

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E TOXICIDADE DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA* (ASCLEPIDACEAE)

Samara Alves Brito¹
Henrique Douglas Melo Coutinho¹
Adriana Rolim Campos Barros²
Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues¹
José Galberto Martins da Costa¹

Resumo

Calotropis procera (Asclepidaceae), é uma espécie lactífera e arbórea típica de áreas com baixos níveis de pluviosidade e solos pobres em nutrientes. Na medicina popular suas folhas e seu látex são utilizados no tratamento de úlceras, tumores e doenças hepáticas. A prospecção fitoquímica das frações hexano, acetato de etila, metanol e água do extrato do seu látex mostrou a presença de metabólitos como: flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis, esteróides e alcalóides. Todas as frações, exceto a hexano, demonstraram atividade antibacteriana contra linhagens Gram-negativas, merecendo destaque a fração aquosa por apresentar o melhor resultado frente a *P. aeruginosa* com CIM de 128 µg/mL. Os ensaios de toxicidade foram realizados frente à *Artemia salina* e indicaram resultados significativos para as frações acetato de etila e metanólica com CL₅₀ de 10,0 e 16,5 µg/mL, respectivamente.

Palavras-chaves: *C. procera*, látex, atividade antibacteriana, toxicidade, prospecção fitoquímica

Abstract

Calotropis procera (Asclepidaceae) is lactiferous and arboreous specie found in areas presenting low pluviosity and nutrient-poor ground. In popular medicine, its leaves and latex are used to treat gastric ulcers, tumours and hepatic diseases. The phytochemical prospection of hexane, ethyl acetate, methanol and aqueous fractions from extract and latex showed the presence of metabolites like flavones, flavonols, xantones, flavononols, steroids and alkaloids. All fractions, except the hexane, demonstrated antibacterial activity against Gram-negative strains. However the aqueous fraction presented the best result against *P. aeruginosa* (MIC 128 µg/mL). The toxicity assays were performed using the *Artemia salina* method and the ethyl acetate and methanolic fractions showed significative results (LC₅₀ 10.0 e 16.5 µg/mL, respectively).

Key-words: *Calotropis procera*, latex, antibacterial activity, toxicity, phytochemical prospection.

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Departamento de Química Biológica, Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antônio Luiz 1161, Pimenta, 63105-000 Crato-CE, Brasil

² Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade de Fortaleza, Av. Washington Soares 1321, Edson Queiroz, 60811-905, Fortaleza-CE, Brasil

INTRODUÇÃO

Calotropis procera (Asclepidaceae), conhecida popularmente como flor-de-seda, leiteira e ciameira é uma espécie lactífera, arbórea, podendo atingir até 6 m de altura. Apesar de ser uma espécie originária da África Tropical e Índia^{1,2}, teve no nordeste brasileiro uma boa adaptação, principalmente nos locais com baixos níveis de pluviosidade e solos pobres em nutrientes^{3,4}. Seu látex, abundante em suas partes aéreas, tem demonstrado várias atividades biológicas como: antibacteriana⁵, analgésica⁶ e antiinflamatória⁷. Entretanto há relatos científicos sobre diversos efeitos toxicológicos relacionados ao seu uso⁸. Na medicina tradicional, diversas partes da planta são indicadas no tratamento de úlceras, tumores, doenças hepáticas e leproses⁹.

Com relação às bactérias patogênicas, um problema crescente e preocupante é o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos^{10,11}. Para pacientes, a resistência antimicrobiana aumenta a morbidade e mortalidade, enquanto que para as instituições de saúde que significa aumento de custos^{12,13}. No que diz respeito à crescente importância clínica dada à comunidade hospitalar e infecções bacterianas e o desenvolvimento progressivo da resistência antimicrobiana, um grande número de pesquisas cientificamente vem sendo realizadas enfatizando as propriedades antibacterianas de

produtos vegetais^{14,15,16,17,18}. No entanto, a maioria das drogas citotóxicas, sintéticas ou de fontes naturais apresenta efeitos colaterais graves¹⁹. Assim, há uma necessidade de drogas que são igualmente eficazes, mas têm menor toxicidade.

São raros os estudos relacionados à composição química e a ensaios de toxicidades de frações do látex de *C. procera*. Considerando que as avaliações das atividades microbiológicas e toxicológicas de plantas medicinais apresentam uma grande importância para a descoberta e identificação de novas substâncias bioativas, este trabalho teve por objetivo realizar a prospecção fitoquímica, avaliar a toxicidade e o potencial antibacteriano das frações hexano, acetato de etila, metanólica e aquosa do látex liofilizado de *C. procera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Partes aéreas de *C. procera* foram obtidas, em março/2009, no Parque Pedro Felício Cavalcante, município de Crato, Ceará, Brasil. Um exemplar da planta foi depositado no Herbário "Prisco Bezerra" do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e identificado com o registro 44455. O látex foi extraído com auxílio de seringa descartável e

armazenado sob resfriamento até momento de análise.

Preparação das frações

Foram utilizados 21,5 g de látex liofilizadas. O material foi pulverizado e extraído com solventes orgânicos ou água, sendo obtidos os seguintes rendimentos: hexano (21,4%), acetato de etila (5,6%), metanol (16,5%) e água (6,5%). As frações orgânicas foram destiladas sob baixa pressão e a fração aquosa foi liofilizada.

Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos para detectar a presença de classes de metabólitos secundários foram realizados seguindo o método descrito por MATOS²⁰. Esses ensaios se baseiam na observação visual por mudança de coloração ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As atividades antibacterianas das frações de *C. procera* foram avaliadas utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 (CLSI/NCCLS)²¹ para bactérias. Previamente aos testes, as cepas bacterianas foram ativadas em meio Brain Hear

Infusion Broth (BHI) durante 24 h a 35±2°C. Foram as seguintes linhagens de microrganismos testadas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6528), *Proteus vulgaris* (ATCC 13135), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 5442) e *Vibrio cholerae* (ATCC) e *Escherichia coli* (2992)

Após o subcultivo, procedeu-se à padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em BHI, cuja turvação fosse similar ao tubo 0,5 da Escala McFarland (1×10^8 UFC/mL). A seguir, esta suspensão foi diluída a 1×10^6 UFC/mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações das frações do látex de *C. procera*, resultando num inóculo final de 5×10^5 UFC/mL.

As frações foram solubilizadas inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada de forma a se obter uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais dos extratos e das frações no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata. As placas foram incubadas a 35±2°C durante 24 h. Como revelador foi utilizado 25µL/poço de resazurina a 0,01%. O controle negativo foi realizado com o caldo BHI. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu. A leitura dos

resultados para determinação da CIM foi considerada como positivo para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativo os que obtiveram coloração vermelha.

Testes de toxicidade frente à *Artemia salina*.

A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo *Artemia salina* através do método proposto por MEYER²². O teste foi realizado em triplicata, com diferentes concentrações, acompanhado de um controle positivo preparado com água marinha e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), e um controle negativo com água marinha e Tween 80. Após 24 horas foi feita a leitura de larvas sobreviventes. O cálculo da CL_{50} foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da realização da prospecção fitoquímica das frações foi possível identificar a presença de classes de metabólitos secundários como: flavonóides, esteróides e alcalóides (Tabela 1), constituintes que possuem uma ampla variedade de atividades biológicas como antimicrobiana^{23,24,25}, antioxidante^{26,27}, antitumoral²⁸ e anti-ofídica²⁹.

As frações em estudo do látex de *C. procera* mostraram-se mais eficazes contra a

linhagem de *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram negativa (Tabela 2), principalmente a fração aquosa (MIC $128\mu\text{g/mL}$). Esse resultado é interessante pois, normalmente, bactérias Gram negativas são mais resistentes a extratos vegetais que Gram positivas, possivelmente devido ao fato de apresentarem um sistema de membranas mais complexo^{13,30}.

Diversos trabalhos relatam a atividade antibacteriana de *C. procera*, entretanto, algumas considerações devem ser feitas. COOPOOSAMY & MAGWA³¹, trabalhando com extratos e frações de látex, relataram em seu trabalho a atividade antibacteriana. Contudo, nestes estudos, os autores utilizaram concentrações superiores a 1mg/mL , concentrações muito maiores que as avaliadas em nosso estudo e consideradas clinicamente irrelevantes³². Nossos dados são condizentes com os resultados observados no estudo de OLADIMEJI et al.³³, o qual trabalhou com extratos das folhas e do caule de *C. procera*, onde foi demonstrado a ação da fração acetato de etila de *C. procera* contra bactérias Gram negativas em níveis semelhantes aos descrito neste estudo.

Também se ressalta que as frações mais efetivas contra *P. aeruginosa* foram as mais polares. GIBBONS³⁴ relaciona a atividade antibacteriana de produtos naturais contra *S. aureus* à sua polaridade, sendo compostos menos polares mais efetivos. Contudo, bactérias Gram negativas aparentemente são mais suscetíveis a

compostos polares, provavelmente a presença de cadeias polissacarídeos serve de barreira para compostos hidrofóbicos ativos na membrana³⁵.

Os índices de mortalidade das larvas no bioensaio de toxicidade das frações acetato de etila do látex sobre *Artemia salina* variaram entre 50 e 99,9%, enquanto para a fração metanólica de 10 a 90%. A dose necessária para matar 50% das larvas (CL₅₀) foi calculada em 16,5 µg/mL e 10 µg/mL para as frações, respectivamente, e maior que 1000 µg/mL para as frações hexano e aquosa, indicando que as frações acetato de etila e metanólica possuem atividade significativa por apresentar CL₅₀ inferior a 1000 µg/mL²².

Segundo OLADIMEJI et al³³ em ensaios com *A. salina*, foram constatadas atividade citotóxica de extratos do caule e das folhas de *C. procera*. Nossos resultados, quando comparados com os dados deste trabalho anterior, demonstraram que as frações acetato de etila e metanólica são de 11 a 19 vezes mais tóxicas. Diversos trabalhos relatam a toxicidade de *C.*

procera^{36,37}, o que indica que estudos sobre o látex desta planta podem ser promissores tanto na terapia antibacteriana como no controle de organismos transmissores de doenças.

CONCLUSÕES

A prospecção fitoquímica das frações do látex de *C. procera* demonstrou a presença de diversos compostos relacionados com atividades biológicas conhecidas, como a atividade antibacteriana. Dentre as frações analisadas, a fração aquosa apresentou melhor atividade principalmente contra *P. aeruginosa*. Com relação à toxicidade, as frações acetato e metanólica foram as que apresentaram um maior potencial citotóxico. Os resultados obtidos mostraram a presença de metabólitos secundários que podem estar associadas às atividades biológicas testadas, porém são ensaios preliminares que sugerem o isolamento de tais substâncias para verificar se são as responsáveis pelas atividades observadas.

REFERÊNCIAS

1. MELO, M.M.; VAZ, A. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNI, H.M. **Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 2(1):15-20, 2001.

Ano IV - Vol. 2- Nº 2 2010
ISSN 1980-5861

2. PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 2: 707, 1984

3. JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Editora Nacional, 10.ed, 777, 1991.

4. SHARMA, P.; SHARMA, J.D. **In vitro schinzonticidal screening of *Calotropis procera***, Fitoterapia, v.71, p.77-9, 2000.
5. LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C.S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M. & JANA, M. **Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants**. Therapie, 54(6): 763-765, 1999.
6. SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C.A., FREITAS, C. D.T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K.M. **Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice**. Journal of Ethnopharmacology, 99 (1): 125-129, 2005. .
7. ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A. & RAMOS, M. V. **Anti-inflammatory effect of the látex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis**. Planta med., 70: 1144-1149, 2004.
8. AGUIAR, V. C.; XAVIER, A, A. S.; LIMA, M. W.; MESQUITA, R. O.; SOUSA, J. M. S ; ALENCAR, N. M. N; RAMOS, M. V. **Análise toxicológica parcial de uma fração protéica do látex de *Calotropis procera***. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005.
9. TANIRA, M.O.M. **Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates**. Journal of Ethnopharmacology., (41):201- 205, 1994.
10. GEORGOPAPADAKOU, N.H. **Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs**. Drug Resist Update 5: 181-191, 2002.
11. NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; M.A.; ENEA, V.; FLAMINI G.; MORELLI, I.; ROCCARO, S.; ALONZO, V.. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol**. FEMS Microbiol Lett 230: 191-195. 2004.
12. DANCER, S.J.. **The problem with cephalosporins**. J. Antimicrob Chemother 48: 463-478, 2001.
13. COUTINHO, H.D.M.; CORDEIRO, L.N.; BRINGEL, K.P.; **Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte - Ceará**. Rev Bras Cienc Saúde 9: 127-138, 2005.
14. AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K.X.F.R.; **Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Rev Bras Farmacogn 18: 436-440, 2008
15. COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. **In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 18 (Supl.): 670-675, 2008.
16. SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.;

- PEREIRA, M.S.V. **Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*.** Rev Bras Farmacogn 18:209-212, 2008.
17. SALVAGNINI LE, OLIVEIRA JRS, SANTOS LE, MOREIRA RRD, PIETRO RCLR . **Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae).** Rer Bras Farmacogn 18: 241-244, 2008.
18. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**, Editora UFC, 1999.
19. POWIS, G.; APPEL, P.L. (1980). **Relationship of the single electron reduction potential of quinones to their reduction by flavoproteins.** Biochem. Pharmacol., 29,2567, 1980.
20. MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 2 ed. Fortaleza. Editora: UFC, 1997
21. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS; **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M7-A6**, 6th ed., NCCLS: Wayne, 2003
22. MEYER BN, FERRIGNE NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JE. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Med 45: 31-34; 1982.
23. DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ J.: **Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae).** *J Ethnopharmacol* 71:307-313, 2000.
24. ESQUENAZI, D; WIGG, M.D; MIRANDA, M.M.F.S; RODRIGUES, H.M; TOSTES, J.B.F; ROZENTAL, S; SILVA, A.J.R; ALVIANO, C.S. **Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract.** Research in Microbiology 53: 647-652, 2002
25. O'KENNEDY, R; THOMES, R.D.: **Coumarins: biology applications and mode of action.** New York: John Willey, 1997.
26. BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M. : **Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo.** Química Nova, 29: 113-123, 2006.
27. HASLAM, E. **Vegetal tannins – Lessons of a phytochemical lifetime.** Phytochemistry, 68: 2713-2721, 2007
28. OKUDA, T., YOSHIBA, T. & HATANO, T. **Ellagitannins as active constituents of medicinal plants.** Planta Med. 55:117-122, 1989.
29. MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A.: **Phytochemistry**, , 55, 627, 2000.
30. AFOLAYAN, A.J.: **Extracts from the shoots of *Arctotis artotoides* inhibit the growth of bacteria and fungi.** Pharm. Biol. 41: 22-25, (2003).

31. COOPOOSAMY, R.M.; MAGWA, M.L.; **Antibacterial activity of aloe emodin and aloin A isolated from Aloe excels.** African Journal of Biotechnology. 5, 2006
32. HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVETON, G.; HILANDS, P.J.; LEE, C.C.; **The sulphordamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity.** Methods. 42: 377-387, 2007.
33. OLADIMEJI, H.O.; NIA, R.; ESSIEN, E.E. **In vitro anti-microbial and brine-shrimp lethality potential of the leaves and stem of *Calotropis procera* (Ait).** Afr. J. Biomed. Res., 9: 205-211, 2006.
34. GIBBONS, S. **Anti-staphylococcal plant natural products.** Nat Prod Repts 21: 263-277, 2004
35. RODRIGUES, F. F.G.; COSTA, J. G.M.; COUTINHO, H.D.M. **Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*.** Phytomedicine 16 (2009) 1052–1055.
36. RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; XAVIER, A. A. S. et al. **Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material.** Fitoterapia, 77: 251-256, 2006.
38. SINGHAL, A.; KUMAR, V.L. **Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat.** J Ethnopharmacol. 22(1):172-4, 2009.

Tabela 1: Propecção fitoquímica das frações do latex of *C. procera*.

Fração	Classe do metabólito										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FHCP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
FAECP	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
FMCP	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
FACP	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

1 – Taninis flobabenicos; 2 – Taninos pirogálicos; 3 – Alcalóides; 4 - Flavonas; 5- Flavonois; 6 – Flavononas; 7 - Antocianina and Antocianidina; 8 - Xantona; 9 - Leucoantocianidina; 10 -esteróides; 11 – triterpenos; + : presença; -: ausência; FACP – fração aquosa de *C. procera*; FMCP – fração metanólica de *C. procera*; FAECP – fração acetato de etila de *C. procera*; HFCP – fração hexano de *C. procera*.

Tabela 2 : Valores do CIM (mg/mL) das frações do latex de *C. procera*.

Frações	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. cholariae</i>
FHCP	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
FAECP	512	>1024	>1024	256	>1024
FMCP	512	>1024	>1024	256	>1024
FACP	>1024	>1024	>1024	128	>1024

FACP – fração aquosa de *C. procera*; FMCP – fração metanólica de *C. procera*; FAECP – fração acetato de etila de *C. procera*; HFCP – fração hexano de *C. procera*.