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

"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.*
120 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

_____ _____

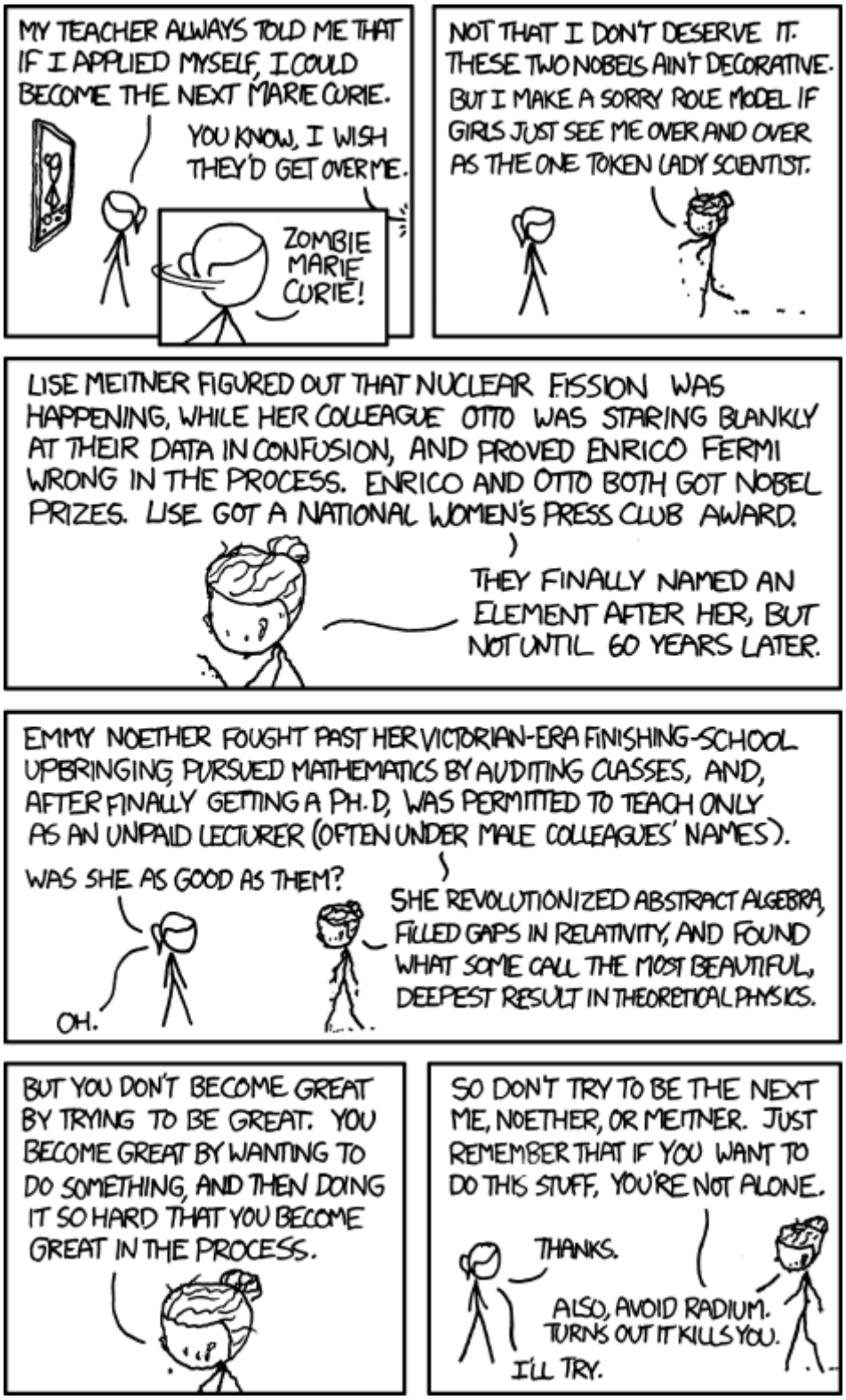
Prof (a). Dr (a). Prof (a). Dr (a).

_____

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

(orientadora)

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



Randall Munroe (xkcd.com)

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

Croton (L.) 10

Referências bibliográficas 17

Capítulo I **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. Conclusões 36
4. Referências bibliográficas 38

Capítulo II **47**

1. Introdução 48
2. Material e métodos 53
    a. Obtenção de extratos e frações 53
    b. Avaliação da atividade antioxidante 53
        I. Análise da atividade in vitro de sequestro do radical DPPH 53
        II. Análise da atividade in vitro de oxidação do β-caroteno 54
        III. Quantificação de fenóis totais 55
    c. Ensaio de quantificação de atividade antimicrobiana 56
    d. Ensaio de quantificação do efeito inibidor da transcriptase reversa HIV-1 57

e. Análises estatísticas 59
3. Conclusões 60
4. Referências bibliográficas 61
Considerações finais **67**
Anexos **72**

Introdução Geral

O potencial medicinal das plantas

A utilização terapêutica de plantas é tão antiga quanto à 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 (Schimdt *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 Media (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 belladona* 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 (Schimdt *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 especifica 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 cientifica 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) (Schimidt *et al.*, 2008), que contem 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 (*Catharanthus 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 diterpenos 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 características 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 derivadas 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 papeis 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, uma rota alternativa, a via do metileritritol fosfato (MEP), foi descrita com ocorrência nos plastídeos, e, por isso, 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 proveninete do aminoácido fenilalanina, formado pela via do ácido chiquímico e que após desaminação origina tanto fenóis simples (C_6C_0 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 acido 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 I.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 morfologicamente 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, sedo 11 delas monotípicas.

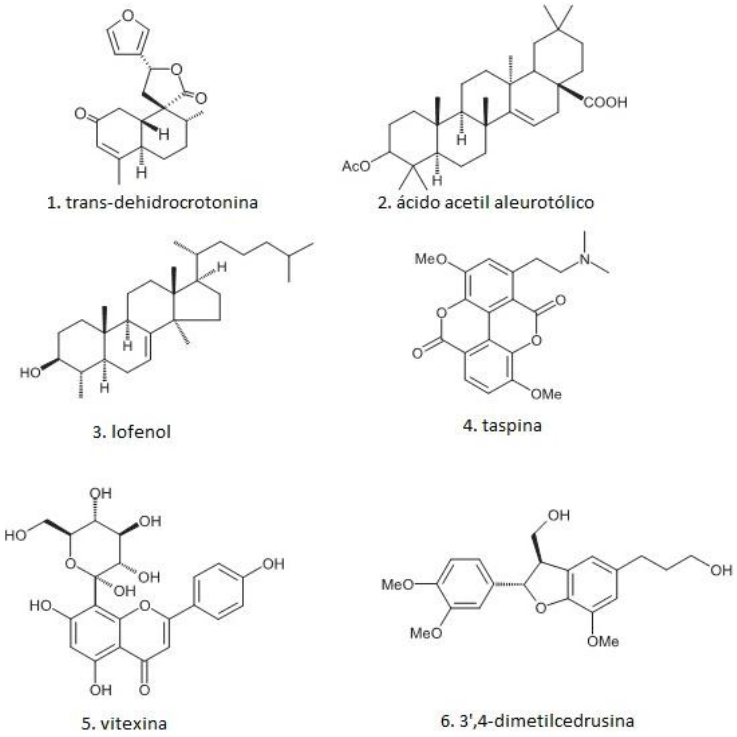


Figura I.2: Estruturas químicas de alguns exemplos de classes de metabólitos secundários ocorrentes em *Croton*: diterpenos (1), triterpeno pentacíclico (2), triterpeno esteroidal (3), alcaloide(4), flavonoide (5) e lignana (6). (adaptado de Salatino *et al*., 2007).

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 geranil-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 tipos de câncer, como o de pulmão e leucemia (Motta *et al.*, 2011).

As espécies *C. vulnerarius* Baill. e *C. echinocarpus* Müll.Arg. (figuras I.3 e I.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 caulinar.

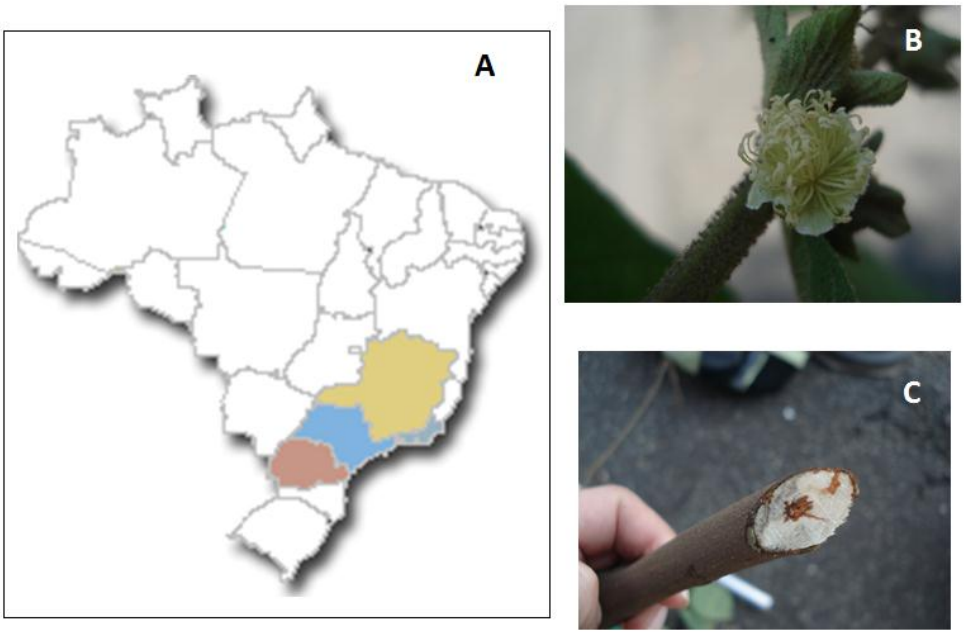


Figura I.3: ***Croton vulnerarius:*** **(A) distribuição geográfica no Brasil (retirado de Cordeiro *et al.*, 2010b), (B) flor masculina e (C) detalhe do ramo com exsudado de látex avermelhado. Fotos: Cláudia Furlan.**

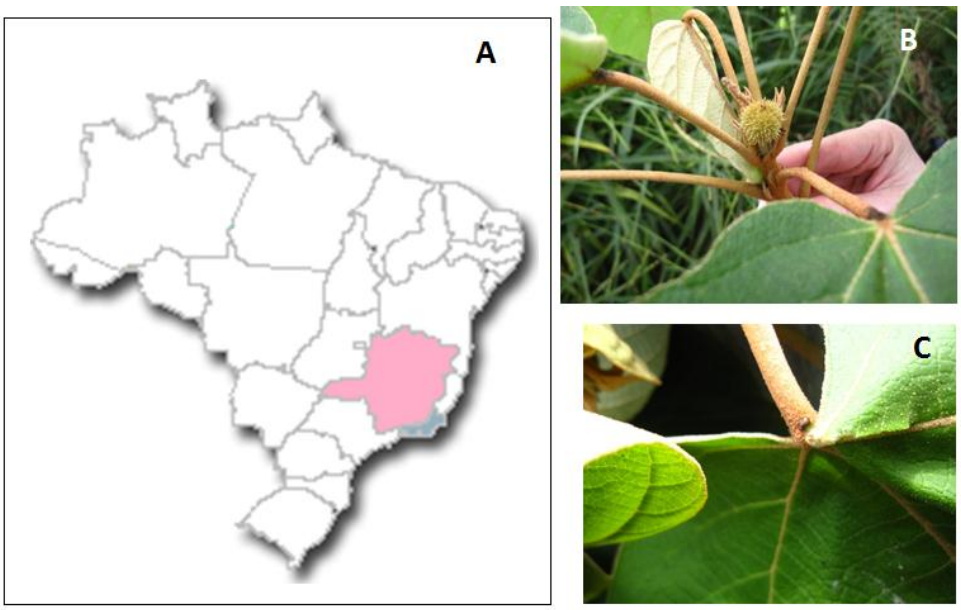


Figura I.4: ***Croton echinocarpus:*** **(A) distribuição geográfica no Brasil (retirado de Cordeiro *et al.,* 2010a), (B) fruto espinhoso e (C) nectários extraflorais. Fotos: Natália Ravanelli.**

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.; HIPP, A.L.; WURDACK, K.J.; VON EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (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 naphtoquinones 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: biochemestry, 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 *Ricius 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, inflamation, 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 therapeutis. 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 seres 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 C_6-C_3-C_6, 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 a posição 4 é característico das flavanonas e seus derivados; uma dupla ligação entre os carbono 2 e 3 é comum as 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).

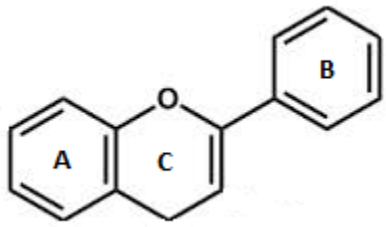


Figura 1.1: Estrutura geral dos flavonoides.

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), bem como o seu uso no tratamento de doenças vasculares e neurodegenerativas (Williams *et al*., 2004). Alguns tipos de flavonoides, como a hespiridina 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 liquida (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 C_{8-} ou C_{18-}, 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 especeis *C. dichrous*, *C. erytroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, esta ultima 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).

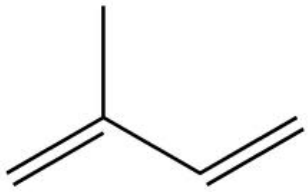


Figura 1.2: estrutura de um isopreno, unidade biogênica de cinco carbonos, formadora dos terpenoides.

As atividades biológicas dos terpenos são muito variadas. Entre eles podemos destacar os diterpenos, já que é grande o numero 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 esqueleno (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 sustâncias 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 alcoloides (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 sequencia 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: inicio 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 λ = 352nm.

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 liquido 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 $\mu L.min^{-1}$, voltagem de 4000 V, nebulizador a 27 psi, gás secante a 320°C e fluxo de 7,0 $L.min^{-1}$.

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

3. 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 abundancia 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.

4. 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 pentylenetetrazole-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.; LÓPES-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.; PERDETZOGLOU, 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.; GIANSANTI, 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.; HERTOG, 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.* Phytochemestry 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 Brasilieira 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 Chemestry 7(7): 659-677, 2003.

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

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

Capítulo II

Atividade Biológica 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 delas 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 nucléicos 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 (λ = 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. argyrophylloides* (De Morais, 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 meticilina 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 imunnodeficiency 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 a cerca do 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 três espécies de 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 $\mu g.mL^{-1}$. 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 $\mu g.mL^{-1}$.

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:

% de atividade antioxidante = {[(AbsCN - AbsBCN) – (AbsA - AbsBA)] / (AbsCN - AbsBCN)} x 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 liquido, 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/acido 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:

% de inib. da ox. do β-caroteno = [(AbsCN – AbsBCN) – (AbsA – AbsBA) / (AbsCN - AbsBCN)] x 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 segundo

Saldanha (2013). 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 $\mu g.mL^{-1}$).

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, 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 $1x10^{6}$ $células.mL^{-1}$ 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 $\mu g.mL^{-1}$ 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 µL de etanol no lugar da amostra, em meio de cultura sem a bactéria; controle negativo (CN) – contendo 10 µL 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:

% de inib. Do crescimento = [(AbsCN – AbsA) / AbsC] x 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 µg.mL^{-1}.

As amostras (20 µL) foram inicialmente incubadas em microtubos por uma hora a 37°C, juntamente com 1 µL 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):

% 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. 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.

4. 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 essencial oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiological Immunology 20: 101–105, 2005.

ANASTASAKI, T.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D.; GAZOULI, M.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Analysis of labdane-type diterpenes from *Cistus creticus* (subsp *creticus* and subs*p 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. Phytochemestry 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.; GIANSANTI, 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 SIVA, 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.* Phytochemestry 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.; ÖZÇELIK, 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.

ÖZÇELIK, 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.

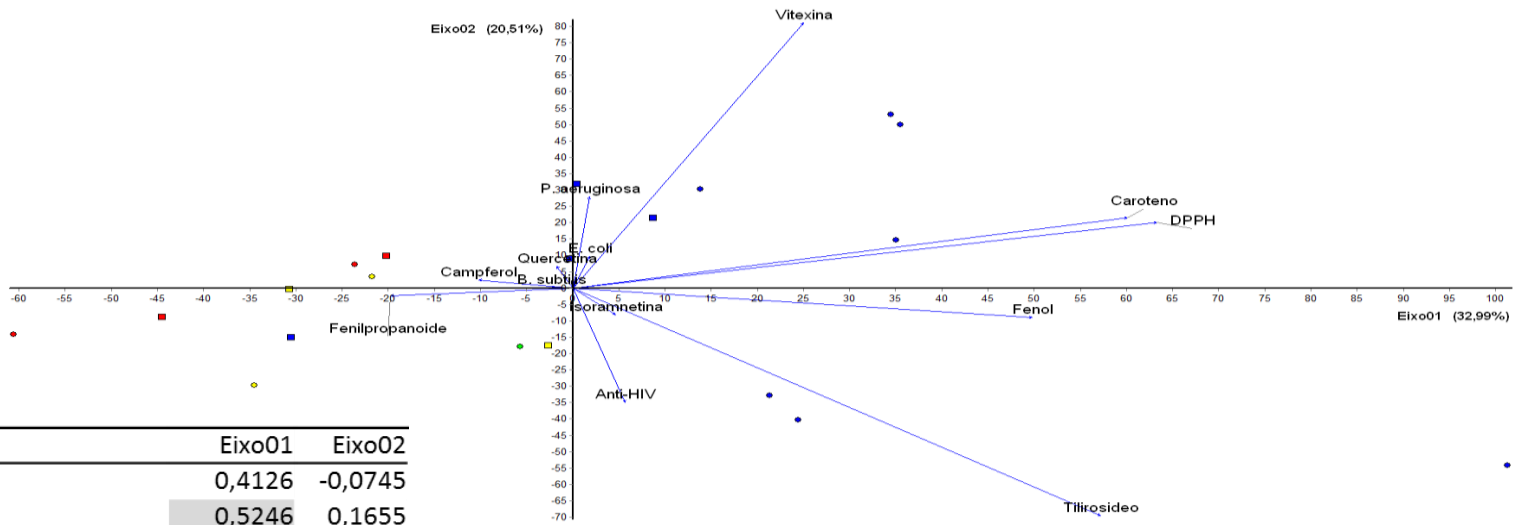
Pelo uso de cromatografia em coluna, foi possível isolar o alcaloide mais abundante, a coridina, que foi utilizado em testes de bioatividade. Da mesma forma, por cromatografia em coluna, os constituintes fenólicos também foram fracionados. Todos os extratos e frações, quando em quantidades suficientes, 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
P. aeruginosa	0,0149	0,2309
E. coli	0,0155	0,0810
B. subtilis	-0,0187	0,0004
Tilirosideo	0,4742	-0,5765
Vitexina	0,2073	0,6715
Isoramnetina	0,0384	-0,0674
Fenilpropanoides	-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.

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 acumulo de agua por sobre o meio de cultura.

Meio Líquido:

Para 1L de agua 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.