farmacológicas promissoras.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. M. D. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/Ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446- 452, 2006.
- ALMEIDA, Emanuel Falcão et al. Atividade antibacteriano do Extrato Etanólico Bruto do caule de *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n. 1, 2018.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- A VAZ, A. et al. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **R. bras. Saúde Prod. Anim.**, 2001
- BARROS, F.E.V. et al. Avaliação das Atividades Analgésica e Anti-inflamatória do Extrato Metanólico de *Calotropis procera* R. Br. (ciúme). **Infarma**, v.16, n.9-10, p.60-4, 2013.
- BASU, A.; NAG CHAUDHURI, A. K. Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extrat, **Journal of Ethano pharmacology**, v.31 p.319-324, 1991.
- BASU, A. et al. Hepato protective effects of *Calotropis procera* root extract on experimental liver damage in animals. **Fitoterapia**, v. 63, n.6, p. 507- 514, 1992.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.
- COSTA, E.T. **Atividade farmacológica de *Calotropis procera* R. Br. (ciúme) no sistema digestório de roedores**. Monografia (Curso de Medicina) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 41 p., 2003.
- COSTA, L.L.G. **Atividade antibacteriana e triterpenopentacíclico em *Calotropis procera* R. Br (Asclepiadaceae)**. Monografia (Curso de Farmácia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 43 p. 2002.
- COSTA, R. G.; MEDEIROS, A. N; ALVES, A. R.; MEDEIROS, G. R. Perspectivas de utilização da flor-de-seda (*Calotropis procera*) na produção animal. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2009.
- 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.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- DUTRA, R.P., ABREU, B.V.D.B., CUNHA, M.S., BATISTA, M.C.A., TORRES, L.M.B.O., NASCIMENTO, F.R.F., RIBEIRO, M.N.S., GUERRA, R.N.M. Phenolicacids, hydrolyzable tannins, and antioxidante activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62(12), 2549-2557, 2014.
- HUSSEIN, H. I. et al. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. **Journal of Chemical Ecology**, v.20, n.11, p. 135-140, 1994.
- HIRATA, L.L., SATO, M.E.O., SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n.3, p. 418-424, 2004.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.
- INSTITUTO HÓRUS** - Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. The Nature Conservancy. Disponível em: <www.institutohorus.org.br/download/fichas/calotropis_procera.htm>. Acesso em: 13 de novembro de 2020.
- KALIA, K., SHARMA, K., SINGH, H.P., SINGH, B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(21), 10129-10134, 2008.
- KHAN, A. Q.; MALIK, A. Asteroids from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2859-2861, 1989.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A., 798p, 1992.
- LIMA, M.R.F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, n.1-2, p.137- 147, 2006.
- LIU, Y.; QI, Y; CHEN, X. Phenolic compounds and antioxidant activity in red- and greenfleshed kiwifruits. **Food Research International**, v. 116, p. 291-301, 2019.
- MAGALHÃES, H.F., et al. Vitro and in vivo anti proliferative activity of *Calotropis procera* atremextracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, p.407-416, 2010.
- MATOS, F. J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª ed, Fortaleza: UFC, 141 p, 1997.
- MEHMOOD, T. et al. Pharmaceutical Potential and Phenolics Profiling of Leaves and Bark of *Calotropis procera* in Relation to Extraction Solvents. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 6, p. 631-641, 2020.

MENSOR LL, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res.** 2001; 15: 127- 130.

MOREIRA FILHO, E. C. et al. Estimação da área foliar da flor de seda (*Calotropis procera*). **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 214, p. 245-248, 2007.

MOREIRA FILHO, E. C.; VIANA, B. L. Flor de seda: considerações gerais, 2007. Disponível em: <<http://www.cca.ufpb.br/lavouraxerofila/pdf/fs.pdf>>. Acesso em: 13 de novembro de 2020.

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

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MURRAY, P. R.; **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed., ASM Press: Washington, 2003. National Committee for Clinical Laboratory Standard. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Approved Standard - M7-A6, ed 6, vol. 23, 2003.

NOVAIS, T.S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, supl.2 p.05- 08, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

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

OLIVEIRA-BENTO, S. R. S. **Biometria de frutos e sementes, germinação e armazenamento de sementes de flor-de-seda [*Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton].** Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 144f., 2012.

OLIVEIRA, V. M.; SOUTO, J. S. Estimativa da produção de biomassa de *Calotropis procera* (Ait) R. BR. e avaliação de sua composição química no estado da Paraíba. **Revista Verde**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 141-161, 2009.

PRATAP, K. et al. Perfil quimiométrico e atividades antimicrobianas do extrato de folha de *Calotropis procera* e *Calotropis gigantea*, **Natural Product Research**, 31:16, 1954-1957, 2017.

RASIK, A.M., et al. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in guinea pigs, **Journal of Ethnopharmacology**, v.68 p261-266, 1999.

REZENDE, A.A.A. **Efeito protetor de proantocianidinas de sementes de *Vitisvinifera* L. (Vitaceae) contra efeitos genotóxicos do cloridrato de doxorrubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 54 f, 2008.

SANTOS, M.P.; OLIVEIRA, N.R.F. A ação das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Ciências da Saúde**, v.15, n.1, p.75-89, 2014.

SETTY, S.R. et al. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats, **Fitoterapia**, v.78 p.451-454, 2007.

SHARMA, P.; PATIL, D.; PATIL, A. Crataeva tapia linn.-an important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 4, p. 582-589, 2013.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic., Lockeford**, v. 16, n. 3, p. 144-58, 1965.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed, Florianópolis: Editora da UFSC., 2000.

SINGHAL, A., KUMAR, V.L. Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122 p.172-174, 2009.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TABATINGA FILHO, G. M. **Fenologia, biologia reprodutiva e ecologia da polinização de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (APOCYNACEAE ASCLEPIADOIDEAE)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 68f., 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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.

TELES, A. M. **Estudo químico, avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos e do óleo essencial do *Ocimum gratissimum* L (ALFAVACA)**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química do Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2015.

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.

TSALA, David Emery et al. Evaluation of the antioxidant activity and the healing action of the ethanol extract of *Calotropis procera* bark against surgical wounds. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 64, 2015.

USMAN, A. et al. Triagem fitoquímica, antioxidante e citotóxica das folhas de extratos de *Calotropis procera*. **FUW Trends in Science & Technology Journal**, v. 5, N. 1, p. 525 – 528, 2020.

VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **Journal of Health Science, Londrina**, v. 16, n. 3, p. 213-219. 2015.