

UNIVERSIDADE SANTA CECILIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

PIETRO COCCARO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA *IN VITRO*, FITOQUÍMICA E
ECOTOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA A PARTIR
DAS FOLHAS DE *TERMINALIA CATAPPA* L. (COMBRETACEAE)

SANTOS/ SP

2014

PIETRO COCCARO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA IN VITRO, FITOQUÍMICA E
ECOTOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA A PARTIR
DAS FOLHAS DE TERMINALIA CATAPPA L. (COMBRETACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade
Santa Cecília como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob
orientação do Prof. Dr. Walber Toma e Co-
Orientação da Profa. Dra. Luciana Lopes
Guimarães

SANTOS/SP

2014

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

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da
Universidade Santa Cecília

Coccaro, Pietro.

Avaliação das atividades antifúngica *in vitro*, Fitoquímica e Ecotoxicológica da fração acetato de etila obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa* L. (combretaceae)/ Pietro Coccaro, Santos, 2014.
49 p.

Orientador: Prof. Dr. Walber Toma.

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães.

Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação). Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Santos, São Paulo, 2014

1 - *Terminalia catappa*; 2 - Chapéu de Sol; 3 – Ácido Gálico; 4 – *Candida albicans*; 5-Ecotoxicologia. Prof. Dr. Toma, Walber. Profa. Dra. Guimarães, Luciana Lopes. Avaliação das atividades antifúngica *in vitro*, Fitoquímica e Ecotoxicológica da fração acetato de etila obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa* L. (combretaceae).

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Vera Lúcia, aos meus filhos Pietro,
Milena e Bruno e ao meu neto Felipe*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Walber Toma, pela orientação e pela confiança na execução deste trabalho, e principalmente pela paciência que teve comigo durante a elaboração final da dissertação.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães, pela ajuda e apoio ao longo dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ecologia da Universidade Santa Cecília, Profa. Dra. Alpina Begossi, Prof. Dr. Álvaro Reigada, Prof. Dr. Angel Del Valls, Prof. Dr. Fábio Giordano, Prof. Dr. João Inácio da Silva Filho, Profa. Dra. Mara Magenta, Profa. Dra. Mariana Clauzet, Profa. Dra. Milena Ramires de Souza, Prof. Dr. Silvio Valadão, Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri e Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, por toda a paciência, dedicação, assistência e conhecimentos transmitidos nestes 20 meses para o desenvolvimento desta pesquisa.

Um agradecimento muito especial ao diretor da Faculdade Don Domenico, Prof. Ms. Fernando Mendes Passaes, e ao coordenador do curso de administração Prof. Ms. Marcel André Valluis, entre tantas outras pessoas me incentivaram e contribuíram para este título.

A todos os estagiários do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecilia que contribuíram com a execução deste trabalho.

Aos Prof. Ms. Fernando Sanzi Cortez e Prof. Ms. Fábio Hernes Pusceddu, que ajudaram muito na realização dos testes de toxicidade.

À Sandra H. A. de Araújo e Imaculada Scorza, da Secretaria da Pós-Graduação *stricto sensu* por estarem sempre presentes e dispostas a ajudar.

Agradeço à colega de curso, Giovanna Mazzeo pela ajuda desde a preparação dos testes até a sua conclusão final, e à Graziella Rizzo pela ajuda na tradução do texto.

RESUMO

O presente estudo teve como propósito avaliação da atividade antifúngica de quatro diferentes concentrações da Fração Acetato de Etila (FrAcOH) obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa*. Os resultados apontam atividade contra *Candida albicans* tendo inibição de 43,76%, 83,67% e 100% nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10 mg/mL, respectivamente. Dados fitoquímicos apontam em cromatografia em camada delgada a presença do composto fenólico ácido gálico. Ensaio quantitativo através do método de Folin relatam em FrAcOH concentração de 42,1 mg de compostos fenólicos expressos na forma de ácido gálico, sendo este considerado marcador referência. Ensaio antioxidante reforça a presença do referido composto químico e fortalece mecanismo de ação antifúngico vinculado à estrutura química de substâncias com propriedades antioxidantes. Dados ecotoxicológicos apontam valores de CEO = 3,125 mg/L; CENO < 3,125 mg/L e CE50 = 31,1933 mg/L. Tais dados apontam que FrAcOH é considerada como nociva ao meio ambiente segundo diretiva 93/67/EEC. No entanto, quando comparados valores de K_{ow} de ácido gálico presente em FrAcOH em relação aos antifúngicos da classe dos Azólicos há hipótese de menor risco de danos ao meio ambiente em virtude do ácido gálico apresentar menor valor de K_{ow} em comparação a tais fármacos já disponíveis no mercado farmacêutico. Conclui-se que FrAcOH apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans* tendo o ácido gálico como marcador químico referência. Valores comparativos de K_{ow} apontam que FrAcOH se trata de proposta terapêutica de menor risco ambiental em comparação aos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico.

Palavras-chave: 1 - *Terminalia catappa*; 2 - Chapéu de Sol; 3 – Ácido Gálico; 4- *Candida albicans*; 5-Ecotoxicologia

ABSTRACT

The present study had as purpose evaluation of antifungal activity of four different concentrations of Ethyl acetate Fraction (FrAcOH) obtained from *Terminalia catappa* leaves. The results show activity against *Candida albicans* and inhibition of 43.76%, 83.67% and 100% at concentrations of 2.5; 5.0 and 10 mg/mL, respectively. Phytochemical data point in thin layer chromatography the presence of Gallic acid phenolic compound. Quantitative assays through the Folin method reported in FrAcOH 42.1 mg concentration of phenolic compounds expressed in the form of Gallic acid, which is considered reference marker. Antioxidant tests strengthen the presence of this chemical compound and strengthen antifungal mechanism of action linked to the chemical structure of substances with antioxidant properties. Ecotoxicological data point values of CEO = 3.125 mg/L; CENO < 3.125 mg/L and Ec50 = 31.1933 mg/l. such data indicate that FrAcOH is regarded as harmful to the environment according to Directive 93/67/EEC. However, when comparing values of Kow of Gallic acid present in FrAcOH in relation to the class of antifungal Azole any chance of reduced risk of damage to the environment as a result of Gallic acid present smallest value of Kow compared to such drugs already available in the pharmaceutical market. It is concluded that FrAcOH presents antifungal activity against *Candida albicans* and Gallic acid like chemical marker reference. Comparative values of Kow indicate that FrAcOH it comes to proposal of lower environmental risk therapy compared to drugs available in the pharmaceutical market.

Keywords: 1 - *Terminalia catappa*; 2 - Chapéu de Sol; 3 – Gallic Acid; 4- *Candida albicans*; 5- Ecotoxicology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Planta <i>Terminalia catappa</i> Linn (Combretaceae)	14
FIGURA 2: Exsicata folhas de <i>Terminalia catappa</i>	17
FIGURA 3: Processo extrativo percolação folhas de <i>Terminalia catappa</i> Linn	18
FIGURA 4: Processo de partição do extrato de <i>Terminalia catappa</i> Linn	19
FIGURA 5 - Estímulo para identificação e liberação de espermatozoides de <i>Lytechinus variegatus</i>	23
FIGURA 6 - Coleta de espermatozoides de <i>Lytechinus variegatus</i>	24
FIGURA 7: Espermatozoides de <i>Lytechinus variegatus</i> acondicionados em um béquer envolto com gelo.	24
FIGURA 8: Fêmea de <i>Lytechinus variegatus</i> liberando os óvulos	25
FIGURA 9: Ovos de <i>Lytechinus variegatus</i> (400X)	26
FIGURA 10: <i>Terminalia catappa</i> na cidade de Santos-SP	28
FIGURA 11: Atividade de FrAcOH de <i>Terminalia catappa</i> após exposição in vitro à <i>Candida albicans</i>	32
FIGURA 12: Placa cromatográfica de FrAcOH de <i>Terminalia catappa</i> eluída com mistura de clorofórmio / metanol / n-propanol / água (5:6:1:4; v/v) como fase móvel e revelada com solução de cloreto férrico 1% em metanol	33
FIGURA 13: Estrutura química do ácido gálico	33
FIGURA 14: Placa cromatográfica de FrAcOH de <i>Terminalia catappa</i> eluída em clorofórmio / metanol / n-propanol / água (5:6:1:4; v/v) como fase móvel e revelando com DPPH 0,2% diluído em metanol	33
FIGURA 15: Avaliação da fertilização de gametas de <i>Lytechinus variegatus</i> após exposição aguda em diferentes concentrações (mg/L) de FrAcOH de <i>Terminalia catappa</i>	38

FIGURA 16: Avaliação da fertilização de gametas de *Lytechinus variegatus* após exposição crônica em diferentes concentrações (mg/L) de FrAcOH de *Terminalia catappa*39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Condições para realização dos ensaios de toxicidade com <i>L. variegatus</i> (Efeito Agudo/Fertilização)	26
TABELA 2: Condições para realização dos ensaios de toxicidade com <i>L. variegatus</i> (Efeito Crônico / Embriolarval)	28
TABELA 3: Rendimento extrativo com folhas de <i>Terminalia catappa</i>	30
TABELA 4: Classificação de FrAcOH de <i>Terminalia catappa</i> baseada na diretiva 93/67/EEC da União Europeia	38
TABELA 5: Fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos disponíveis no mercado farmacêutico para o tratamento de <i>Candida albicans</i> e seus respectivos valores de K_{ow}	40
TABELA 6: Valores de K_{ow} de fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos em comparação ao marcador referência (Ácido gálico) de FrAcOH	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Análise de Variância

CCD – Cromatografia em Camadas Delgadas

CENO – Concentração de Efeito não Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

CFM – Concentração de Fungicida Mínima

DPPH – *Diphenyl – Picryl - Hydrazyl*

EC₅₀ – Concentração Efetiva a 50%

EEB - Extrato Etanólico Bruto Seco

ETE - Estações de Tratamento de Esgotos

FrAcOH - Fração Acetato de Etila

FrAq - Fração Aquosa

FrCHCl₃ - Fração Clorofórmica

FrHex - Fração Hexânica

Kow - Coeficiente de Partição Octanol-Água

NCCLS - *The National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OMS - Organização Mundial da Saúde

POE – Poluentes Orgânicos Emergentes

R_f – Fatores de Retenção

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Coleta e identificação	17
3.2. Processo extrativo	17
3.3. Partição do extrato	18
3.4. Ensaio microbiológicos <i>in vitro</i>	19
3.4.1. Cultivo de fungos e preparação do inóculo	19
3.4.2. Preparo das soluções-estoque para os testes de susceptibilidade aos extratos vegetais	20
3.4.3. Realização dos testes de susceptibilidade à Fração (FrAcOH)	20
3.4.3.1. Diluição em caldo realizada em tubos (macro diluição) ...	20
3.4.3.2. Leitura e interpretação dos resultados	20
3.5. Análise fitoquímica	21
3.5.1. Cromatografia em Camada Delgada	21
3.6. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	21
3.6.1. Avaliação qualitativa	21
3.6.2. Determinação de fenóis totais	21
3.7. Avaliação Ecotoxicológica	22
3.7.1. Ensaio para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com <i>Lytechinus Variegatus</i> (Echinodermata, Echinoidea)	22
3.7.2. Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> (Echinodermata, Echinoidea)	27
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

INTRODUÇÃO

Os fungos são agentes oportunistas de maior distribuição na natureza. Estão presentes no ar, nas superfícies inanimadas de hospitais e dos domicílios, nas plantas, no solo, na água, nos alimentos e nos animais domésticos. Colonizam a pele, mucosas do trato gastrointestinal e também do trato respiratório no hospedeiro humano (SANTANA et al., 2013).

Estudos apontam que diversas são as espécies de fungos distribuídos ao longo do planeta. Estima-se que estes representem 7% de todas as espécies eucarióticas, o que equivale a cerca de 611.000 espécies. Destas, cerca de 600 são consideradas patológicas aos seres humanos, tendo destaque no presente trabalho o gênero *Candida* (BADIEE & HASHEMIZADEH, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância, pela alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano. Estas são encontradas no tubo gastrointestinal em 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* vaginal. Dados apontam também que em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

O gênero *Candida* é constituído por cerca de 200 espécies, sendo que apenas 17 delas têm sido relacionadas a casos de micoses humanas. A maioria destas leveduras não apresenta forma sexuada conhecida, sendo sua identificação ao nível de espécie obtida através da análise de suas características micromorfológicas e perfil bioquímico. As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*. (VIRIATO, 2014).

Candida albicans é, sem dúvida alguma, a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos e como causa de candidíase em todas as partes do mundo. É também a espécie de *Candida* com maior conhecimento patogênico, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. Habitualmente se considera que a origem de

Candida albicans causadora de infecções seja a microbiota do trato digestório humano (organismo comensal), porém diversos casos têm sido relatados de forma horizontal. *Candida albicans* foi o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado (organismo diploide com oito pares de cromossomos), o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço na biologia deste fungo, principalmente na expressão dos genes (BARBEDO & SGARBI, 2010).

Atualmente diversos são os recursos farmacológicos para o tratamento de pacientes acometidos por infecções por *Candida albicans*. Dentre os fármacos mais utilizados clinicamente encontram-se aqueles pertencentes à classe dos Azólicos (Fluconazol, Voriconazol, Cetoconazol, Posaconazol, Itraconazol e Clotrimazol) (VIRIATO, 2014). Tais fármacos apresentam mecanismo de inibição da biossíntese de ergosterol presente na membrana citoplasmática do fungo, alterando a fluidez e a permeabilidade da membrana danificando suas funções de barreira e são considerados como primeira escolha no tratamento de infecções por *Candida albicans* (ESPINEL-INGROFF, 1997).

Apesar do amplo conhecimento da espécie *Candida albicans* e das diversas opções farmacológicas, chama atenção o aumento da resistência deste patógeno contra agentes antifúngicos convencionais disponíveis no mercado farmacêutico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). As falhas no tratamento dessas infecções podem ser atribuídas à resistência clínica ou microbiológica. A determinação da correlação entre ambas as resistências ainda é bastante limitada, o que aumenta a importância de estudos para conhecer o perfil de sensibilidade de cepas clínicas e o espectro de ação dos antifúngicos (VIRIATO, 2014). Além disso, é clara também a possibilidade após uso crônico de quadros de nefrotoxicidade por parte dos antifúngicos disponíveis no mercado farmacêutico que, por sua vez, acabam gerando controvérsias e insegurança por parte dos prescritores no que diz respeito à relação custo/benefício (BADIEE & HASHEMIDAZEH, 2014). Deste modo, são necessários novos estudos que proponham novas propostas terapêuticas antifúngicas capazes de atuar contra tais patógenos, ganhando destaque o estudo com as plantas medicinais.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população em países em desenvolvimento dependem das práticas da medicina tradicional para

o tratamento de suas doenças. Apesar das estratégias de “marketing” e investimentos significativos da indústria farmacêutica objetivando o desenvolvimento de medicamentos alopáticos, a medicina tradicional, em específico a Fitoterapia, continua sendo grande segmento atrativo acerca de pesquisas científicas com propósito do desenvolvimento de novas propostas terapêuticas (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

Dentre tantas espécies disponíveis em território brasileiro e com potencial atividade farmacológica, destaca-se neste trabalho a *Terminalia catappa* Linn (Combretaceae) (Figura 1). Popularmente conhecida como Amendoeira, Amendoeira-da-Praia, Amendoeira-da-Índia, Cuca, Guarda-Sol, Castanheira da Índia, Castanhola e Chapéu-de-Sol, esta é uma espécie originária das Índias Orientais e Oceania e comumente utilizada para arborização ao longo de todo o litoral brasileiro.



Figura 1: *Terminalia catappa* Linn (Combretaceae) – Foto tirada na orla de Santos

Chen, (2000), relata em seus trabalhos a utilização popular de partes obtidas a partir desta planta para o acometimento dos mais diversos males, tais como problemas hepáticos, cólicas, febres e diarreia. A literatura aponta ainda que os extratos de diversos órgãos de *Terminalia catappa* (folhas, frutos e cascas) apresentam atividades anti-inflamatória (FAN *et al.*, 2004; LIN *et al.*,

1999), hepatoprotetora (LIN *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2000; CHEN & LI, 2006), afrodisíaca (RATNASOORYIA & DHARMASIRI, 2000), antidiabética (NAGAPPA *et al.*, 2002) e antioxidante (MASUDA *et al.*, 1999; CHYAU *et al.*, 2002 e 2006). Apesar da ampla utilização terapêutica de extratos obtidos a partir de *Terminalia catappa*, ainda são escassos os trabalhos que demonstrem seu potencial efeito terapêutico no tratamento de infecções fúngicas ocasionadas por *Candida albicans*.

Os fármacos abrangem um grupo diversificado de produtos químicos utilizados na medicina veterinária, nas práticas agrícolas, na saúde humana e nos cosméticos (produtos de higiene e cuidados pessoais). Muitos são altamente bioativos e, quando presentes no ambiente, ocorrem geralmente em concentrações traço. Esta classe de compostos tem suscitado grande preocupação nos últimos anos devido à introdução contínua no ambiente aquático (BARCELÓ & PETROVIC, 2007).

De acordo com Daughton, (2007), os efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) têm sido reconhecidos como as principais vias potenciais de liberação de poluentes. Vale ressaltar que em âmbito nacional, as ETE são preparadas para diminuição da carga orgânica dos efluentes e, em muitas localidades, os mesmos são lançados sem nenhum tratamento. Uma vez liberados no meio ambiente, os fármacos (como outros poluentes) podem ter a sua “residência” em reservatórios de armazenamento que podem ser vistas como fontes secundárias de disponibilização; exemplos são os resíduos concentrados nos sedimentos, em partículas orgânicas, ou na biota, portanto as fontes são diversas.

Dentro do contexto ecotoxicológico, os fármacos são considerados poluentes orgânicos emergentes (POE), uma vez que, após excreção no meio ambiente mantem suas propriedades químicas o bastante para promover influências negativas sobre organismos não-alvos (MONTEIRO & BOXALL, 2010). Dados apontam que cerca de 1 a 4% da dose ingerida de um fármaco é excretada ao meio ambiente na sua forma inalterada. Os demais 96 a 99% correspondem a metabólitos gerados a partir da molécula de origem (GOODMAN & GILMAN, 2012). Tais dados são de suma importância pois

apontam necessidade crescente de estudos ecotoxicológicos a partir de uma série de fármacos e seus metabólitos presentes no meio ambiente.

A questão da ocorrência de fármacos no ambiente aquático tem atraído significativa atenção da mídia e está intimamente relacionada ao estilo de vida da sociedade moderna, aos padrões de consumo e ao envelhecimento da população. Estes fatores exigem, em níveis mais elevados, o uso de medicamentos e produtos para cuidados pessoais. Nesse sentido, para se conhecer os efeitos biológicos e realizar avaliações de risco ambiental, estudos ecotoxicológicos para avaliação de efeitos agudo e crônico de fármacos tem sido realizado com as diferentes classes de fármacos e com distintos organismos-teste (HALLARE *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2005; GAGNÉ *et al.*, 2006; JJEMBA, 2006; CANESI *et al.*, 2007; QUINN *et al.*, 2008). Atualmente, estudos ecotoxicológicos têm sido realizados em diferentes partes do mundo para identificar fármacos potencialmente perigosos para o meio ambiente, porém, os dados disponíveis na literatura são insuficientes. A ocorrência desses fármacos residuais em águas superficiais e subterrâneas, bem como em sedimentos, demonstra a necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos dessas substâncias no ambiente (BILA & DEZOTTI, 2003).

Apesar da crescente preocupação com a presença de fármacos no meio ambiente ainda não existem estudos apontando o risco ambiental de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Tendo em vista que as plantas apresentam uma série de compostos químicos, considera-se também importante realizar avaliação do risco ambiental das mesmas.

Tendo em vista que não existem na literatura científica trabalhos avaliando potencial atividade antifúngica, fitoquímica e ecotoxicológica de folhas caídas das árvores de *Terminalia catappa*, aliado à necessidade de descoberta de novos tratamentos antifúngicos, este trabalho teve como propósito proceder tais avaliações a fim de que sirvam como suporte científicos para novos estudos acerca da referida planta medicinal.

1- OBJETIVOS

- a) Avaliar atividade antifúngica *in vitro* de diferentes concentrações de FrAcOH obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa* mediante exposição a *Candida albicans*;
- b) Análise fitoquímico de FrAcOH obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa*, por contagem em camada delgada;
- c) Proceder avaliação ecotoxicológica de FrAcOH através de ensaios agudo e crônico utilizando *Lytechinus variegatus*.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Coleta e identificação

As folhas caídas de *Terminalia catappa* foram coletadas na orla da cidade do Santos-SP entre os meses de agosto e setembro de 2013. As mesmas foram identificadas pelo Prof. Ms Paulo Sampaio sendo registrada a exsicata (M. TOMAZ 01) (Figura 2).



Figura 2: Exsicata folhas de *Terminalia catappa*

3.2- Processo extrativo

Após a coleta das folhas caídas na orla de Santos de *Terminalia catappa*, foram lavadas, trituradas e submetidas à maceração com etanol absoluto (1:4) (p/v) por período de 2 hs seguida por percolação por 24 hs. O material foi filtrado

e submetido ao rotaevaporador com temperatura controlada (45°C), obtendo-se ao final o extrato etanólico bruto seco (EEB) (Figura 3) (PRISTA, 1995). Os testes foram realizados no laboratório B34 na UNISANTA (Universidade Santa Cecília).



Figura 3: Processo extrativo Percolação folhas de *Terminalia catappa* Linn – (Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais Unisanta)

3.3- Partição do extrato

A partir do EEB foi realizada a partição extrativa com solventes de diferentes polaridades: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Ao final foram obtidas cinco (0,50 frações, sendo codificadas: Fração Hexânica (FrHex), Fração Clorofórmica (FrCHCl₃); Fração Acetato de Etila (FrAcOH); Fração Metanólica (FrMet) e Fração Aquosa (FrAq). Tendo como objetivo a avaliação fitoquímica de compostos fenólicos (Taninos), foram submetidas à cromatografia em camadas delgadas (CCD) as frações FrAcOH e FrAq (Figura 4) (PRISTA, 1995).

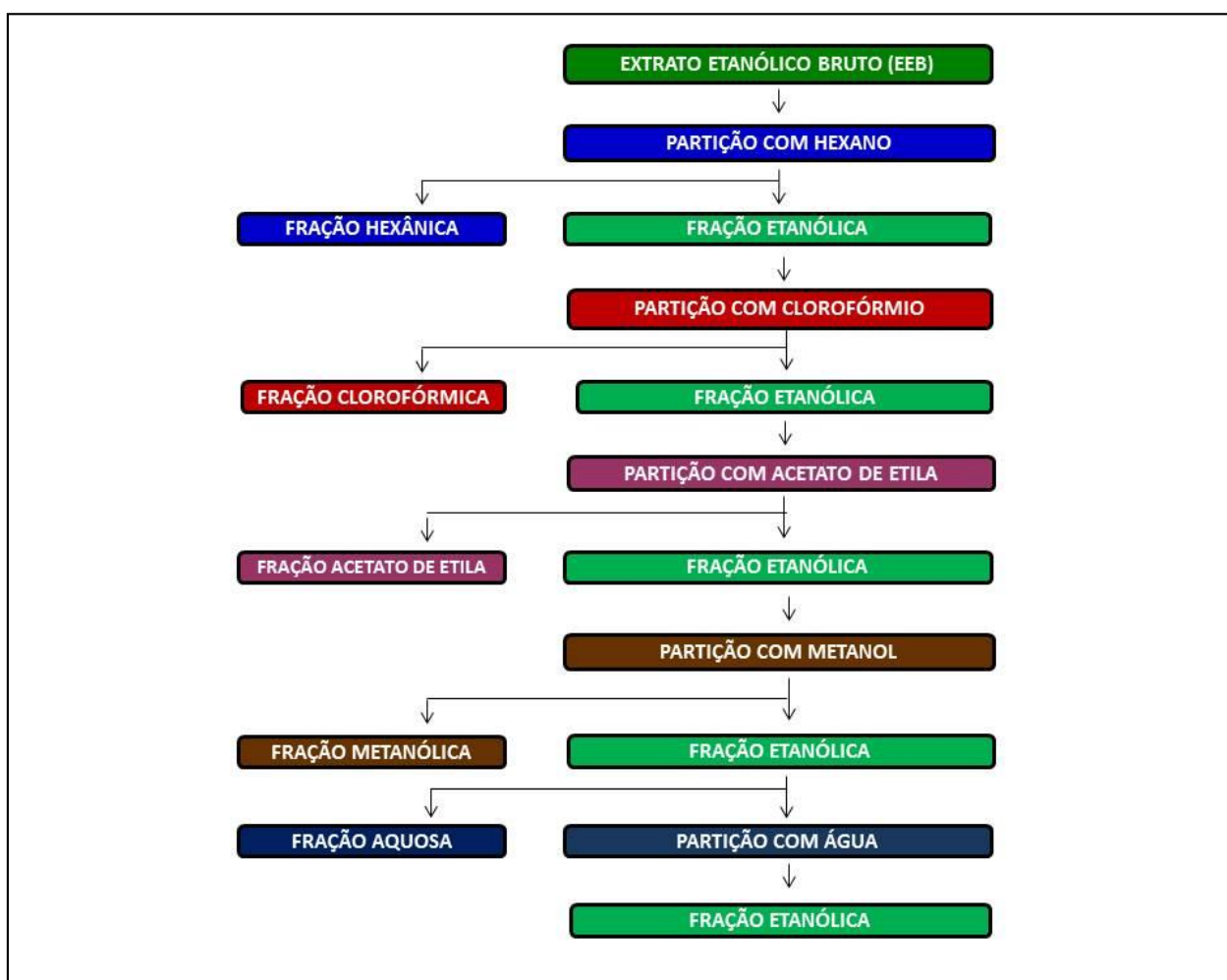


Figura 4: Processo de partição do extrato de *Terminalia catappa* Linn

3.4- Ensaios microbiológicos *in vitro*

3.4.1- Cultivo de fungos e preparação do inóculo

Candida albicans foram submetidas a cultivo em caldo Sabouraud-dextrose em temperatura de 35°C, com ao menos três repiques sucessivos de 24 horas previamente ao experimento. Para a realização dos ensaios de determinação da concentração fungicida mínima, no dia do experimento as leveduras foram contadas e a suspensão do inóculo foi ajustada para $2,5 \times 10^3$ céls/mL em caldo Sabouraud-dextrose. Os testes foram realizados no laboratório B13 na UNISANTA (Universidade Santa Cecília).

3.4.2 - Preparo das soluções-estoque para os testes de susceptibilidade aos extratos vegetais

A fração seca de FrAcOH foi re-suspensa em etanol 30% a modo de se obter a concentração final de 100 mg de extrato seco/mL, sendo então esta solução denominada de “solução estoque”.

3.4.3- Realização dos testes de susceptibilidade à Fração (FrAcOH)

Para realização dos testes de susceptibilidade à Fração (FrAcOH), foi utilizado o método de macro diluição em caldo, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), descrito em detalhes por COLOMBO, (1995).

3.4.3.1- Diluição em caldo realizada em tubos (macrodiluição)

A partir da solução-estoque (100 mg/mL), a fração (FrAcOH) foi diluída em caldo Sabouraud-dextrose e distribuída em tubos esterilizados, realizando-se diluições sucessivas para obter-se uma série de 5 concentrações variando de 1,25 a 10 mg/mL. No dia do experimento 0,9 mL do inóculo foi dispensada em cada tubo contendo as concentrações desejadas dos extratos. Ao final do experimento o inóculo foi testado em 5 tubos contendo as concentrações finais variando de 1,25 a 10 mg/mL da fração. Adicionalmente, para cada ensaio, foi preparado um tubo-controle negativo contendo apenas o diluente do extrato e a solução meio-inóculo. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, as leveduras foram lavadas em caldo Sabouraud-dextrose estéril, semeadas em meio Ágar Sabouraud-dextrose e incubadas a 35°C por 24 horas.

3.4.3.2- Leitura e interpretação dos resultados

Após 24 horas de incubação em meio Ágar Sabouraud-dextrose, a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo foi definida como a Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato para este microrganismo. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

3.5- Análise fitoquímica

3.5.1- Cromatografia em Camada Delgada

Foram pesados 0,01 g de cada uma das amostras e diluídas em 1 mL de metanol. Foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 F254 (Merck) e como fase móvel solução de Clorofórmio: Metanol: n-propanol: Água (25:30:5:20;v/v). Como substância padrão foi utilizado Ácido Gálico (Sigma Aldrich). Foram aplicados na placa 20 µL de cada amostra. Após diluição da amostra em cuba cromatográfica foi nebulizado reagente revelador com solução de cloreto férrico 1% em metanol e calculados os Fatores de Retenção (Rf) (WAGNER & BLADT, 1984). Os testes foram realizados no laboratório C06 na UNISANTA (Universidade Santa Cecília).

3.6- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.6.1- Avaliação qualitativa

Foram pesados 100 µg de FrAcOH às quais foram solubilizadas em etanol e posteriormente serão aplicados em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) de alta resolução (sílica gel 60, Merck, Alemanha). A cromatografia foi desenvolvida utilizando fase móvel compatível para compostos fenólicos utilizando como solventes a mistura de Acetato de etila/metanol/água (40:5,4:5; v/v/v) (KOTZE & ELOFF, 2002). Em seguida, sobre as placas foi nebulizada solução metanólica de DPPH (0,2%) e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. A atividade antioxidante foi observada com o surgimento de bandas amarelo-esbranquiçadas sobre um fundo roxo e, desta forma, permitindo a análise do perfil das bandas que apresentam atividade antioxidante.

3.6.2- Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes em FrAcOH de *Terminalia catappa* foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (BONOLI et al., 2004). A amostra vegetal (FrAcOH) (100 mg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume

acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 e 0,781 mg /mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7- Avaliação Ecotoxicológica

3.7.1- Ensaio para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com *Lytechinus Variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Lytechinus variegatus pertencente à família Toxopneustidae. Possui carapaça esverdeada e achatada inferiormente e espinhos de cor variando desde verde até púrpura arroxeada. Esta espécie alimenta-se de macroalgas, vive em locais onde estas são abundantes e possui o hábito de se recobrir com detritos vegetais e pequenas conchas. Os organismos podem ser encontrados desde a zona entre-marés até cerca de 20 m e profundidade. É bastante comum na região do Caribe e na costa atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do norte (EUA) até a costa sudeste do Brasil (ABNT, 2006).

De acordo com o protocolo da US EPA, (1991), o método consistirá na exposição de espermatozoides de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*), por um período de 1 hora, a diferentes concentrações (0,781 a 0,2 g/L) de FrAcOH obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa*. Após este período, a solução contendo óvulos será adicionada aos frascos-teste. Vinte minutos após o ensaio será encerrado com a adição de 0,5 mL de formol tamponado com bórax em todas as réplicas. A técnica de indução de liberação dos gametas (Figura 5) utilizada neste ensaio seguiu o método descrito na norma técnica ABNT/NBR

15350 (2012). No entanto, neste método é importante estabelecer uma proporção espermatozoide/óvulo que propicie uma taxa adequada de fertilização (70 % - 90 %) no controle do ensaio. Os testes foram realizados no laboratório Ecotoxicológico na UNISANTA (Universidade Santa Cecília).



FIGURA 5: Estímulo para identificação e liberação de espermatozoides de *Lytechinus variegatus*. (Laboratório de Ecotoxicologia Unisanta)

Para isso, após a liberação dos gametas (Figura 6), foram seguidos os procedimentos descritos no protocolo US EPA (1991).



FIGURA 6: Coleta de espermatozoides de *Lytechinus variegatus*. (Laboratório de Ecotoxicologia Unisanta)

No caso dos espermatozoides, o volume liberado por machos foi acondicionado em um béquer seco envolto com gelo (Figura 7); a partir deste volume foram preparadas diferentes soluções (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) diluídas em água do mar filtrada em membrana de 0,45 μm de modo a se obter uma concentração de 5×10^7 espermatozoides/mL, ideal para realização do ensaio.

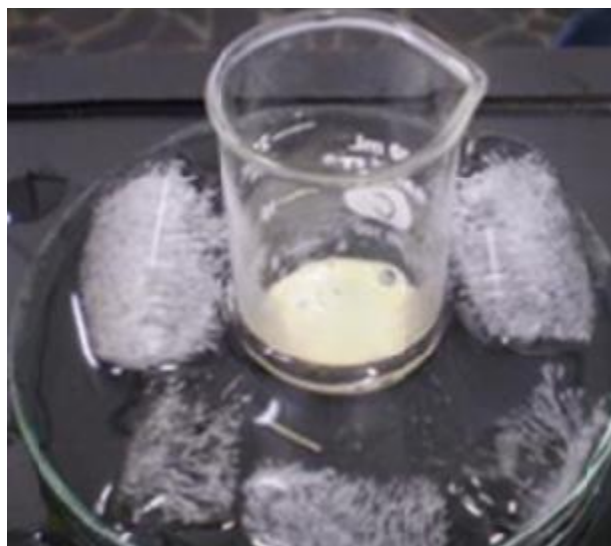


FIGURA 7: Espermatozoides de *Lytechinus variegatus* acondicionados em um béquer envolto com gelo. (Laboratório de Ecotox da Unisanta).

Antes de iniciar os testes, foi realizada uma pré-fecundação, preparada uma solução na proporção de 0,5 mL de espermatozoides para 25 mL de água de diluição. Esta solução foi misturada de modo a proporcionar a dissolução de

possíveis grumos. Em seguida foi acrescentado um volume de 1 mL a 2 mL da solução de espermatozoides ao recipiente contendo os óvulos (Figura 8) e aguardado 10 minutos com leve agitação, sendo a seguir feita uma contagem para verificar a quantidade de óvulos fecundados.

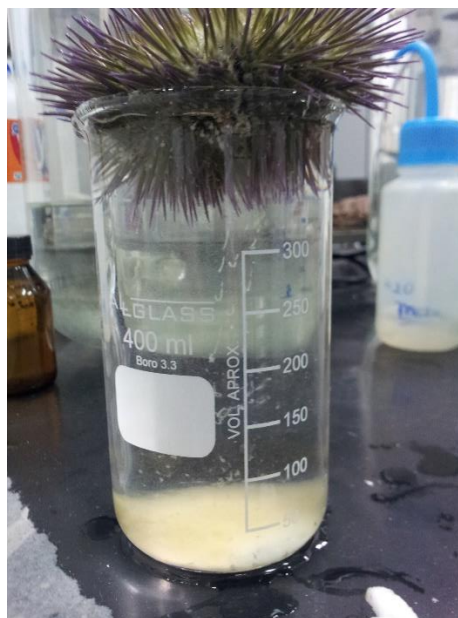


FIGURA 8: Fêmea de *Lytechinus variegatus* liberando os óvulos. (Laboratório de Ecotox da Unisanta).

Assim que preparada a solução com a concentração estimada de 5×10^7 espermatozoides/mL, um volume de 100 (cem) μL desta solução de espermatozoide foi colocada em todas as réplicas dos ensaios e expostos durante 1 (uma) hora a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ em uma incubadora marca FANEM. Durante o período de exposição dos espermatozoides foi preparada a solução de óvulos de 2000 óvulos/mL, conforme já descrito acima. Após o período de exposição dos espermatozoides, a solução de óvulos foi homogeneizada e uma alíquota de 1 mL foi adicionada em todas as réplicas do ensaio. Em seguida foram aguardados 20 (vinte) minutos a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ quando o ensaio foi encerrado com a adição de 0,5 mL de formol tamponado com bórax. Para realização da leitura do ensaio, foi utilizado um microscópio óptico da marca Meiji e, com o auxílio de uma câmara de *Sedgwick-Rafter*, foram contados os 100 (cem) primeiros ovos. Em uma planilha foram anotados os números de óvulos fertilizados (identificados pela membrana de fecundação) (Figura 9) e de óvulos não fertilizados. A tabela 1 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

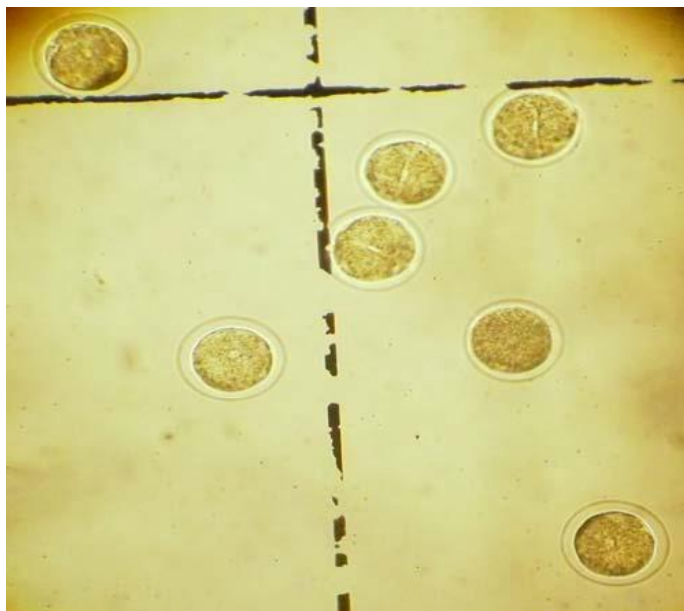


FIGURA 9: Ovos de *Lytechinus variegatus* (400X) – (CORTEZ, 2010)

Tabela 1: Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* (Fertilização)

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±2° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	-
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	1 h e 20 minutos
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 mL
Volume das soluções-teste	10 mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	Aproximadamente 5x10 ⁷ células e espermáticas e 2.000 óvulos por frasco-teste.
Idade do organismo-teste	Gametas de ouriço-do-mar recém liberados
Efeito observado	Taxa de fertilização
Validade do ensaio	De 70% a 90% de fertilização no controle
Alimentação	Sem

3.7.2- Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) de curta duração com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

O método de ensaio seguirá a norma técnica ABNT/NBR 15350, 2012, que consistirá na exposição de ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) a diferentes concentrações (0,781 a 0,2 g/L) de FrAcOH obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa* durante o período de desenvolvimento embriolarval (24h a 28h para *Lytechinus variegatus*). Após o período de 24 horas de exposição com as substâncias teste em câmara com temperatura entre $25 \pm 2^\circ \text{C}$, será retirada uma alíquota do controle para verificar se pelo menos 80% das larvas atingiram o estágio de *pluteus* (critério de aceitabilidade do ensaio). Sendo assim, o ensaio será encerrado adicionando em todas as réplicas 0,5 mL de formol tamponado com bórax. A leitura do ensaio será realizada em câmara de Sedgwick-Rafter e o estágio de desenvolvimento, bem como a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos de cada réplica serão tabulados. Análises físicas e químicas iniciais e finais (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) serão realizadas. A tabela 2 apresenta um resumo da metodologia do ensaio. Os testes foram realizados no laboratório Ecotoxicológico na UNISANTA (Universidade Santa Cecília).

TABELA 2: Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* (Embriolarval)

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±2° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	24 a 28 h
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 mL
Volume das soluções-teste	10 mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	30 organismos por mililitro
Idade do organismo-teste	Gametas de indivíduos adultos
Efeito observado	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento
Validade do ensaio	Mínimo de 80% de larvas pluteus normais nos controles
Alimentação	Sem

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade realizados para FrAcOH após a exposição de *Lytechinus variegatus* serão calculados através do Trimmed Spearman Karber®.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução da biologia molecular, associada ao requinte das técnicas de modelagem química, tem proporcionado o surgimento constante de novas moléculas farmacologicamente ativas. Atualmente, a Farmacologia possui vasta gama de fármacos capazes de tratar os mais variados processos patológicos,

fato este que é considerado de suma importância para o aumento da expectativa de vida da civilização. Dentre tais classes de fármacos de suma importância clínica encontram-se os antifúngicos. Estes podem ser classificados em fungicidas (causam a morte de fungos) e fungistáticos (promovem a inibição do crescimento de fungos). Os agentes antifúngicos convencionais são geralmente fungistáticos, cuja ação não promove a erradicação completa do microrganismo (VIRIATO, 2014).

Apesar desta crescente evolução técnica, a Ciência ainda não foi capaz de descobrir métodos que sejam capazes de gerar tratamentos farmacológicos eficazes, porém ausentes de reações adversas, efeitos colaterais e sintomas de intoxicação. Tal fato leva ao constante debate acadêmico sobre a necessidade do uso de fármacos e sua relação risco/benefício. Este tipo de debate tem sido frequentemente observado em pacientes submetidos a tratamentos farmacológicos em situações clínicas mais complexas tais como aquelas envolvendo infecções fúngicas invasivas.

A constante busca de propostas terapêuticas através do conhecimento de novas moléculas farmacologicamente ativas está direta e historicamente associada às plantas medicinais e à Fitoterapia. Há séculos o homem busca a cura das mais variadas doenças utilizando-se de recursos oferecidos pela natureza. Dentre a ampla diversidade de recursos naturais, encontram-se as plantas medicinais, tendo como destaque no presente trabalho *Terminalia catappa* Linn (Combretaceae).

Especificamente em Santos-SP, *Terminalia catappa* é notada em toda a extensão da orla, bem como em diversos outros pontos da cidade. Levantamentos etnobotânicos elaborados pela Prefeitura Municipal indicam no jardim da Orla da praia de Santos-SP a existência de 1746 árvores, das quais 943 são palmeiras de pequeno e médio porte, de 21 espécies diferentes. Das 803 árvores restantes, *Terminalia catappa* correspondem por mais de 90% da amostragem. Vale ressaltar no presente trabalho que, durante os períodos de Outono e Inverno, há excessiva queda das folhas desta espécie, sendo tais folhas consideradas um contratempo para a população em geral, em virtude do acúmulo de lixo nas ruas e residências (Figura 10) (COCCARO *et al.*, 2013). Tais dados foram os responsáveis pela iniciativa de coleta destas folhas de *Terminalia*

catappa caídas em área urbana, mudando o destino final de lixo comum para obtenção de extrato vegetal em laboratório.

Figura 10: Fotos de *Terminalia catappa* na cidade de Santos-SP



Após processo extrativo utilizando etanol absoluto (1:4) (p/v), foram obtidos 32,66 g de extrato etanólico bruto (EEB) (rendimento extrativo de 6,53%). Após fracionamento com solventes de polaridade crescente foram obtidos 30,87 g da fração acetato de etila (FrAcOH) (rendimento extrativo de 5,46%) (Tabela 3).

Tabela 3: Rendimento extrativo com folhas de *Terminalia catappa*

Peso (g) folhas frescas de <i>Terminalia catappa</i>	Volume de solvente (Etanol absoluto) utilizado (mL)	Quantidade (g) de Extrato Etanólico Bruto (EEB)	Rendimento extrativo do EEB (%)	Quantidade (g) da Fração Acetato de Etila (FrAcOH)	Rendimento extrativo da FrAcOH (%)
500 g	2000 mL	32,66 g	6,53%	30,87 g	5,46%

Nas últimas décadas diversos são os trabalhos publicados correlacionando atividade antifúngica e as plantas medicinais. Tais estudos ganham destaque, uma vez que, além de se tratarem de recursos terapêuticos de fácil acesso às populações de menor renda, estas são também para a indústria farmacêutica uma grande fonte para a obtenção de novas moléculas farmacologicamente ativas (HONG *et al.*, 2011). Dentre os diversos trabalhos científicos abordando este assunto, muitos são aqueles envolvendo plantas do gênero *Terminalia*.

Dados etnofarmacológicos oriundos da África do Sul relatam que é fato comum a utilização de seis (06) espécies de *Terminalia* (*T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis* e *T. sambesiaca*) para o tratamento de infecções fúngicas. Tais dados são também comprovados quando reproduzidos mediante ensaios em laboratório (ELOFF *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* realizados por Babayi, (2004), relatam que o extrato metanólico obtido a partir de *Terminalia catappa* também são capazes de promover significativa atividade farmacológica contra espécies de *Candida albicans*. No entanto, apesar de dados relacionados às propriedades antifúngicas de diversas espécies de *Terminalia*, ainda não existem dados relacionados à provável atividade antifúngica da fração acetato de etila (FrAcOH) de folhas caídas das árvores de *Terminalia catappa* e aptas para descarte em lixo comum. Tais dados serviram como suporte para elaboração de protocolo experimental objetivando avaliação de atividade antifúngica *in vitro* de FrAcOH de *Terminalia catappa*.

Dados obtidos mediante avaliação de atividade antifúngica *in vitro* apontam que após exposição de *Candida albicans* a quatro diferentes concentrações de FrAcOH (1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg/mL) demonstram inibição nas Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nas doses de 2,5 (inibição de 43,76%); 5,0 (inibição de 83,67%) e 10 mg/mL (inibição de 100%) (Figura 11). Os dados apresentados apontam ainda uma Concentração Efetiva 50% (CE50 = 3,167 mg/mL).

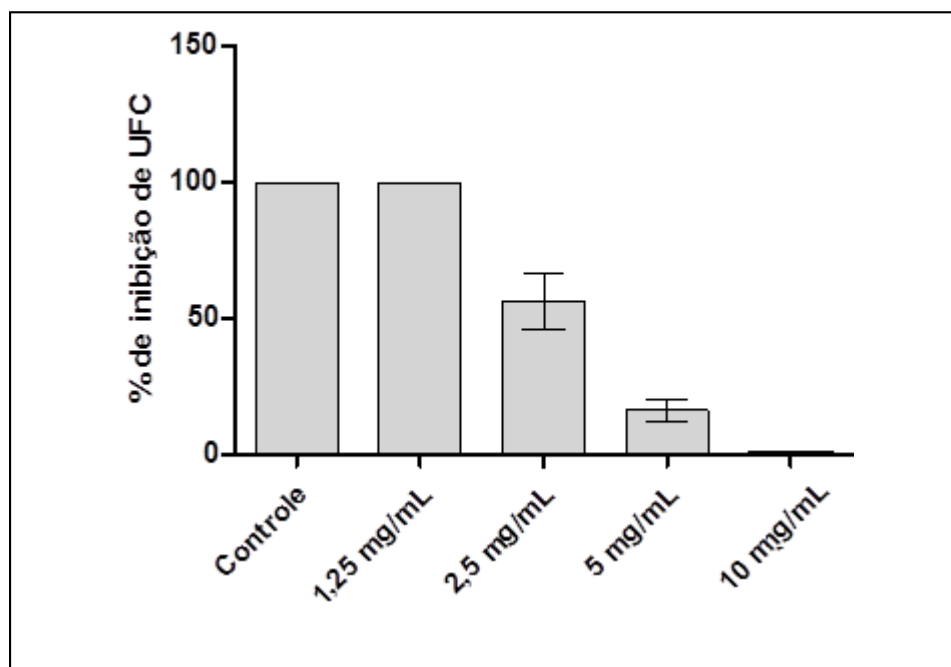


Figura 11: Atividade de FrAcOH de *Terminalia catappa* em quatro diferentes concentrações após exposição *in vitro* à *Candida albicans*. Os resultados são expressos como a porcentagem de inibição de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) comparadas ao grupo controle

Com o enfoque na busca de suporte fitoquímico que justifique esta importante atividade antifúngica, foi realizada avaliação fitoquímica da fração (FrAcOH), obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa*. Os resultados demonstram Fator de Retenção (Rf) de 0,9 (Figura 12) sendo este compatível para o ácido gálico (Figura 13), substância esta utilizada como padrão para análise e pertencente à classe dos taninos.

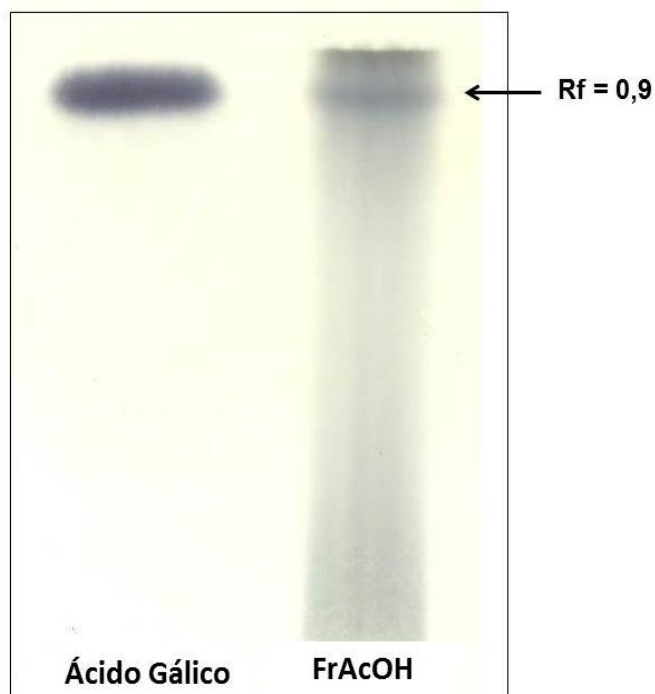


Figura 12: Placa cromatográfica de FrAcOH de *Terminalia catappa* eluída com mistura de clorofórmio / metanol / n-propanol / água (5:6:1:4; v/v) como fase móvel e revelada com solução de cloreto férrico 1% em metanol

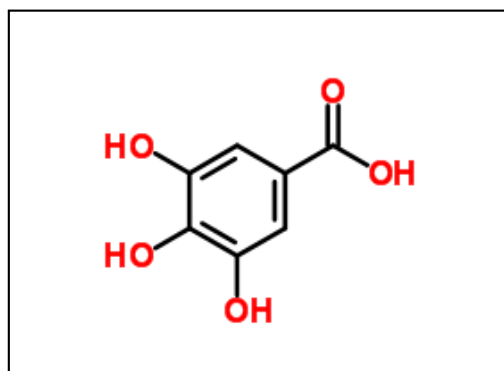


Figura 13: Estrutura química do ácido gálico (Royal Society of Chemistry, 2014)

É fato que taninos se tratam de grupos de metabólitos secundários vegetais de amplo interesse para a indústria farmacêutica. Quimicamente estes são classificados como Taninos hidrolisáveis e Taninos condensados (SINGLETON & KRATZER, 1973). Antolovich, (2000), relata em suas revisões uma série de Taninos hidrolisáveis e condensados que atualmente demonstram grande interesse ao mercado farmacêutico mundial. Dados apontam ainda

eficácia no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, bem como no tratamento de doenças infecciosas fúngicas e bacterianas.

O ácido gálico, composto encontrado no extrato de FrAcOH integra a classe dos taninos hidrolisáveis. KIM *et al.*, 2009, relatam em seus trabalhos que o ácido gálico apresenta propriedades antifúngicas, sendo esta propriedade atribuída à sua capacidade de destruir a estrutura da membrana celular de *Candida albicans*. Outros estudos apontam também a capacidade do ácido gálico em inibir a biossíntese de ergosterol, principal componente integrante de membranas de leveduras, tal como *Candida albicans* (ENDO *et al.*, 2010). Além disso, muitos são os trabalhos que tem atribuído a atividade antifúngica de compostos fenólicos tais como o ácido gálico em virtude de seu perfil químico. De acordo com Souza, (2010), os grupos hidroxílicos presentes nos compostos fenólicos podem formar ligações de hidrogênio com enzimas do metabolismo microbiano desativando-as e causando inibição do desenvolvimento fúngico. Além disso, consta também em literatura que compostos fenólicos tal como o ácido gálico podem promover alterações na bicamada lipídica da membrana celular e modificar a atividade dos canais de cálcio, aumentando a permeabilidade e ocasionando a perda de constituintes intracelulares vitais para a sobrevivência fúngica. Tendo em vista tais dados tem se tornado fato cada vez mais comum na comunidade científica a realização de ensaios antifúngicos com substâncias que demonstrem potencial atividade antioxidante.

Sendo a atividade antioxidante de compostos fenólicos considerada como das principais características de compostos com suposta atividade antifúngica, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante de FrAcOH obtida a partir das folhas de *Terminalia catappa*. A avaliação qualitativa de atividade antioxidante *in vitro* trata-se de método amplamente utilizado nos mais variados setores do mundo científico. Dentre os métodos disponíveis para tal análise encontra-se o método de atividade antioxidante com 2, diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) em placa cromatográfica. Tal teste foi realizado no presente trabalho, cujos dados podem ser observados na Figura 14.



Figura 14: Placa cromatográfica de FrAcOH de *Terminalia catappa* eluída em clorofórmio / metanol / n-propanol / água (5:6:1:4; v/v) como fase móvel e revelando com DPPH 0,2% diluído em metanol. Bandas amarelas indicam atividade antioxidante. O Ácido Gálico foi utilizado como substância padrão (controle positivo)

Segundo Molyneux, (2004), o ensaio antioxidante utilizando o DPPH, fundamenta-se na propriedade deste radical em extrair prótons de moléculas doadoras, tendo como consequência sua redução. O radical DPPH apresenta faixa de absorção de 517 nm em espectrofotômetro e, após reação com moléculas antioxidantes, tal faixa de absorção é diminuída, tendo como consequência mudança de coloração (de violeta intenso a amarelo claro). As bandas amarelo claro observadas após ensaio antioxidante demonstram que existem compostos presentes na fração avaliada (FrAcOH) de *Terminalia catappa* que apresentam propriedades antioxidantes. Seguramente, dentre os diversos compostos que demonstram tal atividade, encontra-se presente em FrAcOH o Ácido Gálico.

Uma vez observada a presença de compostos fenólicos, tal como o Tanino hidrolisável Ácido gálico na amostra avaliada, foi consequentemente realizado teste para quantificação de tal composto fitoquímico na amostra vegetal em questão. Diversos são os métodos utilizados para quantificação de compostos fenólicos; todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é o

mais extensivamente empregado (ABDILLE *et al.*, 2005; DASTMALCHI *et al.*, 2007).

Para realização de tal análise foi realizada curva padrão com ácido gálico (25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 e 0,781 mg). Os dados obtidos demonstram alta concentração de compostos fenólicos (42,1 mg) expressos na forma de ácido gálico em FrAcOH obtida a partir de *Terminalia catappa*. Para efeito de comparação dos resultados obtidos foi utilizada curva padrão com Ácido Gálico.

Tais dados apontam de fato presença de compostos fenólicos em FrAcOH, fortalecendo hipótese de que compostos com propriedades antioxidantes, tais como os taninos, possam contribuir na atividade antifúngica evidenciada.

Estudos relacionados à Ecotoxicologia tem ganhado destaque nos últimos anos em virtude do aumento da presença dos chamados poluentes orgânicos emergentes (POE) no meio ambiente. Tal fato deve-se à maior facilidade do acesso por parte da população mundial aos tratamentos farmacológicos e produtos de higiene pessoal. Levando-se em conta a elevação de tal consumo fica evidente o aumento da presença de tais (POE) sendo liberados em alta escala nos emissários e conseqüentemente aumentando as possibilidades de comprometimento do meio ambiente. Estes fatos já têm sido avaliados em protocolos laboratoriais utilizando-se de modelos agudos e crônicos em espécies de diferentes níveis evolutivos tais como bactérias, algas, crustáceos e peixes. Dados obtidos a partir destes testes são capazes de demonstrar efeitos adversos nestes organismos mediante exposição a diferentes concentrações dos mais variados POE (SANTOS, 2010).

Atualmente muitos são os trabalhos objetivando detecção de (POE) no meio aquático. Tais dados são expressos na forma de ng/L a µg/L sendo de suma importância para promover suporte para análise de risco ambiental (ISIDORI *et al.*, 2007). A diretiva europeia 93/67 é vastamente utilizada em todo o mundo para notificação e classificação de substância de risco ambiental. De acordo com os resultados de toxicidade obtidos em laboratório tal diretiva é capaz de promover classificação do perfil ecotoxicológico da substância avaliada. Esta classificação é determinada através de ensaios que demonstrem a chamada Concentração Efetiva 50% (CE50). Esta é caracterizada como a concentração da amostra capaz de causar um efeito agudo a 50% dos

organismos no tempo de exposição e nas condições do teste. Com base em tais dados é possível classificar os (POE) como: extremamente tóxicos (compostos com $CE_{50} < 0,1$ mg/L); muito tóxicos (CE_{50} entre 0,1 e 1 mg/L); tóxicas (CE_{50} entre 1 e 10 mg/L); nocivas (CE_{50} entre 10 e 100 mg/L) e não tóxicas (CE_{50} maior que 100 mg/L) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1996).

Apesar da evolução acerca dos estudos ecotoxicológicos, após ampla revisão não foram encontrados dados que correlacionem estudos em laboratório com propósito de avaliar risco ambiental por parte das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Levando-se em conta que as plantas são dotadas de compostos químicos com propriedades farmacológicas e toxicológicas, há de se pressupor que a presença destes compostos fitoquímicos no meio ambiente possa trazer danos ambientais. Ao mesmo tempo, vale ressaltar que produtos oriundos de plantas medicinais podem apresentar eficácia farmacológica similar ou melhor quando comparados aos medicamentos sintéticos disponíveis e, ao mesmo tempo, menor risco ao meio ambiente. Neste sentido, as plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos podem se tornar grande alternativa não apenas como importante recurso farmacológico, mas também como valiosa proposta com menores possibilidades de risco ao meio ambiente (TOMA *et al.*, 2014, *in press*). Levando-se em conta tais informações, foram realizadas análises ecotoxicológicas utilizando-se de ensaios de fertilização em modelo agudo com *Lytechinus variegatus*, tendo como propósito avaliar o risco ecotoxicológico de FrAcOH de *Terminalia catappa* (Figura 15).

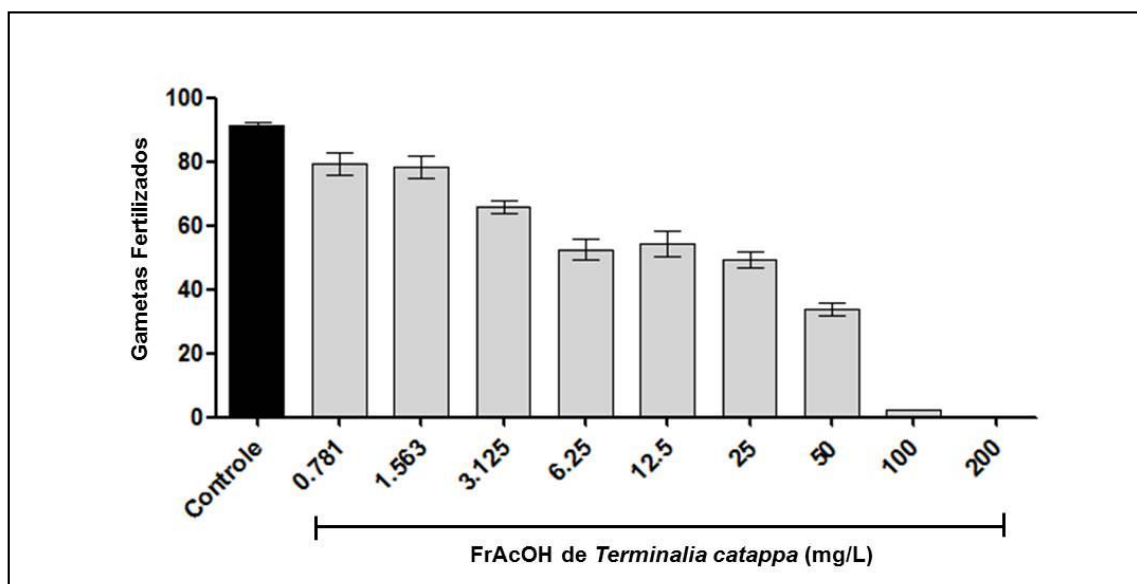


Figura 16: Valores médios de toxicidade aguda (fertilização) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de FrAcOH de *Terminalia catappa*. Os valores expressos representam a média $\pm$ desvio padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio) sendo o valor de CE50 = 31,1933 mg/L.

Os dados obtidos no referido ensaio demonstram influência sobre a fertilização de gametas dos mesmos sendo o valor de CE50 = 31,1933 mg/L. Segundo diretiva 93/67/EEC (CEC, 1996) que classifica as substâncias de acordo com os resultados pontuais de toxicidade (valores de CE₅₀) a FrAcOH de *Terminalia catappa* pode ser considerada como nociva ao meio ambiente (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação de FrAcOH de *Terminalia catappa* baseada na diretiva 93/67/EEC da União Europeia

Não tóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamente tóxico
CE ₅₀ > 100 mg.L ⁻¹	CE ₅₀ entre 10 e 100 mg.L ⁻¹	CE ₅₀ entre 1,0 e 10 mg.L ⁻¹	CE ₅₀ entre 0,1 e 1,0 mg.L ⁻¹	CE ₅₀ < 0,1 mg.L ⁻¹

Além disso, dados obtidos nos ensaios de teste embriolarval em modelo crônico utilizando *Lytechinus variegatus* com exposição à FrAcOH de *Terminalia catappa* demonstram valores de CEO = 3,125 mg/L e CENO < 3,125 mg/L (Figura 16).

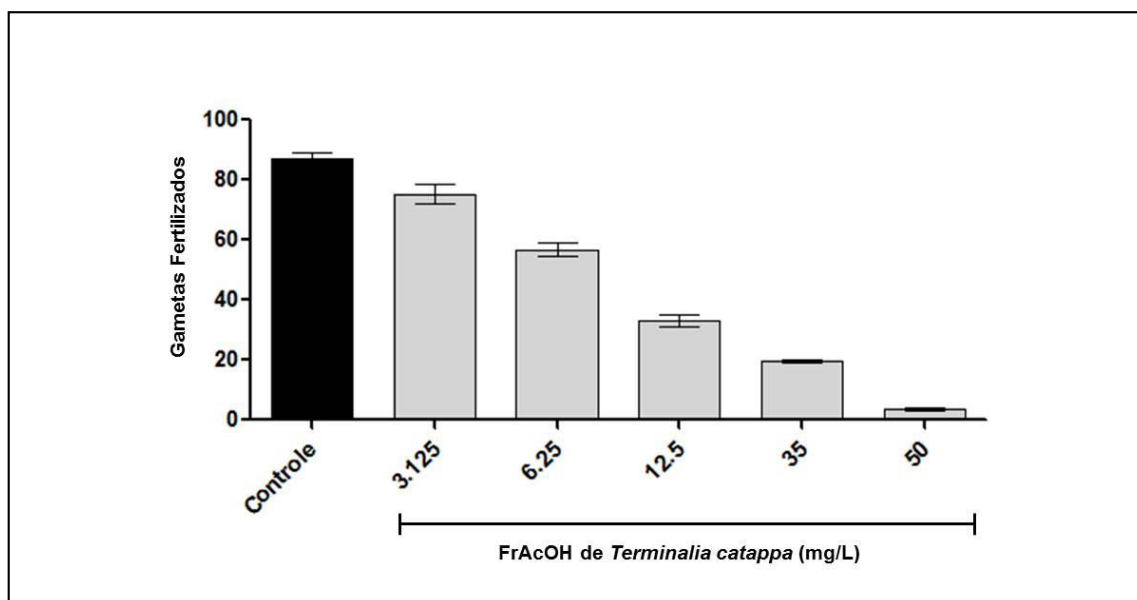


Figura 16: Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de FrAcOH de *Terminalia catappa*. Os valores expressos representam a média $\pm$ desvio padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

Dados relacionados à farmacocinética são de fundamental importância para a avaliação do risco ambiental dos fármacos. Dentre os conceitos associados a esta linha farmacológica encontram-se os valores de K_{ow} . Sabe-se que, a partir destes valores, é possível correlacionar os parâmetros farmacocinéticos de uma molécula, tais como absorção, distribuição, metabolização e excreção no organismo humano, bem como a propriedade de bioacumulação em organismos aquáticos, contribuindo deste modo para análises ecotoxicológicas. De acordo com esta visão, fármacos que apresentam maiores valores de K_{ow} possuem maior efeito bioacumulativo, aumentando deste

modo, a possibilidade da geração de danos ecotoxicológicos. Levando-se em conta tais informações, cabe analisar dados de K_{ow} de fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos (Tabela 5)

Tabela 5: Fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos disponíveis no mercado farmacêutico para o tratamento de *Candida albicans* e seus respectivos valores de K_{ow}

ANTIFÚNGICO (AZÓLICOS)	K_{ow}
Fluconazol	-0.60
Voriconazol	0.20
Cetoconazol	0.64
Posaconazol	0.68
Itraconazol	0.75
Clotrimazol	0.80

Fonte: Toxicology Data Network, 2014

Tendo como suporte os valores de K_{ow} dos fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos, a Tabela 5 apresenta fármacos em ordem crescente de risco ecotoxicológico (Fluconazol (menor valor de K_{ow} – menor risco ecotoxicológico) e Clotrimazol (maior valor de K_{ow} – maior risco ecotoxicológico). Nas últimas décadas tem-se observado aumento exponencial de pacientes portadores de doenças fúngicas, tal como a Candidíase. Tais dados levaram ao expressivo aumento do número de pacientes usuários de fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos, sendo o fluconazol tratamento de primeira escolha. No entanto, com o aumento da incidência do uso de tal fármaco surgiu como consequência a chamada resistência antimicrobiana. Tal fato tem promovido aumento crescente do uso dos demais antifúngicos azólicos, que apresentam valores maiores de K_{ow} quando comparados ao fluconazol. Tal característica química-cinética traz como consequência maior eficácia terapêutica na tentativa de destruir agentes resistentes ao fluconazol, uma vez que, tais fármacos têm maior poder para penetrar em membranas celulares (QUINTERO, 2010). Ao mesmo tempo, levando-se em consideração aspectos relacionados aos valores de K_{ow} , tais fármacos quando excretados nas estações de tratamento de esgoto

tendem a ser mais agressivos ao meio ambiente trazendo portanto maior risco ambiental. Neste sentido, ganha destaque FrAcOH de *Terminalia catappa* uma vez que o ácido gálico, marcador químico referência encontrado na fração em estudo, apresenta $K_{ow} = -0,15$. Deste modo, apesar de FrAcOH ser classificada como nociva ao meio ambiente conforme diretiva 93/67/EEC, quando comparada aos valores de K_{ow} dos antifúngicos da classe dos Azólicos, esta poderia ser considerada como de menor risco ecotoxicológico, sendo supostamente menos agressiva ao meio ambiente (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de K_{ow} de fármacos antifúngicos da classe dos Azólicos em comparação ao marcador referência (Ácido gálico) de FrAcOH

ANTIFÚNGICO (AZÓLICOS)	K_{ow}
Fluconazol	-0.60
Voriconazol	0.20
Cetoconazol	0.64
Posaconazol	0.68
Itraconazol	0.75
Clotrimazol	0.80
MARCADOR REFERÊNCIA DE FrAcOH	K_{ow}
Ácido Gálico	-0.15

Fonte: Toxicology Data Network, 2014

Outra abordagem a ser questionada pelo fato de FrAcOH, segundo diretiva europeia, apresentar classificação de risco nocivo ao meio ambiente trata-se da discussão do conceito popular acerca da ausência de toxicidade por parte de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. É de se esperar que, produtos oriundos de plantas medicinais, tal como FrAcOH de *Terminalia catappa*, não apresentem riscos ao meio ambiente pelo fato de se tratar de substâncias de origem natural. No entanto, se faz necessário reforçar a presença de compostos químicos nas plantas medicinais que, por sua vez, interagem com alvos moleculares nos organismos alvo apresentando suas propostas

terapêuticas, bem como os não-alvos, trazendo como consequência riscos ao meio ambiente. Além disso, cabe também como discussão o fato de que a diretiva 93/67/EEC da União Europeia foi elaborada para classificação de compostos químicos isolados. Considerando que FrAcOH, além do ácido gálico, possui outros compostos químicos de constituição desconhecida, há que se ressaltar hipótese de criação de nova diretiva específica para plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista todos os dados apresentados, pode-se concluir que FrAcOH de *Terminalia catappa* apresenta grande potencial terapêutico nos quadros de infecções fúngicas por *Candida albicans*. Tal efeito pode ser atribuído ao ácido gálico, composto fenólico encontrado na amostra vegetal avaliada. Dados apontam também efeito nocivo de FrAcOH, segundo diretiva europeia 93/67/EEC. No entanto, considerando os valores de K_{ow} em comparação aos antifúngicos azólicos, FrAcOH contendo ácido gálico como marcador referência pode ser classificada como a proposta para o tratamento de *Candida albicans* como menor risco ecotoxicológico. Conclui-se também que são necessários debates acadêmicos para elaboração de critérios para classificação de risco ambiental de produtos obtidos a partir de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDILLE M.H.; Singh R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. **Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits.** *Food Chem.*, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-domar (Echinodermata: Echinoidea).** Rio de Janeiro. NBR 15350, 2012.

ANTOLOVICH M.; PRENZLER P.; ROBARDS K.; Ryan D. **Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits.** *Analyst.*, 125: 989–1009, 2000.

BABAYI H.; KOLO I; OKOGUN J.I.; IJAH U.J.J. **The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms.** *Biokem.*, 19: 106-111, 2004.

BADIEE P.; HASHEMIZADEH Z. **Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management.** *Indian J. Med. Res.*, 139, 195-204, 2014.

BARBEDO L.S.; SGARBI D.B. **Candidiasis.** *J. Bras. Doenças Sex. Transm.*, 22(1): 22-38, 2010.

BARCELÓ D.; PETROVIC M. **Sustainable Management of Sediment Resources. Sedim. Qual. And Impact Assessm. Of Pollu.**, Vol. 1, 1-333, 2007.

BILA D. M.; DEZOTTI M. **Fármacos no meio ambiente.** *Química Nova*, 26 (4): p. 523-530, 2003.

BONIFÁCIO B.V.; da SILVA P.B.; RAMOS M.A.S.; NEGRI K.M.S.; BAUAB T.M.; CHORILLI M.. **Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review.** *Internat. J. Nanomed.*, 9: 1–15, 2014.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.. J. Agric. Food Chem., 52, **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. 5195, 2004.

CANESI I.; CIACCI C.; LORUSSO L.C.; BETTI M.; GALLO G.; POJANA G.; MARCOMINI A. **Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: Possible modes of action on non target organisms**. Compar. Biochem. and Physiol. C 145: p. 464-472, 2007.

CHEN P.S.; LI J.H.; LIU T.Y.; LIN T.C. **Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycininduced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells**. Cancer Letters 152: 115-122, 2000.

CHEN, P.S.; LI, J.H. **Chemopreventive effect os punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH373 cells**. Toxicol. Letters 163(1): 44-53, 2006.

CHYAU C.C.; TSAI S.Y.; KO P.T.; MAU J.L. **Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves**. Food Chem. 78: 483-488, 2002.

CHYAU C.C.; KO P.T.; MAU J.L. **Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves**. LWT – Food Sc. and Techn. 39(10): 1099-1108, 2006.

COCCARO P.; GUIMARÃES L.L.; MAZZEO G.C.C.S.; SILVA M.P.O.; TOMA W. **Phytochemistry Evaluation by Thin Layer Chromatography (TLC) from *Terminalia catappa* fallen leaves**. Unisanta BioScie., 110 - 114; Vol. 2 nº 2, 2013.

COLOMBO AI; BARCHIESI F; MCGOUGH DA; RINALDI MG. **Comparison of Etest and Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing**. J Clin Microbiol.; 33:535-540, 1995.

COLOMBO AL, GUIMARÃES T. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.*** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 36(5): 599-607, 2003.

Commission of the European Communities. **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances.** Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 1996.

CORTEZ, F.S.; **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear, 2010.

DASTMALCHI K.; DORMAN H.J.D.; KOSAR M.; HILTUNEN R. **Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract.** Lebens Wissen un Technol., 40:239–248, 2007.

DAUGHTON C.G. **Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) as Environmental Contaminants.** Synopsis of Significant Works & Contributions on the Environmental and Public Health Aspects of: PPCPs, Illicit Drugs, Emerging Contaminants, and Sewage Chemical Information Mining (SCIM). 2007.

ELOFF J.N.; FAMAKIN J.O.; KATERERE D.R.P. **Isolation of an antibacterial stilbene from *Combretum woodii* (Combretaceae) leaves.** African J. of Biotechnol., Vol. 4 (10), 1167-1171, October, 2005.

ENDO E.H.; CORTEZ D.A.; UEDA-NAKAMURA T.; NAKAMURA C.V.; DIAS FILHO B.P. **Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*.** Res Microbiol., Sep;161(7):534-40, 2010.

ESPINEL-INGROFF A.; BARTLETT M.; BOWDEN R.; CHIN N.X.; COOPER C. Jr; FOTHERGILL A.; MCGINNIS M.R.; MENEZES P.; MESSER S.A.; NELSON

P.W.; ODDS F.C.; PASARELL L.; PETER J.; PFALLER M.A.; REX J.H.; RINALDI M.G.; SHANKLAND G.S.; WALSH T.J.; WEITZMAN I. **Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** J. Clin. Microbiol., 35(1): 139–143, 1997.

FAN Y.M.; XU L.Z.; GAO J.; WANG Y.; TANG X.H.; ZHAO X.N.; ZHANG Z.X. **Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*.** Fitoterapia 75: 253-260, 2004.

GAGNÉ F.; BLAISE C.; ANDRÉ C. **Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.** Ecotoxicol. and Environm. Safety, 64. p., 329-336, 2006.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12 Ed. Editora McGrallHill, 757-769, 2012.

HALLARE A.V.; KOHLER H-R.; TRIEBSKORN R. **Development toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenaco and its solvent, DMSO.** Chemosphere. 56. p. 659-666, 2004.

HONG LS, IBRAHIM D, KASSIM J, SULAIMAN S. **Gallic acid: An anticandidal compound in hydrolysable tannin extracted from the barks of *Rhizophora apiculata* Blume.** J. of Applied Pharm. Scie. 01 (06), 75-79, 2011.

ISIDORI M., LAVORGNA M.; PALUMBO M.; PICCIOLI V.; PARRELLA A. **Influence of alkylphenols and trace elements in toxic, genotoxic, and endocrine disruption activity of wastewater treatment plants.** Environm. Toxicol. Review, 26(8), 1686-94, 2007.

JJEMBA P. K. **Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment.** Ecotoxicol. and Environm. Safety. 63, 113-130, 2006.

KIM K.J.; WOO S.S.; BO K.S.; MOON S.K.; CHOI J.S.; DONG G.L. **Activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans***. *Biometals*. 2009; 22: 235-242

KOTZE M., ELOFF J.N. **Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae)**. *S. Afr. J. Bot.*, 68:62-67, 2002.

LIN C.C.; CHEN Y.L.; LIN J.M.; UJIE T. **Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa***. *Am. J. of Chinese Med.* 25:153-161, 1997.

LIN C.C.; HSU Y.F.; LIN T.C. **Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats**. *Am. J. of Chinese Med.* 27: 371-376, 1999.

MASUDA T.; YONEMORI S.; OYAMA Y.; TAKEDA Y.; TANAKA T.; TADAO ANDOH T.; SHINOHARA A.; NAKATA M. **Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants**. *J. Agric. And Food Chem.* 47: 1749-1754, 1999.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção**. Brasília. 2013.

MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin**. *J. Sci. Technol.*, 26(2) : 211-219, 2004.

MONTEIRO SC; BOXALL ABA. **Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment**. *Reviews of Environm. Contam. and Toxicol.* Withacre, D.M. (Ed.). Vol. II, 189 p. 2010.

NAGGAPA A.N.; THAKURDESAI P.A.; VENKAT N.R.; SINGH J. **Antidiabetic effect of *Terminalia catappa* Linn fruits**. *J. Ethnopharm.* 88:45-40, 2002.

NUNES B.; CARVALHO F.; GUILHERMINO L. **Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii***. Ecotoxicol. and Environm. Safety. 61. p. 413-419, 2005.

PRISTA L.N. **Tecnologia farmacêutica**. V I e II, 5° ed. Fundação CalousteGulbenkian<http://www.hocuspocus.estantevirtual.com.br/mod_perl/bu sca.cgi?alvo=editora&pchave=Fundacao%20Calouste%20Gulbenkian>,1995.

QUINN B.; GAGNÉ F.; Blaise C. **An investigation into acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarians, *Hydra attenuata***. Scie. Total Environment. 389. p. 306-314, 2008.

QUINTERO, CHG. **Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol**. Infection., 14(S2): S172-S180, 2010.

RATNASOORIYA W.D.; DHARMASIRI M.G. **Effects of *Terminalia catappa* seeds on sexual behaviour and fertility of male rats**. Asian J. of Andrology 2: 213-219, 2000.

Royal Society of Chemistry. **SPIDERCHEM**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html?rid=bbe1f209-c343-462e-aa6e-19b9715a292f>>. Acesso em 24/09/2014

SANTANA D.P.; RIBEIRO E.L.; MENEZES A.C.S.; NAVES P.L.F. **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans***. Rev. Ciênc. Méd. Biol., Salvador, v.12, n.2, p.229-233, mai./ago. 2013.

SANTOS L.H.M.L.M.; ARAÚJO A.N.; FACHINI A.; PENA A.; MATOSDELERUE C.; MONTENEGRO M.C.B.S.M. **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment**. J. of Hazard. Materials. 175. p. 45–95, 2010.

SINGLETON V.L.; KRATZER F.H. Plant phenolics. In: **National Academy of Sciences. Toxicants Occur. Natur. in foods.** Washington, p.309-345, 1973.

TANG X.; GAO J.; WANG Y.; FAN Y.M.; XU L.Z.; ZHAO X.N.; XU Q.; QIAN Z.M. **Effective protection of Terminalia catappa L. leaves from damage induced by] carbon tetrachloride in liver mitochondria.** J. Nutrit. Biochem., 17(3): 177-182, 2005.

TOMA W.; GUIMARÃES L.L.; BRITO A.R.M.; SANTOS A.R.; CORTEZ F.S.; PUSCEDDU F.H.; CESAR A.; JÚNIOR L.S.; PACHECO M.T.T; PEREIRA C.D.S. **Safflower oil: an integrated assessment of phytochemistry, antiulcerogenic activity, and rodent and environmental toxicity.** Rev.Bras. Farmacogn, 2014. *In press.*

US EPA. United States Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/003 – **Shortterm methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.** Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. p. 579, 1991.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. EPI Suite® v.4.11. **The Estimation Programs Interface.** <<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm>>. Acesso em 24/09/2014.

Viriato A. **Terpenoides com atividade antifúngica para Candida Berkhout, causadoras de infecções hospitalares.** Rev. O Mundo da Saúde, São Paulo, 38(1):40-50, 2014.

Wagner H.; Bladt S. **Plant drug analysis.** A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Ed. New York. 1984.