NATÁLIA RAVANELLI ATHAYDE

“Perfil químico e atividades biológicas de
Croton echinocarpus Baill. e *Croton*
vulnerarius Müll.Arg”

“*Chemical profile and biological activities of Croton*
echinocarpus Baill. and Croton vulnerarius Müll.Arg”

São Paulo

2013

NATÁLIA RAVANELLI ATHAYDE

VERSÃO CORRIGIDA

* A versão original se encontra-se disponível tanto na biblioteca do IB-USP quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP.

“Perfil químico e atividades biológicas de
Croton echinocarpus Baill. e *Croton*
vulnerarius Müll.Arg”

“*Chemical profile and biological activities of Croton*
echinocarpus Baill. and Croton vulnerarius Müll.Arg”

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Botânica, na Área de Recursos Econômicos
Vegetais.

Orientadora: Profª Drª Cláudia Maria Furlan

São Paulo

2013

Ravanelli, Natália

Perfil químico e atividades biológicas de
Croton echinocarpus e *Croton vulnerarius*.
119 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

Palavras chave: 1. *Croton*; 2. Metabólitos
secundários; 3. Atividade Biológica.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a). Cláudia Maria Furlan
(orientadora)

*Aos meus pais, por todos os anos de
carinho e paciência.*

MY TEACHER ALWAYS TOLD ME THAT IF I APPLIED MYSELF, I COULD BECOME THE NEXT MARIE CURIE.

YOU KNOW, I WISH THEY'D GET OVER ME.

NOT THAT I DON'T DESERVE IT. THESE TWO NOBELS AIN'T DECORATIVE. BUT I MAKE A SORRY ROLE MODEL IF GIRLS JUST SEE ME OVER AND OVER AS THE ONE TOKEN LADY SCIENTIST.

LISE MEITNER FIGURED OUT THAT NUCLEAR FISSION WAS HAPPENING, WHILE HER COLLEAGUE OTTO WAS STARING BLANKLY AT THEIR DATA IN CONFUSION, AND PROVED ENRICO FERMI WRONG IN THE PROCESS. ENRICO AND OTTO BOTH GOT NOBEL PRIZES. LISE GOT A NATIONAL WOMEN'S PRESS CLUB AWARD.

THEY FINALLY NAMED AN ELEMENT AFTER HER, BUT NOT UNTIL 60 YEARS LATER.

EMMY NOETHER FOUGHT PAST HER VICTORIAN-ERA FINISHING-SCHOOL UPRISING, PURSUED MATHEMATICS BY AUDITING CLASSES, AND, AFTER FINALLY GETTING A PH.D, WAS PERMITTED TO TEACH ONLY AS AN UNPAID LECTURER (OFTEN UNDER MALE COLLEAGUES' NAMES).

WAS SHE AS GOOD AS THEM?

SHE REVOLUTIONIZED ABSTRACT ALGEBRA, FILLED GAPS IN RELATIVITY, AND FOUND WHAT SOME CALL THE MOST BEAUTIFUL, DEEPEST RESULT IN THEORETICAL PHYSICS.

BUT YOU DON'T BECOME GREAT BY TRYING TO BE GREAT. YOU BECOME GREAT BY WANTING TO DO SOMETHING, AND THEN DOING IT SO HARD THAT YOU BECOME GREAT IN THE PROCESS.

SO DON'T TRY TO BE THE NEXT ME, NOETHER, OR MEITNER. JUST REMEMBER THAT IF YOU WANT TO DO THIS STUFF, YOU'RE NOT ALONE.

THANKS.

ALSO, AVOID RADIUM. TURNS OUT IT KILLS YOU.

I'LL TRY.

Agradecimentos

O melhor de fazer uma coisa que consideramos difícil é chegar ao final e descobrir que nos tornamos pessoas muito diferentes daquelas que éramos quando começamos a trilhar este caminho. Posso dizer que aprendi muito ao longo desses últimos anos, e nada melhor do que poder agradecer de todo o coração às pessoas que estiveram ao meu lado.

Como não poderia deixar de ser, agradeço primeiramente aos meus pais, que além de aceitarem o fato de ter uma filha “eterna estudante” sempre demonstraram muito orgulho e admiração pelas minhas escolhas. À minha mãe, por ser tão incrivelmente inspiradora como mulher e como profissional. Ao meu pai, pelo carinho e dedicação incondicional.

À minha família, à minha avó Norma, minhas tias, meu tio e primos, por sempre apoiarem minhas “maluquices” e pelos momentos de alegria em família. Aos meus avós, que não estão mais presentes fisicamente, mas que jamais deixarão de fazer parte da minha vida. E, é claro, ao meu irmãozinho canino, por me trazer tanta alegria!

À minha orientadora Claudinha, por todo o aprendizado, pela amizade, e por toda ajuda e paciência, especialmente na fase de conclusão desta dissertação!

Às professoras Deborah e Maria Luiza, por todo apoio, ensinamentos e pelos momentos de conversa e risadas durante o café. À Lucimar, pela ajuda em campo, na qualificação e pelo aprendizado sobre o gênero *Croton*. Ao professor Salatino, por ter sido a minha inspiração para entrar para o mundo da fitoquímica e pelas inúmeras histórias, científicas

ou não. À professora Inês Cordeiro pelo auxílio nas coletas e por toda ajuda inestimável, paciência e risadas agradeço à Mourisa e à Aline.

Agradeço também às pessoas queridas que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto no Laboratório de Fitoquímica. Às minhas “irmãs” Fê e Kátia, Bruna e Carol, obrigada pelos “não-cafés” e “não-cigarros” e pelo apoio nos momentos mais difíceis! Aos queridos Alice, Pri, Sarah, Carmen, Adne, Jana, Toshi, Dalila, Letícia, e a todos os outros que passaram por este laboratório. Foi um prazer dividir a bancada com vocês, obrigada pela amizade!

Aos meus amigos, sem os quais a minha vida não teria graça nenhuma! Às minhas amigas-irmãs Ferni e Cacá, por serem minha segunda família e estarem sempre presentes seja nos momentos de alegria e risada ou de estresse e choradeira!

Às pessoas que fizeram do Instituto de Biociências o melhor lugar do mundo por vários anos: Geds, Kwait, Fê, Samira, Kate, Safs, Dani, Trafs, Frims, Clarissa, Kbeça, Xodó, Léo, Betânia, Max, PH e todos os amigos 05N e agregados. Ao K.O, especialmente, por tudo e por tanto. Às minhas amigas queridas de infância, Thá, Eve, Pri e Luiza.

Agradeço especialmente à duas pessoas incríveis com as quais tive o prazer de trabalhar e sem as quais, provavelmente eu não estaria aqui, Lu e Puquinha!

À CNPq e FAPESP pela bolsa e apoio financeiro ao projeto, respectivamente, e, é claro, ao Instituto de Biociências, pela infraestrutura e principalmente, por ser minha segunda casa!

Muito obrigada!

Resumo

O gênero *Croton* abriga aproximadamente 1300 espécies, muitas delas reconhecidas pela sua utilização terapêutica, que se deve a presença de grande diversidade de metabólitos secundários. Tais propriedades foram ponto de partida para investigações sobre as propriedades fitoquímicas do gênero.

C. vulnerarius e *C. echinocarpus* são espécies endêmicas do Brasil pertencentes à seção *Cyclostigma* e até então pouco estudadas. Neste projeto foram extraídos, identificados e isolados componentes químicos destas espécies e analisadas as suas propriedades bioativas (antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV).

Foi verificado que, diferentemente de outras espécies da mesma seção, *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* não apresentam diterpenos em sua composição. No entanto, *C. echinocarpus* possui entre seus principais componentes um alcaloide, identificado por espectrometria de massas como coridina. Em relação às substâncias fenólicas, observamos que as espécies possuem perfis semelhantes, com alguns flavonoides em comum, sendo que o principal componente de *C. echinocarpus* é a apigenina vitexina e de *C. vulnerarius*, o derivado de campferol tilirosídeo.

Em relação às atividades biológicas, foi verificado que ambas as espécies possuem potencial antioxidante e antimicrobiano contra espécies de bactérias Gram negativas, especialmente nos extratos mais ricos em compostos fenólicos. Quanto à ação anti-HIV, foi observado que a fração contendo o alcaloide coridina isolado apresentou um grande potencial de atividade anti transcriptase reversa, atingindo valores acima de 90% de atividade, mesmo para a menor concentração testada.

Abstract

Croton comprises approximately 1,300 species, many of them known for their therapeutic uses, which is due to the presence of a large diversity of secondary metabolites. Those properties were the starting point for research on the phytochemical characteristics of the genus.

C. vulnerarius and *C. echinocarpus* are Brazilian endemic species belonging to section *Cyclostigma*. This project aimed the extraction, identification and isolation of chemical constituents from both species and the analyze of the bioactive properties of such constituents (antioxidant, antimicrobial and anti-HIV).

It was found that, unlike other species of the same section, *C. echinocarpus* and *C. vulnerarius* does not present diterpenes in their composition. However, *C. echinocarpus* showed alkaloids among its main constituents, one of them identified by mass spectrometry as coridine. Regarding the phenolic substances, we observed that the two species have similar profiles, with some flavonoids in common. *C. echinocarpus* presents the flavone C-glycosylated vitexin as its main flavonoid constituent, while *C. vulnerarius* has the acylated derivative of kaempferol, tiliroside.

Regarding the biological activities, both species showed antioxidant potential; antimicrobial effects against Gram-negative bacteria, especially the extracts richer in vitexin; and anti-HIV activity, where the fraction containing the alkaloid coridine showed great potential, reaching values above 90% of the anti-HIV activity, even when the lowest concentration was tested (100 mg.mL⁻¹).

Sumário

Introdução Geral.....	1
O potencial medicinal das plantas	2
Metabólitos secundários.....	6
Euphorbiaceae (Juss.)	9
<i>Croton</i> (L.)	10
Referências bibliográficas.....	17
Capítulo I: Perfil Químico de <i>C. echinocarpus</i> e <i>C. vulnerarius</i> e isolamento de substâncias..	23
1. Introdução	24
2. Material e métodos	31
a. Obtenção do material vegetal	31
b. Preparação dos extratos.....	32
I. Extração seriada em soxhlet.....	32
II. Maceração em etanol 70%	32
c. Fracionamento dos extratos.....	32
I. Fracionamento inicial em coluna de sílica.....	32
II. Isolamento do alcaloide coridina.....	33
III. Fracionamento de compostos fenólicos por coluna de Sephadex	34
d. Análise dos extratos e frações por CG-EM	34
e. Análise de flavonoides por CLAE.....	35
3. Resultados e Discussão	36
a. Análise dos extratos e frações por CG-EM	36
b. Fracionamento dos extratos por coluna de sílica	50
c. Análise da composição fenólica de <i>C. echinocarpus</i> e <i>C. vulnerarius</i>	52
d. Fracionamento de compostos fenólicos por coluna de Sephadex.....	60
4. Conclusões	65
5. Referências bibliográficas	66
Capítulo II: Avaliação do potencial biológico de extratos e frações de <i>C. echinocarpus</i> e <i>C. vulnerarius</i>	74
1. Introdução	75
2. Material e métodos	81
a. Obtenção de extratos e frações.....	81
b. Avaliação da atividade antioxidante.....	81

I. Análise da atividade in vitro de sequestro do radical DPPH.....	81
II. Análise da atividade in vitro de oxidação do β -caroteno	82
III. Quantificação de fenóis totais.....	83
c. Ensaio de quantificação de atividade antimicrobiana.....	84
d. Ensaio de quantificação do efeito inibidor da transcriptase reversa HIV-1	85
e. Análises estatísticas	87
3. Resultados e Discussão	88
a. Avaliação da atividade antioxidante de <i>C. echinocarpus</i> e <i>C. vulnerarius</i>	88
b. Análise da ação antimicrobiana de <i>C. echinocarpus</i> e <i>C. vulnerarius</i>	95
c. Análise da ação anti HIV de <i>C. echinocarpus</i> e <i>C. vulnerarius</i>	104
4. Conclusões	108
5. Referências bibliográficas	109
Considerações finais	115
Anexos.....	120

Introdução Geral

O potencial medicinal das plantas

A utilização terapêutica de plantas é tão antiga quanto a própria humanidade, chegando a anteceder o estágio de civilização. Um estudo recente (Hardy *et al.*, 2012) analisou resíduos encontrados no tártaro dental de exemplares fossilizados de Neandertais (*Homo neanderthalensis*), extintos num período de 24.000 a 30.000 anos atrás, revelando resquícios de plantas de sabor amargo e sem valor nutricional (como o milefólio e a camomila), pouco viáveis para uso na alimentação. Para os autores, uma possível explicação para o consumo de tais plantas pelos Neandertais seria a sua utilização para fins de automedicação. Foi observado também que os grandes primatas modernos são capazes de reconhecer e utilizar plantas para usos medicinais (Hardy *et al.*, 2012).

É notável que, historicamente, as plantas sempre representaram uma inesgotável fonte de medicamentos para o homem (Schmidt *et al.*, 2008) e sempre foram associadas a suas possíveis propriedades terapêuticas. Os primeiros estudos na área de botânica fazem parte da literatura médica de civilizações antigas, como a egípcia, mesopotâmica, chinesa e indiana, o que indica que foram realizados em virtude da utilização farmacológica das plantas (Reed, 1942).

Em meados do século I, Dioscórides escreveu a obra “De Materia Medica”, que é considerada a primeira farmacopeia ocidental, cujo conteúdo perdurou por muitos séculos e, excetuando-se a Bíblia, foi a obra mais lida durante a Idade Média (Tyler, 1996). Nesta época, os estudos sobre as propriedades medicinais das plantas eram pouco

avançados, e se baseavam em observações e muitas vezes superstições e esoterismo.

Com os avanços tecnológicos na área de química e farmacologia, um grande passo para o estudo de plantas medicinais foi dado no século XIX, através do isolamento do primeiro fármaco de origem vegetal, a morfina, um alcaloide proveniente da papoula (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae) (Turolla *et al.*, 2005), que é utilizado até os dias de hoje devido a sua forte ação analgésica. A partir desse momento, outras substâncias foram isoladas, como quinina e quinidina, obtidas de *Cinchona* spp. L. (Rubiaceae) e a atropina, proveniente da *Atropa belladonna* L. (Solanaceae), e estas passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos de plantas (Turolla *et al.*, 2005).

Nos tempos atuais, apesar da utilização de plantas para fins medicinais ainda ser uma prática muito recorrente em muitas culturas (Maciel *et al.*, 2002), a utilização de fármacos sintéticos é predominante (Schmidt *et al.*, 2008) por conta do crescimento das indústrias farmacêuticas de grande porte e pelas dificuldades em se manter um padrão de qualidade dos extratos vegetais (Turolla *et al.*, 2005).

Entretanto, a partir da década de 1980, os avanços tecnológicos permitiram o aprimoramento das técnicas de isolamento e identificação de substâncias e por conta disso, as plantas voltaram a ser alvo de pesquisas para a descoberta de novos fármacos (Turolla *et al.*, 2005). Graças a sua vasta capacidade de biossíntese, elas são promissoras para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças ainda sem cura, como é o caso do câncer e da AIDS.

Além disso, a utilização de fitoterápicos também vem ganhando força nos últimos anos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a partir dos anos 1990 houve um grande aumento no uso da medicina tradicional e da medicina alternativa, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, e a importância deste tipo de medicina vem crescendo globalmente, ampliando a necessidade de regulamentação específica para a prescrição e venda deste tipo de medicamento (OMS, 2005).

No Brasil, pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) passaram a ter acesso a fitoterápicos em 2007 e no ano seguinte, o Governo Federal aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que visa regulamentar todas as etapas da cadeia produtiva deste tipo de medicamento, bem como ampliar e melhorar as condições para a pesquisa científica neste setor e proteger o patrimônio genético e conhecimento tradicional associados às plantas com propriedades medicinais (Portal Brasil, 2012).

Em 2012, a lista de fitoterápicos oferecidos pelo SUS foi ampliada, e atualmente são doze os medicamentos feitos a base de plantas medicinais e oferecidos pela rede pública em catorze estados brasileiros (Portal Brasil, 2012). Em 2013, a Anvisa publicou a resolução RDC 13/2013, que é a primeira regra voltada especificamente para os procedimentos de fabricação de produtos fitoterápicos (Anvisa, 2013).

Muitos dos fármacos industrializados são provenientes de plantas, sintetizados ou semi-sintetizados a partir de modelos estruturais de origem vegetal. A primeira droga sintética, desenvolvida em 1897, foi a Aspirina (ácido acetilsalicílico) (Schmidt *et al.*, 2008), que contém uma

substância derivada de uma molécula extraída da casca do Salgueiro (*Salix alba* L., Salicaceae), o ácido salicílico, que possui propriedades analgésicas e antipiréticas. Em laboratório, tal molécula foi conjugada com um grupo acetila, tornando-se menos tóxica ao organismo (Hedner & Everts, 1998), e desde então este é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de dores e febre.

A vinca (*Ca tharanthus roseus* L., Apocynaceae) tem um longo histórico como planta medicinal e foi utilizada por séculos na Índia e Europa para o tratamento de diabetes. Em meados dos anos 1950, estudos mostraram que animais de laboratório tratados com extrato desta planta passaram a apresentar uma diminuição drástica na contagem de células brancas, o que chamou a atenção para um possível potencial citotóxico de *C. roseus*. A partir desse momento, o interesse pelo estudo de substâncias bioativas desta planta foi ampliado, e através de um isolamento biomonitorado foram identificados dois alcaloides com ação anticâncer: Vincristina, que possui ação no tratamento de leucemia e câncer de mama e Vinblastina, usado contra linfoma de Hodgkins e coriocarcinoma (Gurib-Fakim, 2006).

Outro exemplo importante de droga anticâncer de origem vegetal é o Taxol, um diterpeno que é extraído de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxacaceae), e que é utilizado atualmente no tratamento de câncer de pulmão, mama e ovário e sarcoma de Kaposi (Jennewein & Croteau, 2001). Apesar de seu grande potencial farmacológico, sua utilização é limitada, pois a planta a partir da qual é obtido possui taxa de crescimento muito lenta e distribuição limitada. Por conta disso, novas abordagens para a obtenção desta molécula vêm sendo estudadas, como a semi-

síntese a partir de moléculas intermediárias mais abundantes na natureza, cultura celular, entre outras (Ajikumar *et al.*, 2010).

Muitos outros exemplos podem ser citados para ressaltar a importância medicinal das plantas, no entanto a imensa maioria das espécies nunca foi analisada química e farmacologicamente. Este é um argumento que ressalta a importância da conservação de áreas de vegetação nativa, que podem abrigar um vasto potencial farmacológico ainda inexplorado (Gurib-Fakim, 2006).

O Brasil é um país que compreende um grande e heterogêneo espaço territorial, no qual podem ser encontrados diversos biomas, cada qual com características florísticas distintas, e detém, portanto, uma grande diversidade biológica. Tais condições o tornam um país com grande potencial fitoquímico, o que intensifica a importância de estudos realizados nesta área com plantas da flora brasileira (De Moura *et al.*, 2001).

Metabólitos secundários

Todo organismo realiza uma série de transformações químicas para manter suas funções vitais, se desenvolver, crescer e se reproduzir. Quando estas seguem uma sequência de passos bem definida, formando uma rede integrada de reações reguladas e intermediadas por enzimas, recebem o nome de vias metabólicas (Dewick, 2009).

Muitos compostos químicos são encontrados em todos os seres vivos, como é o caso dos carboidratos, proteínas, lipídeos, entre outros. As vias metabólicas que envolvem síntese, degradação e conversão destes são denominadas vias do metabolismo primário, ou metabolismo central.

Em contrapartida, os organismos também são capazes de sintetizar uma grande diversidade de compostos que não estão presentes de forma ubíqua entre todos eles (Dewick, 2009), sendo em geral característicos de um grupo restrito, como uma família ou um gênero, ou até mesmo exclusivos a uma espécie. Tais compostos são denominados metabólitos secundários, já que não são produtos das vias primárias do metabolismo, apesar de serem derivados de produtos destas.

As funções de muitos destes compostos ainda não são conhecidas, mas de maneira geral sabe-se que eles possuem grande valor adaptativo. Nos vegetais, entre os papéis atribuídos a este tipo de molécula está a atração de polinizadores, defesa contra herbivoria, proteção contra estresse, alelopatia, entre outros (Dewick, 2009). Nessas funções biológicas reside a grande importância dessas substâncias, com grande potencial como possíveis fontes de novos fármacos.

Elas podem ser classificadas, de modo geral, em uma das seguintes categorias, de acordo com suas estruturas químicas: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (Cseke *et al.*, 2006).

Os terpenos são hidrocarbonetos, descritos tradicionalmente como oriundos da via do acetato-mevalonato (MVA), e são classificados de acordo com a quantidade de isoprenos (unidades de cinco carbonos) presentes em sua cadeia (Taiz & Zeiger, 2008). Mais recentemente, outra rota, a via do metileritritol fosfato (MEP), foi descrita com ocorrência nos plastídeos. Estudos demonstram que fungos e animais parecem utilizar exclusivamente a via MVA, de ocorrência no citoplasma das células, enquanto a via MEP está presente em plantas, algas e bactérias, que utilizam ambas as vias para formar moléculas de isopentenil pirofosfato

(IPP) ou o seu isômero dimetialil pirofosfato (DMAPP), ambas as unidades de cinco átomos de carbono e biogênicas de terpenos.

Entre as substâncias fenólicas, uma classe de grande importância é a dos flavonoides, substâncias caracterizadas pela estrutura básica $C_6C_3C_6$, oriundas de biossíntese mista. A porção C_6C_3 é originada a partir do ácido *p*-cumárico proveniente do aminoácido fenilalanina, formado pela via do ácido chiquímico e que após desaminação origina tanto fenóis simples (C_6C_1 e C_6C_2) como fenilpropanoides (C_6C_3). A esta porção se unem três moléculas de acetato, dando origem a um anel fenólico proveniente, portanto, da via do acetato malonato (Taiz & Zeiger, 2008). Flavonoides são substâncias onipresentes entre as plantas e a eles são atribuídas importantes funções fisiológicas e ecológicas, como a proteção contra a radiação e atração de polinizadores (Ibrahim, 2005). Além disso, também é observado que os flavonoides possuem ação medicinal em seres humanos, atuando como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes e antitumorais (Ibrahim, 2005), entre outras funções.

Dentre as substâncias nitrogenadas, destacam-se os alcaloides, que são moléculas de baixo peso molecular e pH alcalino, encontradas em aproximadamente 20% das plantas (Taiz & Zeiger, 2008), cuja função está relacionada à defesa contra patógenos e herbívoros. Muitos deles possuem potente atividade biológica em mamíferos, muitas vezes associada ao sistema nervoso central, o que os torna um interessante objeto de estudos para prospecção de novos fármacos (Facchini, 2001). Os átomos de nitrogênio dos alcaloides provêm, em sua grande maioria, de aminoácidos, cujo esqueleto carbônico é frequentemente mantido enquanto o ácido carboxílico em geral é perdido através de uma

descarboxilação. Os principais aminoácidos que originam alcaloides são ornitina, lisina, niacina, tirosina, triptofano e histidina, além do ácido antranílico e nicotínico. Blocos construtores derivados das vias do acetato mevalonato, chiquimato e metileritritol fosfato são muitas vezes incorporados à estrutura final do alcaloide (Dewick, 2009).

A maioria dos compostos oriundos de plantas que apresentam importância medicinal é proveniente das vias do metabolismo secundário, e a grande diversidade de metabólitos apresentada pelo grupo das plantas, em especial as Angiospermas, representa uma fonte extremamente rica para a descoberta de novos fármacos (Gurib-Fakim, 2006).

A escolha das espécies vegetais a serem analisadas fitoquímica e farmacologicamente é um ponto chave para o sucesso deste tipo de estudo. São várias as abordagens que podem ser empregadas, desde a abordagem randômica, na qual o único fator levado em conta para a escolha de uma planta é a sua abundância, passando pela abordagem quimiotaxonômica, na qual uma espécie é escolhida por conta da ocorrência de substâncias bioativas em outras plantas do mesmo gênero ou família, até a abordagem etnofarmacológica, que leva em consideração a utilização terapêutica de uma planta por um determinado grupo étnico (Maciel, 2002).

Euphorbiaceae

Euphorbiaceae Juss., pertencente à ordem Malpighiales, é uma das maiores e mais diversificadas famílias das Angiospermas e está amplamente distribuída pelo mundo, especialmente na região dos

trópicos, em diversos tipos de vegetações e habitats (Secco *et al.*, 2012), sendo uma das famílias mais comuns nas formações vegetais brasileiras.

Muitos gêneros de Euphorbiaceae possuem grande importância econômica, como é o caso de *Hevea* Aublet, ao qual pertence a seringueira (*Hevea brasiliensis* Müll Arg.) importante para a extração do látex e para a fabricação de borracha, e *Manihot* Miller, que compreende uma das plantas de maior importância alimentícia no Brasil, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (Secco *et al.*, 2012).

Além disso, a família também é reconhecida pela presença de compostos tóxicos e medicinais. Um exemplo bastante conhecido é a mamona (*Ricinus communis* L.) cujo óleo fixo é consumido por possuir propriedades laxativas ao mesmo tempo em que a torta restante da prensagem das sementes durante a extração do óleo, possui aglutininas, proteínas capazes de inativar a síntese proteica, causando morte celular. Tais moléculas possuem tanto caráter tóxico, como é o caso de *R. communis* aglutinina I (RCA I), que possui forte ação aglutinadora de hemácias, quanto potencial terapêutico, como é o caso da ricina que vem sendo estudada como agente anticâncer, por conta de sua ação citotóxica (Frigerio & Roberts, 2010).

***Croton* L.**

Um dos gêneros de Euphorbiaceae conhecido pelas suas propriedades tóxicas e medicinais é *Croton* L., o segundo maior em número de espécies e presente em diversos ecossistemas.

Croton contém atualmente um número aproximado de 1300 espécies (Riina *et al.*, 2009) entre herbáceas, arbustos, árvores, e lianas. Constitui o 11º maior gênero de angiospermas (Caruzo *et al.*, 2010) e é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo (figura I.1) (Berry *et al.*, 2005; Van Ee, 2011).

Figura I.1: Distribuição geográfica de *Croton* (adaptado de Berry *et al.*, 2005).

Representantes do gênero podem ser reconhecidos em campo por seu odor pungente, pubescência estelar ou lepidota, presença de látex, e folhas que se tornam alaranjadas na senescência.

Uma das razões pelas quais *Croton* possui grande importância ecológica é o seu papel componente da vegetação secundária, o que torna muitas de suas espécies úteis para fins de reflorestamento (Caruzo *et al.*, 2010). Além disso, algumas plantas pertencentes a este gênero são conhecidas devido as suas propriedades tóxicas e terapêuticas.

Como usos medicinais podem ser citados o tratamento de problemas digestivos, diabetes, inflamações, febre, feridas, úlceras, entre outros (Salatino *et al.*, 2007). Algumas espécies deste gênero, como *C.*

celtidifolius Baill. e *C. urucurana* Baill., ambas encontradas no Brasil, são utilizadas no tratamento de câncer (Salatino et al., 2007).

As propriedades tóxicas e medicinais das espécies de *Croton* se devem à presença de uma grande diversidade de compostos químicos oriundos do metabolismo secundário dessas plantas, que estão exemplificados na figura 1.2: diterpenoides de várias classes (1); triterpenoides pentacíclicos (2) e esteroidais (3); óleos voláteis contendo mono e sesquiterpenoides; alcaloides (4); e componentes da via do chiquimato, substâncias fenólicas que incluem predominantemente flavonoides (5), lignanas (6) e proantocianidinas. Tais substâncias são frequentemente descritas para as espécies desse gênero (Salatino *et al.*, 2007).

A grande quantidade de espécies morfológicamente diversas que fazem parte de *Croton* o torna um gênero desafiador para estudos filogenéticos. Em 1993, Webster propôs uma divisão infra genérica de *Croton* em 40 seções, no entanto, muitas espécies não foram enquadradas em nenhuma destas. Em 2011, o trabalho de filogenia molecular de Van Ee e colaboradores, focado nas espécies de *Croton* do Novo Mundo, dividiu o gênero em 4 subgêneros (*Croton* subg. *Quadrilobi* (Müll. Arg.) Pax in Engl. & Prantl, *C.* subg. *Adenophylli* (Griseb.) Riina, *C.* subg. *Geiseleria* A.Gray, e *C.* subg. *Croton* – exclusivamente do Velho Mundo) e descreve 10 novas seções, resultando em 31 seções que incluem todas as espécies do Novo Mundo, sendo 11 delas monotípicas.

Figura I.2: Estruturas químicas de alguns exemplos de classes de metabólitos secundários ocorrentes em *Croton*: diterpenos (1), triterpeno pentacíclico (2), triterpeno esteroidal (3), alcaloide(4), flavonoide (5) e lignana (6). (adaptado de Salatino *et al.*, 2007).

Dentre as 31 seções, *Cyclostigma* Griseb. (*Croton* subg. *Adenophilli*) abriga 41 espécies distribuídas nas regiões tropical e subtropical do México, América Central e América do Sul (Smith, 2006; van Ee *et al.*, 2011). As espécies desta seção são caracterizadas pela presença de inflorescências contendo flores estaminadas na parte superior e pistiladas na parte inferior, de pubescência estelar e de látex frequentemente avermelhado (Riina *et al.*, 2009). Possuem hábito arbustivo ou arbóreo e têm crescimento rápido, ocorrendo predominantemente em ambientes perturbados, como as regiões de beira de córregos e estradas (Riina *et al.*, 2009).

Algumas espécies pertencentes a esta seção são comumente referidas como “sangue de adave” (em espanhol, *sangue de draco*) por conta de seu látex vermelho, o qual é utilizado medicinalmente por povos indígenas (Smith *et al.*, 2006) e comunidades tradicionais, no tratamento de cortes e feridas e prevenção de infecções (Jones, 2009).

A espécie desta seção mais conhecida química e farmacologicamente é *C. urucurana* Baill.; está amplamente presente no Brasil (Cordeiro *et al.*, 2010a e 2010b) e outros países da América do Sul, onde é bastante utilizada na medicina popular (Gurgel *et al.*, 2005). Muitos estudos já foram realizados em relação às propriedades bioativas do látex de *C. urucurana*, comprovando suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, cicatrizante, antiviral e antitumoral (Gurgel *et al.*, 2001). Em estudo recente com esta espécie, foi demonstrada eficácia de seu látex na inibição do crescimento de alguns tipos de fungos causadores de infecções de pele (Gurgel *et al.*, 2005).

Outras espécies pertencentes à seção *Cyclostigma* vêm apresentando propriedades farmacológicas importantes. Em estudo recente foi observado que o extrato de diclorometano de folhas de *C. macrobothrys* Baill. apresentou atividade antiproliferativa de linhagens celulares tumorais, particularmente nas linhagens NCI-H460 (pulmão) e K562 (leucemia). Nesse trabalho, o extrato de diclorometano foi analisado por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e verificou-se a presença de uma mistura de substâncias com a predominância de geraniol-geraniol (diterpenoide acíclico), coridina (alcaloide aporfínico) e diterpenos da classe dos clerodanos. Os resultados apontam o potencial

dessa espécie como fonte para novos fármacos para tratamento de alguns tipos de câncer, como o de pulmão e leucemia (Motta *et al.*, 2011).

As espécies *C. vulnerarius* Baill. e *C. echinocarpus* Müll.Arg. (figuras 1.3 e 1.4) também fazem parte da seção *Cyclostigma* e estão amplamente distribuídas na região da Mata Atlântica brasileira (Cordeiro *et al.*, 2010a e 2010b). Estudos fitoquímicos dessas espécies não foram encontrados na literatura até o presente momento e levando-se em conta critérios quimiotaxonômicos, as espécies pertencentes à Seção *Cyclostigma* apresentariam potencial promissor, já que espécies dessa seção foram referenciadas como possuidoras de substâncias biologicamente ativas.

Ambas as espécies são nativas e endêmicas do Brasil, sendo que *C. vulnerarius* se distribui nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná (Cordeiro *et al.*, 2010b), enquanto que *C. echinocarpus* predomina nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Cordeiro *et al.*, 2010a). Além disso, as espécies pertencentes à *Cyclostigma* consistem em grandes árvores, o que é propício para estudos de prospecção de substâncias bioativas, uma vez que apresentam grandes quantidades de biomassa tanto foliar quanto caular.

Figura 1.3: *Croton vulnerarius*: (A) distribuição geográfica no Brasil (retirado de Cordeiro *et al.*, 2010b), (B) flor masculina e (C) detalhe do ramo com exsudado de látex avermelhado.

Fotos: Cláudia Furlan.

Figura 1.4: *Croton echinocarpus*: (A) distribuição geográfica no Brasil (retirado de Cordeiro *et al.*, 2010a), (B) fruto espinhoso e (C) nectários extraflorais. Fotos: Natália Ravanelli.

Este estudo teve por proposta investigar fitoquimicamente as espécies *C. vulnerarius* e *C. echinocarpus*, com ênfase nas classes químicas de diterpenos, alcaloides e substâncias fenólicas com a finalidade de avaliar o potencial farmacológico de ambas, além de ampliar os conhecimentos sobre a composição química do gênero. Como objetivos específicos, este estudo propôs a análise do potencial antioxidante, antibacteriano e antiviral de diferentes extratos (e substâncias isoladas) dessas duas espécies.

Um conhecimento mais amplo sobre a composição química dessas espécies pode indicar não somente o potencial bioativo de ambas, mas juntamente com resultados obtidos nas investigações químicas e farmacológicas de outras espécies de *Croton*, que vêm sendo realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica da USP, podem sugerir padrões químicos úteis no estabelecimento de relações infragenéricas do grupo.

Referências bibliográficas

AJIKUMAR, P.K.; XIAO, W.K.; TYO, K.E.J.; WONG, Y.; SIMEON, F.; LEONARD, E.; MUCHA, O.; PHON, T.H.; PFEIFER, B.; STEPHANOPOULOS, G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330: 70-74, 2010.

ANVISA. Anvisa publica normas para a fabricação de fitoterápicos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2013+noticias/anvisa+publica+normas+para+fabricacao+de+fitoterapicos>. Acessado em 19/04/2013.

BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VON EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and *trnL-trnF* DNA sequence data. American Journal of Botany 92: 1520-1534, 2005.

CARUZO, M.B.R.; CORDEIRO, I.; BERRY, P.E.; RIINA, R. A new species of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae s.s.) from Minas Gerais, Brazil. Phytotaxa 3: 27-33, 2010.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CANEIRO-TORRES, D.S.; LIMA, L.R.; CARUZO, M.B.R.; BERRY, P.E.; RIINA R.G. *Croton* in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB035971>, 2010 a.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CANEIRO-TORRES, D.S.; LIMA, L.R.; CARUZO, M.B.R.; BERRY, P.E.; RIINA R.G. *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB054583>, 2010 b.

CSEKE, L.J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.B.; WARBER, S.L.; DUKE, J.A.; BRIELMANN, H.L. Natural Products from Plants, 2nd Edition. Taylor & Francis Group, 2006.

DE MOURA, K.C.G.; EMERY, F.S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M.C.F.R.; DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S.L.; PINTO, A.V. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. Journal of the Brazilian Chemistry Society 12: 325-338, 2001.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2009.

FACCHINI, P.J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52: 29-66, 2001.

FRIGERIO, L.; ROBERTS, L.M. The synthesis of *Ricinus communis* lectins. *Toxic Plant Proteins, Plant Cell Monographs* 18: 191-205, 2010.

GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T.M.; CECHINEL FILHO V.; RAO, V.S. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 409–412, 2005.

GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MARTINS, D.T.O.; MATTOS, P.O.; RAO, V.S.N. Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's Blood from *Croton urucurana*. *Phytotherapy Research* 15: 319–322, 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of today and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93, 2006.

HARDY, K.; BUCKLEY, S.; COLLINS, M.J.; ESTALRRICH, A.; BROTHWELL, D.; COPELAND, L.; GARCÍA-TABERNERO, A.; GARCÍA-VARGAS, S.; DE LA RASILLA, M.; LALUEZA-FOX, C.; HUGUT; R.; BASTIR, M.; SANTAMARÍA, D.; MADELLA, M.; WILSON, J.; COERTÉS, A.F.; ROSAS, A. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* 99: 617-626, 2012.

HEDNER, T.; EVERTS, B. The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. *Clinical Rheumatology* 17: 17-25, 1998.

IBRAHIM, R.K. A forty-year journey in plant research: original contributions to flavonoids biochemistry. *Canadian Journal of Botany* 83: 433-450, 2005.

JENNEWEIN, S.; CROTEAU, R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 13-19, 2001.

JONES, K. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9: 877 – 896, 2009.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Química Nova* 25: 429-438, 2002.

MOTTA, L.B.; FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; CORDEIRO, I.; SALATINO, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21 (6): 972-977, 2011.

OMS. National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines, 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7916e/>. Acessado em 19/04/2013.

PORTAL BRASIL. SUS tem fitoterápicos para doenças simples. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/11/09/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>. Acessado em 19/04/2013.

REED, H. S. A Short History of the Plant Sciences. Ronald Press, 1942.

RIINA, R.; BERRY, P.E.; VAN EE, B.W. Molecular phylogenetics of the dragon's blood *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae), a polyphyletic assemblage unraveled. Systematic Botany 34: 360-374, 2009.

SALATINO, A.; SALATINO M.L.F., NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Journal Brazilian Chemical Society 18: 11-33, 2007.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. Metabolism Clinical and Experimental 57: S3-S9, 2008.

SECCO, R.S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M.F.; LIMA, L.R.; MEDEIROS, D.; HAIAD, B.S.; OLIVEIRA, A.S.; CARUZO, M.B.R.; CARNEIRO-TORRES, D.; BIGIO, N.C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae. Rodriguésia 63(1):227-242, 2012.

SMITH, B. A new species of *Croton* (Euphorbiaceae) from Ecuador. A Journal for Botanical Nomenclature, Missouri Botanical Garden 16(2):272-275, 2006.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Plant physiology. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2008.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 42 (2): 289-306, 2005.

TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview. Columbia University Press, 1996.

VAN EE, B.W.; RIINA, R.; BERRY, P.E. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60 (3): 791-823, 2011.

WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793–823, 1993.

Capítulo I

Perfil Químico de *C. echinocarpus* e
C. vulnerarius e isolamento de substâncias

1. Introdução

Croton L. é um gênero pertencente à Euphorbiaceae, muito reconhecido pela diversidade de metabólitos secundários, que está diretamente relacionada com a sua tradicional utilização terapêutica para o tratamento de diversas doenças, como infecções, feridas, febre, diabetes, obesidade, entre outros (Salatino *et al.*, 2007).

Entre as substâncias bioativas estão os flavonoides, uma classe de substâncias amplamente distribuídas entre as plantas, que desempenham um importante papel em sua ecologia e fisiologia, estando relacionados à proteção contra radiação U.V., proteção contra patógenos, e copigmentação em flores, frutos e sementes, mediando suas interações com polinizadores e dispersores (Ibrahim, 2005). Além disso, possuem participação nos processo de germinação e fertilização da planta, interação com organismos simbiontes (Koes *et al.*, 1994) e são fundamentais na proteção contra estresse oxidativo (Agati *et al.*, 2012).

Eles compartilham a estrutura geral C₆-C₃-C₆, ou seja, dois anéis (anéis A e B) aromáticos ligados por uma ponte de 3 carbonos, que formam um anel heterocíclico (anel C) na maioria das classes de flavonoides (figura 1.1). Os flavonoides são subdivididos de acordo com o estado de oxidação do anel C: um grupo cetônico ligado à posição 4 é característico das flavanonas e seus derivados; uma dupla ligação entre os carbono 2 e 3 é comum às flavonas e a presença de uma dupla ligação adicional no anel C (no lugar do grupo C4-cetônico) resulta em uma antocianidina. Além disso, as chalconas, que são substâncias precursoras

de outros flavonoides, também podem ser consideradas flavonoides (Anzenbacher & Zanger, 2012).

Figura 1.1: Estrutura geral dos flavonoides.

Além disso, a adição de grupos hidroxila e metoxila em posições diversas, e a presença de açúcares ligados à estrutura básica do flavonoide, proveem a este grupo uma grande diversidade, sendo que mais de 8000 compostos distintos já foram identificados (Anzenbacher & Zanger, 2012).

Do ponto de vista farmacológico, possuem reconhecida ação antioxidante, sendo que muitos tipos de flavonoides são reconhecidamente benéficos à saúde humana quando fazem parte da dieta. Tal ação se dá graças à natureza polifenólica destas moléculas que permite sua interação com os radicais livres, eliminando-os do organismo (Dewick, 2009).

Os flavonoides também são muito estudados devido ao seu potencial antitumoral (Hollman *et al.*, 2006) e alguns tipos de flavonoides, como a hesperidina e a rutina vêm sendo investigados quanto a sua capacidade de prolongar a vida de células do sistema nervoso (Nones, 2012).

Para a extração de flavonoides de material vegetal, os solventes mais apropriados são os de maior polaridade, como metanol, etanol e

acetonitrila em solução aquosa em diferentes proporções. A proporção de água no solvente deve ser menor quando as substâncias alvo são agliconas ou compostos prenilados, que são menos polares, e maior quando se deseja obter flavonoides glicosilados, que são mais polares. Além disso, solventes alcoólicos são capazes de romper a membrana celular, aumentando a extração de substâncias endocelulares (Corradini *et al.*, 2011).

Os métodos analíticos de maior importância para o estudo de flavonoides são os baseados em cromatografia líquida (CL). Para evitar que substâncias muito polares sejam retidas irreversivelmente na coluna, o método cromatográfico mais adequado para flavonoides é em fase reversa, com coluna de sílica C₈- ou C₁₈-, e com sistema binário de fase móvel, com solventes de alta polaridade. Nessas condições, os compostos mais polares são os primeiros a serem eluídos. Além disso, a utilização de um gradiente de solventes melhora a resolução de uma CL para flavonoides, já que aumenta a capacidade de separação entre substâncias de uma mesma classe (Corradini *et al.*, 2011).

Os flavonoides absorvem eficientemente luz UV, já que possuem pelo menos dois anéis aromáticos. Por conta desta propriedade, podem ser detectados por um espectrofotômetro UV ou por um detector de arranjo de diodos UV (DAD-UV) (Corradini *et al.*, 2011). O espectro de absorção dos flavonoides tipicamente consiste em duas bandas de absorção máxima, uma delas com absorção entre 240-285nm (banda II) e outra em 300-350nm (banda I). A posição e intensidade relativa dessas bandas revelam informações importantes que nos permitem reconhecer a natureza e padrão de oxigenação do flavonoide, por conta disso, a análise

do espectro de UV visível é uma ferramenta muito utilizada para a identificação de substâncias desta classe, principalmente quando utilizados reagentes complexantes e ionizantes capazes de causar mudanças no padrão de absorção (Markham, 1982).

Estudos realizados com espécies de *Croton* descrevem tradicionalmente a presença de glicosídeos de flavonóis e suas agliconas, como quercetina e campferol, assim como agliconas altamente metoxiladas (Salatino *et al.*, 2007).

Nas folhas de *C. cajucara*, espécie conhecida pelas suas propriedades terapêuticas, podem ser encontrados derivados de campferol; de *C. ciliatogladulifer* podem ser extraídos flavonóis metoxilados como a retusina e o paquipodol (Salatino *et al.* 2007). A espécie arbustiva brasileira, *C. betulaster* contém casticina, que vêm sendo estudada como uma possível droga para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Spohr, 2010).

A flavona C-glicosilada vitexina vem sendo frequentemente descrita em diversas espécies de *Croton*, como *C. hovarum* (Krebs & Ramiarantsoa, 1997), *C. kongensis* (Giang *et al.*, 2004) e *C. lechleri* (Alonso-Castro *et al.*, 2012). Outra substância que foi encontrada em muitas espécies do gênero, é o derivado acilado de campferol, o tilirosídeo, que foi relatado em *C. gnaphalii* (Lencina *et al.*, 2001) e *C. sellowii* (Palmeira Júnior *et al.*, 2006), entre outros. Tilirosídeo também foi encontrado nas espécies *C. dichrous*, *C. erytroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, esta última também apresentou vitexina (Savietto *et al.*, 2013).

Outra classe de substâncias encontradas em *Croton* são os terpenoides, moléculas cujo esqueleto principal é formado por unidades biogênicas de 5 carbonos denominadas isoprenos (figura 1.2). São classificadas de acordo com a quantidade de isoprenos que fazem parte de sua estrutura, podendo ser hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (mais do que C_{40}) (Zhang *et al.*, 2002).

Figura 1.2: estrutura de um isopreno, unidade biogênica de cinco carbonos, formadora dos terpenoides.

As atividades biológicas dos terpenos são muito variadas. Entre eles podemos destacar os diterpenos, já que é grande o número de moléculas deste tipo que possuem bioatividade, como por exemplo, os ácidos de forbol (promotores tumorais) e as giberelinas (fitormônios). Muitos triterpenos também possuem ação biológica, como é o caso do ácido betulínico, que possui ação antimelanoma (Zhang *et al.*, 2002).

Uma vez que os terpenos são sintetizados pela combinação de unidades biogênicas (isopentenil pirofosfato IPP e dimetilalil pirofosfato DMAPP), eles possuem grande diversidade estrutural, e o fato de eles poderem ser rearranjados de diversas formas, ou serem altamente oxidados os torna moléculas extremamente difíceis de serem sintetizadas artificialmente (Baran *et al.*, 2007).

Por conta de sua estrutura hidrocarbônica, os terpenos são, tradicionalmente, obtidos através de extração com solventes não polares, como o hexano, ou através de extração com dióxido de carbono em estado supercrítico (Bowman *et al.*, 1997).

A caracterização de terpenos não é uma tarefa simples por conta da grande ocorrência de isômeros, que são difíceis de identificar por possuírem características físicas e químicas muito semelhantes entre si. Além disso, muitos terpenos podem se isomerizar ou oxidar rapidamente, tornando a identificação menos precisa (Zubik & Conner, 1960).

O método cromatográfico a gás é o mais utilizado para análise de terpenos, através do qual é possível uma separação bastante eficiente (Zubik & Conner, 1960). Em geral esta técnica é associada à espectrometria de massas, que permite a identificação de uma determinada substância química submetendo-a a fragmentação por um feixe de elétrons, que produz fragmentos iônicos dos quais é possível conhecer suas massas. Através dessa informação é possível inferir a fórmula molecular de uma substância (Lee, 1998).

Em *Croton*, os terpenos são os metabolitos secundários predominantes, especialmente os diterpenos. De *C. cajucara* foram isolados diterpenos do tipo clerodanos, além da crotonina, trans-dehidrocrotonina e outros diterpenos classificados como nor-clerodanos. Da casca do caule de *C. urucurana* também foram obtidos clerodanos, como a sonderianina (Salatino *et al.*, 2007). Em *C. macrobothrys* foram encontrados dois clerodanos identificados como derivados de crotonina (Motta *et al.*, 2011). Para *C. sphaerogynus* foram descritos nos extratos foliares (hexano, diclorometano e metanol) diterpenos das classes dos

podocarpanos e abietanos, além de derivados de crotonina e trans-dehidrocrotonina (Motta *et al.*, 2013).

Triterpenoides também são frequentemente encontrados em espécies do gênero, tanto os pentacíclicos quanto os esteroidais. Como exemplo, foram encontrados em *C. cajucara* e *C. urucurana*, estigmasterol, β -sitosterol, campesterol e β -sitosterol-*O*-glucosídeo e a partir de *C. hieronymi* foram obtidos α - e β -amirina, lupeol e derivados de esqueleto (Salatino *et al.*, 2007).

Ao contrário dos terpenos, alcaloides não são tão comumente encontrados em Euphorbiaceae, mas *Croton* possui algumas espécies notáveis pela presença destes metabólitos secundários, o que aumenta ainda mais a importância farmacológica deste gênero (Salatino *et al.*, 2007). Os alcaloides são substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular e de caráter básico. Os átomos de nitrogênio presentes nestas substâncias são originados a partir de ácidos aminados, cujo esqueleto carbônico geralmente também se mantém presente na estrutura da molécula, enquanto que o carbono pertencente ao ácido carboxílico se perde durante a descarboxilação (Dewick, 2009). Partes estruturais derivadas das vias do acetato-malonato, chiquimato e do metileritritol fosfato também são frequentemente incorporadas à estrutura dos alcaloides (Dewick, 2009). São relativamente poucos os ácidos aminados envolvidos na síntese de alcaloides, sendo ornitina, lisina, tirosina, triptofano e histidina os precursores mais frequentemente observados. Ácido nicotínico e ácido antranílico também são precursores frequentes de alcaloides (Dewick, 2009).

Biologicamente, podem possuir diversos tipos de atividade, como ação citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, antiparasita, analgésica, anestésica, entre outras. Para a análise desta classe de moléculas, a técnica de cromatografia a gás combinada à técnica de espectrometria de massas também é bastante eficiente para a sua separação e identificação (Aniszewski, 2007).

Em *Croton*, os alcaloides encontrados são frequentemente idênticos ou semelhantes aos encontrados nas plantas da ordem Ranunculales, ou seja, biogeneticamente relacionados com as benzilisoquinolinas (Salatino, *et al.*, 2007), uma classe de substâncias que possui uma grande diversidade estrutural e possui membros de grande valor farmacêutico. Um importante alcaloide, a taspina, foi isolado do látex de *Croton lechleri* e demonstrou possuir atividade anti-inflamatória (Gupta *et al.*, 2008). Em *C. macrobothrys* foram descritos os alcaloides coridina e salutaridina (Motta *et al.*, 2011).

2. Material e métodos

a. Obtenção do material vegetal

O material de *Croton echinocarpus* Müll. Arg. utilizado foi coletado no município de Santana do Riacho, MG, na Serra do Cipó, estrada MG 010 (Voucher LBM62) com o auxílio da pesquisadora Lucimar Barbosa Motta.

Para *Croton vulnerarius* Baill. foram utilizados folhas e caule do espécimen coletado pela pesquisadora Inês Cordeiro no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em São Paulo, SP (Voucher Cordeiro3335).

b. Preparação dos extratos

I. Extração sequencial em soxhlet

O material obtido foi triturado em presença de nitrogênio líquido, no caso das folhas e em moinho de facas para os caules. Cerca de 90 g de cada material foi empacotado em papel filtro, e submetido a uma sequência de extrações de oito horas em aparelho de soxhlet com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e secos em banho-maria.

II. Maceração com etanol 70%

Parte do material triturado (50 g) do caule e das folhas de ambas as espécies foi submetida à maceração com o solvente etanol 70% por sete dias. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados e secos, conforme descrito na seção anterior.

c. Fracionamento dos extratos

I. Fracionamento inicial por cromatografia em coluna de sílica

O extrato etanólico bruto foi incorporado em sílica (Mesh 230-400) para cromatografia em coluna visando o fracionamento e isolamento de substâncias de interesse. A separação de componentes foi feita de acordo com uma adaptação do procedimento de Anastasaki *et al.* (2009). Foram utilizados solventes e misturas, de polaridades crescentes conforme esquematizado na tabela 1.1. Foram utilizados 200 mL de cada solvente, exceto do solvente final (metanol 100%), do qual foram utilizados 400 mL, e foram coletadas frações de 100 mL cada.

Em seguida, as frações foram concentradas até *secura* e analisadas em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) para a análise da composição química, conforme descrito no item 2d. As frações que apresentaram substâncias de interesse para testes biológicos foram utilizadas para o isolamento das mesmas.

Tabela 1-1: Gradiente de solventes utilizado para cromatografia em coluna de sílica gel para o fracionamento inicial dos extratos etanólicos.

Solvente	Hexano	Acetato de Etila	Metanol
S1	100%	-	-
S2	75%	25%	-
S3	50%	50%	-
S4	25%	75%	-
S5	-	100%	-
S6	-	75%	25%
S7	-	50%	50%
S8	-	25%	75%
S9	-	-	100%

II. Isolamento do alcaloide coridina

As frações de *Croton echinocarpus* nas quais foi verificada a presença da coridina foram reunidas e submetidas a uma nova cromatografia com gradiente de solventes de acordo com a tabela 1.2. Foram utilizados 20 mL de cada solvente e coletadas frações de 10 mL cada.

Tabela 1.2.: Gradiente de solventes utilizado para cromatografia em coluna de sílica gel para
isolamento da coridina.

Solvente	Acetato de Etila	Metanol
S1	100%	-
S2	90%	10%
S3	80%	20%
S4	70%	30%
S5	60%	40%
S6	50%	50%
S7	40%	60%
S8	30%	70%
S9	20%	80%
S10	10%	90%
S11	-	100%

III. Fracionamento de compostos fenólicos por coluna de Sephadex

Para o isolamento dos flavonoides, foi realizada cromatografia em coluna com preenchimento de Sephadex. A separação foi feita a partir do macerado etanólico foliar de ambas espécies e a fase móvel utilizada foi metanol absoluto. Foram coletadas 24 frações de 10 mL, que foram concentradas, secas e injetadas em CLAE, conforme descrito no item 5. As frações similares foram reunidas e utilizadas nos testes biológicos.

d. Análise dos extratos e frações por CG-EM

Os extratos e frações obtidas através das colunas de sílica (itens 3a e 3b) foram submetidos à cromatografia a gás associada à espectrometria de massas para investigação química. O equipamento utilizado foi Agilent CG-EM 6850/5975B, com coluna capilar DB5HT (30 m x 0,32 cm) e gás de arraste He com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

A temperatura do injetor foi de 250°C e do detector foi de 350°C. A temperatura da coluna foi variável: início a 150°C por 1 min, com elevação a 5°C.min⁻¹ até 310°C e manutenção por 3 min. A identificação foi feita por comparação com a biblioteca de dados de massas (NIST) e com a literatura.

e. Análise de flavonoides por CLAE

Alíquotas de 3 µL dos extratos de folhas e caules foram analisadas em cromatógrafo líquido Agilent 1260 equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando coluna Zorbax C18 (4,6x150 mm, 3,5 µm) empregando-se o seguinte gradiente de solução aquosa de ácido acético 0,1% (A) em acetonitrila (B): 0-20 min 15% de B em A; 20-25 min 100% de B; 25-30 min 100%-15% de B em A; 30-32 min: 15%C.

O fluxo de solvente foi de 0 a 25 min: 1,5 mL.min⁻¹; de 25,1 a 25,2 min: 1,5 a 1 mL.min⁻¹; de 25,2 a 26,9 min: 1 mL.min⁻¹; 26,9 a 27 min: 1 a 1,5 mL.min⁻¹; de 27 a 35 min: 1,5 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi constante em 40°C, a pressão inicial foi de 146 bar e a detecção através de DAD em $\lambda = 352\text{nm}$.

A identificação dos flavonoides foi feita por comparação do tempo de retenção com biblioteca organizada no Laboratório de Fotoquímica (IB-USP), comparação entre espectros UV gerados e análise de espectros de massas obtidos por CLAE/EM conseguidos por análises realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

As análises de CLAE/EM ou CLAE/EM/EM foram feitas usando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de

massas modelo Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, com mesmo gradiente de solventes e coluna citados anteriormente, fluxo de $90 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, voltagem de 4000 V, nebulizador a 27 psi, gás secante a 320°C e fluxo de $7,0 \text{ L}.\text{min}^{-1}$.

Literatura especializada também foi consultada (Cuyckens & Claeys, 2002, 2004).

3. Resultados e Discussão

a. Análise dos extratos e frações por CG-EM

Todos os extratos obtidos foram submetidos à cromatografia a gás, enquanto que apenas as frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica foram analisadas por CG-EM. Os cromatogramas obtidos para os extratos estão representados nas figuras de 1.3 a 1.9, e as substâncias majoritárias encontradas nos extratos brutos resultantes tanto do processo de maceração com etanol 70% quanto da extração seriada em soxhlet de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* estão descritas nas tabelas de 1.3 a 1.6, bem como a identificação sugerida pela biblioteca de espectros de massas NIST.

Os extratos de acetato de etila foliar de *C. echinocarpus* e caulinar de *C. vulnerarius* apresentaram picos de contaminantes (fitalatos) e, portanto, não foi possível analisar seus componentes. Já os extratos metanólicos e aquosos de ambas as espécies, como esperado, não apresentaram substâncias detectáveis pelo CG-EM, uma vez que devem apresentar majoritariamente substâncias mais polares e menos voláteis.

**Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*
e isolamento de substâncias**

Entre os metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos de *C. echinocarpus* é notável a presença de dois alcaloides no extrato foliar (figura 1.3A), um deles identificado por comparação com a NIST como sendo coridina, que é um alcaloide aporfínico (Salminen *et al.*, 2011), e ou outro como norboldina, pertencente à mesma classe que a coridina (O'Brien *et al.*, 2006).

Quanto aos compostos presentes no extrato caulinar (figura 1.3B) foi constatada a presença de varias substâncias da classe dos alcanos, além da presença de uma substância com esqueleto quinazolínico, característico de uma classe de alcaloides (Wiitt & Bergman, 2003).

Tabela 1.3: Componentes majoritários obtidos por CG-EM dos extratos etanólicos de *Croton echinocarpus*. T.R. = tempo de retenção; N.I. = não identificado.

Subst.	T.R (min)	Massa molec.	Fragmentação	Sugestão (NIST)	%	
					Folha	Caule
1	5.419	N.I.	43 (999), 44 (963), 73 (657), 124 (524), 71 (520), 85 (449), 109 (406), 41 (375), 55 (337), 45 (300)	N.I.	11.70	-
2	5.573	N.I.	124 (999), 44 (942), 73 (519), 43 (407), 45 (304), 41 (230), 55 (214), 79 (156), 42 (154), 78 (150)	N.I.	6.58	-
3	6.953	N.I.	88(999), 44(951), 101(584),43(374), 55(267), 41(237), 70(196), 73(192),57(185),69 (163)	Alcano	-	26,6
4	9.029	N.I.	88 (999), 44 (688), 101 (573), 43 (373), 73 (323), 41 (270), 55 (236), 57 (232), 157 (166), 45 (163)	Alcano	8.81	-
5	9.067	N.I.	44(999), 67(229), 81(217), 55(186), 41(147), 43(141), 68(110), 79(109), 95(109), 69(101)	Alcano	-	16,94
6	9.150	N.I.	44(999), 55(173), 79(153), 41(145), 67(137), 43 (136), 81(130), 69(116), 95(116), 93(82)	Alcano	-	21,31
7	19.926	313	44(999), 312(299), 313(229), 207(133), 281(82), 73(73), 296(59), 41(51), 253(50), 314(49)	Derivado de Quinazolina	-	25,72
8	20.414	341	44 (999), 326 (797), 310 (522), 341 (489), 324 (296), 207 (187), 125 (165), 327 (164), 340 (152), 139 (125)	Coridina	7.52	-
9	22.933	312	44 (999), 312 (675), 313 (534), 207 (329), 73 (164), 281 (161), 253 (133), 314 (112), 283 (110), 96 (89)	Norboldina	4.80	-

Figura 1.3: Cromatogramas obtidos por CG-EM do extrato etanólico foliar (A) e caulinar (B) de *Croton echinocarpus*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.3.

Em relação ao extrato etanólico foliar de *C. vulnerarius* (figura 1.4A) foi observada a presença de triterpenos como β -sitosterol, que é um fitormônio da classe dos esteroides, bastante recorrente em plantas, um derivado de lupeol e outro composto cuja estrutura não pode ser esclarecida por comparação com a NIST, mas que possui um padrão de fragmentação similar aos outros triterpenos encontrados. Além disso, também foi encontrado o diterpeno acíclico fitol que apresenta ampla distribuição entre as espécies de *Croton*.

Quanto ao extrato de caule de *C. vulnerarius* (figura 1.4B), poucos compostos foram detectados por CG-EM, sendo que dois deles não foram identificados e o terceiro e mais abundante foi identificado por comparação com a NIST como acetamida, um composto nitrogenado, derivado de ácido acético.

Tabela 1.4: Componentes majoritários obtidos por CG-EM dos extratos etanólicos de *Croton vulnerarius*. T.R. = tempo de retenção; N.I. = não identificado.

Subst.	T.R (min)	Massa molec.	Fragmentação	Sugestão (NIST)	%	
					Folha	Caule
1	5.217	N.I	44(999), 186(378), 187(350), 43(303), 42(175), 58(120), 7(117), 81(104), 57(98), 45(95)	N.I	-	32,73
2	6.849	210	44(999), 43(255), 58(151), 42(146), 81(123), 55(105), 45(101), 57(98), 73(91), 41(89)	Acetamida (C11H18N2 002)	-	56,45
3	9.019	N.I	88 (999), 101 (542), 43 (258), 55 (212), 41 (173), 57 (165), 89 (162), 73 (159), 70 (141), 157 (131)	N.I	20,66	-
4	10.826	296	71 (999), 43 (298), 57 (296), 55 (272), 69 (262), 81 (249), 41 (233), 123 (233), 68 (192), 83 (170)	Fitol C20H40O	32,08	-
5	22.708	N.I	44(999), 58(231), 207(161), 43(94), 73(88), 281(66), 42(58), 41(51), 81(50), 45(44)	N.I	-	10,82
6	25.079	414	43 (999), 55 (727), 44 (629), 105 (614), 107 (614), 57 (605), 95 (583), 145 (569), 81 (533), 91 (528)	β -Sitosterol C29H50O	7,11	-
7	25.493	424	109 (999), 205 (990), 81 (970), 95 (908), 44 (883), 55 (802), 107 (792), 93 (738), 69 (679), 121 (676)	Derivado de Lupeol C30H48O	5,15	-
8	25.706	NI	95 (999), 207 (878), 81 (864), 93 (840), 107 (789), 121 (784), 109 (766), 135 (735), 55 (679), 67 (646)	Triterpeno	8,48	-

Figura 1.4: Cromatogramas obtidos por CG-EM do extrato etanólico foliar (A) e caulinar (B) de *Croton vulnerarius*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.4.

Os resultados da análise da composição química dos extratos obtidos por extração seriada com diferentes solventes foram bastante distintos dos obtidos por maceração com etanol 70%.

No extrato hexânico foliar de *C. echinocarpus* (figura 1.5A) foi observada a presença de algumas substâncias da classe dos terpenos, como o diterpeno acíclico fitol, também encontrado em *C. vulnerarius*, e alguns triterpenos como o esqualeno, α -amirina e β -sitosterol. Este último também está presente no extrato de diclorometano, assim como a norboldina, que também foi encontrada no macerado etanólico. Já no extrato hexânico obtido a partir do caule de *C. echinocarpus* (figura 1.5B) foi observada a presença de dois triterpenos esteroides, o β -sitosterol e uma molécula derivada de estigmasterol.

No extrato de diclorometano de folhas de *C. echinocarpus* (figura 1.6A), observa-se a mesma tendência de presença de substâncias de caráter mais apolar. Além de β -sitosterol, pequena quantidade de norboldina também foi verificada. Para o caule, a composição do extrato de diclorometano mostrou a presença de ácido ursólico, também um triterpeno. Outras substâncias não foram identificadas.

O ácido ursólico também foi detectado no extrato de acetato de etila obtido a partir do caule de *C. echinocarpus* (figura 1.7). A tabela 1.5 traz as porcentagens relativas das substâncias encontradas nos diferentes extratos de *C. echinocarpus*.

Figura 1.5: Cromatogramas obtidos por CG-EM do extrato hexânico foliar (A) e caulinar (B) de *Croton echinocarpus*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.5.

Figura 1.6: Cromatograma obtido por CG-EM do extrato de diclorometano foliar (A) e caulinar (B) de *Croton echinocarpus*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.5.

Figura 1.7: Cromatograma obtido por CG-EM do extrato de acetato de etila caulinar de *Croton echinocarpus*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.5.

Em relação às substâncias encontradas nos extratos seriados de *C. vulnerarius* é notável a presença do óxido de cariofileno, que está presente tanto em folhas quanto no caule (tabela 1.6). No extrato hexânico foliar (figura 1.8A) foi encontrado esqualeno, assim como β -sitosterol e betulina, substâncias também observadas no extrato de diclorometano (figura 1.9A). A tabela 1.6 traz as porcentagens relativas das substâncias encontradas nos diferentes extratos de *C. vulnerarius*.

Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* e isolamento de substâncias

Tabela 1.5: Componentes majoritários detectados por CG-EM dos extratos de *Croton echinocarpus* obtidos por extração seriada. T.R. = tempo de retenção; N.I. = não identificado.

Substância	T.R (min)	Massa molecular	Fragmentação	Identificação (NIST)	Abundância (%)				
					Hexano		Diclorometano		Acetato de Etila
					Folha	Caule	Folha	Caule	Caule
1	5.531	N.I	124 (999), 43 (241), 44 (161), 79 (118), 41 (115), 125 (103), 55 (87), 111 (75), 122 (74), 77 (72)	N.I	-	-	3,49	-	-
2	8.293	N.I	44(999), 57(487), 71(398), 43(368), 85(279), 41(214), 55(177), 69(94), 99(92), 42(82)	N.I		-	-	24,03	-
3	10.824	296	71 (999), 57 (324), 43 (308), 69 (283), 55 (275), 81 (269), 123 (255), 41 (242), 68 (208), 83 (180)	Fitol C20H40O	1,56	-	-	-	-
4	10.908	N.I	57(999), 43(815), 71(502), 85(264), 41(248), 29(178), 55(124), 56(114), 42(74), 70(73)	N.I		-		41,76	-
5	13.147	N.I	185 (999), 129 (673), 43 (420), 259 (388), 57 (294), 41 (242), 44 (227), 157 (193), 139 (131), 112 (106)	N.I	-	-	4,88	-	-
6	15.009	N.I	57(999), 43(787), 44(744), 82(721), 55(581), 71(554), 83(508), 96(507), 69(450), 41(436)	N.I	-	4,38	-	-	-
7	17.373	N.I	57(999), 82(839), 43(805), 44(729), 55(623), 71(542), 83(542), 96(521), 69(470), 41(425)	N.I	-	14,65	-	-	-
8	18.817	N.I	57 (999), 71 (759), 43 (565), 85 (550), 55 (228), 41 (192), 69 (167), 99 (158), 83 (144), 56 (124)	Alcano	2,62	-	-	-	-
9	20.219	410	69 (999), 81 (546), 41 (208), 95 (141), 68 (121), 137 (107), 121 (103), 136 (101), 67 (100), 93 (95)	Esqualeno C30H50	1,74	-	-	-	-
10	21.118	N.I	57 (999), 71 (748), 43 (543), 85 (535), 55 (223), 69 (175), 41 (173), 99 (163), 83 (146), 56 (128)	Alcano	32,94	1,47	-	-	-
11	22.039	456	281 44(999), 207(235), 43(126), 73(106), 55(81), 41(70), 281(63), 91(59), 133(58), 81(54)	Ácido Ursólico C30H48O3	-	-	-	34,21	11,96

Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* e isolamento de substâncias

Tabela 1.5: Continuação.

Substância	T.R (min)	Massa molecular	Fragmentação	Identificação (NIST)	Abundância (%)				
					Hexano		Diclorometano		Acetato de Etila
					Folha	Caule	Folha	Caule	Caule
12	22.060	414	43(999), 55(668), 81(625), 105(623), 57(592), 107(579), 145(560), 95(544), 91(523), 69(463)	β-Sitosterol C29H50O	-	28,83	-	-	-
13	22.931	312	44 (999), 312 (675), 313 (534), 207 (329), 73 (164), 281 (161), 253 (133), 314 (112), 283 (110), 96 (89)	Norboldina	-	-	4	-	-
14	23.273	N.I	57 (999), 71 (757), 85 (538), 43 (528), 55 (224), 69 (180), 99 (168), 41 (164), 83 (162), 97 (141)	Alcano	9,03	-	-	-	-
15	23.315	412	124(999), 44(433), 43(426), 55(363), 229(363), 95(262), 147(240), 41(226), 57(224), 135(219)	Derivado de Estigmasterol	-	12,95	-	-	-
16	23.420	N.I	165 (999), 164 (304), 430 (290), 43 (161), 57 (129), 166 (118), 431 (92), 205 (90), 55 (75), 71 (71)	NI	3,42	-	4,33	-	-
17	25.052	414	43(999), 55 (698), 81 (657), 107 (647), 57 (642), 95 (628), 105 (609), 145 (555), 91 (514), 93 (499)	β-Sitosterol C29H50O	14,48	-	18,11	-	-
18	25.680	426	218 (999), 95 (678), 81 (633), 135 (590), 93 (577), 207 (577), 109 (567), 69 (565), 107 (556), 55 (533)	α-Amirina C30H50O	7,85	-	-	-	-

Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*
e isolamento de substâncias

Figura 1.8: Cromatograma obtido por CG-EM do extrato hexânico foliar (A) e caulinar (B) de *Croton vulnerarius*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.6.

Figura 1.9: Cromatogramas obtidos por CG-EM do extrato de diclorometano foliar (A) e caulinar (B) de *Croton vulnerarius*. Picos numerados de acordo com a tabela 1.6.

Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* e isolamento de substâncias

Tabela 1.6: Componentes majoritários detectados por CG-EM dos extratos de *Croton vulnerarius* obtidos por extração seriada. T.R. = tempo de retenção;

N.I. = não identificado.

Substância	T.R (min)	Massa molecular	Fragmentação	Identificação (NIST)	Abundância (%)			
					Hexano		Diclorometano	
					Folha	Caule	Folha	Caule
1	5.447	N.I	44(999), 43(259), 69(222), 94(193), 41(191), 79(178), 91(149), 109(120), 93(113), 77(105)	N.I	-	36,21	-	-
2	6.957	220	94 (999), 69 (902), 43 (807), 109 (596), 79 (551), 41 (522), 93 (505), 137 (427), 95 (363), 55 (275)	Derivado de Óxido de Cariofileno	4,45	-	25,73	19,85
3	7.988	220	94 (999), 43 (831), 69 (669), 109 (536), 79 (472), 93 (377), 41 (357), 137 (278), 95 (243), 134 (242)	Derivado de Óxido de Cariofileno	1,5	-	8,92	-
4	10.826	N.I	71 (999), 57 (305), 43 (283), 123 (280), 69 (278), 81 (271), 55 (260), 41 (219), 68 (219), 95 (185)	N.I	2,59	-	-	-
5	16.831	N.I	149 (999), 167 (314), 57 (201), 71 (156), 70 (138), 150 (115), 43 (102), 41 (85), 113 (81), 55 (75)	N.I	-	-	-	-
6	18.126	N.I	44(999), 57(205), 43(167), 71(150), 85(124), 55(92), 207(88), 41(67), 73(61), 69(58)	N.I	-	45,03	-	-
7	20.221	410	69 (999), 81 (566), 41 (183), 95 (147), 137 (113), 68 (111), 121 (108), 136 (108), 93 (106), 67 (99)	Esqualeno (C30H50)	2,17	-	-	-
8	21.157	N.I	57 (999), 71 (809), 85 (613), 43 (517), 55 (233), 99 (204), 69 (187), 41 (168), 83 (167), 97 (155)	Alcano	35,77	-	-	-
9	23.325	N.I	57 (999), 71 (793), 85 (584), 43 (506), 55 (231), 99 (196), 69 (195), 83 (180), 97 (166), 41 (151)	Alcano	18,15	-	-	-
10	25.068	414	43 (999), 107 (789), 55 (726), 105 (720), 81 (707), 95 (691), 145 (687), 57 (685), 91 (592), 93 (552)	β-Sitosterol C29H50O	7,82	-	3,21	-
11	25.706	442	95 (999), 81 (865), 109 (858), 93 (816), 107 (810), 135 (810), 189 (794), 121 (760), 69 (718), 207 (688)	Betulina C30H50O2	9,03	-	2,23	-

Os dois tipos de extração utilizadas neste trabalho geraram perfis químicos distintos tanto para *C. echinocarpus* quanto para *C. vulnerarius*. O procedimento de extração seriada em soxhlet é realizado sob condições de alta temperatura e portanto, é possível que substâncias termo-sensíveis sejam degradadas ou sofram alterações. Em relação à maceração em etanol 70%, foi favorecida a extração de alcaloides, talvez pelo uso de temperatura ambiente e ausência de luz. Por essa metodologia, substâncias com menor polaridade foram desfavorecidas, esse também pode ser mais um fator para a detecção de alcaloides no extrato etanólico.

Diferentemente do perfil fitoquímico de outras espécies do gênero como *C. macrobothrys* (Motta *et al.*, 2011), pertencente à mesma seção *Cyclostigma*, em *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* não foram encontradas moléculas da classe dos diterpenos. No entanto, alcaloides foram encontrados em *C. echinocarpus*, identificados como coridina e norboldina e presentes no extrato etanólico em abundância relativa considerável (7,5 e 4,8% respectivamente), o que a torna uma espécie interessante farmacologicamente.

b. Fracionamento dos extratos por coluna de sílica

Após a análise da composição química das espécies estudadas, optamos neste trabalho por privilegiar o fracionamento em coluna de sílica do extrato etanólico da porção foliar de *C. echinocarpus* já que esta possui alguns alcaloides em quantidade considerável.

Através deste procedimento, foram obtidas 20 frações, que foram analisadas por CG-EM e a fração na qual foi observada maior abundância de alcaloide seu cromatograma está apresentado na figura 1.10.

Figura 1.10: Cromatograma (CG-EM) da fração obtida através de cromatografia em coluna de sílica do extrato etanólico foliar de *C. echinocarpus*. Pico com tempo de retenção de 20,108 minutos corresponde ao alcaloide coridina.

Após a análise das frações em CG-EM, aquelas que apresentaram o alcaloide foram reunidas e submetidas a uma nova cromatografia, conforme descrito no item 2.c.II deste capítulo. Neste procedimento foram coletadas 22 frações, sendo que em uma delas apenas a substância identificada como coridina por comparação com a NIST foi detectada em CG-EM.

O espectro de massas obtido da substância isolada (figura 1.11) apresenta um padrão de fragmentação similar ao encontrado na literatura para a coridina (Pereira *et al.*, 1999), com massa molecular de 341.1 e fragmentos de massas 326, 310, 295 e 281. No entanto uma identificação mais apurada será conseguida através da técnica de ressonância nuclear magnética (RNM), no entanto, a quantidade de substância isolada foi insuficiente para a realização deste procedimento e, por isso, o isolamento segue em andamento.

Figura 1.11: Espectro de massas e estrutura molecular da substância isolada por cromatografia em coluna de sílica, representada no cromatograma da figura 1.15 e identificada como o alcaloide coridina.

c. Análise da composição fenólica de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

As figuras de 1.12 a 1.15 correspondem aos cromatogramas obtidos por CLAE do extrato etanólico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*. Os constituintes foram identificados por comparação do tempo de retenção e padrão de absorção UV-visível com uma biblioteca de padrões autênticos e literatura especializada e estão descritos na tabela 1.7. Os extratos foram analisados por CLAE na concentração de 2 mg.mL⁻¹ e foi observada a presença de 21 substâncias considerando as duas espécies analisadas, com diferenças entre ambas principalmente na quantidade de determinado constituinte. Nesse sentido, *C. echinocarpus* poderia ser caracterizada pela grande abundância em que o flavonoide vitexina ocorre, enquanto *C. vulnerarius* apresenta maior diversidade de derivados do flavonol campferol (Tabela 1.7).

Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* e isolamento de substâncias

Tabela 1.7: Constituintes principais do extrato etanólico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* identificados pelo padrão de absorção UV-vis. D. indica um derivado da aglicona proposta.

Substância	T.R.	U.V-vis (nm)		Classe	Abundância Relativa (% área)			
		Bandas	Ombros		C. echinocarpus		C. vulnerarius	
					Folha	Caule	Folha	Caule
1	0.980	280	-	Fenilpropanoide	2,73	11,02	2,45	8,02
2	1.212	280	-	Fenilpropanoide	-	5,83	2,13	6,35
3	1.663	250, 325	300	Fenilpropanoide	4,36	2,72	3,74	
4	2.787	260, 350	290	D. Quercetina	7,28	-	8,31	5,88
5	3.072	270, 340	285	D. Quercetina	-	3,47	-	2,06
6	3.233	260, 350	290	D. Quercetina	6,89	-	-	-
7	3.774	260, 350	270, 290	D. Quercetina	2,84	-	0,33	-
8	4.027	260, 350	300	D. Campferol	-	-	16,12	2,16
9	4.267	260, 350	300	D. Campferol	-	-	7,48	-
10	4.658	260, 350	310	D. Campferol	2,19	-	-	-
11	4.851	260, 350	310	D. Campferol	-	-	3,64	-
12	4.977	260, 350	310	NI	3,76	-	-	-
13	5.505	270, 340	310	Vitexina	46,10	1,8-	6,82	3,91
14	8.361	260, 355	300	NI	3,57	-	-	-
15	9.621	-	-	NI	-	3,09	0,94	-
16	10.598	-	-	NI	-	3,3	1	-
17	12.260	-	-	Ácido elágico	-	5,92	-	-
18	12.541	-	-	Ácido elágico	-	-	2,56	13,97
19	22.661	270, 295	-	NI	6,89	5,37	2,23	2,46
20	23.029	265, 313	-	Tilirosídeo	9,16	2,03	10,96	2,54
21	27.357	250, 360	280	NI	-	23,63	-	9,66

As espécies estudadas apresentam vários flavonoides em comum, como alguns derivados de quercetina, vitexina e tilirosídeo, além da presença de fenilpropanoides. Observando os cromatogramas, nota-se que em ambas as espécies as folhas possuem maior abundância de flavonoides, o que é um resultado esperado, já que tais substâncias participam dos mecanismos de defesa contra patógenos e da proteção contra a ação da radiação UV e as folhas são órgãos da planta geralmente mais expostos e suscetíveis do que a região caular que apresenta maiores quantidades de ligninas e taninos, como pode ser visto na composição dos caules de ambas as espécies, com a presença de ácido elágico, um componente de taninos hidrolisáveis.

Conforme os resultados de LC e LC/EM a vitexina é o principal constituinte fenólico em *C. echinocarpus* sendo que a mesma foi encontrada em menor abundância em *C. vulnerarius*. A vitexina (apigenina 8-C-glucosídeo) é uma flavona C-glicosilada que está presente em um grande número de plantas, incluindo muitas espécies do gênero, como *C. hovarum* (Krebs & Ramiarantsoa, 1997), *C. kongensis* (Giang *et al.*, 2004) e *C. lechleri* (Alonso-Castro *et al.*, 2012), *C. myrianthus* e *C. splendidus* (Savietto, 2011), *C. betulaster* e *C. antisiphiliticus* (Matos, 2011).

Em seu espectro de absorção UV/Visível observamos a banda I com absorção máxima em 335 nm e a banda II em 269nm. Quanto ao espectro de massas (figura 1.13), observamos que não houve fragmentação, como esperado para um C-glicosídeo, mas o íon molecular observado é correspondente à massa molecular da vitexina, 433 (Cuyckens & Claeys, 2004).

Esta substância já foi alvo de muitos estudos a respeito de suas propriedades farmacológicas e é reconhecida pela sua ação hipotensiva, anti-inflamatória e antiespasmódica (Prabhakar *et al.*, 1981). Em um trabalho realizado com corações de ratos isolados foi observado que a vitexina possui efeito significativo contra lesões causadas por isquemia e reperfusão, pois aumenta o fluxo de sangue nas coronárias (Dong *et al.*, 2011).

Figura 1.12: Perfil fenólico do material foliar (A) e caulinar (B) de *C. echinocarpus* obtido por CLAE (detecção a $\lambda = 352\text{nm}$). Picos numerados de acordo com a tabela 1.7.

Figura 1.13: Espectro UV/Vis (A); estrutura química (B) e espectro de massas (CLAE-EM) (C) do componente fenólico majoritário de *C. echinocarpus*, a flavona C-glicosilada vitexina.

Outro estudo recente (Abbassi *et al.*, 2012) mostra que a vitexina apresenta efeitos anticonvulsivos, o que a torna promissora para a pesquisa de novas drogas para o tratamento da epilepsia. Além disso, a vitexina é um flavonoide com potencial para a aplicação na indústria cosmética, pois tem ação na prevenção das reações da pele à radiação solar UV, como o foto envelhecimento e é capaz de proteger as células da derme de lesões, graças à sua atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kim *et al.*, 2005).

Figura 1.14: Perfil fenólico do material foliar (A) e caulinar (B) de *C. vulnerarius* obtido por CLAE (detecção a $\lambda = 352\text{nm}$). Picos numerados de acordo com a tabela 1.7.

Analisando-se a composição de *C. vulnerarius*, o flavonol acilado tilirosídeo (campferol 3-*O*-(6-*p*-cumaroil)-glucosídeo) é o composto fenólico predominante nessa espécie (figura 1.14), mas também aparece em *C. echinocarpus*, porém em menor abundância. É um flavonol derivado de campferol que vem sendo encontrado frequentemente em estudos com plantas do gênero *Croton*, como *C. grandivelum*, *C. antispyhiliticus*, *C.*

hemiargyreus (Matos, 2011), *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus* (Saviotto, 2011).

É uma molécula de fácil identificação pelo seu espectro UV/Visível, pois possui o pico de absorção máxima da banda I em baixo comprimento de onda (313 nm) para um flavonol (figura 1.15A). Em relação ao seu espectro de massas (figura 1.15C), podemos observar o íon molecular de massa 595.2 e a presença do fragmento 309.2, que corresponde a *p*-cumaroil-glucose (Abad-García *et al.*, 2009).

Figura 1.15: Espectro UV/Vis (A); estrutura química (B) e espectro de massas (CLAE-EM) (C) do componente majoritário de *C. vulnerarius*, o flavonol acilado tilirosídeo.

O tilirosídeo possui uma série de atividades biológicas reconhecidas como antioxidante e anti-inflamatória (Sala *et al.*, 2003), citotóxica (Rao *et. al.*, 2007), ansiolítica (Herrera-Ruiz *et al.* 2008), entre outras.

Em um estudo realizado por Falcão-Silva e colaboradores em 2009, foi mostrado que o tilirosídeo reduz a resistência microbiana a certos antibióticos, ou seja, é capaz de aumentar a eficácia destes, apesar de não possuir ação antimicrobiana significativa quando utilizado isoladamente.

Outro estudo bastante recente (Silva *et al.*, 2013), demonstrou que o tilirosídeo possui efeito anti-hipertensivo e vasorelaxante, diminuindo a resistência dos vasos periféricos. Segundo a autora deste trabalho, esta substância apresenta grande potencial para ser utilizada como modelo para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de hipertensão.

Além disso, o tilirosídeo possui aplicações na indústria cosmética, sendo um potente ativo para o tratamento de peles sensíveis, capaz de reduzir a formação de eritemas (vermelhidão causada pela exposição à radiação UV) graças a sua ação anti-inflamatória (EDM chemicals).

Os cromatogramas do material caulinar (figuras 1.12 e 1.14) das espécies analisadas apresentaram perfis bastante semelhantes, tendo como substâncias majoritárias o fenilpropanoide com tempo de retenção 0.980 minutos e um flavonoide não identificado com tempo de retenção de 27.357 minutos. Como apresenta tempo de retenção maior, podemos inferir que se trata de uma substância mais apolar, possivelmente uma aglicona ou ainda um flavonoide metoxilado.

Os extratos obtidos pela extração seriada também foram analisados por CLAE para se obter suas composições fenólicas. A tabela 1.8 traz as porcentagens relativas em que aparecem os principais constituintes fenólicos em cada extrato, seguindo-se a mesma identificação apresentada na tabela 1.7. Os resultados evidenciam que muitos dos constituintes fenólicos das espécies estudadas possuem polaridade intermediária, pois também são solúveis mais apolares, como por exemplo, o hexano. Derivados de quercetina, vitexina e o constituinte derivado de isoramnetina apresentaram boa solubilidade em acetato de etila, constituinte boa parte desse extrato. Já, o extrato aquoso foi eficiente especialmente para a extração de fenilpropanides.

d. Fracionamento de compostos fenólicos por coluna de Sephadex

As frações geradas a partir dos extratos etanólicos foliares de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* foram analisadas em CLAE e aquelas que apresentaram perfil semelhante foram reunidas.

Foram obtidas seis frações para *C. echinocarpus* (figura 1.16) e cinco para *C. vulnerarius* (figura 1.17) que diferem pela sua composição e abundância dos constituintes fenólicos (tabela 1.9). A mesma identificação utilizada na tabela 1.8 foi adotada para as frações.

Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* e isolamento de substâncias

Tabela 1.8: Porcentagens relativas dos constituintes fenólicos obtidos por CLAE dos extratos seriados de *Croton echinocarpus* (Ce) e *Croton vulnerarius* (Cv). Todos foram injetados na concentração de 1 mg.mL⁻¹. D. = derivados da aglicona proposta.

Caules	Fenilpropanoides		D. Quercetina		D. Campferol		Vitexina		Tilirosídeo		D. Isoramnetina	
	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv
hexano	14,48	4,95	0,00	10,28	0,00	11,36	0,00	19,25	0,00	7,02	0,00	0,28
diclorometano	1,66	1,08	0,00	0,00	1,46	0,00	13,38	9,08	10,92	1,79	2,38	1,38
acetato etila	0,77	14,69	11,90	7,90	0,00	1,67	6,98	18,63	2,31	6,90	4,05	5,17
metanol	15,07	9,60	2,00	5,87	0,00	3,66	1,87	0,00	3,74	2,55	2,54	0,57
aquoso	38,22	33,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Folhas	Fenilpropanoides		D. Quercetina		D. Campferol		Vitexina		Tilirosídeo		D. Isoramnetina	
	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv
hexano	14,07	6,19	0,00	8,31	0,00	27,25	0,00	3,08	0,00	10,96	0,00	0,00
diclorometano	5,50	1,61	0,00	0,00	0,00	0,00	11,73	5,54	0,00	0,83	3,29	4,73
acetato etila	4,71	1,05	1,17	1,69	0,00	0,00	60,65	22,15	6,18	17,88	1,46	29,61
metanol	7,09	8,48	7,28	11,39	5,96	37,33	46,11	6,80	5,67	15,02	0,88	3,48
aquoso	33,25	11,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,05	0,00	0,00

Tabela 1.9: Porcentagens relativas dos constituintes fenólicos obtidos por CLAE das sub-frações do extrato etanólico de *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius*. Todos as frações foram injetadas na concentração de 1 mg.mL⁻¹. D. = derivados da aglicona proposta.

	Fração	Fenilprop.	D. Quercetina	D. Campferol	Vitexina	Tilirosídeo	D. Isoramnetina
<i>C. echinocarpus</i>	CEF1	28,04	24,62	0,00	29,58	0,00	0,00
	CEF2	9,02	13,19	4,77	64,33	2,25	0,00
	CEF3	0,00	3,81	5,47	77,90	1,86	1,50
	CEF4	0,00	0,00	0,62	5,31	57,36	4,11
	CEF5	0,00	0,00	0,00	0,00	65,95	29,23
	CEF6	0,00	0,00	0,00	0,00	95,68	0,00
<i>C. vulnerarius</i>	CVF1	24,92	15,12	59,96	0,00	0,00	0,00
	CVF2	1,82	10,39	7,81	57,98	1,34	0,00
	CVF3	2,94	0,00	0,00	62,42	8,52	0,00
	CVF4	12,38	0,00	0,00	38,49	18,84	12,16
	CVF5	25,80	0,00	0,00	0,00	15,97	58,23

Com exceção à fração CEF6 que apresentou 95% do constituinte tilirosídeo, as sub-frações do extrato etanólico não apresentaram um completo isolamento de substâncias fenólicas. Entretanto, as frações podem ser diferenciadas de acordo com a proporção em que os constituintes aparecem. As frações CEF2, CEF3, CVF2, CVF3 e CVF4 apresentam como principal constituinte o flavonoide C-glicosilado vitexina. Já as frações CEF4, CEF5 e CEF6 apresentam maiores proporções do flavonoide acilado tilirosídeo. A fração CVF1 é caracterizada pela grande presença de flavonóis glicosilados derivados de campferol; e a fração CVF5 apresenta majoritariamente a presença de um flavonol glicosilado derivado da isoramnetina, o qual não foi identificado entre as substâncias majoritárias nos extratos brutos. Dessa forma, mesmo sem ocorrer o isolamento por completo dessas substâncias temos, pelo menos, quatro grupos de frações diferenciados pela presença majoritária de um constituinte fenólico.

Figura 1.16: Perfil fenólico das frações obtidas a partir do extrato etanólico de *C. echinocarpus* por fracionamento em coluna de Sephadex. CLAE (detecção a $\lambda = 352\text{nm}$). Picos numerados de acordo com a tabela 1.7. Ir = Isoramnetina.

Figura 1.17: Perfil fenólico das frações obtidas a partir do extrato etanólico de *C. vulnerarius* por fracionamento em coluna de Sephadex. CLAE (detecção a $\lambda = 352\text{nm}$). Picos numerados de acordo com a tabela 1.7. Ir = Isoramnetina.

4. Conclusões

Diferentemente do perfil fitoquímico de outras espécies do gênero e pertencente à mesma seção, *Cyclostigma*, *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* não apresentaram diterpenos. No entanto, alcaloides foram encontrados em *C. echinocarpus*, identificados como coridina e norboldina e presentes no extrato etanólico em abundância relativa considerável (7,5 e 4,8% respectivamente), o que torna essa espécie interessante para bioprospecção.

Neste estudo optou-se pelo uso de dois procedimentos de extração: seriado com polaridade crescente de solventes e maceração em etanol 70%. Os procedimentos resultaram em composição diferenciada entre os extratos obtidos, sendo a extração em etanol 70% mais recomendada para extração e posterior isolamento de alcaloides do tipo aporfínico.

Quanto à análise dos constituintes fenólicos, as espécies se mostraram semelhantes as já estudadas, com a presença marcante de vitexina e tilirosídeo. O procedimento de fracionamento em coluna de Sephadex se mostrou interessante para obter frações distintas em composição e proporção de constituintes. Por conta disso, essas frações são interessantes para uso em ensaios biológicos, sendo possível inferir sobre o efeito da interação entre os diferentes constituintes e suas proporções.

5. Referências bibliográficas

ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L.A.; GARMÓN-LOBATO, S.; GALLO, B.; VICENTE, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216: 5398-5415, 2009.

ABBASSI, E.; NASSIRI-ASL, M.; SHAFEEI, M.; SHEIKHI, M. Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid on pentylentetrazole-induced seizure in rats. *Chemical Biology and Drug Design* 80: 274-278, 2012.

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 196: 67-76, 2012.

ALONSO-CASTRO, A.J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; ORTIZ-TELLO, A.J.; GARCIA-CARRANCA, A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 140 (2): 438-442, 2012.

ANASTASAKI, T.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D.; GAZOULI, M.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp *creticus* and subsp *eriocephalus*), by GC and GC-MS. *Planta Medica* 65: 735-739, 2009

ANISZEWSKI, T. *Alkaloids – Secrets of Life*. 1st Edition. Elsevier, 2007.

ANZENBACHER, P.; ZANGER, U.M. *Metabolism of Drugs and Other*

Xenobiotics. 1st Edition. Wiley-VCH, 2012.

BARAN, P.S.; MAIMONE, T.J.; RICHTER, J.M. Total synthesis of marine natural products without using protecting groups. *Nature* 446: 404-408, 2007.

BOWMAN, J.M.; BRAXTON, M.S.; CHURCHILL, M.A.; HELLIE, J.D.; STARRETT, S.J.; CAUSBY, G.Y.; ELLIS, D.J.; ENSLEY, S.D.; MANESS, S.J.; MEYER, C.D.; SELLERS, J.R.; HUA, Y.; WOOSLEY, R.S.; BUTCHER, D.J. Extraction method for the isolation of terpenes from plant tissue and subsequent determination by gas chromatography. *Microchemical Journal* 56: 10-18, 1997.

CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantification in foods and plants. *Natural Product Research* 25(5): 469-495, 2011.

CSEKE, L.J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.B.; WARBER, S.L.; DUKE, J.A.; BRIELMANN, H.L. *Natural Products from Plants*, 2nd Edition. Taylor & Francis Group, 2006.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometry and ultraviolet photodiode array detection for analyse of flavonoid glycosides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 2341-2348, 2002;

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15, 2004.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2009.

DONG, L.; FAN, Y.; SHAO, X.; CHEN, Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. Food and Chemical Toxicology 29: 3211-3216, 2011.

EMD CHEMICALS. Rona. Special Skin Care with the Power of Nature: Rona Care Bioflavonoids. Disponível em: <http://85.238.144.18/rona/RonaCare%20Bioflavonoids.pdf>. Acessado em 05/05/2013.

FALCÃO-SILVA, V.S.; SILVA, D.A.; SOUZA, M.F.V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* by a Kaempferol Glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). Phytotherapy Research 23: 1367-1370, 2009.

GIANG, P.M.; SON, P.T.; LEE, J.J.; OTSUKA, H. Four ent-kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* Gagnep. Chemical & pharmaceutical bulletin 52: 879–882. 2004.

GUPTA D., BEAKLEY B., GUPTA R.K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. Journal of Ethnopharmacology 115: 361–380, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of today and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine 27: 1-93, 2006.

HERRERA-RUIZ, M.; ROMAN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER. Flavonoids from *Tilia americana* with

anxiolytic activity in plus maze test. *Journal of Ethnopharmacology*, 118: 312-7, 2008.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATANC, M.B. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 57:43-46.

IBRAHIM, R.K. A forty-year journey in plant research: original contributions to flavonoids biochemistry. *Canadian Journal of Botany* 83: 433-450, 2005.

KIM, J.H.; LEE, B.C.; KIM, J.H.; SIM, G.D.; LEE, D.H.; LEE, K.E.; YUN, Y.P.; PYO, H.B. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmate*. *Archives of Pharmacal Research* 28(2): 195-202, 2005.

KOES, R.E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J.N.M. The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution. *BioEssays* 16(2): 123-132, 1994.

KREBS, H.C.; RAMIARANTSOA, H. Clerodanes diterpenos of *Croton hovarum*. *Phytochemistry* 45: 379-381. 1997.

LEE, T.A. A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation. 1st Edition. John Wiley & Sons. 1998.

LENCINA, C.; PIRES, V.S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* BAILL. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11(2): 89-93, 2001.

MARKHAM, K.R. Techniques of Flavonoid Identification. 1st Edition. Academic Press. 1982.

MATOS, L.M.M. Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de mestrado. São Paulo. Instituto de Biociências USP. 2011.

MOTTA, L.B.; FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; CORDEIRO, I.; SALATINO, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21 (6): 972-977, 2011.

MOTTA, L.B.; FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G.; CARVALHO, J.E.; MONTEIRO, P.A.; RUIZ, A.L.T.G.; CARUZO, M.B.; SALATINO, A. Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Bill. (Euphorbiaceae). *Industrial Crops and Products* 50: 661-665, 2013.

NONES, J.; COSTA, A.P.; LEAL, R.B.; GOMES, F.C.A.; TRENTIN, A.G. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell Tissue Research* 350: 305-315, 2012.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidante or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions* 159: 1-17, 2006.

PALMEIRA JÚNIOR, S.F.; ALVES, V.L.; MOURA, F.S.; VIEIRA, L.F.A.; CONSERVA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(3): 397-401, 2006.

PEREIRA, A.S.; AMARAL, A.C.F.; BARNES, R.A.; CARDOSO, J.N.; AQUINO NETO, F.R. 1999. Identification of Isoquinoline alkaloids in crude

extracts by high temperature gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 10:254-258.

PRABHAKAR, M.C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M.A.; KHAN, M.S.Y. Pharmacological investigations on vitexin. *Journal of Medicinal Plant Research* 43: 396-403, 1981.

RAO, Y.K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S.; TZENG, Y. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1770-1776, 2007.

SALA, A.; RECIO, M.C.; SCHINELLA, G.R.; MAÑES, S; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J.L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* 461: 53-61, 2003.

SALATINO, A.; SALATINO M.L.F., NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society* 18: 11-33, 2007.

SAVIETTO, J.P. Análise fitoquímica e atividade antiproliferativa de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de mestrado. São Paulo, Instituto de Biociências USP, 2011.

SAVIETTO, J.P.; FURLAN, C.M.; MOTTA, L.B.; SLATINO, M.L.F.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; SLATINO, A.; SANTOS, D.Y.A.C. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23(4): 662-667, 2013.

SECCO, R.S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M.F.; LIMA, L.R.; MEDEIROS, D.; HAIAD, B.S.; OLIVEIRA, A.S.; CARUZO, M.B.R.; CARNEIRO-TORRES, D.; BIGIO, N.C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae. *Rodriguésia* 63(1): 227-242, 2012.

SILVA, G.C.; PEREIRA, A.C.; REZENDE, B.A.; SILVA, J.F.P.; CRUZ, J.S.; SOUZA, M.F.V.; GOMES, R.A.; TELES, Y.C.F.; CORTES, S.F.; LEMOS, V.S. Mechanism of the antihypertensive and vasorelaxant effects of the flavonoid tiliroside in resistance arteries. *Planta Medica* 79: 1003-1008, 2013.

SPOHR, T.C.L.S.; STIPURSKY, J.; SASAKI, A.C.; BARBOSA, P.R.; MARTINS, V.; BENJAMIN, C.F.; ROQUE, N.F.; COSTA, S.L.; GOMES, F.C.A. Effects of the flavonoids casticin from Brazilian *Croton betulaster* in cerebral cortical progenitors in vitro: direct and indirect action through astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 88 (3): 530-541, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2008.

WILLIAMS, L.; EVANS, P.E.; BOWERS, W.S. 2001. Defensive chemistry of an aposematic bug, *Pachycoris stallii* Uhler and volatile compounds of its host plant *Croton californicus* Muell.Arg. *Journal of Chemical Ecology* 27:203-216.

WITT, A.; BERGMAN, J. Recent developments in the field of quinazoline chemistry. *Current Organic Chemistry* 7(7): 659-677, 2003.

ZHANG, H.; QIU, M.; CHEN, J.; SUN, Y.; WANG, C.; FONG, H.H.S. Plant Terpenes. *Phytochemistry and Pharmacognosy. Encyclopedia of Life Support Systems*, 2002.

**Capítulo I - Perfil Químico de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*
e isolamento de substâncias**

ZUBYK, W.J.; CONNER, A.Z. Analysis of terpenes hydrocarbons and related compounds by gas chromatography. Analytical Chemistry 32(8): 912-917, 1960.

Capítulo II

Avaliação do potencial biológico de
extratos e frações de *C. echinocarpus* e *C.*
vulnerarius

1. Introdução

Os metabólitos secundários são substâncias de grande diversidade estrutural, que são produzidas pelas plantas a partir de moléculas provenientes de seu metabolismo primário. De modo geral, possuem distribuição restrita a um determinado grupo, como uma família, gênero ou até mesmo espécie, e a estes são atribuídas diversas funções ecológicas, que podem ser consideradas fundamentais para a adaptação ao ecossistema, como a atração de seres polinizadores e dispersores, proteção contra herbívoros, patógenos e a fatores de estresse abióticos, como estresse hídrico e radiação UV (Dewick, 2009).

Além dos efeitos que exercem sobre a fisiologia das próprias plantas, algumas destas substâncias são capazes de exercer efeitos sobre outros seres vivos, podendo trazer efeitos benéficos ou terapêuticos provenientes de sua ingestão ou de outra forma de utilização. Por conta disso, os metabólitos secundários de origem vegetal são um alvo importante para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Um exemplo bastante conhecido de moléculas produzidas por plantas que possuem efeito na saúde humana são os flavonoides, substâncias fenólicas amplamente distribuídas, que, na planta, participam da pigmentação de flores e frutos, provêm proteção contra os efeitos da radiação ultravioleta e patógenos, dentre diversas outras funções. Em seres humanos, podem atuar como agentes anti-inflamatórios, hipolipidêmicos e anticâncer (Ibrahim, 2005), e são amplamente reconhecidos pela sua ação antioxidante compondo alguns alimentos funcionais (ou nutracêuticos).

Substâncias que possuem atividade antioxidante são aquelas que, mesmo presentes em quantidades pequenas em comparação ao substrato oxidável, retardam a velocidade do processo de oxidação e são capazes de proteger um sistema biológico de seus efeitos prejudiciais (Karadag et al, 2009).

Os radicais de oxigênio (hidroxila e peroxila) são importantes para o metabolismo do corpo humano, mas sua produção excessiva pode gerar danos a macromoléculas, como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas, desencadeando processos patológicos, como inflamação crônica, diabetes, distúrbios degenerativos e certos tipos de câncer (Karadag et al., 2009).

A ação antioxidante de uma molécula pode se dar por diversos mecanismos, podendo atuar como: (1) barreira física para prevenir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou seu acesso a sítios biológicos importantes (ex.: filtros UV); (2) “armadilha química” absorvendo energia e elétrons, extinguindo ROS (ex.: carotenoides); (3) sistema catalítico que neutraliza ROS (ex.: superóxido dismutase); (4) ligante de íons metálicos para prevenir a formação de ROS (ex.: catequinas) e (5) antioxidantes de quebra de cadeia, que sequestram e destroem ROS (ex.: flavonoides e vitamina C) (Karadag et al., 2009).

Como existem muitos modos distintos de ação, não é possível avaliar de forma precisa a atividade de um antioxidante utilizando-se um único método. Por conta disso, muitas estratégias foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar a ação antioxidante de um determinado extrato ou substância (Liu, 2010).

Uma metodologia bastante utilizada é a de sequestro de radicais DPPH, que é um radical nitrogenado estável, que possui uma coloração púrpura forte e, quando reduzido exibe coloração amarelo claro. A variação na coloração pode ser monitorada pela diminuição na absorbância da amostra em um comprimento de onda entre 515-528 nm. Este método se destina a mensurar a ação de antioxidantes de quebra de cadeia, sendo bastante utilizado para compostos fenólicos em alimentos (Karadag et al., 2009).

Outro método bem conhecido é o ensaio de clareamento do β -caroteno em emulsão de ácido linoleico (LA). Neste procedimento, é feita uma mistura contendo LA, β -caroteno, tween e água, que é emulsionada e o oxigênio dissolvido na água passa a oxidar LA. No entanto, o β -caroteno presente impede tal oxidação, resultando em um clareamento da mistura ($\lambda = 470$ nm) com o passar do tempo (Liu, 2010). Na presença de substâncias com ação antioxidante, o β -caroteno presente na solução é preservado e o clareamento é inibido, de modo que o decaimento na absorbância do tempo inicial para o final é reduzida. Este ensaio permite uma avaliação do efeito protetor de um antioxidante sobre um sistema biológico.

A descoberta de substâncias com ação antioxidante é fundamental para a pesquisa de novos medicamentos para o tratamento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Yang et al., 2011), como é o caso dos males de Parkinson e de Alzheimer, câncer e doenças do coração (Pietta, 2000). Algumas espécies do gênero *Croton* apresentam ação antioxidante já relatada, como *C. celtidifolius* (Nardi et al., 2003), *C. cajucara* (Tieppo et al., 2006) e *C. lechleri* (Lopes et al., 2004), assim como

o óleo volátil de espécies encontradas no nordeste brasileiro: *C. zenthmeri*, *C. nepetaefolius*, *C. argyrophyloides* (De Moraes, 2006) e *C. urucurana* (Simionatto, 2009).

Além da atividade antioxidante, metabólitos secundários vegetais podem possuir outros tipos de ação biológica. Muitas plantas são capazes de produzir substâncias antimicrobianas, que atuam como mecanismo de defesa química contra bactérias, fungos e vírus patogênicos presentes no solo (Gibbons et al., 2008), e por conta disso, são uma fonte potencial para a descoberta de fármacos com ação antibacteriana.

A questão da resistência bacteriana é um problema recorrente no tratamento das doenças causadas por bactérias, uma vez que a utilização contínua de um antibiótico cria uma pressão seletiva favorável ao desenvolvimento de cepas resistentes, o que torna cada vez mais difícil o tratamento de infecções com os antibióticos já existentes. Daí a necessidade de continuar as pesquisas para a prospecção de novos agentes antimicrobianos para uso clínico, preferencialmente drogas que possuam mecanismos de ação distintos daqueles já existentes (Walsh, 2003).

Produtos provenientes de plantas vêm se destacando em estudos com este fim, sendo que cerca de 60% das prescrições médicas de antibióticos são de medicamentos derivados direta ou indiretamente de plantas. Estas são capazes de produzir uma gama muito ampla de compostos químicos, o que as torna uma potencial fonte de moléculas bioativas; além disso, a singularidade das moléculas de origem natural as distingue das moléculas sintetizadas em laboratório, de modo que

possuem modo de ação diferente, o que é favorável ao tratamento para cepas resistentes.

Muitas espécies de *Croton* já foram estudadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. O óleo volátil de *C. cajucara* apresentou atividade contra *Candida albicans* (Alviano, 2005) e uma substância isolada do mesmo óleo, o 7-hidroxicalameno, apresentou atividade contra cepas resistentes à metilina de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *M. smegmatis* (Azevedo et al., 2013). Os extratos foliares hidroalcóolicos de *C. campestris* apresentaram atividade sobre *S. aureus* e *Escherichia coli* e o óleo volátil obtido da casca e do caule de *C. urucurana* mostrou atividade frente a sete bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Simionatto, 2009).

Outra doença de grande importância atualmente é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), que causa mais de 25 milhões de mortes no mundo (Singh & Bodiwala, 2010) e a busca pela sua cura continua sendo um grande desafio para a comunidade científica.

A AIDS é causada pelo vírus HIV (human immunodeficiency virus), que infecta os linfócitos T, se ligando aos receptores CD4. Na célula, o RNA do vírus é transcrito em DNA por ação da enzima transcriptase reversa, que passa a replicar o genoma viral e a produzir suas proteínas (Singh & Bodiwala, 2010).

As drogas utilizadas no tratamento da AIDS são classificadas em dez grupos, dependendo de qual fase da infecção viral elas agem: adsorção vírus-célula, fusão vírus-célula, desencapsulamento, transcrição reversa,

integração, replicação do DNA, transcrição, tradução, brotamento (montagem / liberação) e maturação (Pomerantz & Horn, 2003).

Os tratamentos disponíveis atualmente, apesar de não serem capazes de curar a infecção, tiveram um grande impacto na redução da mortalidade, aumento no tempo e na qualidade de vida dos pacientes. No entanto, eles possuem um custo muito alto, o que dificulta o acesso por parte dos pacientes de países mais pobres, e, além disso, tais tratamentos tem resposta limitada em alguns pacientes e muitos possuem elevada toxicidade (Liu et al., 2005).

Por conta disso, pesquisas com produtos naturais com ação para o tratamento ou cura da AIDS são de grande importância e muitos resultados promissores já foram obtidos através destas pesquisas. Entre as espécies do gênero *Croton*, podemos citar *C. lechleri*, que apresenta efeito paliativo, auxiliando a reduzir o excesso de evacuações e diarreia, comuns neste tipo de paciente (Holodiniy et al., 1999). Outro trabalho, que analisa a ação de ésteres de forbol presentes nas sementes de *C. tiglium* apresenta resultados extremamente promissores, observando que tais moléculas são capazes de inibir os efeitos citopáticos do vírus HIV, evitando a destruição dos linfócitos (El-Mekkawy et al., 2000).

Neste capítulo, foi feita uma investigação em relação ao potencial biológico de *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius* e de suas frações obtidas. Foi analisada a atividade antioxidante das espécies através do teste de redução do radical DPPH e do teste de inibição da degradação do β -caroteno, a atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a atividade inibidora da transcriptase reversa HIV-1.

Uma vez que estas espécies pertencem a mesma seção que *C. urucurana* e *C. macrobothrys*, plantas que apresentam propriedades farmacológicas (Gurgel et al., 2001 e 2005; Motta et al., 2011), elas representam uma potencial fonte de novas substâncias para uso como antioxidantes, antimicrobianos ou anti-HIV.

2. Material e Métodos

a. Obtenção de extratos e frações

Os extratos e frações utilizados no testes de atividade biológica foram obtidos conforme está descrito na seção “Material e Métodos” do capítulo anterior.

b. Avaliação da atividade antioxidante

I. Análise da atividade in vitro de sequestro do radical DPPH

O teste de sequestro de radicais livres seguiu o método descrito por Rufino et al. (2007) com modificações. Os extratos testados foram diluídos em metanol, em concentrações de 250 a 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Foi preparada uma solução metanólica do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrasila (DPPH, Sigma) em concentração de 0,06 mM. Como controle positivo, foi utilizada uma solução metanólica de padrão de quercetina nas concentrações de 2,5 a 250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

O ensaio foi realizado em microplacas do tipo ELISA de 96 poços. A cada poço, foram adicionados 20 μL de cada amostra (A) ou dos padrões (CP) em triplicata e em seguida 200 μL da solução de DPPH. Como branco

das amostras (BA) e dos padrões (BCP) foram utilizados 20 µL de amostra ou padrão e adicionados de 200 µL de metanol. Como controle negativo (CN), 20 µL de metanol e 200 µL de DPPH e como branco do controle negativo (BCN), 220 µL de metanol. Após a adição do DPPH, as amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 20 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em leitor de microplacas de ELISA a 515nm. O sequestro dos radicais livres DPPH pelos extratos foi avaliado por comparação com o controle negativo (DPPH + metanol). Os resultados foram expressos como porcentagem de sequestro do radical livre DPPH (através de seu descoramento) comparado ao controle negativo, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = \{[(\text{AbsCN} - \text{AbsBCN}) - (\text{AbsA} - \text{AbsBA})] / (\text{AbsCN} - \text{AbsBCN})\} \times 100$$

Onde: Abs. CN = absorbância do controle negativo; Abs. BCN = absorbância do branco do controle negativo; Abs. A = absorbância da amostra; AbsBA = absorbância do branco da amostra.

II. Análise da atividade in vitro de oxidação do β-caroteno

O ensaio de oxidação do β-caroteno foi realizado de acordo com uma adaptação do método descrito por Duarte-Almeida e colaboradores (2006). Foi preparada uma solução de β-caroteno em diclorometano na concentração de 2 mg.mL⁻¹. A mesma foi utilizada para o preparo de uma solução reativa de β-caroteno/ácido linoleico, contendo 21 µL de ácido linoleico, 84 µL de tween 40 e 210 µL da solução de β-caroteno 2 mg.mL⁻¹. O solvente foi evaporado em nitrogênio líquido, e em seguida foram adicionados 25 mL de água ultrapura, previamente saturada com oxigênio. A solução foi agitada vigorosamente e sua absorbância foi ajustada para um valor entre 0,6 e 0,7 a 450 nm.

As concentrações das amostras e padrão utilizadas no teste foram as mesmas descritas para o item 2a, e cada amostra foi testada em triplicata.

Em microplaca do tipo ELISA de 96 poços foram adicionados 10 µL de amostra (A) e 250 µL da solução reativa de β-caroteno/ácido linoleico e como branco das amostras (BA) foram utilizados 10 µL de amostra acrescidos de 250 µL de água ultrapura. Para o controle negativo foram utilizados 10 µL de metanol e 250 µL da solução reativa e como branco do controle negativo (BCN) foram utilizados 10 µL de metanol e 250 µL de água ultrapura. Para o controle positivo (CP) foram utilizados 10 µL da solução padrão de quercetina e 250 µL de solução reativa e como branco do controle positivo (BCP), 10 µL da solução padrão e 250 µL de água ultrapura.

As placas foram lidas em 450 nm imediatamente e a cada 15 minutos, por duas horas e a porcentagem de inibição da oxidação do β-caroteno foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inib. da ox. do } \beta\text{-caroteno} = [(AbsCN - AbsBCN) - (AbsA - AbsBA) / (AbsCN - AbsBCN)] \times 100$$

Onde: Abs. CN = absorbância do controle negativo; Abs. BCN = absorbância do branco do controle negativo; Abs. A = absorbância da amostra; AbsBA = absorbância do branco da amostra.

III. Quantificação de fenóis totais

Os extratos e frações foram analisados em relação à quantidade de substâncias fenólicas utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Uma

alíquota de 100 µL das amostras foi adicionada a 150 µL de Folin – Ciocalteu (previamente diluído em água 0,667: 9,333 48 v/v) e 50 µL de carbonato de sódio 10%. Após 60 minutos em temperatura ambiente a absorbância foi medida a 760 nm. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em mg.g-1 de extrato equivalentes a ácido gálico utilizando a equação baseada na curva de calibração do ácido gálico (1 a 40 µg.mL⁻¹).

c. Ensaio de quantificação de atividade antimicrobiana

Para verificação de atividade antimicrobiana utilizamos a metodologia estabelecida pelo Clinical and Laboratorial Standards Institute, com adaptações. Foram utilizadas cepas reconhecidas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14), *Eschericia coli* (MG1655) e *Bacilus subtilis* (PY79), armazenadas a -80°C em glicerol, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Regina Baldini (IQ-USP).

Um pré-inóculo foi feito espalhando a bactéria em placa de petri contendo meio LB sólido, preparado conforme indicado no anexo deste trabalho, que foi mantida a 37°C por 16h. Em seguida, foi feito o inóculo raspando uma colônia da placa e colocando em tubo do tipo falcon contendo 5 mL de meio LB líquido e incubado em estufa a 37°C sob agitação por mais 16h.

Após este período, o inóculo foi diluído em meio LB até atingir a absorbância de 0,001 nm a 595 nm, o que representa uma diluição de 1x10⁶ células.mL⁻¹ na escala de McFarland. Um volume de 140 µL do meio LB contendo a bactéria diluída foi adicionado em cada poço de uma microplaca do tipo ELISA, e em seguida foram adicionados 10 µL de

extrato vegetal com a concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ previamente solubilizado em etanol. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação (120 rpm) por 20 horas. Cada amostra foi testada em triplicata.

Foram utilizados dois controles diferentes, sendo eles: o branco controle (B) contendo $10 \mu\text{L}$ de etanol no lugar da amostra, em meio de cultura sem a bactéria; controle negativo (CN) – contendo $10 \mu\text{L}$ de etanol no lugar da amostra, em meio de cultura com a bactéria. Como controle positivo (CP) utilizou-se ampicilina. Os cálculos de atividade de inibição do crescimento bacteriano foram realizados a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ de inib. Do crescimento} = [(AbsCN - AbsA) / AbsC] \times 100$$

Onde: Abs. CN = absorbância do controle negativo; Abs. A = absorbância da amostra;

d. Ensaio de quantificação do efeito inibidor da transcriptase reversa HIV-1

A atividade inibitória da TR HIV-1 foi avaliada utilizando o kit Reverse transcriptase assay, colorimetric para ELISA (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, com a colaboração da pesquisadora Dra. Lucimar Barbosa da Motta.

Os extratos e frações foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), e sua atividade foi testada nas concentrações de 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As amostras ($20 \mu\text{L}$) foram inicialmente incubadas em microtubos por uma hora a 37°C , juntamente com $1 \mu\text{L}$ da enzima transcriptase

reversa, 19 µL do tampão de lise (Tris 50 mM, cloreto de potássio 80 mM, DTT 2,5 mM, EDTA 0,75 mM e 0,5% de Triton X-100, pH 7,8) e 20 µL da solução de oligos + polyA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8; com DIG-dUTP, biotina-dUTP e dTTP + modelo/iniciador híbrido poli (A) oligo (dT)₁₅ (9 A₂₆₀ nm.mL⁻¹)).

Após este período a reação (60 µL) foi transferida para a placa de 96 poços, recoberta com streptavidina, seguindo nova incubação a 37°C por uma hora. Em seguida a placa foi lavada por quatro vezes com o tampão de lavagem. Após a lavagem e retirada total do tampão de lavagem foram adicionados 198 µL do tampão de incubação (pH 7,8, tampão Tris 50 mM, contendo cloreto de potássio 319 mM, cloreto de magnésio 33 mM e DTT 11 mM) + 2 µL da solução de anticorpo anti-digoxigenina-peroxidase (Anti-DIG-POD).

Após esse período, a placa foi novamente lavada por cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem, retirando-se ao final todo o tampão. A seguir foram adicionados 200 µL de ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) dissolvido em tampão apropriado (tampão de perborato de sódio e ácido cítrico/fosfato), seguindo nova incubação a 25°C por 10 a 30 min. Ao final a absorbância foi lida a 405 e 490 nm em leitor de microplacas de ELISA.

Foram utilizados três controles diferentes, sendo eles: o branco controle (B) contendo 20 µL de DMSO 10% em água DEPC no lugar da amostra, sem a transcriptase reversa; controle negativo (CN) – contendo 20 µL de DMSO 10% em água DEPC no lugar da amostra, com a transcriptase reversa; controle positivo (CP) – contendo 20 µL de foscarnet

no lugar da amostra. Os cálculos de atividade anti-HIV foram realizados a partir da seguinte equação (Woradulayapinij et al., 2005):

$$\% \text{ Inibição} = [(Abs. CN - AbsB) - (Abs. A - Abs. B)] / [AbsCN - AbsB]$$

Onde: Abs. = absorbância lida a 405 nm subtraindo-se a absorbância lida em 490 nm, AbsA = absorbância resultante da amostra; Abs. B = absorbância resultante do branco e Abs. CN = absorbância resultante do controle negativo

e. Análises estatísticas

Os valores obtidos em porcentagem foram utilizados em análises multivariadas utilizando o método da PCA (Análise do Componente Principal). Para essa análise foram utilizados os resultados de atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV, juntamente com os resultados de composição química a fim de se observar como tais variáveis estão correlacionadas. Os resultados foram catalogados por espécie e por polaridade do solvente utilizado.

3. Resultados e Discussão

a. Avaliação da atividade antioxidante de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

Os extratos e frações obtidos conforme os procedimentos descritos no capítulo I foram testados quanto a sua capacidade antioxidante. Os resultados dos testes estão expressos na tabela 2.1.

Além dos testes de ação antioxidante, uma quantificação de fenóis totais foi realizada, conforme descrito na seção 2.b.III deste capítulo com o intuito de estabelecer relações entre atividade e composição química dos extratos.

Conforme o esperado, os extratos obtidos com solventes de maior polaridade (água, metanol, etanol e acetato de etila) possuem um teor de fenóis totais maior do que aqueles obtidos com solventes mais apolares (hexano e diclorometano), já que substâncias fenólicas possuem caráter polar (Corradini *et al.*, 2011).

De maneira geral, foi observado que os extratos foliares de *C. echinocarpus* possuem maior atividade antioxidante do que os de *C. vulnerarius* em ambos os testes, enquanto que para os extratos caulinares é observado o oposto: os extratos de *C. vulnerarius* apresentam maior ação antioxidante do que *C. echinocarpus*. Apenas os extratos aquosos não apresentaram tal resultado.

Tabela 2.1: Teor de substâncias fenólicas (%) e atividade antioxidante (%) dos extratos de *Croton echinocarpus* (Ce) e *Croton vulnerarius* (Cv) pelos métodos do sequestro de DPPH e degradação do β -caroteno. Todos os extratos, foliares e caulinares, foram testado na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O flavonoide quercetina foi utilizado como controle positivo; (média $\pm$ desvios padrão).

Caules	Fenol Total		DPPH		β -caroteno	
	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv
Hexano	0,42 $\pm$ 0,22	4,66 $\pm$ 0,24	4,06 $\pm$ 2,46	29,44 $\pm$ 2,20	0,00 $\pm$ 1,54	38,89 $\pm$ 3,41
Diclorometano	6,61 $\pm$ 0,74	10,62 $\pm$ 0,59	28,43 $\pm$ 1,52	40,61 $\pm$ 1,32	49,79 $\pm$ 2,87	64,20 $\pm$ 1,83
Acetato de etila	21,26 $\pm$ 0,30	18,94 $\pm$ 1,46	50,51 $\pm$ 1,59	73,6 $\pm$ 2,33	51,23 $\pm$ 3,31	69,96 $\pm$ 3,90
Metanol	35,70 $\pm$ 3,54	20,08 $\pm$ 1,10	80,96 $\pm$ 0,44	85,53 $\pm$ 0,01	55,14 $\pm$ 1,98	71,60 $\pm$ 2,48
Aquoso	6,08 $\pm$ 0,46	0,53 $\pm$ 0,29	50,00 $\pm$ 0,44	37,06 $\pm$ 1,92	34,57 $\pm$ 2,57	33,74 $\pm$ 3,49
Etanol	38,72 $\pm$ 4,03	20,22 $\pm$ 0,89	83,50 $\pm$ 0,43	48,48 $\pm$ 3,08	82,72 $\pm$ 2,49	64,20 $\pm$ 1,49
Folhas	Fenol Total		DPPH		β -caroteno	
	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv
Hexano	0,73 $\pm$ 0,17	0,89 $\pm$ 0,49	15,29 $\pm$ 2,33	5,67 $\pm$ 3,18	71,60 $\pm$ 2,17	16,46 $\pm$ 1,70
Diclorometano	7,95 $\pm$ 0,44	4,66 $\pm$ 0,40	28,43 $\pm$ 1,52	15,48 $\pm$ 1,16	62,14 $\pm$ 3,22	39,09 $\pm$ 3,56
Acetato de etila	21,70 $\pm$ 0,12	4,63 $\pm$ 1,18	69,04 $\pm$ 7,26	15,22 $\pm$ 1,52	63,37 $\pm$ 3,46	38,68 $\pm$ 4,82
Metanol	21,17 $\pm$ 0,22	4,24 $\pm$ 1,03	46,70 $\pm$ 3,32	15,99 $\pm$ 2,01	69,96 $\pm$ 0,76	40,33 $\pm$ 1,85
Aquoso	18,80 $\pm$ 2,50	21,73 $\pm$ 1,55	47,21 $\pm$ 1,59	28,17 $\pm$ 2,01	4,41 $\pm$ 2,03	65,31 $\pm$ 4,26
Etanol	25,61 $\pm$ 0,47	18,52 $\pm$ 2,79	84,77 $\pm$ 0,44	38,58 $\pm$ 2,28	62,55 $\pm$ 0,71	64,2 $\pm$ 1,49
Quercetina			95,94 $\pm$ 0,83	95,94 $\pm$ 0,83	93,29 $\pm$ 1,94	93,29 $\pm$ 1,94

Se compararmos as quantidades de substâncias fenólicas nos extratos caulinares mais apolares, é nítida a diferença entre as espécies, tendo *C. echinocarpus* 0,46% e *C. vulnerarius* 4,46% de substâncias fenólicas totais no extrato hexânico, e 6,61% e 10,62 % no extrato de diclorometano. Dessa forma, os extratos caulinares mais apolares de *C. vulnerarius* também apresentam teores de substâncias fenólicas e, conseqüentemente, atividade antioxidante pelos métodos utilizados.

As frações obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex a partir do extrato etanólico também foram testadas, exceto as frações de *C. echinocarpus* CEF4 e CEF5 (tabela 2.2), que foram obtidas em quantidades mais reduzidas e outros testes de ação biológica realizados neste projeto foram priorizados (atividade anti-HIV e antimicrobiano).

Tabela 2.2: Porcentagens relativas (%) dos constituintes fenólicos obtidos por CLAE das sub-frações do extrato etanólico de *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius*. Todos as frações foram injetadas na concentração de 2 mg.mL⁻¹. D. = derivado da aglicona proposta.

	Fração	Fenilprop.	D. Quercetina	D. Campferol	Vitexina	Tilirosídeo	D. Isoramnetina
<i>C. echinocarpus</i>	A (CEF1)	28,04	24,62	0,00	29,58	0,00	0,00
	B (CEF2)	9,02	13,19	4,77	64,33	2,25	0,00
	C (CEF3)	0,00	3,81	5,47	77,90	1,86	1,50
	D (CEF4)	0,00	0,00	0,62	5,31	57,36	4,11
	E (CEF5)	0,00	0,00	0,00	0,00	65,95	29,23
	F (CEF6)	0,00	0,00	0,00	0,00	95,68	0,00
<i>C. vulnerarius</i>	A (CVF1)	24,92	15,12	59,96	0,00	0,00	0,00
	B (CVF2)	1,82	10,39	7,81	57,98	1,34	0,00
	C (CVF3)	2,94	0,00	0,00	62,42	8,52	0,00
	D (CVF4)	12,38	0,00	0,00	38,49	18,84	12,16
	E (CVF5)	25,80	0,00	0,00	0,00	15,97	58,23

No teste do DPPH, as frações de *C. echinocarpus* apresentaram menor atividade do que a apresentada pelo extrato etanólico bruto, mas para o teste do β -caroteno o resultado foi o inverso, exceto para a amostra CEF3. Para *C. vulnerarius*, em ambos os testes as frações apresentaram maior ação quando comparadas ao extrato bruto, exceto CVF3 no teste do DPPH e CVF5 no teste do β -caroteno (tabela 2.3).

O fato de algumas frações terem apresentado maiores atividades antioxidante do que o extrato bruto (por ex. para *C. vulnerarius*) pode ser devido ao fato de as frações estarem mais purificadas e possuírem algumas substâncias em maiores proporções e/ou isoladas. Para estas frações, as substâncias isoladas seriam as responsáveis pela ação antioxidante. Já as frações que apresentaram menor atividade quando comparadas ao extrato bruto, o resultado poderia indicar a importância de interação entre as substâncias presentes no extrato ou a não atividade da substância isolada. Para *C. echinocarpus* o que parece acontecer é um sinergismo entre as diferentes substâncias que compõem o extrato bruto que, quando isoladas, tem ação reduzida.

Como exposto no capítulo I, com exceção à fração CEF6 que apresentou 95% do constituinte tilirosídeo, as sub-frações do extrato etanólico não apresentaram um completo isolamento de substâncias fenólicas. Entretanto, as frações podem ser diferenciadas de acordo com a proporção em que os constituintes aparecem. As frações CEF2, CEF3, CVF2, CVF3 e CVF4 apresentam como principal constituinte a vitexina. Já as frações CEF4, CEF5 e CEF6 apresentam maiores proporções de tilirosídeo. A fração CVF1 é caracterizada pela grande presença de flavonóis glicosilados derivados de campferol; e a fração CVF5 apresenta

majoritariamente a presença de um flavonol glicosilado derivado da isoramnetina. Dessa forma, mesmo sem ocorrer o isolamento por completo dessas substâncias temos, pelo menos, quatro grupos de frações diferenciados pela presença majoritária de um constituinte fenólico.

Para as frações também se realizou o ensaio de atividade antioxidante. Os resultados estão apresentados na tabela 2.3. A fração CEF6, que apresenta o flavonol tilirosídeo isolado, foi a que apresentou o maior teor de substâncias fenólicas. As frações obtidas a partir de *C. echinocarpus* parecem apresentar maiores teores de substâncias fenólicas se comparadas com as frações obtidas de *C. vulnerarius*, embora nenhum teste estatístico tenha sido aplicado.

Tabela 2.3: Teor de fenóis totais (%) e atividade antioxidante (%) de frações obtidas a partir do extrato etanólico de *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius* pelos métodos do sequestro de DPPH e degradação do β -caroteno. Todas as frações foram testadas na concentração de 250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. O flavonoide quercetina foi utilizado como controle positivo; (média $\pm$ desvios padrão).

	Fração	Fenóis Totais	DPPH	β-caroteno
<i>C. echinocarpus</i>	CEF1	35,54 $\pm$ 1,14	75,89 $\pm$ 1,52	66,05 $\pm$ 3,04
	CEF2	49,32 $\pm$ 1,74	79,70 $\pm$ 0,76	71,60 $\pm$ 1,26
	CEF3	30,66 $\pm$ 2,37	74,62 $\pm$ 1,39	60,91 $\pm$ 3,09
	CEF6	69,76 $\pm$ 1,91	83,50 $\pm$ 1,16	83,95 $\pm$ 4,27
<i>C. vulnerarius</i>	CVF1	32,13 $\pm$ 2,04	59,40 $\pm$ 1,32	72,02 $\pm$ 2,53
	CVF2	26,14 $\pm$ 2,16	47,71 $\pm$ 5,61	58,85 $\pm$ 3,23
	CVF3	15,73 $\pm$ 0,68	33,76 $\pm$ 1,91	59,26 $\pm$ 1,70
	CVF4	26,00 $\pm$ 4,48	57,36 $\pm$ 4,19	69,55 $\pm$ 0,98
	CVF5	22,87 $\pm$ 2,10	52,54 $\pm$ 1,64	55,55 $\pm$ 2,82
	Quercetina	-	95,94 $\pm$ 0,83	93,29 $\pm$ 1,94

A fim de melhor correlacionar o efeito da composição química na atividade antioxidante medida pelos dois sistemas (DPPH e β -caroteno), foi realizada uma análise multivariada pelo método de análise do componente principal (PCA). A matriz de covariância utilizada continha os teores em porcentagem de fenóis totais, das atividades antioxidantes e as porcentagens relativas das substâncias detectadas via CLAE e descritas no capítulo I.

Na figura 2.1 podemos observar que a análise PCA pode explicar 65% da variabilidade existente nos dados, já nos dois primeiros eixos. Podemos notar, ainda, a representação espacial dos diferentes extratos e frações de acordo com sua composição química e potencial antioxidante. O eixo 1 apresenta grande correlação com as variáveis de atividade antioxidante (DPPH e β -caroteno), o teor de substâncias fenólicas totais e a presença majoritária de vitexina e tilirosídeo. Isso significa que as amostras posicionadas ao lado positivo do eixo 1 (à direita), apresentam maior atividade antioxidante e maiores teores de substâncias fenólicas, vitexina e/ou tilirosídeo. Nesse lado do eixo 1 estão posicionados os extratos de maior polaridade (etanol, metanol – em azul; acetato de etila – em verde) que são os que contem maiores quantidades de substâncias fenólicas. No lado negativo do eixo 1 estão posicionados os extratos de menor polaridade (hexano e diclorometano) e consequentemente, com menor conteúdo de substâncias fenólicas. Por essa análise, poderíamos dizer que a atividade antioxidante medida pelo sistema DPPH e β -caroteno é fortemente influenciada pelo teor de substâncias fenólicas presente nos extratos e frações, resultado frequentemente relatado na literatura (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Capítulo II – Avaliação do potencial biológico de extratos e frações de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

A

B.

Variáveis	Eixo01	Eixo02
Fenol	0,3868	0,2090
DPPH	0,6670	0,2420
β-Caroteno	0,4674	0,1282
Tiliosideo	0,1442	0,3473
Vitexina	0,3964	-0,8489
Isoramnetina	-0,0217	0,0772
Fenilpropanoide	-0,0622	0,1795
Derivados de Campferol	-0,0520	0,0265
Quercetina	0,0461	-0,0336

C.

PC	% de Variância	% de Variância acumulada	% de Variância esperada
1	44,98	44,98	31,43
2	20,79	65,77	20,32
3	11,35	77,12	14,76
4	7,91	85,02	11,06
5	6,70	91,73	8,06

Figura 2.1: A. Análise de componente principal de 9 variáveis relacionadas a composição e atividade antioxidante dos extratos e frações de *Croton echinocarpus* (●) e *Croton vulnerarius* (■). Extratos e frações: metanol e etanol (azul); acetato de etila (verde); diclorometano (marrom); hexano (vermelho); e água (amarelo). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os dois vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Na figura 2.2 podemos observar a PCA utilizando os resultados dos testes antioxidantes obtidos apenas para as frações. Nesta análise fica mais claro verificar que a atividade antioxidante das frações é fortemente influenciada por maiores proporções do flavonol tilirosídeo. Amostras posicionadas a direita do eixo 1 apresentam maior atividade antioxidante e maiores porcentagens relativas de tilirosídeo. Maiores porcentagens relativas de vitexina aparecem relacionadas negativamente com o eixo 1 e, por isso, pouco relacionadas à atividade das frações.

Algumas substâncias, como os triterpenos presentes no extrato foliar hexânico também podem apresentar ação antioxidante, pois atuam como substrato para ROS, protegendo a membrana celular. Este tipo de ação é detectada pelo teste do β -caroteno, e este pode ser o motivo de alguns extratos com uma quantidade relativamente baixa de fenóis apresentarem ação antioxidante (Karadag *et al.*, 2009).

b. Análise da ação antimicrobiana de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

Em relação aos testes de ação antibacteriana, os resultados estão apresentados nas tabelas 2.4 e 2.5. Entre as três espécies de bactérias utilizadas, ambas as espécies vegetais apresentaram melhores resultados de inibição de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto que para *Bacillus subtilis* a maioria dos extratos e frações não apresentou efeito inibitório no crescimento.

Capítulo II – Avaliação do potencial biológico de extratos e frações de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

Figura 2.2: Análise de componente principal de 9 variáveis relacionadas a composição e atividade antioxidante das frações de *Croton echinocarpus* (●) e *Croton vulnerarius* (■). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os dois vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Observando os resultados para inibição de *B. subtilis*, os extratos mais polares do caule de *C. vulnerarius* apresentaram, apesar de baixa, pequena atividade inibidora de crescimento. Esses extratos, metanólicos e etanólicos de caules foram também os que apresentaram maiores conteúdos de substâncias fenólicas para essa espécie. Novamente, a composição fenólica dos extratos parece influenciar no potencial antimicrobiano apresentado pelos extratos.

Analisando-se a atividade antimicrobiana das frações (tabela 2.5) se observa a mesma tendência de inibição de crescimento de *P. aeruginosa* e *E. coli* e nenhuma atividade em relação a *B. subtilis*.

Na maioria dos estudos realizados sobre a ação antimicrobiana de plantas, tal ação é relacionada com a presença de substâncias fenólicas (Özçelik *et al.*, 2011). Neste estudo, porém, observamos que mesmo algumas extratos com baixo teor de fenóis, como os extratos de hexano e diclorometano caulinares de *C. echinocarpus* e os de hexano e diclorometano foliares e caulinares de *C. vulnerarius*, também apresentaram grande atividade contra *P. aeruginosa*.

Além disso, as frações contendo preferencialmente flavonoides (tabela 2.2) também apresentaram ação contra *P. aeruginosa*, mas esta não foi, aparentemente, significativamente superior a dos extratos brutos de metanol e etanol, indicando, novamente, que possivelmente há a presença de mais de uma substância ativa nestes extratos, que atuam de maneira sinérgica.

Tabela 2.4: Atividade antibacteriana dos extratos de *Croton echinocarpus* (Ce) e *Croton vulnerarius* (Cv) sobre *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os extratos foram testados na concentração de 100 µg.mL-1. O antibiótico ampicilina foi utilizado como controle positivo; (média ± desvios padrão); s.a = sem atividade.

Caules	<i>B. Subtilis</i>		<i>E. Coli</i>		<i>P. Aeruginosa</i>	
	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv
Hexano	s.a	s.a	24,03 ± 0,92	30,96 ± 2,39	90,74 ± 0,50	96,32 ± 2,90
Diclorometano	s.a	s.a	s.a	s.a	82,73 ± 10,52	96,37 ± 1,93
Acetato de etila	s.a	s.a	21,08 ± 1,59	34,85 ± 2,92	94,42 ± 0,61	96,20 ± 1,32
Metanol	s.a	3,18 ± 4,54	28,21 ± 1,24	39,03 ± 5,68	94,30 ± 0,61	98,14 ± 1,05
Aquoso	5,43 ± 3,61	13,30 ± 10,96	29,63 ± 2,72	29,43 ± 3,05	95,50 ± 0,54	97,19 ± 0,19
Etanol	s.a	39,60 ± 6,36	26,78 ± 3,36	26,78 ± 3,36	92,98 ± 7,50	95,66 ± 0,99
Folhas	<i>B. Subtilis</i>		<i>E. Coli</i>		<i>P. Aeruginosa</i>	
	Ce	Cv	Ce	Cv	Ce	Cv
Hexano	s.a	s.a	24,22 ± 5,69	32,38 ± 2,39	67,24 ± 10,23	92,81 ± 2,79
Diclorometano	s.a	s.a	s.a	s.a	43,58 ± 2,15	95,87 ± 1,26
Acetato de etila	s.a	s.a	0,85 ± 4,20	20,32 ± 3,2	87,87 ± 1,43	94,8 ± 0,29
Metanol	s.a	s.a	s.a	s.a	81,87 ± 4,90	93,10 ± 4,09
Aquoso	s.a	s.a	16,52 ± 4,45	26,21 ± 6,84	27,96 ± 3,41	48,45 ± 4,34
Etanol	s.a	s.a	29,78 ± 2,72	29,44 ± 4,54	93,68 ± 0,76	97,19 ± 0,19
Ampicilina	98,88 ± 1,12	98,88 ± 1,12	94,48 ± 1,00	94,48 ± 1,00	97,65 ± 0,82	97,65 ± 0,82

Tabela 2.5: Atividade antibacteriana de frações obtidas a partir do extrato etanólico de *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius* sobre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as frações foram testadas na concentração de 100 µg.mL⁻¹. O antibiótico ampicilina foi utilizado como controle positivo; (média ± desvios padrão); s.a – sem atividade.

	Fração	% Inibição do crescimento bacteriano		
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>C. echinocarpus</i>	CEF1	s.a	30,86 ± 3,85	96,78 ± 0,31
	CEF2	s.a	18,14 ± 2,91	94,92 ± 1,21
	CEF3	s.a	37,80 ± 4,44	93,89 ± 1,47
	CEF4	s.a	25,55 ± 2,97	94,59 ± 0,59
	CEF5	s.a	14,25 ± 1,87	92,77 ± 2,20
	CEF6	s.a	24,69 ± 1,28	78,93 ± 5,36
	Coridina	s.a	15,00 ± 4,85	77,36 ± 6,44
<i>C. vulnerarius</i>	CVF1	s.a	13,39 ± 3,35	78,07 ± 5,43
	CVF2	s.a	32,67 ± 8,72	67,08 ± 15,28
	CVF3	s.a	33,62 ± 4,59	90,13 ± 1,14
	CVF4	s.a	21,18 ± 9,47	75,96 ± 4,25
	CVF5	s.a	26,40 ± 5,70	67,7 ± 0,19
Ampicilina		98,88 ± 1,12	94,48 ± 1,00	97,65 ± 0,82

Diferentemente da atividade antioxidante, a atividade antimicrobiana parece estar relacionada a presença majoritária da flavona vitexina. Na figura 2.3 está sumarizado o resultado obtido pela análise PCA para a atividade antimicrobiana e composição fenólica dos extratos e frações. Pode ser observada a distribuição espacial dos extratos e frações com o posicionamento de extratos mais polares (em azul) no lado esquerdo do eixo 1, com forte relação entre a atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* e *E. coli* e a presença de vitexina. O mesmo pode ser observado quando a análise é realizada utilizando somente as frações obtidas a partir do extrato etanólico (Figura 2.4).

Capítulo II – Avaliação do potencial biológico de extratos e frações de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

Figura 2.3: A. Análise de componente principal de 9 variáveis relacionadas a composição e atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *Croton echinocarpus* (●) e *Croton vulnerarius* (■). Extratos e frações: metanol e etanol (azul); acetato de etila (verde); diclorometano (marrom); hexano (vermelho); e água (amarelo). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os dois vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

A.

B.

Variáveis	Eixo01	Eixo02
Fenol	0,2669	0,2689
<i>P. aeruginosa</i>	-0,1324	0,0825
<i>E. coli</i>	-0,0838	0,1120
Tiliosideo	0,6492	0,5416
Vitexina	-0,6726	0,4918
Isoramnetina	0,1488	-0,2851
Fenilpropanoide	0,0616	-0,3284
Derivados de Camferol	0,0372	-0,4156
Quercetina	-0,0550	-0,1065

C.

PC	% de Variância	% de Variância acumulada	% de Variância esperada
1	46,77	46,77	31,43
2	25,84	72,62	20,32
3	14,33	86,94	14,76
4	5,74	92,68	11,06
5	3,37	96,06	8,28

Figura 2.4: Análise de componente principal de 8 variáveis relacionadas a composição e atividade antimicrobiana das frações de *Croton echinocarpus* (●) e *Croton vulnerarius* (■). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os dois vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Em um estudo realizado por Falcão-Silva e colaboradores em 2009, foi mostrado que o tilirosídeo reduz a resistência microbiana a certos antibióticos, ou seja, é capaz de aumentar a eficácia destes, entretanto não mostrou ação antimicrobiana significativa quando utilizado isoladamente, resultado também observado no presente estudo.

As bactérias utilizadas neste estudo diferem em relação a composição de sua parede celular. *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva, que possui parede formada majoritariamente por peptidoglicanos enquanto que *P. aeruginosa* e *E. coli* são bactérias Gram-negativas, ou seja, possuem uma membrana exterior a parede celular de peptidoglicanos, formada por uma dupla camada de lipopolissacarídeos (LPS) (Trabulsi, 2004).

Teoricamente, bactérias Gram-negativas são mais resistentes a alguns tipos de antibióticos, já que possuem uma barreira hidrofóbica adicional que as tornam menos permeáveis. Porém, a membrana externa não bloqueia completamente a entrada de substâncias na célula, graças a presença de porinas, que permitem a entrada de algumas moléculas, conferindo a parede celular destas bactérias permeabilidade seletiva. A passagem de substâncias pelas porinas, no entanto, ocorre de forma inespecífica, já que é regulada apenas pelo tamanho da molécula (Trabulsi, 2004).

Apesar de as bactérias Gram-negativas estarem menos sujeitas a ação de substâncias presentes no meio externo, estudos indicam que os flavonoides, de modo geral, apresentam atividade antimicrobiana maior sobre bactérias Gram-negativas do que sobre as Gram-positivas (Basile *et al.* 1999), o que justifica os resultados superiores obtidos para *P.*

aeruginosa e *E. coli*. Além disso, uma revisão realizada por Bylka e colaboradores (2004) sugere que as flavonas exercem maior efeito sobre Gram negativas, e como pudemos inferir através da análise de PCA, a atividade antioxidante destas espécies está correlacionada justamente a presença da flavona vitexina.

Como as espécies de *Croton* estudadas neste trabalho apresentaram grande atividade contra *P. aeruginosa* em uma concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de seus extratos e frações, é interessante que sejam realizados testes mais específicos com os extratos mais ativos, a fim de se determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e avaliar se tais espécies possuem efetivamente potencial para serem utilizadas medicinalmente. Em estudos sobre a atividade antimicrobiana de produtos naturais, compostos com MIC abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados notáveis e aqueles com MIC abaixo de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados muito promissores (Cushnie & Lamb, 2011).

Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo ubíquo: pode ser encontrado no solo, na água, nos vegetais, nos animais e em ambientes hospitalares. É considerado um patógeno oportunista, já que raramente causa infecção em um indivíduo imunocompetente, mas sim em indivíduos com defesas diminuídas, sendo um dos principais agentes causadores de infecção hospitalar (Trabulsi, 2004). Em comparação com outras espécies patogênicas, *P. aeruginosa* é muito difícil de ser erradicada pois apresenta uma alta capacidade de resistência a uma ampla variedade de antibióticos, o que se deve em grande parte por conta da baixa permeabilidade de sua membrana externa (Breidenstein *et al.*, 2011).

Na maioria dos estudos realizados sobre a ação antimicrobiana de plantas, tal ação é relacionada com a presença de substâncias fenólicas (Özçelik *et al.*, 2011). Neste estudo, porém, observamos que mesmo algumas frações com baixo teor de fenóis, como os extratos de hexano e diclorometano caulinares de *C. echinocarpus* e os de hexano e diclorometano foliares e caulinares de *C. vulnerarius*, também apresentaram grande atividade contra *P. aeruginosa*.

Além disso, as frações contendo preferencialmente flavonoides (tabela 2.2) também apresentaram ação contra *P. aeruginosa*, mas esta não foi significativamente superior a dos extratos brutos de metanol e etanol, indicando, novamente, que possivelmente há a presença de mais de uma substância ativa nestes extratos, que atuam de maneira sinérgica.

c. Análise da ação anti HIV de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

Apenas alguns dos extratos e frações obtidos foram utilizados no teste de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa HIV-1. Estes foram escolhidos por sua composição química, exceto os aquosos, que foram selecionados pois os extratos aquosos de outras espécies de *Croton* apresentaram bons resultados em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Fitoquímica da USP (dados não publicados). Diferentemente dos outros testes realizados neste projeto, as amostras não foram testadas em triplicata por se tratar de um teste de alto custo.

Um grande número de compostos de origem natural já foi investigado a respeito de sua ação anti-HIV e quanto à possibilidade real

de sua utilização como medicamento. Todavia, a descoberta de novas substâncias, com novos mecanismos de ação e menor toxicidade permanece sendo de grande interesse.

Neste trabalho, muitos extratos apresentaram atividade inibitória da ação da enzima transcriptase reversa, que é uma enzima crucial para a replicação do vírus e, conseqüentemente, instalação da infecção (tabela 1.7).

A mesma análise de componentes principais foi realizada com a atividade inibitória da transcriptase reversa (figura 2.5) e a composição química dos extratos e frações. A análise revelou que a presença majoritária do flavonol tilirosídeo parece influenciar na atividade do extrato ou fração, podendo esta ser a substância ativa dos extratos para esse bioensaio.

O efeito antiviral de derivados de flavonoides já foi reportado para o vírus da herpes, da raiva, rotavírus, coronavírus, citomegalovírus, entre outros (Özçelik *et al.*, 2011), e muitos estudos já apresentaram substâncias fenólicas com atividade anti-HIV como inibidores da atividade da transcriptase reversa. No entanto, estudos correlacionando a estrutura dos flavonoides com sua atividade indicam que eles também são capazes de inativar outras polimerases, incluindo a DNA polimerase o que impossibilitaria sua utilização em pacientes (Matthée *et al.*, 1999). Uma exceção é a baicalina, um flavonoide proveniente de *Scutellaria baicalensis*, planta tradicional da medicina chinesa, que é capaz de discriminar a estrutura do DNA dupla fita e a do DNA de fita simples (Jiang *et al.*, 2010).

Capítulo II – Avaliação do potencial biológico de extratos e frações de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*

Figura 2.5: A. Análise de componente principal de 7 variáveis relacionadas a composição e atividade anti-HIV dos extratos e frações de *Croton echinocarpus* (●) e *Croton vulnerarius* (■). Extratos e frações: metanol e etanol (azul); hexano (vermelho); e água (amarelo);. B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os dois vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Tabela 17: Porcentagem de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa HIV-1 pelos extratos e frações de *Croton echinocarpus* (Ce) e *Croton vulnerarius* (Cv). Todos as frações foram testadas na concentração de 100, 250 e 500 .mL⁻¹. O antiviral foscarnet foi utilizado como controle positivo.

Espécie	Órgão	Extrato/Fração	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µ.mL ⁻¹
C. echinocarpus	Folha	Hexano	2,82	1,88	2,45
		Metanol	32,30	33,80	33,99
		Água	48,31	58,66	67,70
		Etanol	3,30	5,19	11,11
		CEF3	44,92	57,91	60,26
		CEF4	20,24	55,08	53,67
		CEF5	51,88	41,05	78,06
		CEF6	26,18	55,93	73,82
		Coridina	90,11	91,53	90,58
	Caule	Hexano	37,01	41,24	40,02
		Água	23,82	30,98	53,01
		Etanol	4,95	8,47	26,84
C. vulnerarius	Folha	Hexano	27,68	31,54	42,56
		Metanol	17,89	42,09	42,18
		Aquoso	43,88	55,27	83,99
		Etanol	12,34	21,37	24,48
		CVF3	32,20	91,43	91,62
	Caule	Hexano	18,08	31,17	33,24
		Aquoso	22,88	37,76	52,26
		Etanol	21,85	22,79	26,74
		Foscarnet		77,87	

Assim como foi observado para outras espécies de *Croton* em outros estudos do laboratório de Fitoquímica, os extratos aquosos de ambas as espécies produziram resultados expressivos, especialmente o extrato foliar de *C. vulnerarius*. Tal ação pode estar relacionada a presença de taninos, comuns em extratos feitos com água.

Os taninos hidrolisáveis são moléculas bastante conhecidas pela ação anti-HIV, inclusive ação anti transcriptase reversa. Mas estudos com culturas celulares mostram que estes possuem ação inespecífica, pois interferem na adesão entre célula e vírus, sendo este seu principal

mecanismo de ação. Além disso, sua utilização é limitada devido a toxicidade destas moléculas (Matthée *et al.*, 1999). Análises de teores de taninos são recomendadas para os extratos deste estudo a fim de se correlacionar melhor os resultados de atividade anti-HIV e a composição química dos mesmos.

Dentre os resultados obtidos no ensaio *in vitro* anti-HIV, os mais promissores foram os observados para a coridina, uma vez que se trata de uma substância isolada que apresentou resultados expressivos mesmo para a menor concentração testada, no entanto muitos testes precisam ser realizados para verificar a concentração mínima inibitória e se sua utilização *in vivo* é viável.

4. Conclusões

Ambas as espécies estudadas mostraram grande potencial como fornecedoras de substâncias com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-HIV. Por conta da presença de alcaloides em sua composição química, a espécie *Croton echinocarpus* mostrou ser de maior interesse medicinal se pensarmos na atividade anti-HIV. Além disso, a composição fenólica confere potencial antioxidante e antimicrobiano.

5. Referências Bibliográficas

ALVIANO, W.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, D.S.; BIZZO, H.R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M.L.; BOLOGNESE, A.M.; ALVIANO, C.S., SOUZA, M.M.G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiological Immunology* 20: 101–105, 2005.

ANASTASAKI, T.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D.; GAZOULI, M.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp *creticus* and subsp *eriocephalus*), by GC and GC-MS. *Planta Medica* 65: 735-739, 2009.

AZEVEDO, M.M.B.; CHAVES, F.C.M.; ALMEIDA, C.A.; BIZZO, H.R.; DUARTE, R.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxycalamenene-rich essential oils from *Croton cajucara* Benth. *Molecules* 18: 1128-1137, 2013.

BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPES-SÁEZ, J.A.; COBIANCHI, R.C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479-1482, 1999.

BREIDENSTEIN, E.B.M.; FUENTE-NUÑEZ, C.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* 19(8): 419-426, 2011.

BYLKA, W.; MATALAWSKA, I.; PILEWSKI, N.A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *Journal of American Nutraceutical Association* 7: 24-31, 2004.

CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANSAANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Flavonoids: chemical properties and analytical

methodologies of identification and quantification in foods and plants. *Natural Product Research* 25(5): 469-495, 2011.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38(2): 99-107, 2011.

DE MORAIS, S.M.; CATUNDA JUNIOR, F.E.A.; DA SILVA, A.R.A.; NETO, J.S.M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Antioxidant activity of essential oils from northeastern Brazilian *Croton* species. *Química Nova* 29 (5): 907-910, 2006.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2009.

EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M.R.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 53: 457-464, 2000.

GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weakness and opportunities. *Planta Medica* 74: 594-602, 2008.

GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T.M.; CECHINEL FILHO V.; RAO, V.S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 409–412, 2005.

GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MARTINS, D.T.O.; MATTOS, P.O.; RAO, V.S.N. Studies on the antidiarrheal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. *Phytotherapy Research* 15: 319–322, 2001.

HOLODNIY, M.; KOCH, J.; MISTAL, M.; SCHIMIDT, J.M.; KHANDWALA, A.; PENNINGTON, J.E. A double blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the safety and efficacy of orally administered SP-303 for the symptomatic treatment of diarrhea in patients with AIDS. *American Journal of Gastroenterology* 94 (11): 3267-3273, 1999.

IBRAHIM, R.K. A forty-year journey in plant research: original contributions to flavonoids biochemistry. *Canadian Journal of Botany* 83: 433-450, 2005.

JUNIOR, F.E.B.; MATIAS, E.F.F.; OLIVEIRA, D.R.; RAMOS, A.G.B.; FERNANDES, C.N.; SOUZA, H.H.F.; LACERDA NETO, L.J.; PEREIRA, A.O.B.; ARARUNA, M.K.A.; SANTOS, F.A.V.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A. Modulatory antibiotic activity and chemical composition of hydro alcoholic extract of *Croton campestris*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(18):4400-4404, 2011.

KARADAG, A.; ÖZÇELİK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analysis Methods* 2: 41-60, 2009.

JIANG, Y.; NG, T.B.; WANG, C.R.; ZHANG, D.; CHENG, Z.H.; LIU, Z.K.; QIAO, W.T.; LI, N.; LIU, F. Inhibitors from natural products to HIV-1 reverse protease and integrase. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* 10: 1331-1344, 2010.

LIU, J.P.; MANHEIMER, E.; YANG, M. Herbal medicines for treating HIV infection and AIDS. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3rd Edition, 2005.

LIU, Z.Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. *Chemical Reviews*. 110:5675-5691, 2010.

LOPES, M.I.L.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S. HENRIQUES, J.A.P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 437-445, 2004.

MATTHÉE, G.; WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G.M. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Medica* 65: 493-506, 1999.

MOTTA, L.B.; FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; CORDEIRO, I.; SALATINO, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21: 972-977, 2011.

NARDI, G.M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; ARRUDA, D.C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A.K.; PIZZOLATTI, M.G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine* 10: 176-184, 2003.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxic, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology* 49(4): 396-402, 2011.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63:1035-1042, 2000.

POMERANTZ, R.J.; HORN, D.L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medicine* 9: 867-73, 2003.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20(7): 933-956, 1996.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico 127 Embrapa. 2007.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; PERES, M.T.L.P.; HESS, S.C.; CANDIDO, A.C.S.; DIRAIMO, D.L.; POPPI, N.R.; MATOS, M.F.C.; SANTOS, E.C.S.; OGUMA P.M.; DE CARVALHO, J.E. Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12: 250-261, 2009.

SINGH, I.P.; BODIWALA, H.S. Recent advances in anti-HIV natural products. *Natural Product Reports* 27: 1781–800, 2010.

TIEPPO, M.; PORAWASKI, M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, A.J.; COLLADO, P.S.; GONZALLES-GALEGO, J.; MARRONI, N.P. *Croton cajucara* BENTH. leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29: 161-165, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4ª Edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from. *Nature Reviews* 1: 65-70, 2003.

WORADULAYAPINIJ, W.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; WIWAT, C. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. Journal of Ethnopharmacology 101, 84–9.

YANG, H., DONG, Y., DU, H.; SHI, H.; PENG, Y.; LI, X. Antioxidant compounds from própolis collected in Anhui, China. Molecules 16: 3444-3455, 2011.

Considerações Finais

Considerações finais

A caracterização química realizada neste projeto evidenciou que *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius* são espécies ricas em flavonoides. Suas composições fenólicas se assemelham a de outras espécies do mesmo gênero, com a presença de derivados de quercetina, campferol e apigenina. Como substâncias majoritárias, foram encontradas flavona C-glicosilada vitexina e o flavonol acilado tilirosídeo. Essas substâncias parecem ser bons marcadores taxonômicos para gênero, uma vez que já foram encontrados na maioria das espécies de *Croton* estudadas.

Diferentemente do que foi observado em outros estudos realizados com espécies da seção *Cyclostigma*, as espécies aqui analisadas não apresentaram diterpenos entre seus componentes majoritários dos extratos apolares. Entretanto, *C. echinocarpus* apresentou uma quantidade significativa de alcaloides aporfínicos entre seus metabólitos secundários foliares, especialmente quando analisado o extrato obtido por maceração com etanol 70%, realizado a temperatura ambiente.

Pelo uso de cromatografia em coluna, foi possível isolar o alcaloide mais abundante, a coridina, que foi utilizado em testes de bioatividade. Da mesma forma, por cromatografia em coluna, os constituintes fenólicos também foram fracionados. Todos os extratos e frações, quando em quantidades suficientes, foram utilizados nos bioensaios propostos. A fração contendo o alcaloide coridina resultou em grande percentual de ação inibitória de transcriptase reversa HIV-1, o que a torna uma substância com um grande potencial medicinal.

A presença de tilirosídeo em frações parece proporcionar maior ação antioxidante, mas também ação inibitória da transcriptase reversa. Por outro lado, as frações que contem maiores teores de vitexina demonstraram maior atividade antimicrobiana, especialmente contra *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentou grande sensibilidade às espécies estudadas, principalmente a extratos e frações com maior teor de substâncias fenólicas.

Por fim, realizando-se uma análise PCA onde foram plotadas todas as atividades biológicas analisadas e a composição química dos extratos e frações de ambas as espécies estudadas (figura C.1), é possível sugerir que a atividade antioxidante está fortemente relacionada à presença de substâncias fenólicas em geral (teor de fenóis totais), enquanto a atividade antimicrobiana parece estar relacionada à presença da flavona vitexina nas frações. Já a ação inibitória da transcriptase reversa HIV-1 observada para os extratos e frações mostrou-se fortemente correlacionada a presença do flavonol tilirosídeo.

Na figura C.1, podemos notar que os extratos e frações provenientes de *C. echinocarpus* apresentaram maior atividade biológica e, desta forma, essa espécie apresenta grande potencial para a indústria farmacêutica. Ambas as espécies aqui estudadas possuem porte arbóreo, podendo atingir até quatro metros de altura, o que é um fator facilitador de seu uso e emprego como fonte de substâncias medicinais. Entretanto, ensaios in vivo e outros testes de toxicidade devem ser realizados antes de um uso comercial dessas espécies.

A.

B.

Variáveis	Eixo01	Eixo02
Fenol	0,4126	-0,0745
DPPH	0,5246	0,1655
β-Caroteno	0,4981	0,1785
Anti-HiV	0,0470	-0,2897
<i>P. aeruginosa</i>	0,0149	0,2309
<i>E. coli</i>	0,0155	0,0810
<i>B. subtilis</i>	-0,0187	0,0004
Tilirosideo	0,4742	-0,5765
Vitexina	0,2073	0,6715
Isoramnetina	0,0384	-0,0674
Fenilpropanoide	-0,1635	-0,0192
Derivados de Campferol	-0,0845	0,0192
Quercetina	-0,0147	0,0545

C.

PC	% de Variância	% de Variância acumulada	% de Variância esperada
1	32,99	32,99	24,46
2	20,51	53,49	16,77
3	17,06	70,50	12,92
4	11,85	82,35	10,36
5	6,46	88,82	8,44

Figura 2.6: A. Análise de componente principal de 13 variáveis relacionadas a composição, atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV dos extratos e frações de *Croton echinocarpus* (●) e *Croton vulnerarius* (■). Extratos e frações: metanol e etanol (azul); hexano (vermelho); e água (amarelo). B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2; em cinza destaque para os dois vetores de maior influência em cada eixo. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e % de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Considerações Finais

Diante do exposto, podemos inferir que o trabalho realizado acrescenta informações importantes sobre a química de *Croton* e corrobora para a grande importância medicinal do gênero.

Anexos

Preparo do meio de cultura LB (Luria-Bertani):

Meio Sólido:

Para 1L de água ultrapura: pesar 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 15 g de ágar. Agitar até dissolver completamente, autoclavar por 15 min a 121 °C.

Para cada placa de Petri, colocar 15 mL do meio e deixar solidificar. Armazenar as placas na geladeira, de cabeça para baixo para evitar o acúmulo de água por sobre o meio de cultura.

Meio Líquido:

Para 1L de água ultrapura: pesar 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de cloreto de sódio. Agitar até dissolver completamente, autoclavar por 15 min a 121 °C.

Armazenar na geladeira.