***Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas.**

***Croton sphaerogynus* Baill.: phenolic compounds and biologic activities.**

São Paulo
2014

CROTON sphaerogynus.

Kátia Pereira dos Santos

***Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas.**

***Croton sphaerogynus* Baill.: phenolic compounds and biologic activities.**

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: Prof^ª Dr^a Cláudia Maria Furlan

São Paulo

2014

Santos, Kátia Pereira
Croton sphaerogynus Baill.:
substâncias fenólicas e atividades
biológicas.
104 páginas.

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

Palavra-Chave: *Croton*, antioxidantes,
antimicrobianos, anti-HIV-1.

Universidade de São Paulo. Instituto
de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Cláudia Maria Furlan

Orientadora

*“Aos meus pais, Vera e Geraldo, meus irmãos, Gisele e Rafael,
e meu companheiro de todas as horas, Fernando.”*

Agradecimentos

São tantas as pessoas que de alguma forma me ajudaram, que eu espero não esquecer ninguém!

Primeiramente agradeço a minha orientadora, Claudinha, por todos os ensinamentos e pela amizade construída ao longo desses dois anos.

À Lucimar Barbosa da Motta pelo auxílio nas coletas e pelos churrascos de aniversário, sempre tão divertidos.

À Aline e a Mourisa por todos os ensinamentos e auxílio, principalmente na injeção das amostras. E que venham muitos temakis!

Aos professores do laboratório, Antonio Salatino, Maria Luíza Salatino, Deborah Santos e o mais novo integrante, Marcelo, seja bem vindo! Obrigada por todas as contribuições e momentos de descontração seja nas reuniões, no almoço ou no café.

Aos meus colegas de laboratório Adne, Alice, Bruna, Carmen, Carol, Jocimar, Priscila, Paula, especialmente as minhas “irmãs” mais velhas, Fernanda e Natália, e mais novas Dalila, Fernanda Anselmo, Janayne e o homem da casa, Rafael.

À minha família por ter sido a base de tudo. Meus pais, Vera e Geraldo, meus irmãos, Gisele e Rafael e minha companheira de estudos, Lisa. Amo vocês! E também a minha segunda família, Maria Antônia, Marcos, Marquinhos e Maísa.

Ao meu companheiro, Fernando, por todo o amor, incentivo e todas as palavras de consolo nos momentos difíceis. Te amo!

As minhas irmãs de coração, Ariadne e Melina e às amigas de longa data, Vanessa e Cristiane.

Aos amigos e companheiros de viagens, Luciana, Leonardo, Cileide, Rafael, Randolpho e Mariana. Obrigada por tudo!

Aos amigos que conquistei na faculdade e que levarei para o resto da vida, Anna, Banzi, Helena, Larissa, Lucas, Mykhaela, Thandara e Tassia. Muita saudade!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro e a Capes/Proex pela bolsa concedida e financiamento de Congressos. Ao Instituto de Biociências pela infraestrutura.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Potencial medicinal dos vegetais	1
1.2. Metabólitos secundários	3
1.2.1. Substâncias fenólicas	6
1.3. <i>Croton</i> L. (Euphorbiaceae).....	7
1.3.1. <i>Croton sphaerogynus</i> Baill.	9
1.4. Atividades antioxidantes de produtos naturais vegetais	10
1.5. Atividades antimicrobianas de produtos naturais vegetais	13
1.6. Atividades anti-HIV de produtos naturais vegetais	13
2. Hipóteses e Objetivos do trabalho	17
3. Material e métodos	21
3.1. Coleta do material.....	21
3.2. Extração e fracionamento	21
3.3. Identificação das substâncias majoritárias nos extratos, frações e subfrações	22
3.4. Doseamento das substâncias majoritárias dos extratos, frações e subfrações	24
3.4.1. Quantificação por CLAE-DAD.....	24
3.4.2. Quantificação por espectrofotometria	24
3.4.2.1. Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas totais	24
3.4.2.2. Determinação do conteúdo de flavonas/flavonóis	25
3.5. Atividades biológicas	25
3.5.1. Ensaio de atividades antioxidantes	25
3.5.1.1. Redução do DPPH [•]	25
3.5.1.2. Redução do ABTS [•]	25
3.5.1.3. Poder redutor de ferro (FRAP).....	26
3.5.1.4. Sistema β -caroteno/ ácido linoleico	26
3.5.1.5. Atividade quelante de metais	27
3.5.2. Ensaio de quantificação do efeito inibidor de crescimento bacteriano	27
3.5.3. Ensaio de quantificação do efeito inibidor da atividade da transcriptase reversa HIV-1	28
3.6. Análise multivariada.....	29
4. Resultados e Discussão	31
4.1. Identificação dos constituintes fenólicos	31
4.2. Análise dos conteúdos fenólicos nos extratos de <i>Croton sphaerogynus</i>	47
4.3. Análise do potencial biológico <i>in vitro</i> dos extratos de <i>Croton sphaerogynus</i>	51
4.3.1. Ensaio de atividades antioxidantes	51
4.3.1.1. Porcentagem de inibição de oxidação	54
4.3.1.2. Conteúdo de substâncias antioxidantes equivalentes ao padrão.....	57
4.3.1.3. Concentração efetiva da amostra para atingir 50% de atividade antioxidante (EC ₅₀).....	61
4.3.2. Ensaio de quantificação do efeito inibidor de crescimento bacteriano	65
4.3.3. Ensaio de inibição da atividade da transcriptase reversa: antiRT-HIV1	71
5. Considerações finais.....	75
6. Resumo.....	79
7. Abstract	81
8. Referências Bibliográficas	83
9. Anexo I.....	99

1. Introdução

1.1. Potencial medicinal dos vegetais

Desde os primórdios da medicina, substâncias químicas derivadas de animais, vegetais e microrganismos têm sido usadas no tratamento de diversas doenças (Koehn & Carter, 2005; Schmidt *et al.*, 2008). Dentre estas, os produtos derivados de vegetais têm dominado as farmacopeias por milhares de anos, fornecendo uma fonte inesgotável de recursos medicinais (Schmidt *et al.*, 2008).

Um estudo recente, realizado por uma equipe de cientistas da Espanha, Reino Unido e Austrália sugere que os Neandertais, ao contrário do que se imaginava, não se alimentavam somente de proteína animal. Eles se alimentavam de uma série de vegetais cozidos e também percebiam o valor nutricional e medicinal de alguns deles. A pesquisa foi baseada na análise de placas dentárias fossilizadas de cinco Neandertais provenientes da gruta de El Sidrón, nas Astúrias, que viveram há cerca de 47 e 51 mil anos. Combinando técnicas avançadas de análises químicas com a análise morfológica dos microfósseis vegetais, os pesquisadores conseguiram identificar na placa dentária dos Neandertais: grânulos de amido, hidratos de carbono e vestígios de nozes, ervas e verduras. Além disso, foram identificadas nos dentes de um dos indivíduos, fragmentos de duas plantas: o milefólio e a camomila, que além de não possuírem valor nutricional, contém um desagradável sabor amargo. O milefólio contém azuleno, substância conhecida pela sua ação anti-inflamatória e antifebril e a camomila contém cumarinas, substâncias que aliviam os edemas. Os autores sugerem que os Neandertais que viviam em El Sidrón tinham um conhecimento sofisticado do seu meio natural, incluindo a capacidade de selecionar e utilizar certas plantas pelo seu valor nutricional e medicinal, sugerindo que a medicina tradicional é uma prática muito mais antiga do que imaginamos (Hardy *et al.*, 2012).

Os primeiros estudos na área de botânica fazem parte da literatura médica das antigas civilizações, como a egípcia, mesopotâmica, chinesa e indiana, indicando, portanto, que tais estudos realizaram-se em virtude da utilização farmacológica dos vegetais (Reed, 1942).

No início da Era cristã, o médico grego Dioscórides escreveu a obra “De Materia Medica”, que é considerada a primeira farmacopeia ocidental, cujo conteúdo perdurou por muitos séculos e, excetuando-se a Bíblia, foi a obra mais lida durante a Idade Média (Tyler, 1996). Entretanto, nessa época, os estudos sobre as propriedades medicinais de plantas eram pouco avançados e baseavam-se em observações e muitas vezes em superstições e esoterismo.

Devido aos grandes avanços tecnológicos na área de química e farmacologia no século XIX, foi dado um grande passo para o estudo de plantas medicinais: o isolamento do primeiro fármaco de origem vegetal, a morfina, um alcaloide proveniente da papoula (*Papaver somniferum* L.,

Papaveraceae) que é utilizado até os dias de hoje devido à sua forte ação analgésica. A partir dessa descoberta, outras substâncias foram isoladas, como a quinina e a quinidina, obtidas de *Cinchona* spp. L (Rubiaceae) e a atropina, proveniente de *Atropa beladonna* L. (Solanaceae) e ambas passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos de plantas (Turolla & Nascimento, 2006).

A investigação de produtos naturais como fonte de novas terapias humanas atingiu o seu auge na indústria farmacêutica ocidental no período entre 1970 e 1980, o que resultou em uma paisagem farmacêutica fortemente influenciada por moléculas não sintéticas. Newman e colaboradores (2003) verificaram que, de 877 novas substâncias ativas descobertas entre os anos de 1981 e 2002, cerca de metade (49%) eram produtos naturais, produtos semissintéticos análogos de produtos naturais ou, ainda, substâncias sintéticas baseadas em produtos naturais.

Considera-se planta medicinal, qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, usada para fins terapêuticos. Uma droga vegetal trata-se de qualquer substância purificada, isolada a partir de material vegetal bruto, com uma estrutura química particular e que apresente atividade farmacológica sendo, portanto, usada em medicamentos. Substâncias isoladas que foram submetidas a qualquer semissíntese ou modificação química não podem ser consideradas fitoterápicos (Anvisa, 2010).

Atualmente, muitos medicamentos utilizados em nosso cotidiano são provenientes de produtos naturais sintéticos ou semissintéticos como, por exemplo, o Buscopan[®] obtido modificando-se a estrutura da escopolamina, um alcaloide comum em Solanaceae; Atroveran[®], um medicamento obtido modificando-se a estrutura da papaverina, um alcaloide de *Papaver somniferum*, além de possuir também em sua formulação extrato fluido de *Atropa belladonna*. Ainda da classe dos alcaloides, a morfina, um dos mais poderosos anestésicos e analgésicos é utilizada até os dias atuais. Os alcaloides obtidos de *Chincona calisaya* (Rubiaceae) como a quinina são frequentemente utilizados no combate à malária (Simões, 2001).

Apesar de a classe dos alcaloides apresentar substâncias com conhecido poder medicinal, substâncias da classe dos flavonoides também se encaixam nesse perfil como potentes varredores de radicais livres, sendo consideradas substâncias altamente antioxidantes como, por exemplo, as antocianinas, flavonóis, isoflavonoides, entre outros (Martin, 2013).

Recentemente, no Brasil, pacientes do sistema único de saúde (SUS) passaram a ter acesso a fitoterápicos, e no ano de 2008 o Governo Federal aprovou a Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Tal programa visa regulamentar todas as etapas da cadeia produtiva deste tipo de medicamento, além de ampliar e melhorar as condições para a pesquisa científica nesse segmento, protegendo o patrimônio genético e o conhecimento tradicional associado às plantas com propriedades medicinais (Portal Brasil, 2012).

A grande maioria das espécies vegetais nunca foi analisada química e farmacologicamente e por isso, a conservação de áreas de vegetação nativa torna-se um assunto de extrema importância, visto que estes locais podem abrigar um vasto potencial farmacológico ainda inexplorado (Gurib-Fakim, 2006).

Favorecidos pelos distintos biomas que ocorrem no Brasil, além do grande e heterogêneo espaço territorial, somos detentores, portanto, de uma grande diversidade biológica e provavelmente, de um grande potencial fitoquímico, o que intensifica ainda mais a importância de estudos realizados com plantas da flora brasileira (Moura *et al.*, 2001).

1.2. Metabólitos secundários

Apesar da imensa variedade de características encontradas nos seres vivos, as vias de síntese de substâncias como carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucléicos são as mesmas em todos os organismos. É vital para todos os organismos, a transformação e conversão de compostos orgânicos que permitem a realização de atividades essenciais para a vida, como a reprodução e o crescimento (Dewick, 2009).

Chamamos de metabolismo o conjunto de reações que tem como finalidade a formação e construção dos tecidos de uma planta através de caminhos chamados vias metabólicas. Tais reações envolvem processos como a atuação de substâncias químicas mediadas por enzimas, além de serem minuciosamente controlados, e tendo como objetivo principal, a formação de produtos essenciais para a manutenção da vida da planta (Dewick, 2009).

Vários autores costumam dividir o metabolismo vegetal em primário e secundário. Embora na prática essa divisão seja difícil, caracteriza-se metabolismo primário os processos comuns e pouco variáveis à grande parte dos vegetais e que levam à síntese de carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucléicos. Tais sínteses ocorrem por vias conhecidas como glicólise e ciclo de Krebs (ciclo do ácido carboxílico) que têm como resultado a liberação de energia originada de compostos orgânicos através de reações de oxido-redução. Tal energia também é obtida através da β -oxidação de ácidos graxos e degradação de produtos que não são essenciais para a planta (Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009).

Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por substâncias do metabolismo secundário são os fatores bióticos. Desse modo, produtos secundários estão relacionados à proteção contra herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbioses. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à radiação UV e deficiência de nutrientes minerais (Taiz & Zeiger, 2009). Devido a essas

relações estabelecidas entre as plantas e o meio ambiente, principalmente às interações estabelecidas com os fatores bióticos, pesquisadores começaram a imaginar que várias dessas substâncias poderiam ter aplicação biológica e foi por isso que entre os séculos XIX e XX, iniciaram-se as pesquisas sobre as atividades medicinais por metabólitos secundários. Os estudos de ecologia química foram de extrema importância, pois providenciaram relatos de substâncias envolvidas nessas interações planta-meio ambiente (e.g. Coley *et al.* 2003; Donaldson & Gates, 2004; Albuquerque & Mello, 2012).

O metabolismo secundário geralmente é definido como o responsável pela grande variedade de substâncias químicas apresentadas pelas plantas, porém específicos para alguns grupos. Dessa forma, as substâncias provenientes de tal metabolismo podem caracterizar-se como espécie-específicas (Dewick, 2009).

Produtos do metabolismo primário são utilizados como blocos construtores para o metabolismo secundário que, por sua vez, apresenta quatro vias para formação de substâncias (Figura 1.1): via do malonato, via do chiquimato, via do mevalonato (MEV) e via do metileritritol fosfato (MEP) (Dewick, 2009).

Os produtos originados a partir da via do malonato são provenientes de uma molécula precursora, a acetil-CoA. Esta molécula pode ser formada tanto pela descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico (produto da via glicolítica), quanto pela β - oxidação de ácidos graxos. Entre os produtos finais desta via podemos citar os ácidos graxos e seus derivados constituintes de ceras cuticulares, algumas substâncias fenólicas, entre outros (Dewick, 2009).

A via do ácido chiquímico tem início pela combinação de substâncias também provenientes do metabolismo primário, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-4-fosfato. Entre os metabólitos produzidos a partir desta via estão uma grande variedade de substâncias fenólicas, tais como derivados do ácido benzoico, fenilpropanoides, flavonoides, ligninas, taninos e, ainda, os alcaloides aromáticos (Dewick, 2009).

O ácido mevalônico é formado a partir de três moléculas de acetil-coA e é responsável pela biossíntese de numerosas substâncias conhecidas como terpenoides e esteroides. O isopreno é uma unidade precursora formada por cinco átomos de carbono sendo os terpenoides, derivados de tal substância por possuírem quantidades variáveis de isopreno. Tal variação nas quantidades de isopreno é utilizada para a criação artificial de classes de terpenoides: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e carotenoides (C40) (Vickery & Vickery, 1981; Dewick, 2009).

Figura 1.1 – Esquema das vias de síntese de metabólitos secundários. Em negrito estão destacadas as principais vias de síntese; as principais classes estão indicadas pelas setas conforme legenda da própria figura. As estruturas representam exemplos de metabólitos secundários (Retirado de Rezende, 2013).

O metileritritol fosfato é formado a partir da combinação de dois intermediários da via glicolítica: o ácido pirúvico e o gliceraldeído-3-fosfato. Juntamente com a via do ácido mevalônico, esta via é responsável pela biossíntese de terpenoides e esteroides. Ambas as vias contribuem para a síntese de terpenoides, mas a localização de cada uma delas é particular. A via do mevalonato, a primeira a ser descrita na literatura, ocorre no citoplasma e parece estar envolvida com a síntese, principalmente, de triterpenos e esteroides. Já a via do metileritritol fosfato foi descrita mais recentemente e ocorre nos plastídios, levando a síntese preferencialmente de diterpenos e carotenoides (Dewick, 2009).

1.2.1. Substâncias fenólicas

Entre as substâncias fenólicas, uma classe de grande importância é a classe dos flavonoides, substâncias caracterizadas pela estrutura básica $C_6C_3C_6$, provenientes de biossíntese mista. A porção C_6C_3 é originada a partir do ácido *p*-cumárico, que por sua vez é proveniente do aminoácido fenilalanina e formado pela via do ácido chiquímico. A fenilalanina, após sua desaminação, origina tanto fenóis simples (C_6C_0 , C_6C_1 e C_6C_2) como fenilpropanoides (C_6C_3). A essas porções se unem três moléculas de acetato, dando origem a um anel fenólico proveniente, portanto, da via do acetato malonato (Taiz & Zeiger, 2009).

Os flavonoides são substâncias fenólicas hidroxiladas e a atribuição de suas atividades farmacológicas está diretamente ligada à conformação de sua estrutura. A natureza química dos flavonoides depende da sua classe estrutural, do seu grau de hidroxilação e outras substituições, conjugações e grau de polimerização (Heim *et al.*, 2002). O crescente interesse tanto farmacológico, quanto industrial nestas substâncias, tem sido estimulado pelos benefícios à saúde decorrentes das atividades antioxidantes destes compostos fenólicos. Os grupos hidroxila funcionais nessa classe de substâncias são os maiores responsáveis pela eliminação de radicais livres, quelantes ou redutores de íons metálicos (van Acker *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996; López *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002; Kumar & Pandey, 2013c).

Os flavonoides podem ocorrer naturalmente como agliconas, glicosídeos e derivados metilados, isoprenados ou outros. Sua estrutura básica (Figura 1.2) consiste na presença de dois anéis aromáticos (A e B) ligados entre si por três átomos de carbono que formam um anel heterocíclico oxigenado (anel C) (Manach *et al.*, 2004).

A posição do substituinte benzênico divide esta classe em flavonoides (posição 2) e isoflavonas (posição 3). Flavonóis diferem das flavanonas pela presença de grupo hidroxila na posição 3 e uma dupla ligação C2-C3 (Narayana & Reddy, 2001). Os flavonoides são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 2, 3', 4' e 5'. Metilações, acilações e glicosilações são ocorrências comuns e quando glicosídeos são formados, a ligação com o açúcar está mais frequentemente localizada nas posições 3 ou 7 (Middleton, 1984).

Figura 1.2 – Estrutura básica de um flavonoide.

Os estudos dos flavonoides por espectroscopia revelam que a maioria dos flavonóis e flavonas exibem duas bandas principais de absorção: Banda I (300 – 550 nm) que representa a absorção do anel B e Banda II (240-285 nm) que corresponde à absorção do anel A, sendo que pode ocorrer variações no padrão de absorção dependendo dos grupos funcionais ligados ao esqueleto de um determinado flavonoide (Markham, 1982).

Aos flavonoides atribuem-se importantes funções fisiológicas e ecológicas para o vegetal, como proteção contra a radiação e atração de polinizadores. Para os seres humanos, substâncias dessa classe de metabólitos possuem ação medicinal atuando principalmente como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes, antitumorais, hepatoprotetores, antimicrobianos e antivirais (Ibrahim, 2005; Kumar & Pandey, 2013c).

1.3. *Croton* L. (Euphorbiaceae)

Entre as famílias com maior diversidade de espécies vegetais está Euphorbiaceae Juss., (Malpighiales) que corresponde à terceira maior família vegetal brasileira (Souza & Lorenzi, 2005). Os representantes desta família estão amplamente distribuídos pelo mundo, especialmente na região dos trópicos, em diversos tipos de vegetações e habitats (Secco *et al.*, 2012). Em muitas partes do mundo, os representantes dessa família são conhecidos por apresentarem propriedades tóxicas ou medicinais.

O segundo maior gênero de Euphorbiaceae é *Croton* L., com aproximadamente 1300 espécies arbóreas, arbustivas ou herbáceas, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo. Em praticamente todos os ecossistemas brasileiros encontram-se representantes de *Croton*. Apenas no estado do Rio de Janeiro, reconhecem-se 39 espécies, algumas delas usadas em medicina popular com vários objetivos, inclusive para o tratamento de câncer (Pereira *et al.*, 2002).

Em muitos locais da Ásia, África e Américas, espécies de *Croton* também são apreciadas pela população como medicinais. Por exemplo, no Brasil, espécies são usadas em medicina tradicional para tratamentos de uma ampla diversidade de males, tais como hipercolesterolemia, obesidade (*Croton cajucara* Benth.), inflamações, úlcera, leucemia (*Croton celtidifolius* Baill.), inapetência, cólicas (*Croton nepetaefolius* Baill.), feridas, inflamação intestinal (*Croton palanostigma*

Klotzsch.), reumatismo, câncer (*Croton urucurana* Baill.), anorexia, distúrbios gastrointestinais, folhas e cascas usadas como adoçante (*Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm.) (Salatino *et al.*, 2007).

Muitas espécies de *Croton* apresentam látex vermelho que as caracteriza popularmente com o nome de sangue-de-adave (Brasil) e sangue-de-drago (países hispano-americanos). Entre as espécies com látex vermelho podem ser citadas *Croton lechleri* Müll.Arg., *Croton macrobothrys* Baill., *C. celtidifolius*, *C. palanostigma* e *C. urucurana*, sendo as duas últimas nativas do Brasil. Nesse látex já foram identificadas proantocianidinas (taninos catequínicos) e, em certas espécies, alguns alcaloides. Do látex de *C. lechleri* obtém-se um produto chamado SP-303 que é internacionalmente comercializado. Esse produto contém cerca de 85% de proantocianidinas, conhecidas por seu poder cicatrizante (Amaral & Barnes, 1998). Além disso, esse látex apresenta atividade antibacteriana (Chen *et al.*, 1994) e inibidora da proliferação de células de leucemia (Rossi *et al.*, 2003).

Os flavonoides encontrados em *Croton*, em sua maioria, são agliconas de flavonóis altamente metoxiladas como a artemetina, porém, atualmente, várias espécies de *Croton* vêm sendo descritas como produtoras de flavonoides glicosilados e acilados, como o tilirosídeo (Matos, 2011; Athayde, 2013). Os taninos, por sua vez, são compostos fenólicos responsáveis pela adstringência de vários frutos e produtos vegetais. Isso ocorre devido à precipitação de glicoproteínas salivares que ocasiona a perda do poder lubrificante (Bruneton, 1991). Com relação às interações ecológicas entre vegetais e herbívoros, estudos mostram que os taninos podem contribuir para a diminuição da taxa de predação por herbivoria devido à capacidade de se tornarem impalatáveis, afastando assim seus predadores naturais (Scalbert, 1991; Mole *et al.* 1993; Heldt, 1997). Estudos realizados por Scalbert (1991) e Chung *et al.* (1998) sobre a atividade biológica de taninos, mostraram importante ação contra determinados microrganismos como agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática.

São muitos os artigos que tratam dos efeitos farmacológicos de extratos de diferentes órgãos de *Croton* e de substâncias isoladas. Como exemplo, podemos citar os extratos aquosos e etanólicos de *C. schiedeana* Schltdl., que têm atividade vaso-relaxante e anti-hipertensiva (Guerrero *et al.*, 2001, 2002a); os efeitos citotóxicos observados em ensaios com o alcaloide taspina presente no látex vermelho de *Croton draco* Schltdl., *C. lechleri* e *C. palanostigma* e os diterpenos secoaurenos de *C. kongensis* Gagnep. que apresentam atividade citotóxica, antimalárica e antimicobacteriana. Vários outros efeitos de substâncias de *Croton* têm sido relatados, incluindo anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiespasmódicos, antiulcerogênicos, antivirais e miorelaxantes (Salatino *et al.*, 2007). Entre as substâncias isoladas de *Croton* a que tem recebido maior atenção em estudos sobre atividade farmacológica é a *trans*-desidrocrotonina, obtida de uma espécie nativa, *C. cajucara*. Comprovaram-se efeitos hipolipidêmico e hipoglicêmico (Maciel *et al.*, 2002), além de antiestrogênico e antitumoral (Grynberg *et al.*, 1999). Outra

substância de grande interesse farmacológico é um diterpeno de cadeia aberta chamado plaunotol (isolado de *C. sublyratus* Kurz.), com atividade potencializadora de drogas contra *Helicobacter pylori* (que causa a úlcera péptica) (Koga *et al.*, 2002) e antiangiogênica (Kawai *et al.*, 2005).

Muitas espécies de *Croton* já foram estudadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. É o caso do óleo volátil de *C. cajucara* que apresentou atividade contra *Candida albicans* (Alviano, 2005) e uma substância isolada do mesmo óleo, o 7-hidroxicalameneno, que apresentou atividade contra cepas resistentes à metilicina de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* (Azevedo *et al.*, 2013). Os extratos hidroalcoólicos de *Croton campestris* A. St-Hil. apresentaram atividades frente a *S. aureus* e *Escherichia coli* e óleo obtido da casca e do caule de *C. urucurana* mostrou atividade frente a sete bactérias gram-positivas e gram-negativas (Simionatto, 2009).

A grande diversidade de espécies e morfologias que ocorrem em *Croton* o torna um gênero desafiador para estudos filogenéticos. Em 2011, o trabalho de filogenia molecular realizado por van Ee e colaboradores (2011), com enfoque nas espécies de *Croton* do Novo Mundo, dividiu o gênero em 4 subgêneros: *Croton* subg. *Quadrilob* (Müll. Arg.) Pax in Engl. & Prant, subg. *Adenophylli* (Griseb.) Riina, subg. *Geiseleria* A. Gray e subg. *Croton* (exclusivamente do Velho Mundo), e descreve 10 novas seções, resultando em 31 seções que incluem todas as espécies do Novo Mundo, 11 delas monotípicas.

1.3.1. *Croton sphaerogynus* Baill.

Croton sphaerogynus, seção *Cleodora* (Klotzsch) Baillon (Étude Euphorb.: 369. 1858 ≡ *Cleodora* Klotzsch em Arch. Naturgesch. 7: 196. 1841 - Tipo: *Cleodora sellowiana* Klotzsch ≡ *Croton pachycalyx* Müll. Arg. = *C. sphaerogynus* Baill. = *Croton* sect. *Stolidanthi* Baill. em Adansonia 4: 323. 1864 - Tipo: *C. heterocalyx* Baill., lectótipo designado por Webster em Taxon 42: 800. 1993) é uma árvore nativa da Mata Atlântica do Brasil do tipo arbustiva, com ocorrência nos Estados da Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo (Figura 1.3) onde normalmente é observada com flores nos meses de junho e novembro e com frutos em junho. Tal espécie possui uma distribuição geográfica restrita sendo a maioria de florestas de restinga na costa atlântica do Brasil.

Como característica das espécies do gênero, possui na base de seu pecíolo, glândulas que, no caso de *C. sphaerogynus*, mostram-se globosas e sésseis. Como características de extrema importância para sua identificação em campo, além das glândulas globosas podemos citar as folhas oval-lanceoladas a ovais, com base cordada a sagitada, sendo os lobos basais sobrepostos e a presença de tricomas no arbusto bem como em suas inflorescências, flores masculinas e femininas, estiletes e frutos (Figura 1.3) (Caruzo *et al.*, 2010). Uma característica interessante dessa espécie é o

seu hábito arbóreo, o que facilita a obtenção de grandes massas tanto de folhas quanto de caules para as análises de caracterização e isolamento de substâncias.

Figura 1.3 - Distribuição geográfica de *C. sphaerogynus* Baill. no Brasil (Cordeiro *et al.* 2010). Características morfológicas de *C. sphaerogynus*. A: Hábito; B: glândula basilaminar; C: Flor pistilada; D: Flor estaminada; E: Frutos (Caruzo *et al.*, 2010).

1.4. Atividades antioxidantes de produtos naturais vegetais

Os radicais livres ou, menos especificamente, espécies reativas de oxigênio (ERO), são produtos do metabolismo das células. Tais ERO são associadas com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e a síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, em excesso, estas substâncias apresentam efeitos prejudiciais tais como a peroxidação dos lípidos de membrana, danos para as proteínas que se encontram em tecidos e membranas e danos para as enzimas e o DNA (Husain *et al.*, 1987). Devido a isso, acredita-se que uma série de doenças como câncer, artrite, arteriosclerose, diabetes, malária, AIDS e doenças do coração, tenha um componente importante de estresse oxidativo com a presença de ERO. Além disso, sabe-se também que as ERO estão diretamente relacionadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (Brenna & Pagliarini, 2001; Yildirim *et al.*, 2001).

Antioxidantes naturais, particularmente em frutas e vegetais têm ganhado interesse crescente entre os consumidores e a comunidade científica, pois estudos epidemiológicos indicaram que o consumo frequente de antioxidantes naturais está associado a um menor risco de doenças cardiovasculares e câncer (Renaud *et al.*, 1998.; Temple, 2000; Thaipong *et al.*, 2006; Roby *et al.*, 2013).

Os efeitos de defesa de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: vitaminas, compostos fenólicos e carotenóides. O ácido ascórbico e compostos

fenólicos são conhecidos como antioxidantes hidrofílicos, enquanto que os carotenóides são conhecidos como antioxidantes lipofílicos (Halliwell, 1996).

A atividade antioxidante de substâncias fenólicas como flavonoides, taninos condensados e/ou hidrolisáveis, fenilpropanoides e ácidos fenólicos provenientes dos vegetais (portanto classificados como naturais), é caracterizada pela propriedade de oxido-redução que lhes é atribuída, a qual pode desempenhar uma importante função na neutralização de ERO (Antunes & Canhos, 1984; Simão, 1985; Fennema, 1993; Brenna & Pagliarini, 2001; Zheng & Wang, 2001). Particularmente, o grupo dos flavonoides tem merecido destaque por apresentar inúmeras propriedades farmacológicas. Algumas das propriedades farmacológicas se dão devido à inibição de certas enzimas, mas principalmente pelo seu alto poder antioxidante (Haenen *et al.*, 1993; Brandi, 1992; Perez-Vizcaino *et al.*, 2012; Farias & Santos, 2013).

Frutas e bebidas, como chá, vinho tinto e café constituem as principais fontes de polifenóis na dieta, entretanto legumes, leguminosas e cereais também são boas fontes e seu consumo diário pode atingir facilmente 1 g, no caso de pessoas que consomem grandes quantidades dessas substâncias por dia (Manach *et al.*, 2004). Apesar da distribuição abundante em plantas, os efeitos desses compostos na saúde humana tornaram-se foco de atenção apenas na década de 90.

As plantas sintetizam centenas de substâncias fenólicas e polifenólicas, que possuem variadas estruturas e funções. Entre estas substâncias, as mais estudadas como antioxidantes são os flavonoides que têm em comum a estrutura C₆-C₃-C₆ (Figura 1.4), consistindo de dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico oxigenado. Dentre os aproximados 4000 flavonoides já descritos, as principais classes são flavonóis, flavonas, catequinas ou flavanas, antocianinas e isoflavonas. Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e acilação das moléculas. Além disso, como citado anteriormente, flavonoides formam complexos com açúcares, lipídeos, aminas e ácidos carboxílicos (Duthie *et al.*, 2000; Sun *et al.* 2002).

Numerosos estudos *in vitro* indicam que polifenóis encontrados em plantas podem, efetivamente, participar de processos que possam ter implicações anticarcinogênicas e antiaterogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz ERO e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância. A capacidade antioxidante dos polifenóis é influenciada pelo número e posição dos grupos hidroxílicos (OH), assim como pelas posições de glicosilação (Sun *et al.*, 2002; McKay & Blumberg, 2002). Ao contrário do ácido ascórbico e α -tocoferol, que agem em meio aquoso e na camada fosfolipídica, respectivamente, os flavonoides podem se localizar nas duas fases (Sun *et al.*, 2002).

Figura 1.4 – Estrutura química das principais classes de flavonoides (Cerqueira *et al.*, 2007).

Halliwell & Gutteridge (2007) definiram antioxidantes como uma “substância presente em concentrações baixas, comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previne significativamente ou atrasa a oxidação de substratos susceptíveis”. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam ERO e a ligação de íons metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes.

Os radicais livres do oxigênio, com seus elétrons não pareados, podem atacar e danificar, praticamente, qualquer molécula encontrada no organismo. São tão ativos que, uma vez formados, ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Ao fazê-lo, eles podem entregar seu elétron não-pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, mas a molécula atacada, em si, transforma-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente sobre um tecido (Youngson, 1995).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante de um extrato ou substância possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (Alves, *et al.* 2010).

Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução de metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (DPPH[•] e ABTS[•]), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) (Frankel & Meyer,

2000; Sanchez-Moreno, 2002; Aruoma, 2003), entre outros. Dentre estes métodos, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais usados atualmente (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006; Thaipong *et al.*, 2006; Dudonné *et al.*, 2009; Pieroni *et al.*, 2011; Sánchez-Burgos *et al.*, 2013; Roby *et al.*, 2013; Bentayeb *et al.*, 2014).

1.5. Atividades antimicrobianas de produtos naturais vegetais

Além da atividade antioxidante, metabólitos secundários vegetais podem possuir outros tipos de ação biológica. Muitas plantas são capazes de possuir substâncias antimicrobianas que atuam como mecanismos de defesa química contra bactérias, fungos e vírus patogênicos (Gibbons, 2008), e devido à isso, são uma fonte potencial para a descoberta de fármacos com ação antimicrobiana.

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 espermatófitas contra *S. aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microrganismos. Embora vários estudos tenham avaliado e confirmado as propriedades antimicrobianas de diferentes extratos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Pederson, 1944), verificou-se também, que outros extratos estimulavam de modo acentuado o crescimento de *Bacillus subtilis* e *E. coli* (Sanders *et al.*, 1945).

A partir de 1950 foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais: o diterpeno biflorinina e o triterpeno maitenina. Outros compostos flavonoídicos com propriedades antimicrobianas efetivas contra *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) foram isolados, como a primina, a miconidina, lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, filantimida, luteolina e miricetina (Xu & Lee, 2001; Zacchino *et al.*, 2001).

Devido à problemática existente quanto à resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado, tornam-se imprescindíveis pesquisas voltadas ao estudo e avaliação de produtos naturais com propriedades antibióticas. Além disso, há a problemática da deterioração e toxicidade dos alimentos por microrganismos, sendo este, um problema que ainda não se encontra sob controle adequado, apesar da variedade de técnicas de preservação disponíveis. Hoje em dia, sabe-se que cada vez mais, os consumidores têm evitado alimentos preparados com conservantes de origem química. Diante disto, as alternativas naturais são, portanto, uma possibilidade para se alcançar uma vida útil mais longa aos alimentos, além de um alto grau de segurança em relação a microrganismos patogênicos de origem alimentar (Rauha *et al.*, 2000).

1.6. Atividades anti-HIV de produtos naturais vegetais

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus HIV (Human immunodeficiency virus), um retrovírus pertencente à

subfamília *Lentivirinae*. Retrovírus são vírus que contém RNA como material genético (Gallo & Montagnier, 1988).

Após mais de 30 anos, a AIDS continua a ser um dos mais sérios desafios mundiais à saúde, tendo custado mais de 35 milhões de vidas em todo o mundo. Globalmente, o HIV continua a ser a quinta principal causa de morte entre adultos e a principal causa de morte de mulheres entre 15 e 49 anos. Em 2011, 34 milhões de pessoas viviam com HIV. Apesar da queda geral no número de pessoas recém-infectadas pelo vírus, 2,5 milhões de pessoas o adquiriram em 2011, incluindo 890 mil jovens. Apenas em 2011, 1,7 milhão [1,5 a 1,9 milhão] de pessoas morreram de causas relacionadas à AIDS em todo o mundo – 24% a menos do que em 2005. No Brasil, estima-se que cerca de 630 mil indivíduos de 15 a 49 vivam com HIV. Desses, 255 mil não sabem que são portadores do vírus. De acordo com o Ministério da Saúde, desde o início da epidemia, em 1980, até junho de 2011, foram registrados 608.230 casos de AIDS (condição em que a doença já se manifestou). Nos últimos anos, tem-se observado um registro de 38 mil novos casos a cada ano, o que representa uma incidência de 20 casos por cem mil habitantes (Unaid, 2012).

O ciclo de replicação do vírus HIV envolve uma série de eventos que se iniciam com a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo, sendo essa interação mediada por uma glicoproteína do envelope do vírus. A proteína responsável pelo reconhecimento do HIV por suas células alvo é a gp120 e o principal correceptor para HIV-1 é o CD4, uma proteína tipo imunoglobulina (Ig) expressa na superfície de células T e macrófagos primários. Para que ocorra a ligação do vírus à membrana celular da célula alvo, somente a interação gp120-CD4 não é suficiente, ocorrendo daí a mobilização de um grupo de quimiocinas, essenciais ao reconhecimento da célula alvo. Após a ligação à membrana celular, uma série de mudanças conformacionais promovem a fusão vírus-célula. Após essa etapa, o capsídeo do vírion é então desencapado ocorrendo assim a liberação do conteúdo do capsídeo (RNA genômico e enzimas virais) para o citoplasma da célula afetada. É nesse momento que a transcriptase reversa (RT) participa da síntese de uma cópia de DNA de fita dupla formando um complexo nucleoprotéico que é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira. Por ação de enzimas como a integrase, ocorre a integração do cDNA do genoma viral no DNA cromossômico. Uma vez que o pró-vírus é integrado no DNA hospedeiro, RNAs virais são transcritos e transportados para o citoplasma onde serão traduzidos. A tradução dos mRNAs virais fornece uma série de proteínas e poliproteínas que, após uma série de modificações, atuam na montagem do vírus. Os vírions são inicialmente montados próximos à membrana celular e neste momento são compostos de um envelope glicoproteico, RNA genômico e poliproteínas virais. Neste processo, denominado “brotamento”, as partículas virais passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação. É na maturação que ocorre a clivagem de certas poliproteínas pela enzima protease do vírus, dando origem a outras enzimas e a

proteínas estruturais do capsídeo completando o ciclo de replicação do HIV. Os vírions maduros, por sua vez, são capazes de infectar um linfócito adjacente (Peçanha *et al.*, 2002).

É inegável que a terapia combinada de medicamentos anti-HIV atualmente disponível promoveu maior tempo e qualidade de vida aos pacientes diagnosticados com HIV/Aids. Por outro lado, o surgimento de resistência ao vírus HIV, além dos efeitos colaterais e longo prazo do tratamento são as principais causas para o fracasso da terapia antiretroviral (ART). Dessa forma, o contínuo desenvolvimento de novos agentes anti-HIV torna-se inevitável (Wang *et al.*, 2006).

Produtos naturais tem sido uma fonte de sucesso na descoberta de novos medicamentos anti-HIV. Muitas substâncias com tal efeito vêm sendo sintetizadas a partir de produtos naturais e as descobertas são cada vez mais promissoras. A maior parte delas inibe a ação do vírus em quase todas as fases de seu ciclo de vida (Wang *et al.*, 2004). Tais substâncias incluem os alcaloides, polissacarídeos sulfatados, polifenóis, flavonoides, cumarinas, taninos, triterpenos, lectinas, floroglucinóis, lactonas, iridoides, depsídonas, derivados de *O*-cafeoil, lignanas, proteínas inativadoras de ribossomo, saponinas, xantonas, naftodiantronas, fotossensibilizadores, fosfolipídeos, quininas e peptídeos (Ng *et al.*, 1997; Vlietinck *et al.*, 1998; Yang & Cragg, 2001).

Segundo Peçanha e colaboradores (2002), diversas etapas do ciclo replicativo do HIV foram identificadas como alvos para intervenção terapêutica. Muitos estudos vêm sendo conduzidos a fim de descobrir novas drogas que atuem como inibidores de transcriptase reversa, inibidores de protease e integrase, inibidores de adsorção viral, inibidores da fusão vírus-célula, inibidores do desapeamento viral, inibidores da transcrição do DNA pró-viral e inibidores da tradução do RNA viral. Entretanto, os estudos atuais estão voltados aos inibidores de transcriptase reversa (Andréola, 2009; Lee *et al.*, 2010; César *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2012), inibidores de protease e integrase (Brik & Wong, 2003; Andréola, 2009; Filho *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011) e inibidores de replicação (Bedoya *et al.*, 2010; Leteane *et al.*, 2012).

Entre as espécies de *Croton* já estudadas quanto à atividade anti-HIV está *C. lechleri* que apresentou efeito paliativo, auxiliando a reduzir o excesso de evacuações e diarreia, comuns em pacientes que apresentam a síndrome (Holodniy *et al.*, 1999). Além deste, sementes de *C. tiglium* L. também foram utilizadas para analisar a ação de ésteres de forbol, cujos resultados apresentaram-se extremamente promissores devido à capacidade de inibição dos efeitos citopáticos do vírus HIV, evitando assim a destruição dos linfócitos (El-Mekkawy *et al.* 2000). Estudos anti-HIV em *C. sphaerogynus*, não foram relatados na literatura.

2. Hipóteses e Objetivos do trabalho

Considerando-se a grande variedade de substâncias reconhecidas como metabólitos secundários e a grande diversidade vegetal brasileira, estudos que visam à identificação e descrição de novas substâncias são importantes.

Croton constitui um gênero altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias naturais farmacologicamente ativas, favorecido pela grande diversidade de espécies que ocorre em biomas brasileiros.

Em 2011, van Ee e colaboradores propuseram uma filogenia molecular para espécies de *Croton* do Novo Mundo, estimados em dois terços (aproximadamente 712) do total de espécies descritas para esse gênero. Os autores reconheceram 31 seções e 10 subseções para os táxons do Novo Mundo utilizando marcadores moleculares de todos os três genomas (nuclear, cloroplasto e mitocondrial) (Figura 2.1).

Também em 2011, Caruzo e colaboradores analisaram as semelhanças entre as espécies de *Croton* comparando o sequenciamento de duas regiões do cloroplasto (trnL-F, trnH-psbA) e do núcleo (ITS) (Figura 2.2). Nesse estudo, os autores buscaram pela filogenia e histórico evolutivo da seção *Cleodora*. Segundo os autores, *Cleodora* é um grupo de particular interesse devido a englobar as espécies *C. cajucara*, *C. hemiargyreus* Müll. Arg. e *C. heterocalyx* Baill., todas descritas na literatura em relação a suas propriedades farmacológicas e usos na medicina popular. Para os autores, estudos filogenéticos de grupos com importância farmacológica são importantes para orientar futuros trabalhos de bioprospecção (Caruzo *et al.*, 2011).

Partindo da premissa que *C. sphaerogynus* pertence à seção *Cleodora*, das 40 espécies estudadas por Caruzo e colaboradores (2011), *C. sphaerogynus* emergiu no mesmo clado que *C. cajucara*, evidenciando um próximo parentesco entre essas duas espécies. *C. cajucara* é uma espécie em testes clínicos de algumas de suas substâncias isoladas, tendo indicações terapêuticas para diabetes, distúrbios hepáticos e renais, anti-inflamatório, antimicrobiano, entre outras (Grynberg *et al.*, 1999; Maciel *et al.*, 2002; Alviano, 2005; Salatino *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2013). Dessa forma, *C. sphaerogynus* se torna uma espécie promissora na prospecção de substâncias bioativas.

Alguns estudos foram e vêm sendo conduzidos no Laboratório de Fitoquímica (IB-USP) a fim de caracterizar, isolar e identificar substâncias pertencentes às classes químicas dos terpenos e alcaloides isolados de espécies de *Croton*. Motta e colaboradores (2013) verificaram uma maciça presença de diterpenos do tipo abietanos e podocapanos em *C. sphaerogynus*, apontando para esta classe de metabólitos secundários como responsável pela atividade antiproliferativa verificada pelos autores. Outros estudos, analisando espécies relativamente próximas a seção *Cleodora*, como *C.*

vulnerarius Baill. e *C. echinocarpus* Müll. Arg., ambas pertencentes à seção *Cyclostigma*, apontaram para o potencial antimicrobiano, antioxidante e anti-HIV de flavonoides e alcaloides presentes nessas espécies (Athayde, 2013).

Diante do exposto, nossa premissa foi a de atribuir a atividade biológica não somente a presença de diterpenos, como verificado por Motta e colaboradores (2013), mas também a composição de flavonoides e fenilpropanoides presentes na espécie. Este trabalho teve como objetivo investigar a composição e o potencial biológico de substâncias fenólicas presentes nos extratos foliares e caulinares de *C. sphaerogynus*. Essa espécie vem sendo estudada com relação a sua composição terpenoídica, mas nada se sabe sobre a sua composição fenólica.

Como objetivos específicos deste estudo temos:

1. a caracterização química de flavonoides e fenilpropanoides de folhas e caules de *C. sphaerogynus*;
2. o fracionamento, isolamento e identificação dos constituintes fenólicos majoritários presentes nos extratos;
3. a análise do potencial antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV-1 do extrato, suas frações e subfrações.

Figura 2.1 - Filograma de análise Bayesiana combinando dados moleculares de ITS (nuclear), exon 9 *EMB2765* (nuclear), *trnL-F* (cloroplasto) e *rps3* (mitocondrial) de espécies de *Croton*. Clados fortemente apoiados ($\geq 90\%$ PP Bayesiana e $\geq 90\%$ ML BS) estão representados por linhas grossas, clados moderadamente apoiados ($\geq 90\%$ PP Bayesiana e $\geq 75\%$ ML BS) estão representados por linhas grossas tracejadas e as linhas finas representam clados pouco apoiados. Os nomes à direita representam as seções e os asteriscos representam as seções que não foram enquadradas como grupos monofiléticos (retirado de van Ee *et al.*, 2011).

Figura 2.2 - Filograma de análise Bayesiana combinando dados de *trnL-F*, *trnH-psbA* e ITS para 40 espécies de *Croton*, ênfase na seção *Cleodora* (retirado de Caruzo *et al.*, 2011). Destaque para o clado formado por *C. sphaerogynus*, *C. cajucara*, *C. heterocalyx* e *C. organensis*.

3. Material e métodos

3.1. Coleta do material

O material vegetal foi coletado dia 24/01/2012 no período da manhã na cidade de Itanhaém, litoral sul de São Paulo. A coleta de caules e folhas de uma mesma população foi realizada com o auxílio da pesquisadora Lucimar Barbosa da Motta. Para que a coleta fosse realizada com sucesso, algumas características observadas em campo foram essenciais, como por exemplo, as glândulas globosas e sésseis presentes na base do pecíolo (Figura 3.1D) e principalmente, as sépalas das flores pistiladas com prefloração quincuncial¹ (Figura 3.1C**), característica exclusiva de *Croton sphaerogynus* (Caruzo *et al.*, 2011). A confirmação da espécie foi feita pela especialista Inês Cordeiro do Instituto de Botânica. Voucher do material coletado (LBM65) foi depositado nos Herbários do Instituto de Biociências, USP (SPF) e do Instituto de Botânica, SMA (SP).

Figura 3.1 – (A): Indivíduo adulto de *C. sphaerogynus*; (B): detalhe do caule com látex avermelhado; (C): flores pistiladas (**) e flores estaminadas (*); (D): glândulas na base do pecíolo; (E): detalhe da área de coleta com vegetação de restinga (Fotos: Claudia Furlan).

3.2. Extração e fracionamento

Após secagem em estufa a 40° C por uma semana e moagem em moinho de facas, folhas (aproximadamente 1 kg) e caules (aproximadamente 20 g) foram submetidos à maceração em etanol (Synth[®]) por sete dias em temperatura ambiente e no escuro. O mesmo material (aproximadamente 20 g de cada) também foi submetido à maceração em água fervente por seis horas.

¹ Diz-se da prefloração de flores de perianto pentâmero em que duas das peças florais (tépalas ou pétalas) são completamente externas, outras duas completamente internas e a quinta cobre uma interior com uma das suas margens e tem a outra coberta pela margem de uma das peças exteriores.

Os extratos aquosos foram diretamente secos em liofilizador. Os extratos etanólicos foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C, liofilizados e pesados para obtenção do rendimento.

Para iniciar o processo de fracionamento do extrato bruto etanolico, o extrato liofilizado (70,62 g) foi retomado em metanol (Synth[®]) e particionado com hexano (Synth[®]). Após a partição, as frações metanólica e hexânica foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e, liofilizadas. Neste estudo, apenas a fração metanólica foi subfracionada a fim de se isolar substâncias polares bioativas. A fração hexânica, já reconhecida por possuir uma serie de diterpenos (Motta *et al.*, 2013), foi utilizada apenas para comparação dos ensaios de atividades biológicas, mas não para o isolamento de bioativos.

A fração metanólica foi submetida à cromatografia por exclusão utilizando Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare) como adsorvente e metanol como fase móvel. As subfrações foram coletadas utilizando luz UV como detecção. Foram coletadas frações a cada 10 mL de metanol, totalizando 5 subfrações.

Todos os extratos, frações e subfrações, retomados em metanol na concentração de 2 mg mL⁻¹, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (LC1260 - Agilent Technologies), utilizando uma coluna Zorbax C-18 (150 X 4.6 mm, 3,5 µm) a 40° C. O gradiente de solventes utilizado foi 0,1% ácido acético (AcOH; Synth[®]) e acetonitrila (CH₃CN; J. T. Backer[®]) começando com 15% de CH₃CN (0-20 min) e aumentando para 100% (20–25 min), isocrático por 5 min, diminuindo para 15% (30–32 min) e isocrático por 3 minutos. O fluxo dos solventes foi de 1,5 mL min⁻¹ (0-25 min), 1,0 mL min⁻¹, (25-26 min), 1,5 mL min⁻¹, (26-35 min); volume de injeção 3 µl, e detecção a 352 nm e 280 nm.

Para as subfrações obtidas por CC de Sephadex[®] com a presença de apenas 2 ou 3 substâncias evidenciadas por CLAE-DAD, foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-prep) (LC1200 - Agilent Technologies), utilizando uma coluna PrepHT XDB-C-18 (150 X 21,2 mm, 5 µm). O solvente utilizado foi metanol (J. T. Backer[®]) 85% isocrático por 10 minutos. O fluxo de solvente foi de 8 mL min⁻¹, volume de injeção 250 µl e detecção a 352 nm com a coleta das faixas por coletor automático no modulo *threshold*.

3.3. Identificação das substâncias majoritárias nos extratos, frações e subfrações

Todos os extratos, frações e subfrações, retomados em metanol (J. T. Backer[®]) na concentração de 2 mg mL⁻¹, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (LC1260 - Agilent Technologies), utilizando metodologia descrita no item 3.2. Uma identificação preliminar das diferentes bandas presentes nos

cromatogramas foi feita utilizando os espectros UV/visível nos comprimentos de onda 352 nm para a classe dos flavonoides e 280 nm para substâncias fenólicas em geral.

A subfração metanólica foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM ou CLAE-EM-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da USP em equipamento modelo Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, utilizando coluna Zorbax SB-C18 (250 X 4.6 mm, 5 μ m, Agilent, USA). Solventes: ácido acético 0,1% (AcOH; Synth[®]) e acetonitrila (CH₃CN; J. T. Backer[®]) começando com 12% de CH₃CN (0-5 min); aumentando de 12 a 20% (5-8 min); isocrático por 20 min; aumentando de 20 a 50% (28-38 min); aumentando de 50-65% (38-48 min); aumentando de 65 a 100% (48-50 min); isocrático por 5 min; diminuindo para 12% (55-60 min). Fluxo de 90 μ L min⁻¹, voltagem de 4000V, nebulizador a 27 psi, gás secante a 320°C e fluxo de 7 L min⁻¹.

A caracterização dos constituintes apolares foi realizada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando o sistema Agilent 6890/5975B. O extrato bruto, frações e subfrações foram retomados em metanol na concentração de 2 mg mL⁻¹. Foi injetado 1 μ L em coluna capilar de sílica DB-5HT (30 m x 0.32 mm x 0.10 μ m) e hélio como gás de arraste a 1 mL min⁻¹. A programação de temperatura da coluna iniciou-se a 150°C (1 min), aumentando 6°C min⁻¹ até atingir 320°C; a temperatura do injetor foi de 250°C. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV e as varreduras variavam de 40 a 450 daltons em 2 scans seg⁻¹. Para a identificação das substâncias foram realizadas comparações com espectros de massas da biblioteca e por dados conhecidos na literatura (Morais *et al.*, 2006).

Para maiores informações a respeito dos espectros de absorção UV/vis de duas subfrações com maior grau de pureza, foi utilizada, ainda, metodologia descrita por Markham (1982) com adaptações para análise espectrométrica de flavonoides. Nesta metodologia, foi possível utilizar diferentes reagentes para interpretação de reações de deslocamento dos espectros. A metodologia foi realizada em espectrofotômetro onde, após a medição do espectro da amostra (40 μ L mL⁻¹) em metanol (MeOH), 3 gotas de hidróxido de potássio (KOH; Quimex[®]) foram adicionadas à cubeta e o espectro de “MeOH/KOH” foi mensurado. Para verificar se houve decomposição da amostra, o espectro de KOH foi mensurado novamente após 5 minutos e a amostra foi descartada. Na segunda reação, seis gotas de cloreto de alumínio (AlCl₃; Vetec- Sigma-Aldrich[®]) foram adicionadas à solução de amostra em MeOH e o espectro de “MeOH/AlCl₃” foi mensurado. Na mesma cubeta, foram adicionadas 3 gotas de ácido clorídrico (HCl; Synth[®]) e após homogeneização obtivemos o espectro “MeOH/AlCl₃/HCl” sendo a solução, descartada logo depois. Na terceira reação, adiciona-se à cubeta quantidade suficiente de acetato de sódio (NaOAc; Nuclear[®]) para se atingir aproximadamente 2 mm ao fundo. Após homogeneização, o espectro “MeOH/NaOAc” foi

mensurado. O espectro “MeOH/NaOAc/H₃BO₃” foi mensurado após a adição de ácido bórico (H₃BO₃; Nuclear[®]) até se atingir aproximadamente 1 mm no fundo da cubeta.

Foi realizada hidrólise ácida seguida de cromatografia em camada delgada (CCD) de celulose das mesmas subfrações a fim de detectar ou não, a presença de glicosilações. Foram utilizadas algumas gotas das substâncias a serem analisadas, diluídas em metanol. A metodologia foi realizada em tubos de banho seco onde as amostras foram mantidas em banho seco até a evaporação total do solvente. Após, foi acrescentado a cada tubo 1 mL de HCl (Synth[®]) 2N e as amostras foram mantidas durante 1 hora a 90°C. Posteriormente, foi adicionado acetato de etila (Synth[®]) para realização de partição, com a formação de duas fases: acetato de etila (agliconas) e água (açúcares). Para verificar se houve a hidrólise e concluir se tratava-se de um flavonoide glicosilado ou não, foi realizada uma CCD de celulose utilizando a quercetina (padrão aglicona; Sigma-Aldrich[®]), rutina (padrão diglicosídeo; Sigma-Aldrich[®]), amostras antes da hidrólise e amostras após hidrólise.

3.4. Doseamento das substâncias majoritárias dos extratos, frações e subfrações

3.4.1. Quantificação por CLAE-DAD

Quercetina e campferol (flavonóis; Sigma-Aldrich[®]), nas concentrações de 0,6 a 360 ng mL⁻¹, foram usados para o preparo de curvas de calibração para a quantificação das substâncias. Foram realizadas curvas de calibração em CLAE-DAD seguindo as mesmas condições de análise utilizadas no item 3.2 e as amostras foram analisadas na concentração de 2 mg mL⁻¹. Os picos majoritários dos extratos, frações e subfrações foram quantificados utilizando a curva de cada padrão e os resultados estão expressos em miligramas do padrão por grama de amostra seca.

3.4.2. Quantificação por espectrofotometria

Extratos, frações e subfrações foram analisados quanto aos teores de substâncias fenólicas totais e flavonas/flavonóis em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). As amostras foram pesadas e diluídas em metanol (J. T. Backer[®]) para atingir as concentrações de 50, 100, 150 e 250 µg mL⁻¹. Apenas para os extratos aquosos as concentrações usadas foram de 100, 250, 500, 750 µg mL⁻¹ e as diluições foram feitas em metanol 80% para o extrato aquoso de folhas e em água ultrapura para o extrato aquoso do caule.

3.4.2.1. Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado de acordo com o método Folin-Ciocalteu modificado de Saldanha (2013). Em microplacas do tipo Elisa, extratos, frações e subfrações, 50 µL, foram misturados a 190 µL de água ultrapura, 10 µL do reagent Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich[®]) e 50 µL de carbonato de sódio (Merck[®]) 10%. Após incubação da microplaca por 30 min a 40° C, a absorbância foi detectada a 760 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). Foi utilizado como padrão para construção de curva de calibração, solução metanólica de ácido gálico (Sigma-

Aldrich®) (5 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados estão expressos em mg equivalentes a ácido gálico por grama de extrato.

3.4.2.2. Determinação do conteúdo de flavonas/flavonóis

O conteúdo de flavonas/flavonóis foi determinado de acordo com o método estabelecido por Watanabe e colaboradores (2011), com modificações. Em microplacas do tipo Elisa, extratos, frações e subfrações, 100 μL , foram misturados a 100 μL de cloreto de alumínio (Vetec- Sigma-Aldrich®) 5%. Após incubação da microplaca por 15 min a 30° C, a absorbância foi detectada a 420 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). Foi utilizado como padrão o flavonol rutina (Sigma-Aldrich®) em solução metanólica (20 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados estão expressos em mg equivalentes a rutina por grama de extrato.

3.5. Atividades biológicas

3.5.1. Ensaio de atividades antioxidantes

Extratos, frações e subfrações foram testados quanto ao seu potencial antioxidante em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). As amostras foram pesadas e diluídas em metanol (J. T. Backer®) para atingir as concentrações de 50, 100, 150 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apenas para os extratos aquosos as concentrações utilizadas foram de 100, 250, 500, 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as diluições foram feitas em metanol (J. T. Backer®) 80% para o extrato aquoso de folhas e em água ultrapura para o extrato aquoso do caule.

3.5.1.1. Redução do DPPH·

A atividade de sequestro do radical DPPH (2,2'-difeníl-1-picril-hidrazila; Sigma-Aldrich®) foi determinada de acordo com o método descrito por Rufino e colaboradores (2007a) com modificações. Uma solução de DPPH em metanol (J. T. Backer®) (0,2 mM) foi preparada no momento do teste em ambiente escuro e uma alíquota de 200 μL foi misturada a 20 μL de cada amostra em microplaca do tipo Elisa. Após incubação da microplaca por 20 min a temperatura ambiente e em ambiente escuro, a absorbância foi detectada a 515 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). Foram utilizadas como controle positivo, soluções metanólicas dos padrões Trolox (ácido carboxílico-2-(±)6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano; Sigma-Aldrich®) (6 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina (Sigma-Aldrich®) (7,5 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Como brancos foram utilizados metanol (J. T. Backer®), metanol 80% e água ultrapura.

3.5.1.2. Redução do ABTS·

O ensaio de atividade de sequestro do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico; Sigma-Aldrich®) seguiu o protocolo descrito por Rufino e colaboradores (2007b) com modificações. Primeiramente foram preparadas uma solução de ABTS (3,84 mg mL^{-1}) em água ultrapura e uma solução de persulfato de potássio (Sigma-Aldrich®) 2,6 mM ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Para a

formação do radical ABTS, as duas soluções anteriores foram misturadas na proporção de 1:1. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 12-16 horas. No momento do teste, 1 mL da mistura de ABTS[•] previamente preparada foi diluída em 30 mL de metanol (J. T. Backer[®]) (absorbância $1,1 \pm 0,2$ a 734 nm). Em microplaca do tipo Elisa, para cada 20 μ L de amostra e controles foram adicionados 280 μ L da solução de ABTS[•] diluída. A microplaca foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente e no escuro. A absorbância foi detectada a 734 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). Foram utilizadas como controle positivo, soluções metanólicas dos padrões Trolox (12 a 250 μ g mL⁻¹) e quercetina (15 a 120 μ g mL⁻¹) (Sigma-Aldrich[®]). Como brancos foram utilizados metanol (J. T. Backer[®]), metanol 80% e água ultrapura.

3.5.1.3. Poder redutor de ferro (FRAP)

O ensaio de poder redutor de ferro foi desenvolvido de acordo com o protocolo descrito por Rufino e colaboradores (2006), com modificações. A solução FRAP foi preparada no dia da análise misturando-se 25 mL de tampão acetato (0,3 M pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina; Fluka- Sigma-Aldrich[®]) 10 mM preparada em ácido clorídrico (HCl; Synth[®]) 40 mM e 2,5 mL de cloreto férrico (Sigma-Aldrich[®]) 20 mM. A solução FRAP (265 μ L) foi misturada a 25 μ L de cada amostra e 25 μ L de água ultrapura em microplaca do tipo Elisa. Após incubação da microplaca por 30 min a 37°C, a absorbância foi detectada a 595 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). Foram utilizadas como controle positivo soluções metanólicas dos padrões Trolox (6 a 200 μ g mL⁻¹) e quercetina (7,2 a 180 μ g mL⁻¹) (Sigma-Aldrich[®]). Como brancos foram utilizados metanol (J. T. Backer[®]), metanol 80% e água ultrapura.

3.5.1.4. Sistema β -caroteno/ ácido linoleico

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi utilizada a metodologia de Duarte-Almeida e colaboradores (2006), com adaptações. Foi preparada uma mistura reativa em 500 μ L de diclorometano (Synth[®]) combinando-se 21 μ L de ácido linoleico (Sigma-Aldrich[®]), 100 mg de Tween 40 (Sigma-Aldrich[®]) e 210 μ L da solução de β -caroteno (Sigma-Aldrich[®]) 2 mg mL⁻¹ (em diclorometano). O solvente foi evaporado sob nitrogênio até secagem total. Foram então adicionados 32 mL de água previamente saturada de oxigênio durante 30 minutos e a solução foi vigorosamente homogeneizada. Foi medida a absorbância da solução em equipamento EPOCH (Sellex, Inc) para assegurar que estivesse entre 0,4 e 0,5 a 450 nm. Para a reação em microplaca do tipo Elisa, foram misturados 250 μ L da solução reativa e 10 μ L das amostras e padrões. Após a primeira leitura, as placas foram mantidas a 45° C e as leituras foram feitas com intervalos de 15 min durante 120 min. Foram utilizadas como controle positivo, soluções metanólicas dos padrões Trolox (6 a 200 μ g mL⁻¹) e quercetina (7,5 a 105 μ g mL⁻¹) (Sigma-Aldrich[®]). Como brancos foram utilizados metanol (J. T. Backer[®]), metanol 80% e água ultrapura.

Os resultados foram expressos em porcentagem de proteção contra oxidação. A redução da absorbância do sistema sem antioxidante é considerada como 100% de oxidação. O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação. Subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100, tem-se o cálculo da porcentagem de proteção contra oxidação (Eq. 1).

$$100 - [(\text{Absorbância inicial da amostra} - \text{Absorbância final da amostra}) \times 100 / (\text{Absorbância inicial do controle} - \text{Absorbância final do controle})] \quad (1)$$

3.5.1.5. Atividade quelante de metais

O ensaio foi realizado segundo o método descrito por Min e colaboradores (2011), misturando-se em microplaca do tipo Elisa, 10 µL de cada extrato em 130 µL de tampão acetato 10%, 10 µL de sulfato de amônio ferroso (Sigma-Aldrich®) 1mM e 10 µL de solução de ferrozina (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4 – trizina-4',4''-dissulfônico, Fluka-Sigma-Aldrich®) 6,1 mM. A microplaca foi mantida em temperatura ambiente durante 10 minutos com agitação 120 rpm e a absorbância foi detectada a 562 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc). Foi utilizada como controle positivo, uma solução metanólica do padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich®) (5 a 100 µg mL⁻¹). Como brancos foram utilizados metanol (J. T. Backer®), metanol 80% e água ultrapura.

Para a interpretação e discussão dos resultados antioxidantes, foram analisados três parâmetros:

- (1) miligramas de substâncias equivalentes ao padrão por grama de amostra seca, utilizando as curvas obtidas com os padrões;
- (2) porcentagem de inibição da oxidação segundo Dudonneé (2009), que consiste no uso da fórmula (Absorbância do controle negativo (branco) - Absorbância da amostra)/Absorbância do controle negativo)x100; e
- (3) concentração efetiva da amostra para atingir 50% de atividade antioxidante (EC₅₀) plotando as quatro concentrações testadas para cada amostra com a porcentagem de atividade medida em cada teste.

3.5.2. Ensaio de quantificação do efeito inibidor de crescimento bacteriano

Para verificarmos a capacidade dos extratos, frações e subfrações em inibir o crescimento bacteriano seguimos o protocolo descrito por Carneiro e colaboradores (2010), com adaptações. Utilizamos as bactérias *Escherichia coli* (cepa MG1655) e *Bacillus subtilis* (cepa PY79) sendo a primeira gram-negativa e a segunda gram-positiva, respectivamente. Os procedimentos descritos a seguir foram os mesmos para as duas bactérias.

O meio sólido Luria-Bertani (LB) foi preparado utilizando 10 gr de triptona (caseína enzimática hidrolisada; Himedia[®]), 5 gr de extrato de levedura (Himedia[®]), 10 gr de cloreto de sódio (NaCl; Nuclear[®]) e 15 gr de pó de agar (Himedia[®]). Em placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo 15 mL de meio LB sólido previamente esterilizado em fluxo laminar sob luz UV, espalhou-se a bactéria e manteve-se em estufa a 30° C por 16 horas. Como controle negativo de crescimento utilizou-se uma placa com meio de cultura e sem a bactéria, mantida nas mesmas condições de incubação. Após 16 horas, uma colônia foi selecionada e adicionada a um tubo plástico contendo 5 mL de meio LB líquido (sem adição de ágar), incubando-se por 16 horas a 30°C com agitação de 120 rpm. O pré-inóculo foi diluído em 25 mL de meio LB líquido até obter-se a absorbância entre 0,001 e 0,002 (diluição de aproximadamente 1×10^6 células mL⁻¹ na escala de Mcfarland).

As amostras e padrões foram diluídos em DMSO (dimetil sulfóxido; Sigma-Aldrich[®]) 10% para atingir as concentrações de 100, 250, 500 e 1000 µg mL⁻¹. Foi utilizado como controle positivo, uma solução do padrão ampicilina (Sigma-Aldrich[®]) em DMSO 10% na concentração de 100 µg mL⁻¹.

Para a reação, foram misturados em microplacas do tipo Elisa, 280 µL de meio LB com bactéria e 20 µL das amostras e padrão. A primeira leitura (tempo zero) foi realizada imediatamente após a preparação da microplaca a 595 nm em equipamento EPOCH (Sellex, Inc) e após incubação da mesma por 16 horas a 37°C. Dois controles negativos foram utilizados: 20 µL de DMSO 10% e 280 µL de meio LB com bactéria; e 20 µL de DMSO 10% e 280 µL de meio LB sem bactéria.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi feita a subtração das absorbâncias do tempo final do tempo inicial e a formula a seguir foi utilizada (Absorbância do controle negativo (branco) - Absorbância da amostra)/Absorbância do controle negativo)x100. Além do resultado em porcentagem, foi determinado a MIC₅₀ de substâncias cujas médias de porcentagem apresentaram curva linear.

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

A preparação das soluções bem como a metodologia do teste, foi realizada de acordo com as especificações do fabricante contidas no manual do Kit de teste colorimétrico de transcriptase reversa (Roche) (disponível em lifescience.roche.com), com base no trabalho de Wang e colaboradores (2008). As amostras foram diluídas em DMSO (dimetil sulfóxido; Sigma-Aldrich[®]) 10% para atingir as concentrações de 200, 500 e 1000 µg mL⁻¹. Foi utilizado como controle positivo, uma solução do padrão Foscarnet (fosfonoformato de sódio tribásico hexahidratado; Sigma-Aldrich[®]) em DMSO 10% na concentração de 3 µg mL⁻¹.

Brevemente, para a reação, foram acrescentados a microtubos de 200 µL, 20 µL das amostras e padrões, 19 µL de tampão de lise, 20 µL de oligo (dT)₁₅+ poli-A e 1 µL da enzima HIV-1 RT. Para o branco foi utilizado DMSO 10% sem a adição da enzima; controle negativo foi preparado utilizando DMSO 10% com a adição da enzima. Após incubação por 1h a 37° C, a solução foi transferida para os módulos de reação fornecidos pelo kit e permaneceram por mais 1h a 37° C. Após o período de incubação os módulos foram lavados com tampão de lavagem e o mix preparado com tampão e anticorpo (200 µL) foi adicionado aos poços, permanecendo em incubação por mais 1 h a 37° C. Após esse período, os módulos foram lavados com tampão de lavagem e foram adicionados 200 µL de solução ABTS* para leitura da absorbância em equipamento EPOCH (Sellex, Inc) a 405 e 490 nm.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da atividade da enzima foi feita a subtração das absorbâncias de 405 e 490 nm e a fórmula a seguir foi utilizada (Absorbância do controle negativo (branco) - Absorbância da amostra)/Absorbância do controle negativo)x100. Além do resultado em porcentagem, foi determinada a EC₅₀ de substâncias cujas médias de porcentagem apresentaram uma curva linear.

3.6. Análise multivariada

Os valores obtidos em porcentagem foram utilizados em análises multivariadas utilizando o método da PCA (análise de componente principal). Para essa análise, foram utilizados os resultados de atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV-1 juntamente com os dados de composição química a fim de se observar como tais variáveis estão correlacionadas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação dos constituintes fenólicos

A fim de priorizar a obtenção de substâncias de natureza polar, utilizamos para a maceração o solvente etanol. Posteriormente o extrato etanólico foi particionado, esperando-se obter uma separação ainda maior de substâncias de natureza polar (fração metanólica) das substâncias de natureza apolar (fração hexânica). Entretanto, analisando-se por CG-EM o extrato etanólico e as duas frações, há a presença de inúmeros diterpenos em todas elas, variando apenas a intensidade em que aparecem em cada extrato (tabela 4.1; cromatogramas Anexo I).

A composição de diterpenos encontrada neste estudo foi similar à verificada previamente por Motta e colaboradores (2013), entretanto, no estudo de Motta e colaboradores, os autores utilizaram extração seriada, de forma, que o extrato hexânico apresentou apenas dois diterpenos. O extrato diclorometano foi o que apresentou a maior diversidade de substâncias, sendo o mais similar à fração hexânica deste estudo, e o extrato metanólico apresentou três diterpenos.

A maceração alcoólica à temperatura ambiente foi eficiente para a extração de substâncias fenólicas, foco deste estudo, mas também para a extração de uma diversidade maior de diterpenos, nove não descritos no estudo de Motta e colaboradores (2013). Este tipo de extração foi empregado nesta pesquisa a fim de preservar as substâncias terpenoídicas presentes no extrato, uma vez que a fração hexânica vem sendo trabalhada pela pesquisadora Lucimar Motta, objetivo este que foi alcançado. A ausência de temperatura na extração apresenta menor risco de reações químicas evitando assim a formação de artefatos provenientes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas (Maciel *et al.*, 2002). Como o objetivo maior deste estudo era avaliar a composição química fenólica, aliado ao fato que a pesquisadora Lucimar Motta vem trabalhando com a fração hexânica, esta última não foi subfracionada, sendo utilizada apenas como comparação com os outros extratos e subfrações. Entretanto, a fração metanólica e a subfração FP ainda apresentaram diterpenos em sua composição (Tabela 4.1).

O material vegetal proveniente de folhas e caules também foi submetido à extração por fervura em água, além da maceração em etanol. Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o extrato etanólico de caules, bem como para os extratos aquosos de caules e folhas estão representados na figura 4.1 (A, B e C, respectivamente). Todos foram analisados na concentração de 2 mg mL⁻¹ mas as abundâncias verificadas para as substâncias detectadas a 280 nm (eficiente para detectar flavonas, flavonóis e fenilpropanoides) são baixas.

Tabela 4.1 – Principais constituintes do extrato etanólico (EtOH), frações metanólica (MeOH) e hexânica (Hex) e subfração FP (FP) e seus respectivos dados de CG-EM.

	Tr (min)	MM	MS: <i>m/z</i> (intensidade, %)	Constituinte	Porcentagem Relativa (%)			
					EtOH	MeOH	Hex	FP
1	14,8	272	272 (100), 257 (50), 229 (80), 187 (40), 148 (60), 136 (80), 105 (90)	Abieta-8, 11-dieno	-	-	3,8	-
2	15,2	278	123 (38), 111 (21), 97 (31), 96 (20), 95 (50), 84 (23), 83 (39), 82 (47), 81 (50), 71 (100)	NI	-	0,9	1,6	-
3	16,2	306	107 (25), 108 (36), 95 (72), 94 (26), 93 (53), 91 (33), 81 (52), 80 (42), 79 (100), 77 (22)	NI	-	-	1,3	-
4	16,4	286	286 (60), 271 (100), 135 (90), 119 (70), 107 (70), 91 (100), 79 (70)	Abieta-8,11-dieno-3-ona	36,0	22,3	27,6	23,8
5	16,7	286	286 (60), 271 (100), 135 (80), 119 (70), 107 (70), 105 (60), 93(80), 91 (90), 79 (70)	Abieta-8,11,13-trieno-3-ol	5,4	6,5	7,7	7,1
6	16,9	288	288 (20), 270 (30), 255 (30), 135 (100), 119 (30), 107 (40), 91 (40)	Abieta-8,11-dieno - 3-ol	4,6	8,0	3,3	8,9
7	17,2	286	286 (100), 271 (50), 257 (55), 243 (40), 229 (50), 215 (40), 201 (60), 187 (50), 133(60), 119 (80), 105 (100), 91 (100), 79 (80)	Podocarp-7-eno,13-metil-13-vinil-3-ona	11,2	17,9	18,5	17,9
8	17,5	286	229 (52), 213 (43), 131 (39), 119 (33), 107 (42), 105 (67), 93 (49), 91 (100), 79 (57), 77 (45)	NI	2,1	2,5	0,9	2,7
9	17,7	288	255 (53), 133 (58), 119 (83), 107 (61), 106 (56), 105 (100), 93 (58), 91 (85), 81 (65), 79 (67)	NI	0,9	3,8	1,5	4,6
10	18,0	284	284 (36), 269 (74), 227 (100), 185 (36), 171 (27), 143 (30), 129 (30), 128 (26), 125 (30), 91 (24)	NI	3,6	1,7	1,6	1,4
11	18,1	286	286 (55), 135 (78), 133 (79), 119 (100), 107 (84), 105 (99), 93 (66), 91 (90), 79 (63), 77 (44)	NI	-	1,3	1,8	1,6
12	18,2	286	243 (79), 201 (58), 119 (40), 107 (42), 105 (65), 93 (52), 91 (100), 81 (47), 79 (62), 77 (41)	NI	6,7	4,0	3,3	3,4
13	18,6	286	286 (100), 271 (30), 253 (30), 243 (50), 136 (50), 105 (70), 91 (60)	Abieta-8,11,13-trieno-12-ol	10,3	13,9	21,8	13,5
14	19,2	288	288 (100), 273 (20), 255 (30), 245 (30), 227 (60), 136 (60), 105 (70), 91 (60)	Podocarp-7-eno-3-ol, 13-metil-13-vinil	1,6	6,2	4,0	6,0
15	19,3	302	302 (40), 287 (50), 246 (50), 231 (40), 175 (70), 147 (40), 161 (30), 135 (60), 119 (80), 105 (70), 91 (100)	13-hidroxi-abieta-8,11-dieno-7-ona	4,2	2,1	-	1,9
16	20,3	300	300 (60), 282 (20), 257 (30), 225 (80), 197 (100), 183 (60), 162 (50), 141 (50), 105 (40), 91 (50)	11-hidroxi-abieta-8,11,13-trieno-7-ona	2,2	0,9	-	1,2
17	20,5	302	284 (97), 185 (54), 143 (57), 134 (54), 131 (82), 129 (54), 105 (67), 91 (100), 79 (56)	NI	-	1,2	-	1,3
18	20,6	300	300 (20), 285 (100), 267 (30), 243 (20), 225 (40), 183 (20), 143 (20), 105 (20), 91 (30)	Abieta-6,8,11,13-tetraeno-3,12-diol	10,2	4,8	0,7	4,2
19	21,1	286	285 (76), 275 (71), 225 (100), 267 (64), 143 (57), 131 (55), 129 (60), 128 (62), 105 (55), 91 (76)	NI	-	1,2	-	0,4
20	21,2	302	302 (50), 287 (100), 284 (90), 269 (40), 259 (50), 227 (30), 213 (50), 185 (50), 133 (60), 121 (60), 105 (70), 91 (80)	Abieta-8,11,13-trieno-6,14-diol	0,9	0,9	-	-
NI					8,8	9,7	7,1	7,8

Tr (min): tempo de retenção em minutos; MS: massa molecular; NI: não identificado

Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (280 nm) dos extratos de caules e folhas de *C. sphaerogynus*, (A): extrato etanólico de caules; (B): extrato aquoso de caules; (C): extrato aquoso de folhas. Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações apresentadas na tabela 4.2.

Pode-se observar que os mesmos apresentaram uma variedade de substâncias que de acordo com as características de seus espectros de UV/vis (Figura 4.2 e tabela 4.2), foi evidenciada a presença de 16 substâncias das classes de ácidos fenólicos e fenilpropanoides. Devido à baixa resolução dos espectros, não foi possível a caracterização das substâncias 17 a 23 e por isso, as mesmas não estão presentes na tabela 4.2.

A proposta inicial foi trabalhar com todos os extratos provenientes das extrações, inclusive com os extratos aquosos e o extrato etanólico de caules. Entretanto, na tabela 4.2, pode-se verificar que é praticamente inexistente a presença de substâncias da classe dos flavonoides nesses últimos extratos. Testes antioxidantes preliminares indicaram baixa atividade para essas três amostras e, além disso, problemas na solubilização das mesmas foram encontrados no decorrer dos ensaios. Unindo esses fatores à baixa abundância das substâncias, optou-se pelo não fracionamento desses extratos.

Figura 4.2 - Espectros de absorção em UV/vis dos constituintes detectados por CLAE-DAD (280 nm) no extrato etanólico e aquoso de caules e extrato aquoso de folhas de *C. sphaerogynus*. Números de 1 a 16 correspondem às identificações apresentadas na tabela 4.2.

As substâncias fenólicas são caracterizadas por conter pelo menos uma hidroxila funcional ligada a um anel aromático. As principais funções gerais exercidas pelas substâncias fenólicas nas plantas são a de defesa contra herbívoros e patógenos, atrativo de polinizadores, proteção contra radiação ultravioleta (UV), redução no crescimento de plantas competidoras adjacentes e suporte mecânico (lignina) (Taiz & Zeiger, 2009).

Os fenilpropanoides são substâncias fenólicas simples que possuem um anel benzênico (C_6) e uma cadeia lateral de carbonos que podem variar de três (C_6C_3) nos fenilpropanóides a um (C_6C_1) quando ocorre a perda de duas moléculas de carbonos, características de substâncias derivadas do ácido benzóico (Taiz & Zeiger, 2009). É a presença desses anéis que caracteriza o espectro de UV/vis dos ácidos fenólicos e fenilpropanoides, que apresentam somente uma banda máxima de absorção no espectro UV/vis (Figura 4.2). Para os extratos de caules, esperava-se encontrar a

presença de taninos, como os ácidos gálico e elágico, entretanto, com o uso de amostras autênticas, foi detectada a presença apenas de ácido gálico. Fenilpropanoides detectados tiveram correspondência apenas com o padrão de ácido cafeico e derivados de ácido clorogênico.

Tabela 4.2 – Constituintes majoritários dos extratos etanólico e aquoso de folhas e extrato aquoso de caules de *C. sphaerogynus*, analisados por CLAE-DAD e identificados pelo padrão de absorção UV/vis e tempo de retenção de amostras autênticas.

Constituinte	Tr (min)	UV/visível (nm)	Sugestão
1	1,22	278	Ácido Gálico
2	1,37	312	NI
3	1,41	276	NI
4	1,42	312	NI
5	1,53	310	NI
6	1,62	266, 284	NI
7	1,70	278	NI
8	1,92	278	NI
9	2,14	268, 310	Derivado do ácido clorogênico
10	2,36	276, 312	Ácido cafeico
11	4,64	276	NI
12	4,75	280, 312	Derivado do ácido clorogênico
13	5,13	268	NI
14	7,37	284, 320	Derivado do ácido clorogênico
15	23,72	242, 288 (om), 350	NI
16	24,21	316	NI

Tr: tempo de retenção médio em minutos. NI: não identificado

Da mesma forma, o extrato etanólico e frações metanólica e hexânica de folhas foram analisados por CLAE-DAD. Os cromatogramas estão apresentados na figura 4.3, onde pode ser observada a semelhante composição do extrato etanólico (Figura 4.3A) e a fração metanólica (obtida após a partição; Figura 4.3B), porém os constituintes no extrato etanólico apresentam-se em menores abundâncias. Como esperado, a fração hexânica apresentou praticamente a ausência de substâncias fenólicas analisadas em CLAE-DAD com detecção de 352 nm e 280 nm, comumente utilizadas para a análise de substâncias fenólicas.

Nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para os extrato etanólico de folhas e frações metanólica e hexânica, podemos sugerir uma grande variedade de flavonoides glicosilados e agliconas. Isso porque em coluna de fase reserva (utilizada para esta análise) os grupos funcionais presentes na fase estacionária são de natureza apolar. Dessa forma, os flavonoides glicosilados (mais polares que suas agliconas), possuem interação fraca com tais grupos, sendo, portanto arrastados pela fase móvel e detectados em tempos de retenção menores do que as agliconas ou substâncias metiladas que, por sua vez, possuem uma forte interação com os grupos funcionais, fazendo com que eles sejam arrastados e detectados em tempos maiores de retenção (Collins *et al.*, 2006). O uso de amostras autênticas auxilia na definição de intervalos de tempo de retenção para mono, di, triglicosídeos e, ainda, suas agliconas.

Figura 4.3 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (352 nm) de extratos de folhas de *C. sphaerogynus* onde (A): extrato etanólico de folhas; (B): fração metanólica e (C) fração hexânica. Os números acima de cada pico correspondem às possíveis identificações apresentadas na tabela 4.3. A partir da substância 20 até a 28 a caracterização não foi possível devido à baixa resolução dos espectros UV/vis.

Analisando-se por CLAE-DAD a composição do extrato etanólico e suas frações, pode-se verificar que a partição em funil de separação foi eficiente para o fracionamento de substâncias fenólicas, que se concentraram na fração metanólica, preservando totalmente a composição do extrato etanólico. Entretanto, embora a fração hexânica resultasse livre da presença de substâncias fenólicas, por ser uma espécie rica na composição e quantidades de diterpenos, a partição não foi eficiente para eliminar da fração polar (metanólica) essa classe de substâncias (ver cromatogramas no anexo I).

Para o fracionamento das substâncias fenólicas, optou-se pelo uso de cromatografia em coluna (CC) de Sephadex[®]. A fração metanólica, após o fracionamento, resultou em 5 subfrações que serão referidas pelos seguintes nomes: subfrações FP, F1A, F2A, F3A e F4A.

Tabela 4.3 – Componentes majoritários obtidos por CLAE-DAD (352 nm) e CLAE-EM presentes no extrato etanólico, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Constituintes	Tr (min)	UV/ visível (nm)	Espectro de massas		Sugestões
			$[m/z]^+$	$[m/z]^-$	
1	1,75	254, 264 (om), 348			derivado de quercetina
2	2,96	256, 264 (om), 296 (om), 354	757,8; 611,1; 465; 303	755,7	quercetina triglicosídeo (2 ramnose; 1 hexose)
3	3,16	260, 296, 356	741,8; 595,1; 433,1; 286,8		campferol triglicosídeo (2 ramnose; 1 hexose)
4	4,05	264, 292, 346	741,8; 595,1; 287		campferol rutnosídeo (1 ramnose; 1 glicose)
5	4,30	264, 294, 348	741,9; 595,2; 448,7; 287	739,6	derivado de campferol
6	4,99	256, 266 (om), 294 (om), 354	595, 303		quercetina diglicosídeo (1 pentose; 1 hexose)
7	5,33	256, 266 (om), 294 (om), 354	661,1; 465	608,9	Rutina
8	6,04	264, 294, 348	595 [#] , 286,9	593	campferol rutnosídeo (1 ramnose; 1 glicose)
9	6,35	256, 264 (om), 296 (om), 354	479, 316,9		Isoramnetina monoglicosídeo (1 hexose)
10	7,30	264, 294, 348	448,9; 286,9		campferol monoglicosídeo (1 hexose)
11	9,23	264, 294, 346			derivado de campferol
12	10,10	256, 268 (om), 356			derivado de quercetina
13	10,72	264, 294, 346			derivado de campferol
14	10,97	256, 264 (om), 306 (om), 348	449,0; 302,9	447	Quercitrina
15	20,44	262, 294, 340			derivado de campferol
16	22,95	254, 270, 298, 370			Quercetina
17*	23,23	256, 266 (om), 298 (om), 356	317, 302	314,8	Quercetina 3,7-metoxilado
18	23,55	264, 292, 320, 366			Campferol
19*	23,73	266, 294, 350			Campferol 3-metoxilado
20	23,84	254, 268 (om), 294 (om), 356			derivado de quercetina

Tr: tempo de retenção médio em minutos. *: Substâncias com o maior grau de fracionamento, submetidas às reações de deslocamento e hidrólise ácida.

Os cromatogramas das subfrações FP, F1A e F2A provenientes da cromatografia em CC de Sephadex[®] da fração metanólica, estão apresentados na figura 4.4. Podemos observar a presença dos mesmos constituintes da fração metanólica e semelhanças qualitativas entre as subfrações, com maior abundância de substâncias fenólicas mais polares (com menores tempos de retenção). As subfrações F1A e F2A foram as que apresentaram maior diversidade de substâncias, mas com a presença de constituintes majoritários diferentes. Por exemplo, na subfração F1A (Figura 4.4B), a substância de tempo de retenção 5,33 minutos é uma das majoritárias, enquanto na fração F2A, a substância de tempo de retenção 10,98 minutos é a majoritária (Figura 4.4C).

Figura 4.4 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (352 nm) após fracionamento em CC de Sephadex[®] da fração metanólica: (A): subfração FP; (B): subfração F1A; (C): subfração F2A. Os números acima de cada pico correspondem as possíveis identificações apresentadas na tabela 4.3. A partir da substância 20 até a 28 a caracterização não foi possível devido à baixa resolução dos espectros de UV/vis.

Os cromatogramas das subfrações F3A e F4A estão apresentados na figura 4.5, onde se pode observar claramente um maior isolamento de constituintes de caráter mais apolar (com maiores tempos de retenção). A subfração F4A é composta praticamente por uma única substância, **17**.

Observando o perfil do espectro de absorção em UV/vis para cada constituinte (Figura 4.6), observamos a presença de duas bandas de absorção máxima em todas as substâncias, sem exceção.

Diversos estudos por espectroscopia revelaram que a maioria dos flavonóis exibe duas bandas principais de absorção: banda I (330-360 nm), que representa a absorção do anel B, e a banda II (250-280nm), correspondente à absorção do anel A (Markham, 1982). As 20 substâncias analisadas apresentaram espectros de absorção característicos da classe dos flavonóis. Sabe-se que a presença de um ombro no maior comprimento da banda II indica a presença de dois oxigênios vicinais no anel B do flavonoide, característico de substâncias derivadas de quercetina, como podemos observar nos espectros **1, 2, 6, 7, 9, 12, 14, 16, 17 e 20** da figura 4.6.

Figura 4.5 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (352 nm) após fracionamento em CC de Sephadex® da fração metanólica: (A): subfração F3A; (B): subfração F4A. Os números acima de cada pico correspondem as possíveis identificações apresentadas na tabela 4.3.

A ausência de ombro no maior comprimento da banda II indica a presença de apenas um oxigênio no anel B do flavonoide, caracterizando substâncias derivadas de campferol (Markham, 1982), como podemos observar nos espectros das substâncias **4, 5, 8, 10, 11, 13, 15, 18 e 19** da figura 4.6.

Com a análise preliminar dos espectros UV/vis pode ser observada uma composição baseada na presença de derivados de quercetina e de campferol. Não foi observada a presença de flavonas nessa espécie, que apresentam o máximo de absorção da banda I em 350 nm, além de espectros bem característicos (Markham, 1982). Alguns dos derivados puderam ser identificados combinando-se a informação dos tempos de retenção de amostras autênticas, como rutina, quercitrina, quercetina, campferol e isoramnetina.

Figura 4.6 - Espectros de absorção UV/vis dos constituintes detectados por CLAE-DAD (352 nm) no extrato, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*. Os números de 1 a 20 correspondem às identificações apresentadas na tabela 4.3.

Pesquisadores do laboratório de Fitoquímica da Universidade de São Paulo (USP), analisando quatro espécies de *Croton* pertencentes à seção *Lamprocroton*, sendo elas *C. dichrous* Mull. Arg., *C. erythroxylodes* Baill., *C. myrianthus* Mull. Arg. e *C. splendidus* Mart., verificaram a presença de flavonas como apigenina e luteolina, entretanto, substâncias do grupo dos flavonóis foram mais abundantes em todas as espécies, com exceção de *C. splendidus* que apresentou maior proporção de flavonas em suas folhas (Savietto, 2011). Com exceção de *C. dichrous*, a flavona C-glicosilada vitexina, também foi observada em *C. erythroxylodes*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, substância

esta também relatada por Athayde (2013) em *C. echinocarpus* e *C. vulnerararius*, estas últimas, pertencentes à seção *Cyclostigma*.

Comparando-se *C. sphaerogynus* às quatro espécies de *Croton* estudadas por Savietto (2011), constataram-se algumas características comuns ao gênero, como a presença de rutina e maior proporção de flavonóis do que flavonas. Entretanto, algo muito interessante de se notar foi que, ao contrário de *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. echinocarpus* e *C. vulnerararius*, não foi detectada a presença do flavonol acilado tilirosídeo (campferol *p*-cumaroil) em *C. sphaerogynus*, assim como o observado por Savietto (2011) em *C. splendidus*.

Este flavonol também foi observado em extratos alcoólicos de *C. echinocarpus* e *C. vulnerararius*, ambos *Cyclostigma* (Athayde, 2013), e extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*, seção *Lamprocroton* (Soares, 2013). O flavonol tilirosídeo também foi observado por Matos (2011) ao estudar os flavonoides de cinco espécies de *Croton*, sendo estas pertencentes às seções *Barhamia*, *Argentini* e *Cleodora* (segundo classificação de van Ee e colaboradores, 2011). Entre elas *C. hemiargyreus* foi a que apresentou a menor abundância deste flavonol, o que é interessante, já que se trata de uma espécie pertencente à seção *Cleodora*, a mesma de *C. sphaerogynus*.

Maciel e colaboradores (2002), estudando *C. cajucara*, também pertencente à seção *Cleodora*, apontam para a presença de derivados de campferol, especialmente caempferol 3,4,7-trimetil éter e não relataram a presença de vitexina ou tilirosídeo nessa espécie. Esses resultados sugerem algumas diferenças na composição flavonoídica entre as espécies de *Croton* e estas podem ser dependentes da seção estudada.

A cromatografia por exclusão de tamanho que é a realizada na CC de Sephadex[®] possui propriedades desejáveis para separação de substâncias com massas molares abaixo de 1000, como exemplo os flavonoides. Além disso, também apresenta relativa simplicidade na execução da técnica. As partículas estacionárias compõem um gel preparado com o mesmo solvente utilizado na extração das substâncias a serem separadas. Sephadex[®] LH-20, um gel, é um hidroxipropil derivado de dextrana, que pode ser usado com solventes orgânicos polares ou misturas aquosas contendo esses solventes (Collins *et al.*, 2006). Alguns trabalhos utilizando Sephadex[®] LH-20 já evidenciaram a eficiência desse sistema no isolamento de substâncias fenólicas como polifenóis poliméricos do vinho (Kantz & Singleton, 1991), sinapina (Amarowicz *et al.*, 2006), a silimarina (Křenek *et al.*, 2014), entre outros.

A subfração F3A, por apresentar majoritariamente três constituintes, foi escolhida para fracionamento via CLAE preparativo, resultando, assim, nas subfrações chamadas 1 e 2.

Os cromatogramas das subfrações 1 e 2 coletadas por CLAE-prep estão apresentados na figura 4.7. O objetivo de submeter à subfração F3A ao CLAE-prep foi verificar se as substâncias

majoritárias dessa subfração (mais ativa nos ensaios antioxidantes; resultados apresentados adiante) continuavam a apresentar os mesmos resultados de atividades mesmo quando isoladas. Como um dos picos majoritários da subfração F3A já se encontrava isolado após a CC em Sephadex®, o objetivo principal foi a tentativa de isolamento das substâncias **14** e **19** (Figura 4.5A). Infelizmente, a quantidade de material não foi suficiente para o isolamento completo desses dois constituintes, mas a metodologia foi eficiente para reduzir a presença da substância **19** na subfração 1 e apresentá-la praticamente isolada na subfração 2.

Figura 4.7 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (352 nm) após a subfração F3A ser submetida à CLAE-prep: (A): subfração 1; (B): subfração 2. Os números acima de cada pico correspondem as possíveis identificações apresentadas na tabela 4.3. A substância 21 não pode ser caracterizada devido à baixa resolução do espectro de UV/vis que apresentou.

O extrato etanólico, frações e subfrações foram, ainda, enviados à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) para análise via CLAE-EM. Infelizmente, por se utilizar uma metodologia em coluna de menor diâmetro de partícula interna e um fluxo pouco acima de 1 mL min^{-1} a separação dos constituintes não foi a mesma obtida no Laboratório de Fitoquímica em CLAE-DAD e os espectros de massas, para alguns dos constituintes, não foram satisfatórios.

A tabela 4.3 traz as informações dos tempos de retenção, espectros UV/vis e de massas para as 20 substâncias detectadas no extrato etanólico foliar de *C. sphaerogynus* e suas subfrações, com a tentativa de identificação das substâncias majoritárias. Literatura especializada também foi consultada (Cuyckens & Claeys, 2002, 2004).

As subfrações com maior grau de pureza foram submetidas às reações ionizantes e complexantes para sua identificação. A partir das reações de deslocamento, foi possível obter

maiores informações a respeito da subfração F4A e subfração 2. Nas figuras 4.8 e 4.9 encontram-se os espectros de absorção de UV/vis em solução metanólica e com o acréscimo de alguns reagentes. Por meio das interpretações baseadas em Markham (1982), foi possível obter uma maior caracterização quanto ao grau de hidroxilação das moléculas de flavonoides.

Analizando a subfração F4A (Figura 4.8I), o primeiro reagente a ser adicionado à solução metanólica (MeOH), o hidróxido de potássio (KOH), ioniza as hidroxilas da molécula do flavonoide. Na presença de desvio batocrômico e aumento de intensidade da banda I, o que ocorreu para esta subfração, evidenciou-se a presença de uma hidroxila (OH) na posição 4'. Também é possível identificar, nessa reação, a presença de hidroxila livre na posição 7 (anel A), caso ocorra o surgimento de uma terceira banda no espectro de KOH, o que não ocorreu para esta subfração. No espectro em metanol, podemos notar, ainda, a presença de um ombro no menor comprimento da banda II, o que indica a presença de dois oxigênios vicinais no anel B, provavelmente nas posições 3' e 4'.

A adição de acetato de sódio (NaOAc) à solução metanólica ioniza as hidroxilas mais ácidas e fornece informações complementares da ocorrência de hidroxilas livres na posição 7, 3' e 4' das flavonas, flavonóis e isoflavonas, caso ocorra desvio batocrômico entre 5 e 20 nm na banda II entre este espectro e o de MeOH. Para a substância da subfração F4A, não ocorreu esse desvio, confirmando a posição 7 como substituída. Adicionando ácido bórico (H_3BO_3) a esta mesma solução, obtivemos confirmações a respeito da existência de hidroxilas vicinais no anel B. O boro se complexa a esses pares de hidroxilas ocasionando um desvio entre 12 e 36 nm na banda I em relação ao valor observado na solução metanólica. Esta subfração apresentou um desvio de 15 nm, o que indica a presença de duas hidroxilas no anel B.

A adição de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) na solução metanólica, leva à formação de complexos entre todas as hidroxilas vicinais. Quanto maior o número de complexos, maior será o desvio batocrômico. Desvios entre 30 e 40 nm na banda I em relação à solução metanólica, significam *o*-dihidroxilas no anel B. Adicionando-se ácido clorídrico (HCl), os complexos são desfeitos, exceto os que envolvem o grupamento da posição 4 (complexo hidroxí-cetônico). Assim, as hidroxilas vicinais são detectadas caso ocorra desvio hipsocrômico no espectro “MeOH/ $AlCl_3$ /HCl” em relação ao “MeOH/ $AlCl_3$ ”, o que ocorreu para esta subfração.

Figura 4.8 - Espectro de absorção UV/vis da subfração F4A (I) e subfração 2 (II) na presença de diferentes reagentes de deslocamento. Metanol (MeOH), hidróxido de potássio (KOH), cloreto de alumínio (AlCl₃), ácido clorídrico (HCl), acetato de sódio (NaOAc), ácido bórico (H₃BO₃).

Para a subfração 2 (Figura 4.8II) foram feitas as mesmas análises. Adicionando hidróxido de potássio (KOH) à solução metanólica, confirmou-se uma hidroxila na posição 4' (anel B) pelo desvio batocrômico sem a perda de intensidade. Além disso, confirmou-se a presença de hidroxila livre na posição 7 (anel A) devido ao surgimento de uma terceira banda no espectro de KOH.

A adição de acetato de sódio (NaOAc) à solução metanólica confirmou a posição 7-OH livre, com um desvio batocrômico de 27 nm. Adicionando ácido bórico (H_3BO_3) não foi verificada a presença de hidroxilas vicinais no anel B. Com a adição de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) à solução metanólica, não houve a diferença entre os espectros ($AlCl_3$ e $AlCl_3/HCl$), confirmando a ausência de *o*-dihidroxilas no anel B. Além disso, a formação de 4 bandas nesse último par de espectros nos informa a presença de uma hidroxila em 5.

A coloração em luz UV das agliconas e glicosídeos também é fonte de informação estrutural. Para as duas subfrações, a coloração em luz UV apresentou-se púrpura, indicando a posição 3 como substituída. Na presença de amônia (NH_3) tornaram-se amareladas, confirmando a informação.

Os índices de retenção (Rf) das duas substâncias também foram calculados com relação aos padrões rutina (diglicosídeo), campferol e quercetina (agliconas). Em CCD de celulose realizada em ácido acético 15%. As subfrações F4A e 2 apresentaram o mesmo Rf (0,06) podendo ser comparadas às agliconas que apresentaram valores próximos (0,03), enquanto a rutina apresentou valor maior (0,53).

Após a hidrólise ácida e nova CCD de celulose utilizando CAW (clorofórmio:ácido acético:água) como fase móvel, pudemos verificar que a amostra hidrolisada não apresentou Rf diferente da amostra não hidrolisada, o que sugere a ausência de açúcares em ambas as subfrações.

Embora a hidrólise não confirmasse a presença de açúcares, é intrigante duas posições substituídas segundo as reações de deslocamento e coloração no UV. Para essa substância, combinando-se as informações de identificação, podemos sugerir a presença de uma metoxila (OCH_3) na posição 7 (corroborado pelo espectro com fragmento de 315 unidades de massa no módulo negativo de aquisição) e a posição 3 também substituída, segundo a coloração púrpura em UV que se torna amarela na presença de hidróxido de amônio. O mesmo foi observado para a subfração 2, um derivado de campferol com 7-OH livre, mas 3-OH substituída. Essa subfração apresentou o mesmo Rf quando hidrolisada e não-hidrolisada, e por apresentar tempo de retenção superior ao do campferol aglicona em CLAE-DAD, sugere-se ser um campferol metoxilado em 3.

Desta forma, concluímos que na subfração F4A temos uma quercetina-3,7-dimetil éter (**17**), enquanto na subfração 2 identificamos um campferol-3-metil éter (**19**). Flavonoides altamente metoxilados foram descritos na literatura como comuns em espécies de *Croton*, por exemplo, em *C. schiedeanus* a quercetina-3,7-dimetil éter já foi reportada (Guerrero *et al.*, 2002b), assim como outros flavonoides metoxilados, como retusina, artemetina, paquipodol e derivados metoxilados de

campferol em *C. cajucara* (Maciel *et al.*, 2002; Salatino *et al.*, 2007). Um flavonoide dimetoxilado já havia sido encontrado anteriormente no extrato etanólico de *C. montevidensis* Spreng. (Matos, 2011). Uma flavona dimetoxilada foi isolada das folhas de *C. betulaster* Mull. Arg. (Barbosa *et al.*, 2004) e de *C. cajucara* isolaram-se dois derivados metoxilados de campferol, sendo um deles, campferol 3,7-dimetil éter (Maciel *et al.*, 2000). Em *Croton* os flavonoides até hoje descritos costumam ser agliconas de flavonas e mais frequentemente de flavonóis altamente metoxiladas (Maciel *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2004; Palmeira Junior *et al.*, 2005, 2006; González-Vásquez *et al.*, 2006), provavelmente um resultado relacionado ao método de extração utilizado, que nesses trabalhos, utilizou solventes apolares. Neste estudo, o uso de maceração com etanol proporcionou a extração tanto de flavonoides glicosilados como também flavonoides mais metoxilados.

Reunindo todas as caracterizações, obtivemos as sugestões de identificações para os flavonoides encontrados em *C. spaherogynus* e apresentadas na tabela 4.3. As substâncias referentes às subfrações F4A e 2 são as de número **17** e **19**, respectivamente.

Após extração e fracionamentos, conforme mencionado acima, foram obtidas 13 amostras referidas pelos seguintes nomes: extrato aquoso de caule, extrato aquoso de folhas, extrato etanólico de caule, extrato etanólico de folhas, fração metanólica e fração hexânica, subfrações FP, F1A, F2A, F3A, F4A, 1 e 2.

A seguir serão descritos os resultados dos ensaios de atividade biológica. Para estes, os extratos aquosos e etanólico de caule não foram incluídos nos testes por questões de baixa solubilidade e, conseqüentemente, problemas metodológicos para as quantificações. Testes preliminares utilizando quatro concentrações de cada amostra mostraram que, para esses três extratos, a resposta atividade vs. concentração não era linear, muito provavelmente salientando o problema da solubilidade das amostras. Dessa forma, para os próximos resultados foram consideradas apenas 10 amostras: extrato etanólico de folhas, fração metanólica e fração hexânica, subfrações FP, F1A, F2A, F3A, F4A, 1 e 2. Todas as frações e subfrações partem, portanto de um único extrato: o etanólico, e conseqüentemente de um único órgão vegetal: as folhas (figura 4.9).

Figura 4.9 – Fluxograma de extração e fracionamento para os extratos foliares e caulinares de *C. sphaerogynus* onde M: extrato obtido por maceração; P: frações obtidas após partição em funil de separação; CC: subfrações obtidas após cromatografia em coluna de vidro; CL: subfrações obtidas por CLAE-preparativo.

4.2. Análise dos conteúdos fenólicos nos extratos de *Croton sphaerogynus*

Para qualquer ensaio biológico, *in vivo* ou *in vitro*, o conhecimento da composição de substâncias presentes no extrato testado é importante se o objetivo é correlacionar atividade com estrutura química. Ainda mais importante é o conhecimento das quantidades dessas substâncias presentes nos extrato para revelar um resultado dose-resposta. Esses conhecimentos são importantes se a intenção for propor um uso efetivo dos extratos para fins fitoterápicos, por exemplo.

Uma vez comprovada a presença apenas de flavonóis nessas amostras, especificamente derivados de quercetina e campferol, esses padrões na sua forma aglicona foram utilizados para a quantificação dos flavonoides por CLAE-DAD. Inicialmente, o doseamento de flavonoides foi realizado a partir do extrato etanólico de folhas. De acordo com a tabela 4.4, em um quilo de material foliar seco de *C. sphaerogynus* extraído por maceração a frio em etanol, a porcentagem de substâncias equivalentes a campferol foi de 0,03%, e 0,06% para substâncias equivalentes a quercetina. Dessa forma, *C. sphaerogynus* apresentou 0,09% de sua massa seca de folhas, constituída por flavonoides. Na tabela 4.4 estão apresentados os valores, em porcentagens, de cada flavonoide detectado no extrato etanólico de folhas de *C. sphaerogynus*.

Tabela 4.4 – Quantificação de flavonoides derivados de quercetina e camperol por massa seca de *C. sphaerogynus*. Números dos constituintes referem-se às substâncias listadas na tabela 4.3.

Constituinte	% EQ	% EC
1	nd	nd
2	0,004	-
3	nd	nd
4	-	0,011
5	-	0,020
6	0,002	-
7	0,007	-
8	-	0,002
9	0,002	-
10	-	0,003
11	-	0,018
12	nd	nd
13	nd	nd
14	0,009	-
15	nd	nd
16	nd	nd
17	0,007	-
18	nd	nd
19	-	0,004
20	nd	nd
Total	0,03	0,06

% EQ: porcentagem equivalente a quercetina por massa seca de folhas (mg EQ.g⁻¹).

% EC: porcentagem equivalente a campferol por massa seca de folhas (mg EC.g⁻¹).

nd: substância abaixo da detecção mínima no extrato etanólico de folhas.

Neste estudo, todas as amostras foram caracterizadas em relação as suas quantidades de flavonoides e substâncias fenólicas totais usando métodos colorimétricos tradicionais de doseamento dessas classes.

Da mesma forma, foram quantificadas por extrato produzido (etanólico, frações e subfrações) as mesmas substancias identificadas e quantificadas para *C. sphaerogynus*. De acordo com a quantificação dos constituintes majoritários por extrato (tabela 4.5), podemos observar que o extrato etanólico é o que apresenta substâncias derivadas dos dois flavonóis (quercetina e campferol), assim como a fração metanólica e subfrações F1A e F2A. Todos estes últimos, possuem composição pouco afetada pelo fracionamento. Entretanto, na subfração F3A, é evidente a predominância tanto qualitativa como quantitativamente, de substâncias derivadas do flavonol quercetina. O mesmo é observado na subfração F4A, mas nesta, a predominância é do flavonol quercetina 3,7-dimetil éter (17). Na fração hexânica foi verificada a presença de apenas uma substância derivada de quercetina e em baixa quantidade. A subfração 1 é composta unicamente por substâncias derivadas de quercetina e a subfração 2, apesar de conter os dois tipos de flavonóis, apresenta uma quantidade bem maior do campferol metoxilado equivalente à substância 19 (tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Constituintes majoritários do extrato etanólico, frações metanólica e hexânica e subfrações FP, F1A, F2A, F3A, F4A, 1 e 2 de *C. sphaerogynus* analisados por CLAE-DAD (352 nm) e expressos em mg EQ.g⁻¹ e mg EC.g⁻¹.

Constituinte	Extrato Etanólico	Frações		Subfrações						1	2
		Metanólica	Hexânica	FP	F1A	F2A	F3A	F4A			
1	nd	0,10 ^Q	-	-	0,47 ^Q	-	-	-	-	-	
2	0,20 ^Q	1,17 ^Q	-	0,94 ^Q	-	-	-	-	-	-	
3	nd	-	-	-	2,23 ^C	3,00 ^C	-	-	-	-	
4	0,57 ^C	2,45 ^C	-	2,01 ^C	-	-	-	-	-	-	
5	1,03 ^C	3,73 ^C	-	3,04 ^C	-	-	-	-	-	-	
6	0,09 ^Q	0,35 ^Q	-	-	4,65 ^Q	5,18 ^Q	-	-	-	-	
7	0,37 ^Q	1,63 ^Q	-	0,89 ^Q	19,35 ^Q	8,39 ^Q	-	-	-	-	
8	0,10 ^C	0,51 ^C	-	0,50 ^C	-	-	-	-	-	-	
9	0,09 ^Q	0,48 ^Q	-	-	0,91 ^Q	6,51 ^Q	8,42 ^Q	-	3,84 ^Q	-	
10	0,18 ^C	0,67 ^C	-	0,48 ^C	5,50 ^C	1,84 ^C	-	-	-	-	
11	0,99 ^C	3,04 ^C	-	2,42 ^C	19,71 ^C	4,42 ^C	-	-	-	-	
12	nd	-	-	-	7,47 ^Q	8,39 ^Q	-	-	-	-	
13	nd	-	-	-	4,15 ^C	-	-	-	-	-	
14	0,51 ^Q	3,13 ^Q	-	-	3,65 ^Q	34,51 ^Q	47,06 ^Q	-	88,09 ^Q	-	
15	nd	-	-	-	2,54 ^C	7,89 ^C	-	-	-	-	
16	nd	-	-	-	2,47 ^Q	3,68 ^Q	nd	-	4,06 ^Q	-	
17	0,59 ^Q	3,26 ^Q	0,20 ^Q	0,13 ^Q	3,06 ^Q	2,16 ^Q	70,96 ^Q	58,31 ^Q	14,49 ^Q	8,06 ^Q	
18	nd	-	-	-	2,94 ^C	1,70 ^C	-	-	-	-	
19	0,48 ^C	0,97 ^C	-	-	-	2,13 ^C	29,68 ^C	-	-	262,60 ^C	
20	nd	-	-	-	-	2,23 ^Q	nd	-	-	31,35 ^Q	
	5,20	21,49	0,20	10,41	79,10	92,03	156,12	58,31	110,48	302,01	

^Q : valores expressos em miligramas de substâncias equivalentes à quercetina por grama de extrato (mg EQ g⁻¹)

^C : valores expressos em miligramas de substâncias equivalentes a campferol por grama de extrato (mg EC g⁻¹)

nd: substância no extrato abaixo da detecção mínima.

A quantificação de substâncias fenólicas totais e flavonas/flavonóis para os extratos, frações e subfrações em leitor de microplaca do tipo Elisa, estão apresentadas na tabela 4.6. Vale ressaltar que as quantificações são independentes entre si, pois diferem nos padrões e na sensibilidade da metodologia empregada. As subfrações 1 e 2 foram quantificadas somente por CLAE-DAD.

Na quantificação de fenóis totais os valores variaram entre 27,25 e 331,6 mg GAE g⁻¹. A amostra que apresentou o maior valor foi a subfração F3A (331,6 mg GAE g⁻¹) seguida pela subfração F4A (289,8 mg GAE g⁻¹), F2A (243,5 mg GAE g⁻¹), F1A (192 mg GAE g⁻¹), extrato etanólico de folhas (115,19 mg GAE g⁻¹), fração metanólica (87,01 mg GAE g⁻¹), subfração FP (57,6 mg GAE g⁻¹) e fração hexânica (27,25 mg GAE g⁻¹). A fração hexânica, conforme observado no cromatograma e doseamento (Figura 4.3C e tabela 4.5) realmente apresenta uma escassez de substâncias flavonoídicas.

Tabela 4.6 - Conteúdo de substâncias fenólicas totais e flavonas/flavonóis utilizando os métodos Folin-Ciocalteu e do Cloreto de Alumínio, respectivamente.

Amostras	Fenóis totais ^a	Flavonas/flavonóis totais ^b
Etanólico	115,19 ± 6,39	115,57 ± 4,50
Metanólica	87,01 ± 4,86	98,36 ± 1,19
Hexânica	27,25 ± 15,86	* *
FP	57,60 ± 5,10	72,90 ± 4,40
F1A	192,00 ± 1,00	277,00 ± 7,50
F2A	243,50 ± 8,60	300,70 ± 1,80
F3A	331,60 ± 14,30	460,20 ± 8,20
F4A	289,80 ± 5,40	140,10 ± 1,20

^a Fenóis totais estão expressos em miligramas equivalentes a ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG g⁻¹).

^b Flavonas/flavonóis totais estão expressos em miligramas equivalentes a rutina por grama de extrato seco (mg ER g⁻¹).

* Não foi possível a quantificação da fração hexânica devido à turbidez que a amostra apresentou no ensaio.

Na quantificação de flavonas/flavonóis totais os valores variaram de 72,9 a 460,2 mg ER g⁻¹. A amostra que apresentou o maior valor foi da subfração F3A (460,2 mg ER g⁻¹) seguida pela subfração F2A (300,7 mg ER g⁻¹), subfração F1A (277 mg ER g⁻¹), subfração F4A (140,1 mg ER g⁻¹), extrato etanólico de folhas (115,57 mg ER g⁻¹), fração metanólica (98,36 mg ER g⁻¹) e subfração FP (72,9 mg ER g⁻¹). Entre os extratos e frações, era de se esperar que o extrato etanólico de folhas apresentasse o maior valor em relação aos demais, isso por tratar-se do extrato bruto.

A subfração F3A foi a que apresentou maior quantidade de substâncias da classe dos flavonoides, o que era esperado uma vez que a mesma apresenta os maiores conteúdos de derivados

de quercetina e campferol (tabela 4.5) entre os extratos e subfrações (excetuando-se as subfrações 1 e 2 que não foram empregadas neste ensaio).

Como já citado anteriormente, a presença dessa classe de substâncias em muitas espécies pertencentes a *Croton* já havia sido relatada por vários autores: Savietto (2011) (*C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*), Matos (2011) (*C. betulaster*, *C. glutinosus* Müll. Arg., *C. pycnocephalus* Müll. Arg., *C. montevidensis*, *C. hemiargyreus*, *C. antisiphiliticus* Mart., *C. grandivelum* Baill.), Athayde (2013) (*C. echinocarpus* e *C. vulnerararius*) e Soares (2013) (*C. pallidulus* var. *pallidulus*) indicando que é característico de espécies do gênero a presença tanto de flavonas quanto de flavonóis, podendo ocorrer espécies com predominância majoritária de uma dessas classes. *C. sphaerogynus* se mostrou como produtor exclusivo de flavonóis.

Comparando-se as quantificações por CLAE-DAD e o doseamento por colorimetria, há coerência entre as metodologias, pois entre os extratos e subfrações, F3A foi a que apresentou maior quantidade de fenóis totais e também a que contém maior abundância de substâncias equivalentes a quercetina e a campferol (tabela 4.5). A quantificação de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu e flavonoides pelo uso do cloreto de alumínio, são metodologias menos específicas, podendo, muitas vezes, superestimar os valores finais de conteúdos totais. Além disso, essas metodologias não nos informam a real composição dos constituintes fenólicos e flavonoídicos presentes na amostra e devido a isso, a quantificação por CLAE-DAD, quando possível, se faz mais interessante (Roby *et al.*, 2013).

4.3. Análise do potencial biológico *in vitro* dos extratos de *Croton sphaerogynus*

4.3.1. Ensaios de atividades antioxidantes

Halliwell & Gutteridge (2007) definem antioxidante como qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo sofrido em uma molécula alvo. As ERO (espécies reativas de oxigênio) incluem as diversas formas de oxigênio ativo como, por exemplo, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO) que são muitas vezes gerados no organismo como subprodutos de reações biológicas ou de fatores exógenos (Dar *et al.*, 2011). Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo* ou obtidos através da dieta. Os antioxidantes exógenos mais conhecidos e oriundos da dieta são as vitaminas A, C e E e as substâncias fenólicas (Tripathi *et al.*, 2007).

No organismo (*in vivo*), a produção de ERO é equilibrada pela ação de algumas enzimas que agem como antioxidantes como a superóxido- dismutase, superóxido- redutase, catalase e glutathione peroxidase, que agem removendo cataliticamente as espécies reativas (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Além da ação das enzimas, podemos citar outras defesas antioxidantes que compreendem:

- (a) agentes que diminuem a formação de espécies reativas, por exemplo proteínas mitocondriais; e nesta categoria pode-se incluir proteínas que minimizam a ação de pro-oxidantes como íons ferro, e.g. albumina, oxigenases e poliaminas;
- (b) proteínas que protegem biomoléculas do dano oxidativo, por exemplo chaperonas;
- (c) agentes que causam a “extinção” das espécies reativas, por exemplo carotenoides;
- (d) a substituição de moléculas sensíveis ao dano oxidativo por moléculas resistentes, por exemplo fumarase C de *E. coli*;
- (e) agentes de “sacrifício” que são preferencialmente oxidadas pelas espécies reativas, consequentemente preservando biomoléculas mais importantes, por exemplo α -tocoferol, ascorbato e albumina (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Neste contexto, a realização dos ensaios antioxidantes foi baseada em cinco metodologias: sequestro do DPPH[•] e ABTS[•], poder redutor de ferro (FRAP), oxidação do β -caroteno pelo ácido linoleico e atividade quelante de metais.

Para a atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio (radicais livres ou não), metodologias que avaliam a atividade antioxidante de um extrato analisam se suas substâncias antioxidantes podem reagir de forma a consumir da solução um radical estável, por exemplo, DPPH[•] e ABTS[•]. O ensaio do ABTS[•] é extremamente interessante para ser aplicado a extratos vegetais, uma vez que a absorção no comprimento de onda em 734 nm elimina a interferência de cores provenientes do extrato (Li *et al.*, 2008). A redução dos radicais DPPH[•] e ABTS[•] é seguida pelo monitoramento da diminuição de sua absorbância em um comprimento de onda característico (Brand-Williams, 1995) e os extratos que apresentam atividade positiva podem ser considerados como bom sequestradores de radicais livres, característica interessante para a indústria alimentícia, por exemplo (Kumar & Pandey, 2013c).

Além dos ensaios de captura de radicais livres, testes antioxidantes realizados em alimentos e sistemas biológicos também são utilizados para avaliar a peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é utilizado e o grau de inibição da oxidação é medido (Sánchez-Moreno, 2002). O método de lipoperoxidação do β -caroteno é baseado na técnica de co-oxidação do substrato ácido linoleico. Ao ser exposto a condições favoráveis a sua oxidação (como, por exemplo, a presença do oxigênio e alta temperatura) o ácido linoleico produz estruturas radicalares, que atacam as duplas ligações do β -caroteno. Essas estruturas, ao perder o seu cromóforo, provocam a descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes nas amostras testadas protege o ácido linoleico prolongando o período de formação desses radicais (Marco, 1968; Miller, 1971; Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

Outra forma de atuação antioxidante é o poder da substância no que diz respeito à redução de metais, especialmente ferro, um metal oxidante (Halliwell & Gutteridge, 2007). O método do poder redutor do ferro (FRAP) baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) das amostras reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Uma vez reduzido, o Fe^{2+} produzido reage com o TPTZ presente na solução de teste, formando um complexo de intensidade azul que é medido colorimetricamente. Quanto maior o poder redutor da amostra, maior será a intensidade de azul observada (Benzie & Strain, 1996).

A remoção de metais de uma solução é outra função antioxidante muito avaliada e referenciada na literatura. O ensaio de atividade quelante de metais foi baseado no método descrito por Carter (1971) onde se utiliza o reagente ferrozina, um composto férrico sulfonado que reage com os íons ferrosos das amostras formando um complexo ferro-ferrozina. O método determina o nível de íons ferrosos não quelados depois de permitir que estes sejam quelados por substâncias presentes nas amostras e com tal propriedade. A concentração de íon ferroso não quelado será sempre negativamente correlacionada com a capacidade quelante de metais do extrato, o que é analisado colorimetricamente, uma vez que o complexo ferro-ferrozina dá a coloração à solução.

Assim como as metodologias amplamente empregadas para avaliar o potencial antioxidante, algumas substâncias autênticas são comumente utilizadas como controles positivos das reações. Trolox, o análogo solúvel em água do α -tocoferol, é utilizado pela sua alta atividade antioxidante. O grupo carboxil presente no interior de sua estrutura, torna-o solúvel em água, o que faz com que sua utilização seja mais vantajosa em relação a antioxidantes de caráter apolar, como por exemplo a vitamina E, solúvel em lípideos (Poljšak & Raspor, 2008).

Além do Trolox, os flavonoides, particularmente os derivados de quercetina, vêm recebendo maior atenção durante os últimos anos. Isso devido a estudos que demonstram seus efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo proteção cardiovascular, atividade antitumoral, efeitos antiúlcera e antialérgico, antiviral e anti-inflamatória. Tudo indica que esses efeitos estejam relacionados a sua atividade antioxidante natural (Ahmadi *et al.*, 2011; Ezzati *et al.*, 2014) e por esta razão, o flavonol quercetina, é bastante empregado como controle positivo em ensaios antioxidantes.

O ácido gálico e seus derivados são potentes antioxidantes naturais que também estão presentes em muitas espécies vegetais, os quais são amplamente usados nas indústrias farmacêutica e alimentícia. As atividades biológicas e farmacológicas dos derivados de ácido gálico incluem a eliminação de radicais livres (Dwibedy *et al.*, 1999; Asnaashari *et al.*, 2014) e a indução a apoptose de células cancerosas (Saeki *et al.*, 2000), entre outras.

Os resultados de atividade antioxidante foram calculados utilizando-se três parâmetros: 1. a porcentagem de atividade para cada uma das quatro concentrações de amostra testada; 2. a

quantidade (em mg) de substâncias antioxidantes presentes nas amostras e equivalentes aos controles positivos; e 3. as concentrações efetivas (EC) de cada amostra para se atingir 50% da atividade analisada. Os resultados serão apresentados em relação a estes três parâmetros.

4.3.1.1. Porcentagem de inibição de oxidação

As porcentagens de inibição da oxidação quer por sequestrar radicais, ou reduzir e quelar metais, ou ainda impedir a oxidação de moléculas é o parâmetro mais comumente encontrado na literatura. Entretanto, este parâmetro dificulta a comparação dos resultados entre os diferentes estudos, espécies e entre as amostras testadas, assim como entre os controles positivos, se estes todos não estiverem numa mesma concentração. Se um extrato ou substância apresenta atividade antioxidante, espera-se que esta atividade seja tanto maior quanto maior for a concentração da substância utilizada e, portanto, as comparações entre diferentes estudos devem ser feita de forma cuidadosa.

Os resultados de inibição de oxidação para os ensaios DPPH[•], ABTS[•], FRAP, sistema β -caroteno/ ácido linoléico e quelante de metais, avaliados de acordo com a porcentagem de atividade apresentada pelas amostras estão apresentados nas tabelas 4.7 e 4.8, para as quatro concentrações testadas por ensaio.

Para a atividade de sequestro do DPPH[•] os valores variaram desde a não atividade, ou seja, valores iguais ao controle negativo, a 75,61%. Neste ensaio, a fração hexânica foi a que não apresentou nenhuma atividade, seguida da subfração 2 (6,87%), fração FP (8,55%) e fração metanólica (16,26%), resultados para as maiores concentrações testadas para cada amostra. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição da oxidação foi a subfração F3A (75,61%) seguida pela subfração F4A (66,02%), subfração F2A (53,33%), subfração 1 (51,83%), subfração F1A (40,25%) e extrato etanólico de folhas (23,02%).

Para a atividade de sequestro do ABTS[•] os valores também variaram desde a não atividade, ou seja, valores iguais ao controle negativo, a 95,20%. Neste ensaio, a fração hexânica foi a que não apresentou nenhuma atividade. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição da oxidação foi a subfração F3A (95,20%) seguida pela subfração F4A (95,16%), subfração F2A (95,09%), subfração F1A (91,92%), subfração 1 (85,58%), extrato etanólico de folhas (56,63%), fração metanólica (48,34%), subfração 2 (36,82%) e subfração FP (35,39%).

Para o ensaio utilizando o sistema β -caroteno/ ácido linoleico, os valores variaram entre 3,18% e o máximo de 54,59%. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição da oxidação foi a subfração F3A (54,59%) seguida pela subfração F4A (50,07%), subfração F2A (42,75%), subfração F1A (42,11%), subfração 1 (30,45%), fração metanólica (28,98%), subfração FP (18,65%), extrato etanólico (11,33%), fração hexânica (9,18%) e subfração 2 (3,18%).

Tabela 4.7 – Atividade antioxidante de extratos, frações e subfrações expressa em porcentagem de inibição da oxidação para os ensaios de sequestro do DPPH[•], ABTS[•] e sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Amostras	DPPH [•]			
	50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	250 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Etanólico	3,51 $\pm$ 0,58	10,38 $\pm$ 0,00	13,38 $\pm$ 0,14	23,02 $\pm$ 2,74
Metanólica	4,32 $\pm$ 0,72	5,07 $\pm$ 0,09	7,98 $\pm$ 0,27	16,26 $\pm$ 0,65
Hexânica	-	-	-	-
FP	-	-	0,57 $\pm$ 0,31	8,55 $\pm$ 0,72
F1A	5,85 $\pm$ 2,18	10,95 $\pm$ 1,16	18,90 $\pm$ 0,29	40,25 $\pm$ 1,30
F2A	11,52 $\pm$ 2,12	16,80 $\pm$ 0,32	28,16 $\pm$ 0,78	53,33 $\pm$ 0,52
F3A	15,66 $\pm$ 1,37	28,42 $\pm$ 0,83	46,22 $\pm$ 0,77	75,61 $\pm$ 1,41
F4A	16,44 $\pm$ 0,99	25,43 $\pm$ 0,55	38,54 $\pm$ 0,41	66,02 $\pm$ 1,20
1	11,31 $\pm$ 1,02	23,93 $\pm$ 1,25	33,20 $\pm$ 1,57	51,83 $\pm$ 1,24
2	0,24 $\pm$ 0,75	3,57 $\pm$ 0,06	3,64 $\pm$ 0,06	6,87 $\pm$ 1,37
Amostras	ABTS [•]			
	50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	250 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Etanólico	14,13 $\pm$ 0,92	26,25 $\pm$ 0,35	42,02 $\pm$ 2,66	56,63 $\pm$ 1,37
Metanólica	11,35 $\pm$ 1,17	23,58 $\pm$ 0,70	39,35 $\pm$ 3,29	48,34 $\pm$ 1,29
Hexânica	-	-	-	-
FP	3,35 $\pm$ 0,54	13,60 $\pm$ 0,40	26,25 $\pm$ 3,01	35,39 $\pm$ 1,04
F1A	22,06 $\pm$ 0,11	43,92 $\pm$ 1,55	67,58 $\pm$ 2,35	91,92 $\pm$ 0,8
F2A	34,93 $\pm$ 0,33	51,73 $\pm$ 0,86	83,01 $\pm$ 1,58	95,09 $\pm$ 0,11
F3A	39,81 $\pm$ 0,29	81,18 $\pm$ 5,58	95,05 $\pm$ 0,13	95,20 $\pm$ 0,11
F4A	40,30 $\pm$ 1,22	68,72 $\pm$ 0,78	85,94 $\pm$ 1,10	95,16 $\pm$ 0,17
1	26,21 $\pm$ 2,85	41,11 $\pm$ 0,31	85,58 $\pm$ 0,29	85,58 $\pm$ 0,29
2	12,61 $\pm$ 0,29	19,96 $\pm$ 0,94	26,80 $\pm$ 0,67	36,82 $\pm$ 0,36
Amostras	β -caroteno/ácido linoleico			
	50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	150 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	250 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Etanólico	-	-	4,88 $\pm$ 2,43	11,33 $\pm$ 1,83
Metanólica	6,03 $\pm$ 0,91	17,93 $\pm$ 3,45	13,7 $\pm$ 2,13	28,98 $\pm$ 4,87
Hexânica	4,23 $\pm$ 0,30	5,95 $\pm$ 2,13	9,61 $\pm$ 0,61	9,18 $\pm$ 3,04
FP	4,45 $\pm$ 6,70	7,25 $\pm$ 0,30	7,68 $\pm$ 0,91	18,65 $\pm$ 4,26
F1A	11,12 $\pm$ 0,91	19,08 $\pm$ 1,29	32,64 $\pm$ 2,13	42,11 $\pm$ 2,13
F2A	14,63 $\pm$ 0,66	19,51 $\pm$ 0,61	20,16 $\pm$ 3,35	42,75 $\pm$ 1,83
F3A	21,23 $\pm$ 0,43	13,06 $\pm$ 0,61	28,77 $\pm$ 3,96	54,59 $\pm$ 7,00
F4A	26,83 $\pm$ 3,65	25,75 $\pm$ 2,13	18,65 $\pm$ 8,52	50,07 $\pm$ 6,7
1	17,95 $\pm$ 0,39	22,05 $\pm$ 1,42	23,64 $\pm$ 0,96	30,45 $\pm$ 0,00
2	-	4,20 $\pm$ 1,45	3,86 $\pm$ 0,00	3,18 $\pm$ 0,00

-: Amostras sem atividade.

Para a atividade quelante de metais, os valores variaram entre 0,05 e 31,81%. A amostra que apresentou maior porcentagem quelante de metais foi a subfração 2 (31,81%) seguida pela subfração F3A (26,10%), subfração 1 (21,12%), subfração F2A (19,52%), subfração F1A (17,33%), subfração F4A (17,19%), subfração FP (13,83%), extrato etanólico (13,24%), fração metanólica (13,02%) e fração hexânica (5,50%) (tabela 4.8).

Para a atividade redutora de ferro (FRAP) os valores variaram entre 2,39 e 99,26%. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição da oxidação foi a subfração F3A (99,26%) seguida pela subfração F4A (89,16%), subfração F2A (71,26%), subfração 1 (71,21%), subfração F1A (55,79%), extrato etanólico (26,57%), fração metanólica (20,75%), subfração FP (13,02%), subfração 2 (11,43%) e fração hexânica (2,39%).

Tabela 4.8 – Atividade antioxidante de extratos, frações e subfrações expressa em porcentagem de inibição da oxidação para os ensaios de sequestro do quelante de metais e redução de ferro (FRAP).

Amostras	Quelante de metais			
	50 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	150 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹
Etanólico	3,97 ± 2,17	11,30 ± 0,84	10,76 ± 2,07	13,24 ± 0,41
Metanólica	4,11 ± 0,93	11,12 ± 1,14	7,55 ± 5,99	13,02 ± 0,1
Hexânica	4,55 ± 0,31	-	1,51 ± 0,97	5,50 ± 0,62
FP	7,11 ± 2,07	6,67 ± 0,00	12,73 ± 2,79	13,83 ± 0,91
F1A	7,91 ± 0,93	6,60 ± 0,10	10,13 ± 1,71	17,33 ± 1,45
F2A	9,15 ± 0,21	13,46 ± 0,52	15,36 ± 0,72	19,52 ± 0,62
F3A	9,64 ± 0,75	13,78 ± 1,24	16,82 ± 0,72	26,10 ± 1,45
F4A	6,23 ± 3,30	5,36 ± 0,62	10,37 ± 1,17	17,19 ± 0,83
1	7,72 ± 0,19	8,97 ± 0,27	10,86 ± 0,59	21,12 ± 2,7
2	8,97 ± 0,63	13,3 ± 2,07	20,80 ± 0,99	31,81 ± 0,72

Amostras	FRAP*			
	50 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	150 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹
Etanólico	5,26 ± 0,61	10,3 ± 0,31	15,74 ± 0,77	26,57 ± 0,14
Metanólica	6,34 ± 0,42	9,73 ± 0,18	11,69 ± 0,69	20,75 ± 0,71
Hexânica	1,74 ± 0,26	2,01 ± 0,18	1,91 ± 0,1	2,39 ± 0,15
FP	3,87 ± 0,59	6,48 ± 1,05	8,20 ± 0,18	13,02 ± 0,50
F1A	13,14 ± 0,89	25,28 ± 1,00	34,38 ± 0,87	55,79 ± 2,30
F2A	18,59 ± 0,59	32,86 ± 1,76	50,41 ± 0,86	71,26 ± 3,80
F3A	21,83 ± 1,00	42,6 ± 1,33	65,88 ± 0,65	99,26 ± 3,08
F4A	20,14 ± 0,96	33,87 ± 0,14	53,60 ± 1,94	89,16 ± 2,01
1	17,01 ± 0,15	32,25 ± 0,77	46,36 ± 1,14	71,21 ± 0,61
2	4,56 ± 0,44	6,45 ± 0,20	7,80 ± 0,06	11,43 ± 0,47

*: % inibição FRAP: porcentagem de atividade antioxidante calculada em relação ao controle positivo Trolox.

-: Amostras sem atividade.

4.3.1.2. Conteúdo de substâncias antioxidantes equivalentes ao padrão

Os resultados de atividade antioxidante para os ensaios DPPH[•], ABTS[•], FRAP e quelante de metais avaliados de acordo com o parâmetro miligramas equivalentes ao padrão por grama de extrato seco estão apresentados nas tabelas 4.9, quando calculado para o padrão Trolox e tabela 4.10 para o padrão quercetina. Conforme informado na metodologia, não foi possível obter o resultado para o ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico para este parâmetro, isso devido às curvas de calibração com os padrões Trolox e quercetina não apresentarem linearidade entre concentração vs. intensidade da resposta. O uso de dois padrões reside no fato que a maioria dos trabalhos utiliza apenas o padrão Trolox, facilitando as comparações, mas como os extratos são compostos basicamente por flavonoides, acrescentamos o padrão quercetina, também reconhecido como potente antioxidante, para melhor representar a classe de substâncias presentes nas amostras.

Para a atividade de sequestro do DPPH[•] os valores variaram de 24,99 a 894,33 mg ET g⁻¹. Da mesma forma que para o parâmetro porcentagem de atividade, as quantificações seguem o mesmo padrão anterior, já que são resultados dependentes, todos os três parâmetros partem de uma mesma variável que é a absorbância. A amostra que apresentou maior conteúdo de substâncias equivalente ao antioxidante Trolox pelo ensaio de sequestro do DPPH[•] foi a subfração F3A (894,33 mg ET g⁻¹) seguida pela subfração F4A (783,60 mg ET g⁻¹), subfração F2A (604,35 mg ET g⁻¹), subfração 1 (514,49 mg ET g⁻¹), subfração F1A (450,83 mg ET g⁻¹), extrato etanólico de folhas (333,71 mg ET g⁻¹), fração metanólica (237,34 mg ET g⁻¹), subfração FP (140 mg ET g⁻¹), subfração 2 (80,85 mg ET g⁻¹) e por fim fração hexânica (24,99 mg ET g⁻¹).

Para o ensaio de sequestro do ABTS[•] os valores variaram entre 173,41 e 961,88 mg ET g⁻¹. Neste teste, a fração hexânica não apresentou substâncias equivalentes ao antioxidante Trolox. A amostra que apresentou maior conteúdo de substâncias antioxidantes pelo ensaio de sequestro do ABTS[•] foi a subfração F3A (961,88 mg ET g⁻¹) seguida pela subfração F4A (849,96 mg ET g⁻¹), subfração F2A (688,19 mg ET g⁻¹), subfração 1 (545,70 mg ET g⁻¹), subfração F1A (514,06 mg ET g⁻¹), extrato etanólico de folhas (311,45 mg ET g⁻¹), fração metanólica (272,51 mg ET g⁻¹), subfração 2 (253,62 mg ET g⁻¹), subfração FP (173,41 mg ET g⁻¹).

Para o ensaio do poder redutor de ferro (FRAP) os valores variaram entre 15,49 e 1000 mg ET g⁻¹. A amostra que apresentou maior conteúdo de substâncias redutoras de ferro foi a subfração F3A (1000 mg ET g⁻¹) seguida pela subfração F4A (813,97 mg ET g⁻¹), subfração F2A (765,55 mg ET g⁻¹), subfração 1 (595,40 mg ET g⁻¹), subfração F1A (544,89 mg ET g⁻¹), extrato etanólico de folhas (223,47 mg ET g⁻¹), fração metanólica (184,27 mg ET g⁻¹), subfração FP (113,33 mg ET g⁻¹), subfração 2 (80,80 mg ET g⁻¹) e fração hexânica (15,49 mg ET g⁻¹).

Para a atividade antioxidante quelante de metais os valores variaram entre 30,52 e 229,01 mg EAG g⁻¹. A amostra que apresentou maior quantidade de substâncias quelantes de ferro (para este

parâmetro o cálculo utilizou o conteúdo equivalente a ácido gálico) foi a subfração 2 (229,01 mg EAG g⁻¹) seguida pela subfração 1 (136,53 mg EAG g⁻¹), subfração F3A (135,17 mg EAG g⁻¹), subfração F2A (113,96 mg EAG g⁻¹), extrato etanólico de folhas (108,15 mg EAG g⁻¹), subfração FP (83,54 mg EAG g⁻¹), subfração F1A (68,59 mg EAG g⁻¹), fração metanólica (71,70 mg EAG g⁻¹), subfração F4A (70,15 mg EAG g⁻¹) e fração hexânica (30,52 mg EAG g⁻¹).

Tabela 4.9 – Conteúdo de substâncias antioxidantes nos extratos, frações e subfrações expressa em miligramas equivalentes a Trolox por grama de extrato seco (mg TE g⁻¹).

Amostras	DPPH [•]	ABTS [•]	FRAP	Quelante de metais ^b
Etanólico	333,71 ± 2,47	311,45 ± 8,06	223,47 ± 7,11	108,15 ± 4,12
Metanólica	237,34 ± 2,71	272,51 ± 6,59	184,27 ± 6,49	71,70 ± 8,14
Hexânica	24,99 ± 4,78	* *	15,49 ± 2,26	30,52 ± 1,46
FP	140,00 ± 17,70	173,41 ± 8,38	113,33 ± 1,48	83,54 ± 7,43
F1A	450,83 ± 17,74	514,06 ± 7,57	544,89 ± 13,09	68,59 ± 5,34
F2A	604,35 ± 9,20	688,19 ± 13,42	765,55 ± 16,09	113,96 ± 4,49
F3A	894,33 ± 14,65	961,88 ± 7,34	1000,00 ± 12,27	135,17 ± 8,76
F4A	783,60 ± 7,76	849,96 ± 9,93	813,97 ± 9,61	70,15 ± 3,61
1	514,49 ± 6,44	545,70 ± 6,58	595,40 ± 8,02	136,53 ± 0,51
2	80,85 ± 9,48	253,62 ± 6,29	80,80 ± 0,69	229,01 ± 9,16

^b: Atividade quelante de metais está expressa em miligramas de substâncias equivalentes a ácido gálico por grama de extrato seco (mg GAE g⁻¹).

*: Valores para cálculo menores que 0,0001.

De acordo com os resultados observados na tabela 4.9 podemos afirmar que as subfrações possuem maior atividade antioxidante que os extratos e frações, para qualquer ensaio analisado. Este resultado sugere que, provavelmente, a atividade antioxidante das amostras está fortemente relacionada com fatores qualitativos. Analisando os dois parâmetros apresentados, fica claro que a subfração F3A é a mais ativa, independentemente do ensaio analisado. Com estes parâmetros já é possível sugerir que entre os flavonoides detectados em *C. sphaerogynus*, as substâncias **17** (quercetina 3,7-dimetil éter) e **19** (campferol 3-metil éter) apresentam propriedade antioxidante, principalmente de sequestro de radicais (DPPH[•] e ABTS[•]) e de redução de ferro. Tal fato já havia sido reportado por Heim e colaboradores (2002) que atribuíram as mais altas atividades de sequestro de radicais à quercetina, seguida por seus derivados *O*-metilados e *O*-glicosilados.

O extrato, frações e subfrações com composição química mais diversificada, tiveram baixa atividade antioxidante. Cabe lembrar que o extrato, frações e a subfração FP ainda apresentam grande quantidade de diterpenos em sua composição (Tabela 4.1; Anexo I), classe de substâncias raramente relacionada à atividade antioxidante de um extrato.

Conforme o esperado, a fração hexânica apresentou baixa atividade antioxidante, pois é praticamente inexistente a presença de substâncias da classe dos flavonoides; aliada à grande quantidade de diterpenos. A subfração FP apresentou menor atividade em relação às subfrações

F1A e F2A o que também era o esperado, já que em tal amostra, a presença de flavonóis tanto quantitativa quanto qualitativamente, é menor. As subfrações F1A e F2A apresentaram valores relativamente próximos, pois possuem características semelhantes quanto à composição e quantidades de flavonóis.

Com o objetivo de confirmar as atividades antioxidantes encontradas, tais atividades também foram quantificadas para os extratos, frações e subfrações utilizando o padrão quercetina nos ensaios de sequestro do DPPH[•], sequestro do ABTS[•] e poder redutor de ferro (FRAP) (tabela 4.10). Nestes ensaios, a fração hexânica apresentou valores próximos à zero.

Tabela 4.10 – Atividade antioxidante de extratos, frações e subfrações expressa em miligramas de substâncias equivalentes à quercetina por grama de extrato seco (EQ g⁻¹).

Amostras	DPPH [•]		ABTS [•]		FRAP	
Etanólico	123,41	± 7,57	126,91	± 3,71	55,72	± 3,39
Metanólica	75,89	± 6,52	102,97	± 5,05	49,53	± 1,39
Hexânica	*	*	*	*	*	*
FP	45,57	± 3,92	59,75	± 4,96	26,01	± 1,51
F1A	175,00	± 11,97	230,78	± 2,04	146,35	± 1,95
F2A	253,40	± 5,74	289,58	± 15,15	210,30	± 2,53
F3A	413,49	± 6,97	411,77	± 24,23	266,77	± 3,86
F4A	348,27	± 3,52	372,19	± 1,21	223,07	± 4,41
1	225,69	± 6,48	215,38	± 7,46	139,90	± 0,96
2	13,84	± 3,09	60,81	± 6,19	15,42	± 0,03

*: Valores para cálculo menores que 0,0001.

Analisando detalhadamente a atividade das subfrações com substâncias melhor isoladas, entre os ensaios realizados utilizando o padrão Trolox (tabela 4.9) e quercetina (tabela 4.10), a subfração F3A foi a que apresentou os melhores resultados com exceção do ensaio quelante de metais em que a subfração 2 apresentou a melhor atividade.

A subfração F3A é composta majoritariamente por derivados de quercetina, quercitrina e quercetina 3,7-dimetil éter. Tudo indica que as atividades antioxidantes exibidas estejam relacionadas diretamente com a sinergia entre alguns derivados de quercetina já que a subfração F4A, composta exclusivamente por quercetina 3,7-dimetil éter, apresentou resultados muito próximos, porém não maiores nos ensaios DPPH[•], ABTS[•] e FRAP do que as subfrações F3A e 1. As interações sinergistas entre as substâncias químicas de uma planta podem potencializar o efeito de bioativos, ou simplesmente interferir em sua atividade (Lila & Raskin, 2005). Além da qualidade, a quantidade desses flavonóis nas duas subfrações, F3A e F4A, provavelmente está relacionada à atividade, já que a fração F3A possui aproximadamente duas vezes mais substâncias derivadas de quercetina quando comparada à fração F4A.

A relação entre a função e a estrutura do flavonoide é a chave para as diversas atividades biológicas exercidas por essa substância. Um estudo realizado por van Acker e colaboradores (1996), relacionou os aspectos estruturais dos flavonoides com atividades antioxidantes e sugeriram que flavonóis exibindo um grupo catecol no anel B (duas hidroxilas vicinais no anel aromático) apresentam altas taxas de atividade antioxidante. Além disso, a combinação do grupo catecol com uma ligação dupla em C₂-C₃ e uma hidroxila na posição 3, torna a substância com extrema capacidade antioxidante, como ocorre com a quercetina. A eficácia medicinal de muitos flavonoides já está bem estabelecida. A quercetina, por exemplo, é alvo de muitos estudos onde já foram relatadas atividades antibacterianas, hepatoprotectoras, anti-inflamatória, antitumoral e antiviral e em todas as atividades reportadas, a presença de hidroxila livre na posição 3, assim como hidroxilas vicinais no anel B, parecem ser importantes para potencializar a atividade (Kumar & Pandey, 2013c). Além disso, a presença de substituintes na posição 7 parece não influenciar na atividade de sequestro de radicais (van Acker *et al.*, 1996).

Analisando os resultados da subfração 2, composta majoritariamente por campferol 3-metil éter, os valores são bem reduzidos quando comparados aos das frações com derivados de quercetina, corroborando a proposta de que flavonóis que não apresentam o grupo catecol, como os derivados de campferol, apresentam menor atividade antioxidante.

Tal resultado difere do encontrado por van Acker e colaboradores (1996). Em flavonoides que possuem apenas uma hidroxila no anel B, o restante da molécula parece tornar-se mais importante para a atividade de sequestro de radicais, ao contrário de flavonoides com um grupo catecol, onde a intensa atividade baseia-se na presença desse grupo no anel B. Essa característica da molécula como um todo, no caso do campferol, faz com que seus derivados tornem-se potentes sequestradores de radicais livres. Tal atividade é provavelmente causada pela combinação da ligação dupla C₂-C₃ com o 3-OH (van Acker *et al.*, 1996). No caso da subfração 2, podemos inferir portanto, que tal perda de atividade sequestradora de radicais deva-se à presença do grupo metila em 3, aliada a baixa presença de derivados de quercetina nessa amostra.

Porém, no ensaio de atividade quelante de metais foi diferente. A subfração 2 apresentou valores ligeiramente maiores para essa atividade. De acordo com o doseamento de quercetina e campferol feito para todas as substâncias (tabela 4.5), realmente a substância **19** presente na subfração 2 apresenta 262,64 mg EC g⁻¹, ou seja, a maior quantidade de derivado de campferol entre todas as amostras. Um alto potencial antioxidante para substâncias derivadas de campferol não é comum de ser observado, pois diversos trabalhos relacionam positivamente a presença de grupos hidroxílicos funcionais à atividade quelante de metais (Mira *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2013a, Kumar & Pandey 2013b, 2013c) e como é sabido, o campferol possui uma hidroxila a menos do que a quercetina em sua estrutura. Além disso, o campferol presente na subfração 2 apresenta uma

metila substituindo a hidroxila da posição 3, o que reduziria ainda mais sua atividade. Entretanto, nessa fração temos a presença de dois derivados de quercetina que, quando somados, chegam a quantidades próximas ao total da fração F4A (composta exclusivamente por quercetina 3,7-dimetil éter). Essa presença de derivados de quercetina poderia explicar a maior atividade quelante dessa amostra.

Retornando à estrutura da substância **17**, quercetina 3,7-dimetil éter, pelas análises de deslocamento do espectro e coloração UV/vis, a posição 3-OH parece estar substituída, o que poderia ser relacionado à menor atividade quelante observada quando comparada à subfração 2.

Sobre a subfração 2, a mesma apresentou a menor atividade redutora de ferro após a fração hexânica. Novamente, a estrutura do flavonol em questão está diretamente relacionada a sua atividade. O poder redutor do campferol apresenta boa correlação com as suas características estruturais, especialmente o número de grupos hidroxila, sendo que quanto menor esse número, menor é a probabilidade de redução do metal (Dimitrić *et al.* 2014). Para esta atividade, as frações com a presença de derivados de quercetina apresentaram maiores atividades.

Corroborando os resultados observados por Thaipong e colaboradores (2006) e Dudoné e colaboradores (2009), foi observada uma ótima correlação entre os valores obtidos nos ensaios DPPH[•], ABTS[•] e FRAP, com exceção da subfração 2 no ensaio ABTS[•].

Com exceção do extrato etanólico, todas as amostras que apresentaram atividade antioxidante utilizando o padrão quercetina podem ser relacionadas com a quantificação via CLAE-DAD usando a curva de calibração construída com quercetina.

Conforme o esperado, a subfração F3A apresentou os maiores resultados para todos os ensaios realizados assim como quando utilizado o padrão Trolox. Além disso, para esta subfração, temos em sua composição quercitrina (quercetina 3-*O*-ramnosila, **14**) como a segunda substância em abundância, seguida pelo campferol 3-metil éter (**19**) e por um derivado de quercetina metoxilado e glicosilado (**9**) (Tabela 4.5). Essa combinação de substâncias pode ser a responsável pela alto potencial antioxidante observado em todos os ensaios.

4.3.1.3. Concentração efetiva da amostra para atingir 50% de atividade antioxidante (EC₅₀)

Os resultados de atividade antioxidante para os ensaios DPPH[•], ABTS[•], sistema β-caroteno/ácido linoleico, FRAP e quelante de metais avaliados de acordo com o parâmetro de concentração efetiva estão apresentados na tabela 4.11. Para este parâmetro, também foi calculada a EC₅₀ dos padrões utilizados e os resultados estão apresentados na tabela 4.12. Os valores de EC₅₀ são baseados nos valores de porcentagem que estão apresentados nas tabelas 4.7 e 4.8. No caso de algumas amostras, não foi possível o cálculo de EC₅₀ por apresentarem atividades próximas à zero

ou mesmo porcentagens de atividade decrescentes (Anexo I). Os cálculos foram feitos utilizando no mínimo três concentrações diferentes.

Vale ressaltar que os valores obtidos para este parâmetro são inversamente proporcionais aos valores de atividade antioxidante exibidos nos primeiros dois parâmetros, portanto, quanto menor a EC₅₀ da amostra, maior a atividade antioxidante exercida por ela.

Para a atividade de sequestro do DPPH[•] os valores variaram entre 166,05 e 1557,36 µg mL⁻¹. Neste teste, a EC₅₀ da fração hexânica por apresentar atividade zero, não foi calculada. A amostra que apresentou menor EC₅₀ foi a subfração F3A (166,05 µg mL⁻¹) seguida pela subfração F4A (190,75 µg mL⁻¹), subfração 1 (237,84 µg mL⁻¹), subfração F2A (242,69 µg mL⁻¹), subfração F1A (315,23 µg mL⁻¹), extrato etanólico de folhas (535,98 µg mL⁻¹), fração metanólica (808,81 µg mL⁻¹), subfração FP (946,86 µg mL⁻¹) e subfração 2 (1557,36 µg mL⁻¹).

Para a atividade de sequestro do ABTS[•] os valores variaram entre 50,65 e 353,81 µg mL⁻¹. Novamente, a EC₅₀ da fração hexânica por apresentar atividade zero, não foi calculada. A amostra que apresentou menor EC₅₀ foi a subfração F4A (50,65 µg mL⁻¹) seguida pela subfração F3A (60,15 µg mL⁻¹), subfração F2A (84,97 µg mL⁻¹), subfração F1A (119,19 µg mL⁻¹), subfração 1 (127,58 µg mL⁻¹), extrato etanólico de folhas (208,83 µg mL⁻¹), fração metanólica (241,86 µg mL⁻¹), subfração FP (326,83 µg mL⁻¹) e subfração 2 (353,81 µg mL⁻¹).

Para o ensaio utilizando o sistema β-caroteno/ácido linoleico, os valores variaram entre 232,00 e 1947,67 µg mL⁻¹. Neste ensaio não foi possível obter a EC₅₀ da subfração 2 pois as porcentagens de atividade não se mostraram crescentes com o aumento da concentração (tabela 4.7). A amostra que apresentou menor EC₅₀ foi a subfração F3A (232,00 µg mL⁻¹) seguida pela subfração F4A (267,40 µg mL⁻¹), subfração F1A (287,91 µg mL⁻¹), subfração F2A (321,07 µg mL⁻¹), fração metanólica (440,56 µg mL⁻¹), subfração 1 (575,19 µg mL⁻¹), subfração FP (715,16 µg mL⁻¹), extrato etanólico (769,29 µg mL⁻¹) e fração hexânica (1947,67 µg mL⁻¹).

Para a atividade antioxidante quelante de metais, os valores variaram entre 405,31 e 1238,80 µg mL⁻¹. A amostra que apresentou menor EC₅₀ foi a subfração 2 (405,31 µg mL⁻¹) seguida pela subfração F3A (547,08 µg mL⁻¹), subfração F4A (671,67 µg mL⁻¹), subfração 1 (695,04 µg mL⁻¹), subfração F2A (857,19 µg mL⁻¹), subfração F1A (961,26 µg mL⁻¹), extrato etanólico de folhas (1026,57 µg mL⁻¹), fração metanólica (1088,56 µg mL⁻¹), subfração FP (1304,07 µg mL⁻¹) e fração hexânica (1451,57 µg mL⁻¹).

Para a atividade antioxidante do poder redutor de ferro (FRAP) os valores variaram entre 118,43 e 16119,33 µg mL⁻¹. A amostra que apresentou menor EC₅₀ foi a subfração F3A (118,43 µg mL⁻¹) seguida pela subfração F4A (139,78 µg mL⁻¹), subfração F2A (162,91 µg mL⁻¹), subfração 1 (168,28 µg mL⁻¹), subfração F1A (222,30 µg mL⁻¹), extrato etanólico de folhas (469,91 µg mL⁻¹),

fração metanólica ($671,61 \mu\text{g mL}^{-1}$), subfração FP ($1070,96 \mu\text{g mL}^{-1}$), subfração 2 ($1389,46 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fração hexânica ($16119,33 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 4.11 – Concentração efetiva da amostra para atingir 50% de atividade antioxidante (EC_{50} ; $\mu\text{g mL}^{-1}$) testada pelos métodos do sequestro do DPPH[•] e ABTS[•], redução de ferro (FRAP), quelante de metais e oxidação do β -caroteno.

Amostras	DPPH [•]	ABTS [•]	β -caroteno/ácido linoleico	Quelante de metais	FRAP
Etanólico	535,98	208,83	769,29	1026,57	469,91
Metanólica	808,81	241,86	440,56	1088,56	671,61
Hexânica	-	-	1947,67	1451,57	16119,33
FP	946,86	326,83	715,16	1304,07	1070,96
F1A	315,23	119,19	287,91	961,26	222,30
F2A	242,69	84,97	321,07	857,19	162,91
F3A	166,05	60,15	232,00	547,08	118,43
F4A	190,75	50,65	267,40	671,67	139,78
1	237,84	127,58	575,19	695,04	168,28
2	1557,36	353,81	-	405,31	1389,46

-: Valores não calculados.

Este parâmetro é o que revela a real atividade antioxidante da amostra testada, uma vez que contabiliza as atividades em diferentes concentrações resultando em curvas dose-resposta. Além disso, este parâmetro pode, ainda, sugerir quais amostras seriam mais indicadas para um uso comercial, podendo-se estimar quanto efetivamente é necessário de uma substância e, consequentemente de massa seca vegetal, para se obter uma determinada intensidade de reação.

Recentemente, um trabalho realizado por Azevedo e colaboradores (2013), sugeriu que a substância 7-hidroxicalameneno (um sesquiterpeno) e presente majoritariamente (38,4% a 37,5%) no óleo essencial de *C. cajucara* seria a responsável por uma EC_{50} de $35,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio de sequestro do DPPH[•]. Podemos sugerir que terpenoides que não os mono ou sesquiterpenos não apresentam atividade antioxidante para o método de sequestro do DPPH[•] já que a fração hexânica, constituída majoritariamente por diterpenos, não se mostrou ativa.

Iniciando pela subfração F3A, que apresentou as maiores atividades antioxidantes na maioria dos ensaios, a mesma apresentou as menores EC_{50} nos ensaios de sequestro do DPPH[•], sistema β -caroteno/ácido linoleico e atividade redutora de ferro (FRAP). Já no ensaio de sequestro do ABTS[•], a subfração F4A apresentou valor muito próximo de EC_{50} ao da fração F3A, porém, ainda menor ($50,65 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Comparando a EC_{50} dos padrões apresentadas na tabela 4.12, pode-se observar que a quercetina tem maior poder antioxidante do que o Trolox, apresentando praticamente o dobro de atividade, sendo comumente citada na literatura como um flavonol com alto poder antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entretanto, apresenta baixa atividade quelante de metais.

Tabela 4.12 – Concentração efetiva para atingir 50% de atividade antioxidante (EC_{50} ; $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos padrões Trolox, quercetina e ácido gálico, testada pelos métodos do sequestro dos radicais DPPH e ABTS, redução de ferro (FRAP), quelante de metais e oxidação do β -caroteno.

Padrões	DPPH [*]	ABTS [*]	β -caroteno/ ácido linoleico	Quelante de metais	FRAP
Trolox	152,15	121,51	*	-	115,89
Quercetina	68,42	52,73	86,02	648,51	40,55
Ácido gálico	-	-	-	39,29	-

*: Não foi possível o cálculo de EC_{50} do padrão para o teste em questão.

As amostras com menor EC_{50} foram comparadas com os padrões. Apenas para o teste de sequestro do ABTS^{*} temos duas amostras com valores de EC_{50} próximos ao apresentado pela quercetina: as subfrações F3A e F4A, ambas apresentando majoritariamente o flavonol quercetina-3,7-dimetil éter (**17**).

Quanto à atividade quelante de metais, a subfração 2 continua sendo a mais ativa, se mostrando inclusive, mais ativa do que o padrão de quercetina. Entretanto, essa mesma subfração apresenta a menor atividade em relação à capacidade de redução de íons férricos (excetuando-se à fração hexânica). Esse resultado evidencia, novamente, que a estrutura química é importante na atividade medida. Para a subfração 2, composta majoritariamente pelo campferol-3-metil éter (**19**), há grande potencial quelante de ferro, mas baixo poder redutor do mesmo.

Extratos hidroalcoólicos de *C. gratissimus* Burch. e *C. zambesicus* Müll. Arg. também foram avaliados a respeito de sua atividade antioxidante através do ensaio de sequestro do DPPH^{*} onde, para *C. gratissimus* os resultados mostraram-se promissores apresentando EC_{50} de $58,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Ndhlala *et al.*, 2013). *C. sparsiflorus* Morong. também apresentou baixa EC_{50} para o ensaio de sequestro do DPPH^{*}, porém utilizando o extrato butanólico (Shahwar *et al.*, 2011). Em relação ao que se observa na literatura, neste estudo os extratos de *C. sphaerogynus* não se apresentaram como potentes antioxidantes no sequestro do DPPH^{*}.

Em um trabalho realizando testes *in vivo*, o extrato aquoso de *C. cajucara* constituído por flavonoides, cumarinas e alcaloides, apresentou atividade antioxidante significativa no ensaio de hipoxantina/xantina oxidase, verificando-se que a peroxidação lipídica hepática que se observava aumentada em animais diabéticos foi diminuída, reduzindo o estresse oxidativo e contribuindo para a recuperação do tecido (Rodrigues *et al.*, 2012). No ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoléico, a subfração F3A continuou a apresentar os menores valores de EC_{50} , sugerindo que tal subfração possui diversos pontos de ação antioxidante, entre eles a proteção contra a peroxidação lipídica.

O cálculo de EC_{50} de uma substância pode ser amplamente aplicado em investigações farmacológicas, principalmente ao considerar que substâncias naturais muitas vezes são as responsáveis pelo efeito de proteção contra o desenvolvimento de diversas patologias.

Atualmente, existem muitas metodologias para se avaliar a capacidade antioxidante de uma espécie vegetal. Estes possuem fundamentos, mecanismos de reação e maneiras de expressar resultados muito diferentes, visando as diversas aplicações nas áreas de fisiologia, farmacologia, nutrição, agroquímica, cosmética entre outras. Dessa forma, torna-se difícil escolher os métodos mais apropriados, de modo a evitar a interpretação errônea dos resultados. A comparação de dados a partir de diferentes estudos também é difícil e devido a isso, é preferível realizar uma bateria de ensaios, analisando diferentes aspectos químicos dos antioxidantes e compará-los aos padrões sintéticos utilizados como antioxidantes (Trolox, quercetina, BHT, entre outros) como foi o caso desta pesquisa. Avaliando uma série de resultados e possibilidades, obtemos um perfil antioxidante mais completo, sem perder de vista a relação com a potencial aplicação do produto. É imprescindível optar por métodos comumente aceitos, validados e padronizados, com informações acumuladas na literatura.

Esforços têm sido feitos, especialmente nos últimos anos, para organizar essa área de pesquisa, ampla e em contínuo crescimento. Segundo Oliveira (2009), outros métodos analíticos *in vitro* devem ser desenvolvidos criteriosamente, levando-se em consideração o uso de oxidantes e alvos de significância biológica como as proteínas, triacilgliceróis e modelos celulares em condições reacionais (concentração, tempo de reação, pH) mais próximas possíveis daquelas *in vivo*. Além disso, testes *in vivo* são necessários para a comprovação das atividades observadas e de possíveis efeitos colaterais do uso de uma substância.

4.3.2. Ensaio de quantificação do efeito inibidor de crescimento bacteriano

Os resultados para as atividades antimicrobianas do extrato, frações e subfrações de *C. sphaerogynus* estão apresentados na tabela 4.13 (*E. coli*) e tabela 4.14 (*B. subtilis*). Para esse ensaio foram analisados os parâmetros de porcentagem de inibição de crescimento da bactéria para as quatro concentrações testadas por ensaio e, para as amostras que apresentaram curvas lineares foi calculada a MIC₅₀ que corresponde à concentração mínima para que o extrato apresente 50% de atividade inibitória do crescimento.

Com relação ao padrão ampicilina (0,1 mg mL⁻¹), os valores variaram entre 99% e 99,5% de inibição de crescimento nas duas bactérias testadas, conforme o esperado. Também foi testado o padrão de quercetina, que apresentou valores não significativos para *E. coli* e uma porcentagem de 12,49% de inibição de crescimento de *B. subtilis* quando na concentração de 0,25 mg mL⁻¹, sendo sua MIC₅₀ calculada em 0,44 mg mL⁻¹ (tabela 4.14).

Analisando os resultados para cada amostra na concentração de 0,25 mg mL⁻¹, os valores de porcentagem de inibição do crescimento de *E. coli* (tabela 4.13) variaram entre 4,32 e 14,47%. Neste ensaio, as subfrações F1A, F2A e 2 não apresentaram atividade de inibição de crescimento na maior concentração testada. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição do

crescimento de *E. coli* foi a fração hexânica (14,47%) seguida pela fração metanólica (13,40%), extrato etanólico (13,19%), subfração FP (11,88%), subfração F4A (8,86%) e subfração 1 (8,54%), todas na concentração de 0,25 mg mL⁻¹. A MIC₅₀ das amostras para *E. coli* variaram entre 1,53 mg mL⁻¹ e 2,98 mg mL⁻¹, sendo este parâmetro calculado apenas para três amostras. A amostra que apresentou menor MIC₅₀ foi a subfração FP (1,53 mg mL⁻¹) seguida pela fração metanólica (2,21 mg mL⁻¹) e subfração 1 (2,98 mg mL⁻¹).

Tabela 4.13 – Porcentagem de atividade antimicrobiana e concentração mínima inibitória (MIC₅₀) frente à *E. coli*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento, do extrato, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Amostras	<i>Escherichia coli</i> MG1655					
	0,05 mg mL ⁻¹	0,1 mg mL ⁻¹	0,25 mg mL ⁻¹	0,50 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹	MIC ₅₀ ^b
Ampicilina		99,43				-
Quercetina		*	*	*	*	-
Etanólico		20,21	13,19	25,63	21,13	-
Metanólica		*	13,40	16,7	27,34	2,21
Hexânica		20,62	14,47	10,15	14,47	-
FP		0,00	11,88	14,25	*	1,53
F1A		*	*	*	*	-
F2A		*	*	*	*	-
F3A		*	4,32	*	*	-
F4A		*	8,86	*	*	-
1	4,45	*	8,54	*	13,00	2,98
2	0,80	*	*	19,55	14,93	-

^b: Valores expressos em mg mL⁻¹.

*: Amostras inativas (<0,001).

-: MIC não calculada.

Os valores de porcentagem de inibição do crescimento de *B. subtilis* (tabela 4.14) variaram entre 9,17 e 51,26% para as amostras testadas na concentração de 0,25 mg mL⁻¹. Para esta bactéria, as subfração 1 e 2 forma inativas quando testadas na concentração de 0,25 mg mL⁻¹. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição do crescimento de *B. subtilis* foi a fração hexânica (51,26%) seguida pelo extrato etanólico (35,67%), subfração F4A (19,33%), fração metanólica (19,22%), subfração FP (18,55%), subfração F2A (15,16%), subfração F1A (12,42%) e subfração F3A (9,17%). A MIC₅₀ das amostras para *B. subtilis*, variaram entre 0,26 mg mL⁻¹ e 2,26 mg mL⁻¹ sendo que esse parâmetro foi calculado para todas as amostras com exceção da subfração 1. A amostra que apresentou menor MIC₅₀ para *B. subtilis* foi a fração hexânica (0,26 mg mL⁻¹) seguida pela subfração FP (0,47 mg mL⁻¹), fração metanólica (0,48 mg mL⁻¹), extrato etanólico (0,73 mg mL⁻¹), subfração F4A (1,09 mg mL⁻¹), subfração 2 (0,83 mg mL⁻¹), subfração F2A (1,09 mg mL⁻¹), subfração F3A (1,50 mg mL⁻¹) e subfração F1A (2,23 mg mL⁻¹).

Tabela 4.14 – Porcentagem de atividade antimicrobiana e concentração mínima inibitória (MIC₅₀) frente à *B. subtilis*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento, do extrato, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Amostras	<i>Bacillus subtilis</i> PY79					MIC ₅₀ ^b
	0,05 mg mL ⁻¹	0,1 mg mL ⁻¹	0,25 mg mL ⁻¹	0,50 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹	
Ampicilina		99,02				-
Quercetina		0,00	12,49	36,32	*	0,44
Etanólico		15,80	35,67	47,45	56,84	0,73
Metanólica		0,00	19,22	68,73	100,00	0,48
Hexânica		17,12	51,26	97,13	*	0,26
FP		0,00	18,55	66,25	99,73	0,47
F1A		0,00	12,42	17,12	21,94	2,23
F2A		0,00	15,16	28,71	43,05	1,09
F3A		0,00	9,17	25,20	30,4	1,50
F4A		0,00	19,33	21,81	*	1,09
1	*	*	*	*	*	-
2	*	*	0,00	39,93	57,3	0,83

^b: Valores expressos em mg mL⁻¹.

*: Amostras inativas (<0,001).

-: MIC não calculada.

No presente trabalho, a bactéria gram-negativa é representada por *E. coli*, que pertence à flora normal de humanos. No entanto, já foi relatado que uma cepa de *E. coli* causou casos graves de intoxicação alimentar e, devido à isso, conservantes para eliminar o seu crescimento são necessários (Rauha *et al.*, 2000). A bactéria gram-positiva por sua vez é representada por *B. subtilis* que apesar de bastante utilizada para biocontrole é também conhecida pela causa de graves doenças pulmonares como asma e bronquite (Flindt, 1969; Krebs *et al.*, 1998).

Entre diversas atividades biológicas exercidas pelos produtos naturais, nos dias de hoje eles também são reconhecidos como importantes agentes antimicrobianos devido a sua diversidade de ações que por sua vez, acredita-se estar relacionada com suas estruturas químicas. Devido a isso, as substâncias provenientes de produtos naturais vêm sendo usadas por diversos grupos de pesquisa com o objetivo de descobrir novas drogas e/ou alternativas para diversos tratamentos, entre eles, os antimicrobianos (Horiuchi *et al.*, 2007; Ndi *et al.*, 2007; Viano *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2011).

A fração hexânica de *C. sphaerogynus* foi a que apresentou a maior porcentagem de inibição do crescimento bacteriano, mostrando-se promissora no ensaio utilizando a bactéria *B. subtilis*. Resultados similares a este foram relatados por Cai e colaboradores (1993) ao testar dois diterpenos isolados de *C. lechleri* frente a *B. subtilis* e *E. coli*. Entretanto, para *E. coli* (tabela 4.13), tal fração apresentou resultado relativamente baixo e próximo ao obtido com o extrato etanólico e fração metanólica.

Podemos inferir que tal resultado apresentado pela fração hexânica deva-se à presença majoritária de terpenoides nessa fração, sendo a maioria, pertencente ao grupo dos diterpenos tipo abietanos, podocarpanos e clerodanos, já relatados por Motta e colaboradores (2013) com atividade

antiproliferativa. Entretanto, são necessários testes complementares para analisar se os efeitos são de natureza bactericida ou bacteriostática. A subfração FP mostrou-se com atividade menor se comparada à hexânica, o que pode ser devido às diferenças qualitativas e quantitativas entre elas em relação aos diterpenos presentes em ambas (tabela 4.1; Anexo I).

Em *Croton*, trabalhos têm demonstrado a presença de agentes antimicrobianos da classe dos diterpenos. A atividade antimicrobiana demonstrada pelo diterpeno casbano extraído e isolado de *C. nepetaefolius* pode ser explicada pela presença de um grupo hidrofóbico e uma região hidrofílica possuindo dois grupos hidroxilas. Estes dois requisitos estruturais podem ser os responsáveis por uma inserção adequada deste composto em membranas celulares por meio de uma interação não específica com fosfolipídeos de membrana, desestabilizando as interações não covalentes entre os ácidos graxos da bicamada lipídica e, assim, interferindo no desenvolvimento celular (Carneiro *et al.*, 2011, Cardoso *et al.*, 2012).

Em *C. sonderianus* Müll. Arg., o extrato hexânico e o extrato etanólico de suas raízes, apresentaram atividades antimicrobianas em ensaios qualitativos utilizando, entre outras bactérias e fungos, as mesmas bactérias testadas neste trabalho: *E. coli* e *B. subtilis* (McChesney & Clark, 1991).

Em *C. rhamnifolioides* Pax & K. Hoffm. os resultados demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas e sugerem a possibilidade de aplicação do mesmo para inibir o crescimento e sobrevivência de agentes patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* e *S. aureus* presentes nos alimentos (Costa *et al.*, 2013). Novamente, a classe dos terpenos se mostra com atividade antimicrobiana.

As subfrações, em especial as com maior grau de pureza, apresentaram porcentagens de inibição ínfimas se comparadas ao padrão ampicilina. Tal resultado provavelmente deva-se ao fato de que as substâncias flavonoídicas presentes em *C. sphaerogynus* não apresentam atividade antimicrobiana, já que é praticamente inexistente a presença de substâncias apolares da classe dos terpenos a partir da subfração F1A. Exceção à subfração 2, composta majoritariamente por um campferol metoxilado e que apresentou MIC₅₀ de 0,83 mg mL⁻¹. As frações compostas majoritariamente por derivados de quercetina, apresentaram baixa atividade antimicrobiana, assim como o padrão quercetina.

Em 2001, Xu & Lee testaram 38 flavonoides e os que apresentaram atividades antimicrobianas representam sete grupos estruturais diferentes: miricetina, datiscetina, campferol, quercetina e duas flavonas, entre elas a luteolina. Todos apresentaram atividade contra *S. aureus*, porém, a miricetina foi ativa também contra *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*. Ao relacionar as atividades com as estruturas, os autores sugerem que o grupo hidroxílico na posição 3 do flavonoide é necessário para a atividade antimicrobiana. Ainda,

segundo este grupo de pesquisadores, a posição dos grupos hidroxílicos livres da molécula também pode ser importante para a atividade antimicrobiana. Quando os grupos hidroxílicos são substituídos por grupos metoxílicos, tal como a substância isolada na subfração F4A (quercetina 3,7-dimetil éter, **17**) deste estudo, a atividade é reduzida.

Segundo Wu e colaboradores (2013a), flavonoides têm potencial no uso como agentes antimicrobianos pela indústria alimentícia. Entretanto, as diferentes estruturas químicas exibem diferentes atividades. Geralmente um agente antimicrobiano atua por três mecanismos de inibição: inibindo a síntese de ácido nucleicos, por meio da inibição da enzima DNA-girase; alterando as funções da membrana plasmática, principalmente sua permeabilidade; e inibindo o metabolismo energético (Wu *et al.*, 2013a; 2013b). Quando testados diferentes flavonoides frente à *E. coli*, Wu e colaboradores (2013a) verificaram que o flavonóis são mais eficientes em inibir a atividade da enzima DNA-girase, sendo campferol o mais ativo, seguido por quercetina, crisina, galangina, luteolina, alguns isoflavonoides e, como menos ativo o flavonol miricetina, sendo o mecanismo de ação provavelmente a interação do flavonoide com o sítio de ligação de ATP. A posição 5-OH parece ser importante para resultar na atividade antimicrobiana e, segundo os autores, a presença de hidroxilas adicionais nas posições 7 e 4' podem potencializar a ação.

Da mesma forma, Wu e colaboradore (2013b) testaram a interação de flavonoides com a membrana plasmática de *E.coli*. Os autores verificaram, utilizando a metodologia de modelo estrutura-atividade (QSAR), que isoflavonoides são menos ativos em alterar a permeabilidade da membrana plasmática do que os flavonoides. Novamente, campferol aparece como o flavonoide mais ativo em aumentar a rigidez da membrana, seguido por crisina, quercetina, baicaleina, luteolina, e outros. O grupo hidroxílico na posição 3 parece ser o primeiro determinante para a diminuição da permeabilidade da membrana da bactéria (aumenta sua rigidez) e o aumento do numero de grupos hidroxílicos, diminui a hidrofobicidade do flavonoide e, conseqüentemente, reduz sua atividade antimicrobiana.

Dessa forma, os resultados obtidos para as subfrações estão em conformidade com os trabalhos acima citados, sendo a subfração 2 a mais ativa na inibição do crescimento bacteriano, em especial de *B. subtilis*. Essa subfração é composta majoritariamente pela substância campferol 3-metil éter (**19**).

Tratando-se de flavonoides de *Croton*, Oliveira e colaboradores (2008) relataram a presença de atividade antibacteriana no látex seco e *in natura* e nos extratos obtidos por partição em diferentes solventes e em diferentes órgãos de *C. urucurana*, indicando que os princípios ativos são de naturezas diferentes e distribuem-se de modo não uniforme nas diferentes partes da planta. No mesmo trabalho, a abordagem fitoquímica preliminar do látex seco de *C. urucurana* revelou a presença de alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos, taninos condensados e esteroides, classes

de metabólitos secundários com conhecidos efeitos antimicrobianos (Rauha *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2001; Sartori, 2005; Pretto, 2005).

Um trabalho similar já havia sido realizado por Peres e colaboradores (1997) onde relataram atividade antimicrobiana de extratos hexânicos, diclometânicos, hidroalcoólicos e frações metanólicas do material caulinar de *C. urucurana* frente a *S. aureus* e *Salmonella typhimurium*. Após análises químicas inferiu-se que as atividades antimicrobianas ocorreram devido à presença de uma variedade de substâncias como ácido acetil aleuritólico, β -sitosterol-*O*-glicosídeo, sonderianina, estigmasterol, β -sitosterol, campesterol, catequinas e galocatequinas.

Segundo pesquisas antimicrobianas desenvolvidas no laboratório de Fitoquímica da USP, extratos foliares hexânicos, etanólicos e metanólicos de *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius* testados na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ frente a *B. subtilis* não apresentaram atividade. Entretanto, frente a *E. coli*, os extratos hexânicos e etanólicos apresentaram atividade de 24,22% e 29,78%, respectivamente para *C. echinocarpus* e 32,38% e 29,44%, respectivamente para *C. vulnerarius* (Athayde, 2013). Tal resultado foi relacionado à presença da flavona vitexina, substância que não faz parte da composição química de *C. sphaerogynus* inferindo, portanto, que a presença dessa flavona parece não estar muito relacionada à atividade antimicrobiana frente a *E. coli* uma vez que *C. sphaerogynus* apresentou valores de atividade muito próximos a *C. echinocarpus* e *C. vulnerarius*. Além disso, *C. sphaerogynus* apresentou atividade contra *B. subtilis*, o que não foi observado para as duas outras espécies. Em *C. pallidulus* var. *pallidulus*, o extrato metanólico apresentou MIC de 2,05 mg mL⁻¹ frente a *S. aureus*, valor este próximo ao obtido para *C. sphaerogynus* frente a *E. coli*, porém muito superior ao obtido para *B. subtilis*.

As bactérias gram-positivas e gram-negativas possuem diferenças marcantes na composição de suas membranas e, por isso, são relevantes no estudo dos mecanismos de ação dos produtos naturais. Essa diferença consiste na parede celular das bactérias gram-positivas que é composta de aproximadamente 90% de peptidoglicanos, diferindo das gram-negativas, com paredes mais complexas e compostas majoritariamente por camadas lipídicas (Trabulsi *et al.*, 1999). Os agentes antimicrobianos se difundem com mais facilidade através da parede celular das gram-positivas, de natureza menos apolar e devem atravessar os canais de porinas nas gram-negativas, compostas por parede celular altamente hidrofóbica (Baron & Finegold, 1990).

Tanto os valores de porcentagem de inibição quanto a MIC₅₀ foram maiores em *B. subtilis*, uma bactéria gram-positiva, do que em *E. Coli*, uma bactéria gram-negativa, corroborando os resultados anteriores onde já foi relatado que diterpenos realmente são mais ativos nesse tipo de organismos (Chinou, 2005; Porto *et al.*, 2013; Fonseca *et al.*, 2013; Ngwoke, 2014).

4.3.3. Ensaio de inibição da atividade da transcriptase reversa: antiRT-HIV1

A pesquisadora Lucimar Barbosa da Motta, em ensaios preliminares utilizando os extratos aquosos de folhas e caules, extrato etanólico e frações metanólica e hexânica de *C. sphaerogynus* observou atividade anti-HIV-1 para essas amostras somente na concentração de 2 mg mL⁻¹. Em extração realizada segundo metodologia de Han e colaboradores (2011), não seriada como utilizada acima, os extratos aquosos de folhas e caules de *C. sphaerogynus* foram ativos na concentração de 200 µg mL⁻¹ (comunicação pessoal).

De acordo com esses resultados preliminares, optou-se por realizar o ensaio de atividade anti-HIV-1 apenas com as subfrações da fração metanólica, a fim de verificar se, isoladamente ou com um maior grau de pureza (subfração F4A, 1 e 2), poderia ser observado algum resultado promissor.

Os resultados para as atividades anti-HIV-1 de subfrações de *C. sphaerogynus* estão apresentados na tabela 4.15. Para esse ensaio foram analisados os parâmetros de porcentagem de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa frente a três concentrações diferentes de cada amostra. Para as subfrações que apresentaram curvas lineares de porcentagem, foi calculada a MIC₅₀. O padrão Foscarnet na concentração de 0,003 mg mL⁻¹ apresentou valor de inibição de 96,68%, conforme esperado.

Para as amostras, os valores de porcentagem de inibição da atividade da enzima para a maior concentração, variaram entre 18,66% e 44,22%. A amostra que apresentou maior porcentagem de inibição foi a subfração F1A (44,22%) seguida pela subfração FP (42,10%), subfração F4A (35,10%), subfração F3A (34,70%), subfração 1 (29,72%), subfração F2A (23,67%) e subfração 2 (18,66%). A MIC₅₀ pode ser calculada apenas para duas amostras: a subfração F4A que apresentou MIC₅₀ de 1,33 mg mL⁻¹ e a subfração 1 que apresentou MIC₅₀ de 3,49 mg mL⁻¹.

Tabela 4.15 – Porcentagem de inibição da atividade da transcriptase reversa (antiRT-HIV-1) de subfrações de *C. sphaerogynus*.

Amostras	0,2 mg mL ⁻¹	0,5 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹	MIC ₅₀ ^b
FP	53,90	28,92	42,10	-
F1A	0,00	0,00	44,22	-
F2A	1,72	0,00	23,67	-
F3A	22,99	19,28	34,70	-
F4A	4,48	29,58	35,10	1,33
1	23,16	26,03	29,72	3,49
2	8,19	31,55	18,66	-

^b: Valores expressos em mg mL⁻¹.

-: MIC₅₀ não calculada.

No ciclo de vida do vírus HIV, a ação da enzima transcriptase reversa é importante para dar início à transcrição do RNA viral em DNA complementar (cDNA), que rapidamente migra para o

núcleo da uma célula hospedeira incorporando-se ao seu cromossomo. A partir daí, o material genômico bem como várias proteínas virais passam a ser produzidos, após eventos de transcrição e tradução, pela célula hospedeira. Ao final, duas cópias de RNA viral além de outras proteínas, são incorporadas ao vírus inativo fazendo com que ele seja convertido em vírus um funcionalmente ativo (Singh & Bodiwala, 2010). Na ausência de atividade da enzima transcriptase reversa, o genoma viral não pode ser incorporado à célula hospedeira e como consequência, o vírus não completa seu ciclo de vida. Devido a tal importância que a enzima transcriptase reversa exerce no ciclo de vida do vírus HIV, a mesma tornou-se alvo de drogas antirretrovirais, tais como Nevarapina e Delavirdina que são utilizadas para tratar pacientes infectados com HIV (Woradulayapinij *et al.*, 2005; De Clercq, 2007).

A amostra que apresentou a maior atividade foi a subfração F1A que está entre as subfrações com maior e mais variado número de substâncias, sendo a rutina seu flavonoide majoritário. Relatos demonstram que a rutina possui atividade frente a sete tipos de vírus entre eles o vírus do herpes simples (HSV), vírus respiratório sincicial, poliovírus e vírus Sindbis (Cushnie & Lamb, 2005). Polímeros sulfatados apresentam atividade anti-HIV graças à presença dos grupos sulfato, que por sua vez, são os responsáveis pela inibição da ligação do vírus com a célula. Dessa forma, diversos compostos fenólicos sulfatados foram sintetizados, entre eles o sulfato de rutina, já que ele contém os grupos hidroxílicos necessários para a ligação dos grupos sulfato (Vlietinck *et al.*, 1998). Já a rutina no estado não sulfatado, ou seja, no seu estado natural, não apresentou atividade anti-HIV em testes isolados (Tao *et al.*, 2007). Substâncias ésteres de rutina foram patenteadas por um grupo de pesquisadores da China por apresentarem potente ação anti-HIV (Chen *et al.*, 2005).

Entre as subfrações, a F4A que possui a substância **17** (quercetina dimetoxilada), apresentou a menor MIC₅₀ (1,33 mg mL⁻¹), apontando para a atividade anti-HIV dessa substância. Entretanto, este resultado apresenta um valor muito acima dos encontrados na literatura para outras substâncias consideradas como ativas nesse tipo de ensaio e que estão na faixa dos nanogramas ou microgramas de concentração (El-Mekkawy *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2004, Andrae-Marobela *et al.*, 2013).

Apesar dos resultados do ensaio utilizando as subfrações de *C. sphaerogynus* terem se mostrado pouco promissores, as substâncias fenólicas geralmente têm sido bem descritas na literatura no que se refere às atividades anti-HIV.

Em um trabalho de revisão realizado por Andrae-Marobela (2013) verificou-se que flavonoides tendem a apresentar ações em vários alvos, mediando diversas atividades anti-HIV, porém, a eficácia dessas atividades foi considerada baixa. Pesquisas que verifiquem efeitos sinérgicos dos flavonoides com outros agentes retrovirais são interessantes, visto o imenso potencial terapêutico exibido por essas moléculas. Nesse mesmo trabalho, também foi verificado que substâncias da classe das cumarinas atuam em sítios mais específicos e com potencial mais elevado

em alvos do ciclo de vida do vírus HIV-1. De fato, as dipiranocumarinas extraídas de *Calophyllum brasiliense* apresentaram MIC₅₀ de 20 µg mL⁻¹.

Kumar & Pandey (2013c) reunindo dados de diversos trabalhos, verificaram que baicaleína, um flavonóide pouco comum e isolado a partir de *Scutellaria baicalensis* (Lamieaceae) inibe a infecção por HIV-1 e sua replicação numa dose de 2 µg mL⁻¹ (Asres *et al.*, 2005), assim como os flavonoides robustaflavona e hinokiflavona (Cushnie & Lamb, 2005). A relação entre a estrutura e função dos flavonoides e sua atividade inibidora de enzimas envolvidas no processo de infecção pelo vírus foram observadas por Gerdin e Svensjö (1982), que demonstraram que flavanas-3-ol apresentam maior eficácia na inibição seletiva de HIV-1 e HIV-2 do que as flavonas e flavononas.

Também já foi relatado sinergismo entre os flavonoides e os outros agentes antivirais. A quercetina, por exemplo, potencializa os efeitos de 5-etil-2-dioxiuridine e o aciclovir contra o HSV e a infecção da pseudorraiva. A apigenina também aumenta a atividade antiviral do aciclovir contra os mesmos vírus (Mucsi *et al.*, 1991; Middleton & Kandaswami, 1994). Asres e colaboradores (2005) apontam os flavonoides como promissores agentes anti-HIV, inibindo a atividade da transcriptase reversa, induzindo interferons, inativando proteases virais e inibindo a expressão de co-receptores virais (como CCR2b e CCR3). Entretanto, o mecanismo molecular para esses efeitos antivirais de flavonoides ainda não é claro.

Poucos estudos de atividade anti-HIV já foram reportados para *Croton*. Filho e colaboradores (2010) reuniram vários trabalhos anti-HIV e entre eles há um relato sobre o extrato aquoso de sementes de *C. zambesicus* que apresentou MIC₅₀ de 125 µg mL⁻¹ em ensaios preliminares usando cultura de células infectadas (Hussein, 1999).

Ésteres de forbol como 12-*O*-acetilforbol-13-decanoato e 12-*O*-decanoilforbol-13-(2-metilbutirato) presentes em extratos metanólicos de sementes de *C. tiglium* inibiram totalmente o efeito citopático causado pelo vírus HIV-1 em concentrações de 7,6 ng mL⁻¹ e 7,8 µg mL⁻¹, respectivamente (El-Mekkawy *et al.*, 2000).

De acordo com os resultados obtidos para *C. sphaerogynus*, podemos sugerir que tal espécie é pouco promissora para a prospecção de substâncias fenólicas com atividade anti-HIV-1, porém, um estudo com diterpenos isolados seria interessante para a confirmação dessa informação.

5. Considerações finais

A proposta inicial do trabalho foi contribuir com a descrição de substâncias fenólicas ainda pouco conhecidas em *C. sphaerogynus*, mais especificamente pertencentes à classe dos flavonoides. Dessa forma, o objetivo geral foi atingido com êxito.

Diante dos resultados encontrados para os ensaios antioxidantes, passamos a investir no isolamento de substâncias de subfrações que se mostravam mais ativas, como foi o caso das subfrações F3A e F4A. Tentativas de isolamento foram feitas com a subfração F3A que se mostrou a mais promissora. Entretanto, nem sempre a substância em maior grau de pureza foi a que apresentou maior atividade biológica, sugerindo um sinergismo na ação de flavonoides para as atividades biológicas testadas neste estudo. Por exemplo, à subfração F4A, composta pela substância **17**, não apresentou maior atividade do que a subfração F3A, composta por quatro constituintes, entre eles a substância **17**. Da mesma forma, a subfração 2, composta pela substância **19** em maior grau de pureza, também não se mostrou mais ativa, na maioria dos ensaios, do que a subfração F3A.

Assim como relatado por muitos trabalhos, pudemos verificar que a estrutura química do flavonoide é determinante para a sua atividade biológica. Uma fração com alta atividade antioxidante não necessariamente apresentou alta atividade antimicrobiana, por exemplo.

A atividade antimicrobiana da fração hexânica frente a *B. subtilis* também foi um resultado promissor descoberto durante esta pesquisa. Entretanto, para o ensaio de atividade anti-HIV-1, *C. sphaerogynus* não se mostrou como uma espécie promissora para síntese de substâncias com potencial antiviral.

Na tentativa de elucidar completamente as estruturas em maior grau de pureza das subfrações F4A e 2, foi solicitada a análise de ressonância magnética nuclear (RMN), entretanto não foi possível a obtenção dos resultados até o depósito desta dissertação. Essa análise confirmará a presença das metoxilas nas posições do flavonoide sugeridas neste trabalho, uma vez que o espectro de massas para a substância **17** não corroborou integralmente sua identificação.

Para obtermos uma visão geral e resumida dos resultados apresentados, correlacionamos a composição química do extrato, frações e subfrações com as atividades biológicas analisadas neste estudo, utilizando, para isso, uma análise multivariada pelo método de análise do componente principal (PCA) (Figura 5.1). Para essa análise foi construída uma matriz de covariância contendo como variáveis os teores das substâncias majoritárias de cada extrato, frações e subfrações (diterpenos e flavonoides), bem como as porcentagens de atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV-1 de todas as amostras.

Na figura 5.1 podemos observar que a PCA pode explicar 70% da variabilidade existente nos dados já nos dois primeiros eixos. Podemos, ainda, notar a representação espacial das diferentes substâncias de acordo com sua composição química e potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV-1.

Conforme verificado no decorrer do trabalho e confirmado pela PCA, o eixo 1 apresenta como variável determinante para a separação das amostras, a composição química das mesmas. As amostras posicionadas no lado positivo desse eixo são as subfrações que não apresentam diterpenos em sua composição. Nesse lado positivo do eixo 1, posicionadas as amostras ricas em flavonoides, estão também as amostras que apresentaram o maior potencial antioxidante em todos os ensaios, excetuando atividade quelante. Interessantemente, essas amostras também apresentaram maior potencial anti-HIV-1. A posição da subfração F3A mais distante no lado positivo do eixo 1 evidencia seu alto poder antioxidante. Do lado negativo do eixo 1 estão posicionados o extrato etanólico, frações metanólica, hexânica e subfração FP, amostras que apresentam em sua composição, substâncias da classe dos diterpenos. Para esse lado do eixo 1, encontram-se as amostras com maior potencial antimicrobiano, indicando que a classe de diterpenos tem maior interferência no crescimento bacteriano do que os flavonoides. Finalmente, de acordo com a PCA, pudemos verificar que o flavonol quercetina 3,7-dimetil éter tem maior potencial antioxidante e anti-HIV do que o flavonol campferol 3-metil éter, que parece melhor se correlacionar à atividade quelante. Entretanto, com somente duas substâncias isoladas é difícil afirmar se outro flavonol teria maior ou menor atividade. Pelo tamanho dos vetores, podemos apenas inferir que de todos os flavonóis incluídos na PCA, a substância **9** (rutina) é a que menos colabora para a atividade antioxidante analisada.

Dessa forma e certos de que serão necessárias maiores investigações e pesquisas a respeito das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *C. sphaerogynus*, podemos com esta pesquisa, concluir que tal espécie, nativa e abundante em nossa flora, apresenta-se promissora para uso de seus extratos como agentes antioxidantes naturais.

Figura 5.1: A. Análise de componente principal de 17 variáveis relacionadas à composição, atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-HIV-1 dos extratos e frações de *Croton sphaerogynus*. Extrato etanólico, frações metanólica e hexânica e subfrações FP, F1A, F2A, F3A, F4A, 1 e 2. Para identificação dos diterpenos (D4, D7, D13 e D18), ver tabela 4.1; para identificação dos flavonoides (F7, F9, F14, F17 e F19), ver tabela 4.5. B. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2. C. Porcentagem de variância explicada pela análise e porcentagem de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

6. Resumo

Desde os primórdios da medicina, substâncias químicas derivadas de animais, vegetais e microrganismos têm sido usadas no tratamento de diversas doenças. Dentre estas, os produtos derivados de vegetais têm dominado as farmacopeias por milhares de anos, fornecendo uma fonte inesgotável de recursos medicinais. O metabolismo secundário geralmente é definido como o responsável pela grande variedade de substâncias químicas apresentadas pelas plantas, porém específicos para alguns grupos. Aos flavonoides atribuem-se importantes funções fisiológicas e ecológicas para o vegetal, como proteção contra a radiação e atração de polinizadores. Para os seres humanos, substâncias dessa classe de metabólitos possuem ação medicinal atuando principalmente como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes, antitumorais, hepatoprotetores, antimicrobianos e antivirais. O segundo maior gênero de Euphorbiaceae é *Croton* L., com aproximadamente 1300 espécies arbóreas, arbustivas ou herbáceas, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo. Em praticamente todos os ecossistemas brasileiros encontram-se representantes de *Croton*. *Croton cajucara* é uma espécie em testes clínicos, tendo indicações terapêuticas para diabetes, distúrbios hepáticos e renais, anti-inflamatório, antimicrobiano, entre outras. *Croton sphaerogynus* Baill. por emergir no mesmo clado que *C. cajucara*, torna-se promissora na prospecção de substâncias bioativas. Este trabalho teve como objetivo investigar a composição fenólica e o potencial biológico de substâncias fenólicas presentes nos extratos foliares de *C. sphaerogynus* por meio de ensaios antioxidantes, antimicrobianos e anti-HIV-1. Como principais resultados, *C. sphaerogynus* se caracterizou como uma espécie produtora exclusivamente de flavonóis, além de ser grande produtora de diterpenos. Dois flavonoides foram isolados, quercetina 3,7-dimetil éter e campferol 3-metil éter. Quanto às atividades biológicas, a subfração composta majoritariamente por quercetina 3,7-dimetil éter apresentou alto potencial antioxidante e a maior atividade anti-HIV-1 entre os extratos e outras subfrações testadas. A fração hexânica, rica em diterpenos, foi a que apresentou atividade antimicrobiana promissora. Dessa forma, *C. sphaerogynus* torna-se uma espécie promissora para o uso de substâncias antioxidantes.

7. Abstract

Since the early days of medicine, chemical substances derived from animals, plants and micro-organisms have been used in treating various diseases. Among these, the products derived from plants have dominated the pharmacopoeia for thousands of years, providing an inexhaustible source of medicinal resources. Secondary metabolism is generally defined as responsible for the wide variety of chemical substances produced by plants, but specific for some groups. Important physiological and ecological plant functions are attributed to flavonoids, such as photoprotection and pollinators attraction. For humans, this class of substances has medicinal properties, acting mainly as anti-inflammatory, antiviral, antitumor, antioxidant, hepatoprotective and antimicrobial. *Croton* L. is the second largest genus of Euphorbiaceae, with about 1300 species of trees, bushes or herbs. *Croton* is distributed in tropical and subtropical regions of the New and Old World, occurring in almost all Brazilian ecosystems. *Croton cajucara* is an example of species in clinical trials, having therapeutic indications for diabetes, hepatic and renal disorders, anti-inflammatory, antimicrobial, among others. *Croton sphaerogynus* Baill. emerges in the same clade of *C. cajucara*, and becomes a promising species for prospection of bioactive substances. This study aimed to investigate the phenolic composition and biological potential of phenolic substances present in leaf extracts of *C. sphaerogynus* and test their antioxidant, antimicrobial and anti - HIV potential. *C. sphaerogynus* was characterized as exclusive producer of flavonol, besides it is a major producer of diterpenes. Two flavonoids were isolated quercetin 3,7-dimethyl ether, and kaempferol 3-methyl ether. Regarding biological activities, the subfraction composed mainly of quercetin 3,7-dimethyl ether showed high antioxidant potential and the higher anti-HIV-1 activity when compared to extracts and other subfractions tested. The hexane fraction, rich in diterpenes, showed promising antimicrobial activity. Thus, *C. sphaerogynus* becomes a promising species for the uses of antioxidants substances.

8. Referências Bibliográficas

- Ahmadi, S. M., Dehghan, G., Hosseinpourfeizi, M. A., Dolatabadi, J. E. N., & Kashanian, S. (2011). Preparation, characterization, and DNA binding studies of water-soluble quercetin-molybdenum (VI) complex. *DNA and Cell Biology*, 30(7), 517–23. doi:10.1089/dna.2010.1205
- Albuquerque, U. P., Ramos, M. A., & Melo, J. G. (2012). New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(1), 197–201. doi:10.1016/j.jep.2011.12.042
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202–2210. doi:10.1590/S0100-40422010001000033
- 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. (2005). Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(2), 101–5. doi:10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x
- Amaral, A., & Barnes, R. (1998). A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. *Phytochemistry*, 47(7), 1445–1447.
- Amarowicz, R., Kolodziejczyk, P. P., & Pegg, R. B. (2003). Chromatographic Separation of Phenolic Compounds from Rapeseed by a Sephadex LH-20 Column with Ethanol as the Mobile Phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(13), 2157–2165. doi:10.1081/JLC-120022400
- Andrae-Marobela, K., Ghislain, F. W., Okatch, H., & Majinda, R. R. T. (2013). Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. *Current Drug Metabolism*, 14(4), 392–413.
- Andréola, M. L. (2009). Therapeutic potential of peptide motifs against HIV-1 reverse transcriptase and integrase. *Current Pharmaceutical Design*, 15(21), 2508–19.
- Antunes, A. J.; Canhos, V. (1984). *Aditivos em Alimentos*. Campinas: Editora da Unicamp.
- Anvisa (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 24: Registro de Medicamentos Específicos, pp. 8. Diário Oficial da União, Brasília.
- Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523-524, 9–20. doi:10.1016/S0027-5107(02)00317-2
- Asnaashari, M., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2014). Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 159, 439–444. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.038
- Asres, K., Seyoum, A., Veeresham, C., Bucar, F., & Gibbons, S. (2005). Naturally derived anti-HIV agents. *Phytotherapy Research*, 19(7), 557-581.
- Athayde, N. R. (2013). Perfil químico e atividades biológicas de *Croton echinocarpus* Baill. e *Croton vulnerarius* Müll. Arg.. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo.

- 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. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxycalamenene-rich essential oils from *Croton cajucara* Benth. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(1), 1128–37. doi:10.3390/molecules18011128
- Baillon, H. 1858. *Étude générale du groupe des Euphorbiacées*. Paris: Masson.
- Baillon, H. 1864. Species Euphorbiacearum. Euphorbiacées Américaines. Première partie: Amérique austro-orientale. *Adansonia* (4) 257–377.
- Barbosa, P., Fascio, M., Martins, D., & Roque, N. (2004). Benzoyl-methylpolyols from *Croton* species (Euphorbiaceae). *Arkivoc*, 6, 95–102.
- Baron, E.J.; Finegold. S.M. Bailey & Scott's. (1990). *Diagnostic microbiology*. The C.V. Mosby Co: St. Louis.
- Bedoya, L. M., Abad, M. J., Sánchez-Palomino, S., Alcami, J., & Bermejo, P. (2010). Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17(1), 69–74. doi:10.1016/j.phymed.2009.08.008
- Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C., & Nerín, C. (2014). The additive properties of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay: the case of essential oils. *Food Chemistry*, 148, 204–8. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.037
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Brandi, M. L. (1992). Flavonoids: biochemical effects and therapeutic applications. *Bone and Mineral*, 19 Suppl 1, S3–S14.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brenna, O. V., & Pagliarini, E. (2001). Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4841–4844. doi:10.1021/jf0104376
- Brik, A., & Wong, C. (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1, 5–14.
- Bruneton, J., & Barton, D. H. R. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Acribia.
- Cai, Y., Chen, Z., & Phillipson, J. (1993). Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 34(1), 265–268.
- Cardoso Sá, N., Cavalcante, T. T. A., Araújo, A. X., dos Santos, H. S., Albuquerque, M. R. J. R., Bandeira, P. N., Cunha, R., Marangape, S., Cavada B. S., Teixeira, E. H. (2012). Antimicrobial and antibiofilm

- action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 57(5), 550–5. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.10.016
- Carneiro, V. A., Santos, H. S. Dos, Arruda, F. V. S., Bandeira, P. N., Albuquerque, M. R. J. R., Pereira, M. O., Henriques M., Cavada B. S., Teixeira, E. H. (2011). Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(1), 190–201. doi:10.3390/molecules16010190
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 40(2), 450–8.
- Caruzo, M. B. R., van Ee, B. W., Cordeiro, I., Berry, P. E., & Riina, R. (2011). Molecular phylogenetics and character evolution of the “sacaca” clade: novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(2), 193–206. doi:10.1016/j.ympev.2011.04.013.
- Caruzo, M., Cordeiro, I., Berry, P., & Riina, R. (2010). A new species of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae ss) from Minas Gerais, Brazil. *Phytotaxa*, 33, 27–33.
- Cerqueira, F., Medeiros, M. de, & Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 441–449.
- César, G.-Z. J., Alfonso, M.-G. G., Marius, M.-M., Elizabeth, E.-M., Angel, C.-B. M., Maira, H.-R., Guadalupe C.-L. M., Manuel J.-E., Ricardo, R.-C. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia*, 82(7), 1027–34. doi:10.1016/j.fitote.2011.06.006
- Chen Y, Wang X, Cai J (2005). Rutin ester compounds have stronger anti-HIV action, so can be used to prepare anti-AIDS medicines. Patente de Zhejiang Modern Tradicional Chinese Medicine (China) nº CN1657535-A.
- Chen, Z., Cai, Y., & Phillipson, J. (1994). Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon’s blood. *Planta Medica*, 60, 541–545.
- Chinou, I. (2005). Labdanes of natural origin-biological activities (1981-2004). *Current Medicinal Chemistry*, 12(11), 1295–1317.
- Chung, K., Wei, C., & Johnson, M. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology*, 9, 168–175.
- Coley, P., Heller, M., & Aizprua, R. (2003). Using ecological criteria to design plant collection strategies for drug discovery. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(8), 421–428.
- Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato P. S. (2006). *Fundamentos de cromatografia*. Editora da Unicamp.
- Cordeiro, I.; Secco, R.; Cardiel, J. M.; Steinmann, V.; Caruzo, M. B. R.; Riina, R.; Lima, L. R. de; Maya-L., C. A.; Berry, P.; Carneiro-Torres, D. S.; Pscheidt, A. C.; Silva, O. L. M.; Melo, A. L. de; Sales, M. F. de.; Silva, M. J. da; Oliveira, L. S. D. de.; Souza, S. M. A.; Sodré, R. C.; Martins, M. L. L. *Euphorbiaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB54421. Acesso em 31/05/14 as 8h00min.

- Costa, A. C. V. Da, Melo, G. F. A., Madruga, M. S., Costa, J. G. M. Da, Garino Junior, F., & Queiroga Neto, V. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6), 2853. doi:10.5433/1679-0359.2013v34n6p2853
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2002). Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 16(24), 2341–8. doi:10.1002/rcm.861
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 39(1), 1–15. doi:10.1002/jms.585
- Dar, M. Y., Shah, W. a., Rather, M. a., Qurishi, Y., Hamid, A., & Qurishi, M. a. (2011). Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chemistry*, 129(4), 1606–1611. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.016
- De Clercq, E. (2006). Anti-HIV drugs. *Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie*, 69(2), 81-104.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. New York: John Wiley & Sons.
- Dimitrić Marković, J. M., Amić, D., Lučić, B., & Marković, Z. S. (2014). Oxidation of kaempferol and its iron(III) complex by DPPH radicals: spectroscopic and theoretical study. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 145(4), 557–563. doi:10.1007/s00706-013-1135-z
- Donaldson, J. R., & Cates, R. G. (2004). Screening for Anticancer Agents from Sonoran Desert Plants: A Chemical Ecology Approach. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 42(7), 478–487. doi:10.1080/13880200490891287
- Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. J. dos, Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH*. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 446–452. doi:10.1590/S0101-20612006000200031
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768–74. doi:10.1021/jf803011r
- Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, J. A. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13(01), 79-106.
- Dwibedy, P., Dey, G. R., Naik, D. B., Kishore, K., & Moorthy, P. N. (1999). Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid–OH adduct. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1(8), 1915–1918. doi:10.1039/a809147a

- El-Mekawwy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., & Otake, T. (2000). Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, 53(4), 457–64.
- Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Mokhtarzadeh, A., Ghareghoran, S. M., & Dehghan, G. (2014). Synthesis, Characterization and Antioxidant Property of Quercetin-Tb(III) Complex. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(2), 101–4. doi:10.5681/apb.2014.016
- Farias, K., & Santos, T. (2013). Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(4), 520–528.
- Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Filho, J. R., de Sousa Falcão, H., Batista, L. M., Filho, J. M. B., & Piuvezam, M. R. (2010). Effects of plant extracts on HIV-1 protease. *Current HIV Research*, 8(7), 531–44.
- Flindt, M. (1969). Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. *The Lancet*, 1177–1181.
- Fonseca, A. P., Estrela, F. T., Moraes, T. S., Carneiro, L. J., Bastos, J. K., dos Santos, R. a, Ambrósio S. R., Martins, C. H. G., Veneziani, R. C. S. (2013). In vitro antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(7), 7865–72. doi:10.3390/molecules18077865
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). Review The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941.
- Gallo, R. C., & Montagnier, L. (1988). AIDS in 1988. *Scientific American*, 259(4), 40-48.
- Gerdin, B., & Svensjö, E. (1982). Inhibitory effect of the flavonoid O-(beta-hydroxyethyl)-rutoside on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *International journal of microcirculation, clinical and experimental/sponsored by the European Society for Microcirculation*, 2(1), 39-46.
- Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance--strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74(6), 594–602. doi:10.1055/s-2008-1074518
- González-Vázquez, R., King Díaz, B., Aguilar, M. I., Diego, N., & Lotina-Hennsen, B. (2006). Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1217–21. doi:10.1021/jf051897s
- Grynberg, N., & Echevarria, A. (1999). Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 65(3), 687–689.
- Guerrero, M. F., Carrón, R., Martín, M. L., San Román, L., & Reguero, M. T. (2001). Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeana* Schlecht in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(1), 33–6.

- Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & Román, L. S. (2002a). Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 37–42.
- Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & San Román, L. (2002b). Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeianus* Schlecht. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(10), 1373–8. Doi:10.1211/0022357027 60345455
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008
- Haenen, G. R. M. M., Jansen, F. P., & Bast, A. (1993). The antioxidant properties of 5 O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture Venorutin. *Phlebology*, 8, 10-17.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50. doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.000341
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Claredon Press: Oxford.
- Han, H., He, W., Wang, W., & Gao, B. (2011). Inhibitory effect of aqueous Dandelion extract on HIV-1 replication and reverse transcriptase activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 112. doi:10.1186/1472-6882-11-112
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M. J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., García-Tabernero, García-Vargas, S., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Huguet, R., Bastir, M., Santamaría, D., Madella, M., Wilson, J., Cortés, A. F., Rosas, A. (2012). Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Die Naturwissenschaften*, 99(8), 617–26. doi:10.1007/s00114-012-0942-0
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
- Heldt, H. (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, University Press: Oxford.
- Holodniy, M., Koch, J., Mistal, M., Schmidt, J. M., Khandwala, A., Pennington, J. E., & Porter, S. B. (1999). 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. *The American journal of gastroenterology*, 94(11), 3267-3273.
- Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), 1147–9.
- Hu, G., Li, X., Li, Y., Sun, X., Liu, G., Li, W., Huang J., Shen X., Tang, Y. (2012). Inhibitors of HIV-1 integrase-Human LEDGF/p75 interaction identified from natural products via virtual screening. *Chinese Journal of Chemistry*, 30(12), 2752–2758. doi:10.1002/cjoc.201200897
- Husain, S. R., Cillard, J., & Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), 2489–2491.

- Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., Otake, T., Kakiuchi, N., Shimotohno, K. (1999). Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. *Phytotherapy Research: PTR*, 13(1), 31–6. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1<31::AID-PTR381>3.0.CO;2-C
- Ibrahim, R. (2005). A forty-year journey in plant research: original contributions to flavonoid biochemistry. *Canadian Journal of Botany*, 83(5), 433–450. doi:10.1139/B05-030
- Kantz, K., & Singleton, V. (1991). Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(4), 309–316.
- Kawai, K., Tsuno, N., & Kitayama, J. (2005). Anti-angiogenic properties of plaunotol. *Anti-Cancer Drugs*, 16(4), 401–407.
- Klotzsch, J. F. 1841. Neue und weniger gekannte sidamerikanische Euphorbiaceen-Gattungen. *Arch. Naturgesch.* 7(1): 175-204.
- Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(3), 206–20. doi:10.1038/nrd1657
- Koga, T. (2002). Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(1), 133–136. doi:10.1093/jac/dkf094
- Krebs, B., Höding, B., & Kübart, S. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 105(2), 181–197.
- Křenek, K., Marhol, P., Peikarová, Ž., Křen, V., & Biedermann, D. (2014). Preparatory separation of the silymarin flavonolignans by Sephadex LH-20 gel. *Food Research International*, 1–6. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.001
- Kumar, S., Mishra, A., & Pandey, A. K. (2013a). Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 120. doi:10.1186/1472-6882-13-120
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013b). Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. *Vegetos-An International Journal of Plant Research*, 26(1), 301-307.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013c). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750. doi:10.1155/2013/162750
- Kwon, H. S., Park, J. A., Kim, J.-H., & You, J. C. (2012). Identification of anti-HIV and anti-reverse transcriptase activity from *Tetracera scandens*. *BMB Reports*, 45(3), 165–70.
- Lee, S.-A., Hong, S.-K., Suh, C.-I., Oh, M.-H., Park, J.-H., Choi, B.-W., Park, Paik, S.-W., S.-Y. (2010). Anti-HIV-1 efficacy of extracts from medicinal plants. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 48(2), 249–52. doi:10.1007/s12275-009-0176-9

- Leteane, M. M., Ngwenya, B. N., Muzila, M., Namushe, A., Mwinga, J., Musonda, R., Moyo S., Mengestu Y. B., Abegaz B. M., Andrae-Marobela, K. (2012). Old plants newly discovered: *Cassia sieberiana* D.C. and *Cassia abbreviata* Oliv. Oliv. root extracts inhibit in vitro HIV-1c replication in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by different modes of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 48–56. doi:10.1016/j.jep.2012.01.044
- Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 385–390. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.011
- Lila, M., & Raskin, I. (2005). Health related Interactions of Phytochemicals. *Journal of Food Science*, 70(1), R20–R27.
- López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., & Miró, M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 922(1-2), 359–63.
- Maciel, M. A, Pinto, A. C., Arruda, A. C., Pamplona, S. G., Vanderlinde, F. A, Lapa, A. J., Echevarria A., Grynberg N. F., Côlus I. M., Farias R. A., Costa A. M. L., Rao, V. S. (2000). Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(1), 41–55.
- Maciel, M., Pinto, A., & Veiga, V. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25(3), 429–438.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–47.
- Marco, G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45 (9), 594–598.
- Markham, K. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. New Zealand.
- Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., & Petroni, K. (2013). Plants, diet, and health. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 19–46. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120142
- Matos, L. M. M. (2011). Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo.
- McChesney, JD, Clark, A. (1991). Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3, 4-secotrachylobanoic acids. *Journal of Natural Products*, 54(6), 1625–1633.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2002). The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1–13
- Middleton, E. (1984). *The flavonoids*. Trends in Pharmacological Sciences, (5), 335-338. Springer US.
- Middleton, Jr, E., & Kandaswami, C. (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In *The flavonoids* (p. 619-652). Springer US.

- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(2), 91-91.
- Min, B., McClung, A. M., & Chen, M.-H. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of Food Science*, 76(1), C117–26. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01929.x
- Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., & Jennings, K. R. (2002). Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research*, 36(11), 1199–1208. doi:10.1080/10715760 21000016463
- Mole, S., Rogler, J. C., & Butler, L. G. (1993). Growth reduction by dietary tannins: different effects due to different tannins. *Biochemical systematics and ecology*, 21(6), 667-677.
- Morais, S. de, Catunda, F., & Silva, A. da. (2006). Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Química Nova*, 29(5), 907-910.
- Motta, L. B., Furlan, C. M., Santos, D. Y. A. C., Salatino, M. L. F., Negri, G., de Carvalho, J. E., Monteiro P. A., Ruiz A. L. T. G., Caruzo M. B., Salatino, A. (2013). Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). *Industrial Crops and Products*, 50, 661–665. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.008
- Moura, K. De, & Emery, F. (2001). Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(3), 325–338.
- Mucsi, I., Gyulai, Z., & Beladi, I. (1991). Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures. *Acta microbiologica Hungarica*, 39(2), 137-147.
- Narayana, K., & Reddy, M. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33(1), 2–16.
- Ndhlala, A. R., Aderogba, M. a, Ncube, B., & Van Staden, J. (2013). Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(2), 1916–32. doi:10.3390/molecules18021916
- Ndi, C. P., Semple, S. J., Griesser, H. J., Pyke, S. M., & Barton, M. D. (2007). Antimicrobial compounds from the Australian desert plant *Eremophila neglecta*. *Journal of Natural Products*, 70(9), 1439–43. doi:10.1021/np070180r
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022–37. doi:10.1021/np030096l
- Ng, T., Huang, B., Fong, W., & Yeung, H. (1997). Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences*, 61(10), 933–949.
- Ngwoke, K. G., Chevallier, O., Wirkom, V. K., Stevenson, P., Elliott, C. T., & Situ, C. (2014). In vitro bactericidal activity of diterpenoids isolated from *Aframomum melegueta* K.Schum against strains of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(3), 1147–54. doi:10.1016/j.jep.2013.12.035

- Oliveira, A. de, Valentim, I., & Goulart, M. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689–702.
- Oliveira, I., Lima, J., Silva, R., & Martins, D. (2008). Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(August), 587–593.
- Osborn, E. M. (1943). On the occurrence of antibacterial substances in green plants. *British journal of experimental pathology*, 24(6), 227.
- Palmeira Júnior, S., Alves, V., & Moura, F. (2006). Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(3), 397–402.
- Palmeira Junior, S., Conserva, L., & Silveira, E. (2005). Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), 1420–1424.
- Peçanha, E., Antunes, O., & Tanuri, A. (2002). Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, 25(6), 1108–1116.
- Pederson, C. S., & Fisher, P. (1944). Bactericidal activity of vegetable juice. *Journal of Bacteriology*, 47, 421–422.
- Pereira, A. dos S., Carbonell, S. A., de Aquino Neto, F. R., do Amaral, A. C. F., & Barnes, R. A. (2002). High-temperature gas chromatography–mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. *Journal of Chromatography A*, 947(2), 255–265.
- Peres, M. T., Delle Monache, F., Cruz, a B., Pizzolatti, M. G., & Yunes, R. a. (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 56(3), 223–6.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7), 791–800. doi:10.1016/j.foodres.2006.02.003
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., & Santos-Buelga, C. (2012). The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1822–5. doi:10.1002/jsfa.5697
- Pieroni, L. G., de Rezende, F. M., Ximenes, V. F., & Dokkedal, A. L. (2011). Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(11), 9439–50. doi:10.3390/molecules16119439
- Poljšak, B., Raspor, P. (2008). The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *Journal of Applied Toxicology*, (June 2007), 183–188. doi:10.1002/jat
- Portal Brasil (2012). SUS tem fitoterápicos para doenças simples. Disponível em www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples. Acesso em 31/03/2014 as 08h50min.
- Porto, T. S., Simão, M. R., Carlos, L. Z., Martins, C. H. G., Furtado, N. a J. C., Said, S., Arakawa, N. S., Santos, R. A., Veneziani, R. C. S., Ambrósio, S. R. (2013). Pimarane-type diterpenes obtained by

- biotransformation: antimicrobial properties against clinically isolated Gram-positive multidrug-resistant bacteria. *Phytotherapy Research : PTR*, 27(10), 1502–7. doi:10.1002/ptr.4887
- Pretto J. B. (2005). Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Vale do Itajaí.
- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, a, Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja K., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3–12.
- Reed, H. S. (1942). A short history of the plant sciences. *A short history of the plant sciences*.
- Renaud, S., Guéguen, R., Schenker, J., & D'Houtaud, A. (1998). Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, 9(2), 184–188.
- Rezende, F. M. (2013). Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme *Thymus vulgaris* L., sage *Salvia officinalis* L. and marjoram *Origanum majorana* L. extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831. doi:10.1016/j.indcrop.2012.08.029
- Rodrigues, G. R., Di Naso, F. C., Porawski, M., Marcolin, E., Kretzmann, N. A., Ferraz, A. D. B. F., Richter M. F., Marroni, C. A., Marroni, N. P. (2012). Treatment with aqueous extract from *Croton cajucara* Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 902351. doi:10.1155/2012/902351
- Rossi, D., Bruni, R., Bianchi, N., Chiarabelli, C., Gambari, R., Medici, A, Lista, A., Paganetto, G. (2003). Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 10(2-3), 139–44. doi:10.1078/094471103321659843
- Rufino, M. S. M.; Alves R. E., Brito E. S., Morais S. M., Filho J. M., Moreira A. V. B. (2006). *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)*. Comunicado técnico 125. ISSN 1679-6535. Embrapa Agroindústria Tropical.
- Rufino, M. S. M.; Alves R. E., Brito E. S., Morais S. M., Sampaio C. G., Pérez-Jimeénez J., Sura-Calixto, F. D. (2007a). *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Comunicado técnico 127. ISSN 1679-6535. Embrapa Agroindústria Tropical.
- Rufino, M.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. (2007b). *Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS*. Comunicado técnico 128. ISSN 1679-6535. Embrapa Agroindústria Tropical.

- Saeki, K., Yuo, A., Isemura, M., Abe, I., Seki, T., & Noguchi, H. (2000). Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 1391–1394.
- Salatino, A., Salatino, M., & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33.
- Saldanha, L. L. (2013). Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Júlio de Mesquita Filho.
- Sánchez-Burgos, J. a., Ramírez-Mares, M. V., Larrosa, M. M., Gallegos-Infante, J. a., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., & Rocha-Guzmán, N. E. (2013). Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*, 42, 57–62. doi:10.1016/j.indcrop.2012.05.017
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137. doi:10.1106/108201302026770
- Sanders, D., Weatherwax, P., & McClung, L. (1945). Antibacterial substances from plants collected in Indiana. *Journal of Bacteriology*, 49(6), 611–615.
- Sartori M. R. K. (2005). Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Vale do Itajaí.
- Savietto, J. P. (2011). Análise fitoquímica e atividade antiproliferativa de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883.
- Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57(Suppl 1), S3–S9. doi:10.1016/j.metabol.2008.03.001
- Secco, R. D. S., Cordeiro, I., Senna-vale, L. De, Sales, M. F. De, Lima, L. R. De, Medeiros, D., Haiad, B. De S., Oliveira, A. S. De., Beatriz, M., Caruzo, R., Carneiro-Torres, D., Bigio, N. C (2012). An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae. *Rodriguésia*, 63(1), 227–242.
- Shahwar, D., Ullah, S., Raza, M. A., Sana, U., Yasmeen, A., Ghafoor, S., & Ahmad, N. (2011). Acetylcholine esterase and antioxidant potential of some members of Asteraceae and Euphorbiaceae. *J Med Plants Res*, 5(32), 7011–7016.
- Simão, A. M. (1985). *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico*. São Paulo: Nobel.
- Simionatto, E., Bonani, V. F., Peres, M. T., Hess, S. C., Candido, A. C., Diraimo, D. L., Poppi, N. R., Matos, M. F., Santos, E., C. S., Oguma P. M., Carvalho, J. E. (2009). Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(3), 250–261.
- Simões, C. M. O. (2001). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFRGS; Florianópolis: UFSC.

- Singh, I. P., & Bodiwala, H. S. (2010). Recent advances in anti-HIV natural products. *Natural Product Reports*, 27(12), 1781–800. doi:10.1039/c0np00025f
- Soares, S. A. (2013). Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Croton pallidulus* var. *pallidulus* (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. (2005). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Sun, A., Simonyi, A., & Sun, G. (2002). The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(4), 314–318.
- Taiz L., Zeiger E. (2009). *Fisiologia Vegetal*. São Paulo: Artmed.
- Tao, J., Hu, Q., Yang, J., Li, R., Li, X., Lu, C., Chen, C., Wang, L., Shattoch, R., Ben, K. (2007). In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Research*, 75(3), 227–33. doi:10.1016/j.antiviral.2007.03.008
- Temple, N. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449–459.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669–675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F.; Candeias, J.A.N. (1999). Microbiologia. São Paulo: Atheneu.
- Tripathi, R., Mohan, H., & Kamat, J. P. (2007). Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chemistry*, 100(1), 81–90. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.012
- Turolla, M. S. dos R., Nascimento, E. D. S. (2006). Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(2), 289–306.
- Tyler, V. E. (1996). Natural products and medicine: an overview. *Medicinal resources of the tropical forest: Biodiversity and its importance to human health*, 1.
- Unaid, (2012). Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS. Relatório Global sobre AIDS 2012. Disponível em <http://www.unaids.org.br/documentos>. Acesso em 23/04/14 as 13h00min.
- van Acker, S. A., Van Den Berg, D. J., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331–342.
- van Ee, B. W., Riina, R., & Berry, P. E. (2011). A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 60(3), 791–823.
- Viano, Y., Bonhomme, D., Camps, M., Briand, J.-F., Ortalo-Magné, A., Blache, Y., Pioveti L., Culioli, G. (2009). Diterpenoids from the Mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling

- substances against a marine bacterial biofilm. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1299–304. doi:10.1021/np900102f
- Vickery M. L.; Vickery B. (1981). *Secondary Plant Metabolism*. London and Basingstoke: Mc Millan.
- Vlietinck, a J., De Bruyne, T., Apers, S., & Pieters, L. a. (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Medica*, 64(2), 97–109. doi:10.1055/s-2006-957384
- Wang, J.-H., Tam, S.-C., Huang, H., Ouyang, D.-Y., Wang, Y.-Y., & Zheng, Y.-T. (2004). Site-directed PEGylation of trichosanthin retained its anti-HIV activity with reduced potency in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(4), 965–71. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.139
- Wang, R.-R., Gu, Q., Wang, Y.-H., Zhang, X.-M., Yang, L.-M., Zhou, J., Chen J.-J., Zheng, Y.-T. (2008). Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(2), 249–56. doi:10.1016/j.jep.2008.01.037
- Wang, R.-R., Gu, Q., Yang, L.-M., Chen, J.-J., Li, S.-Y., & Zheng, Y.-T. (2006). Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1-2), 269–73. doi:10.1016/j.jep.2005.11.008
- Watanabe, T., & Rozane, D. (2011, March). Phenolic compounds and carotenoids amounts on guava epicarp injury, 'girdling'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(1), 008–013.
- Webster, G. L. (1993). A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 42(4), 793–823.
- Woradulayapinij, W., Soonthornchareonnon, N., & Wiwat, C. (2005). In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 84–9. doi:10.1016/j.jep.2005.03.030
- Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., & Xu, X. (2013b). A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of E. coli by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(11), 2751–6. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.029
- Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013a). Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185–90. doi:10.1021/jf402222v
- Xu, H. X., & Lee, S. F. (2001). Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy Research : PTR*, 15(1), 39–43.
- Yang, S., & Cragg, G. (2001). Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products*, 64(2), 265–277.
- Yıldırım, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4083–4089. doi:10.1021/jf0103572

- Youngson, R. (1995). *Como Combater os Radicais Livres: O Programa de Saúde dos Antioxidantes*. Rio de Janeiro: Campos.
- Zacchino, S. (2001). Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 47-75.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–70.

9. Anexo I

Figura A1- Cromatogramas obtido por CG-EM do extrato etanólico (A) e frações metanólica (B) e hexânica (C) de *Croton sphaerogynus*. Picos numerados de acordo com a tabela 4.1.

Figura A2- Cromatogramas obtido por CG-EM das subfrações FP (A), F1A (B), F2A (C) de *Croton sphaerogynus*. Picos numerados de acordo com a tabela 4.1.

Figura A3- Cromatogramas obtido por CG-EM das subfrações F3A (A) e F4A (B), F2A (C) de *Croton sphaerogynus*. Picos numerados de acordo com a tabela 4.1.

Tabela A1- Curvas de calibração utilizadas para doseamento das substâncias majoritárias dos extratos, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Substância referência	Equação da reta	r^2	Concentração mínima	Concentração máxima	Equipamento
Quercetina	$y = 10,931x$	0,999	9 ng mL ⁻¹	360 ng mL ⁻¹	CLAE
Campferol	$y = 7,0293x$	1,000	9 ng mL ⁻¹	360 ng mL ⁻¹	CLAE
Ácido gálico	$y = 0,3293x + 0,0695$	0,994	5 µg mL ⁻¹	75 µg mL ⁻¹	EPOCH
Rutina	$y = 0,0882x + 0,0438$	0,997	20 µg mL ⁻¹	400 µg mL ⁻¹	EPOCH

Tabela A2- Curvas de calibração utilizadas para cálculo de miligramas de substâncias equivalentes ao padrão por grama de amostra seca.

Substância referência	Equação da reta	r^2	Concentração mínima	Concentração máxima	Equipamento	Ensaio
Trolox	$y = -0,2061x + 1,169$	0,9976	6 µg mL ⁻¹	200 µg mL ⁻¹	EPOCH	DPPH•
Quercetina	$y = -0,4093x + 1,1096$	0,9925	7,5 µg mL ⁻¹	120 µg mL ⁻¹	EPOCH	DPPH•
Trolox	$y = -0,3428x + 0,8564$	0,9942	12 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	EPOCH	ABTS•
Quercetina	$y = -0,5868x + 0,7469$	0,9917	15 µg mL ⁻¹	120 µg mL ⁻¹	EPOCH	ABTS•
Trolox	$y = 0,4161x + 0,1312$	0,9972	6 µg mL ⁻¹	200 µg mL ⁻¹	EPOCH	FRAP
Quercetina	$y = 1,4784x + 0,1421$	0,9985	7,2 µg mL ⁻¹	180 µg mL ⁻¹	EPOCH	FRAP
Trolox	$y = -0,0396x + 0,0912^*$	0,1976	6 µg mL ⁻¹	200 µg mL ⁻¹	EPOCH	Sistema β-caroteno/ ácido linoleico
Quercetina	$y = -0,0868x + 0,1877^*$	0,7912	7,5 µg mL ⁻¹	105 µg mL ⁻¹	EPOCH	Sistema β-caroteno/ ácido linoleico
Ácido gálico	$y = -0,4551x + 0,791$	0,9882	5 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	EPOCH	Quelante de metais

* Curvas não utilizadas.

Tabela A3- Curvas de porcentagem de atividade antioxidante utilizadas para cálculo de EC₅₀ dos extratos, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Amostras	Ensaio					
	DPPH*		ABTS*		FRAP	
	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²
Etanólico	y = 0,0942x - 0,3822	0,987	y = 0,2137x + 5,3714	0,971	y = 0,1069x - 0,2339	1,000
Metanólica	y = 0,0622x - 0,1465	0,944	y = 0,1853x + 5,182	0,926	y = 0,0713x + 2,316	0,979
Hexânica	y = -0,0135x - 2,3395*	0,750	y = 0,0167x - 2,3077*	0,964	y = 0,003x + 1,6425	0,964
FP	y = 0,0602x - 7,0015	0,927	y = 0,1603x - 2,3913	0,947	y = 0,0451x + 1,6996	0,997
F1A	y = 0,1756x - 5,165	0,979	y = 0,3478x + 8,5431	0,972	y = 0,2106x + 3,1837	0,998
F2A	y = 0,2155x - 2,1784	0,979	y = 0,308x + 23,837	0,901	y = 0,2646x + 6,894	0,987
F3A	y = 0,3039x - 0,3141	0,998	y = 0,5524x + 16,775	0,924	y = 0,3878x + 4,0736	0,994
F4A	y = 0,2522x + 1,9316	0,994	y = 0,2595x + 36,854	0,844	y = 0,3506x + 0,9932	0,997
1	y = 0,1993x + 2,6705	0,995	y = 0,2987x + 11,984	0,996	y = 0,2694x + 4,6647	0,998
2	y = 0,0332x - 1,3932	1,000	y = 0,12x + 7,5437	0,990	y = 0,0339x + 2,8974	0,997
Amostras	β-caroteno/ ácido linoleico		Quelante de metais			
	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²		
Etanólico	y = 0,074x - 6,9276	0,988	y = 0,0464x + 2,3673	0,9329		
Metanólica	y = 0,1053x + 3,6089	0,9111	y = 0,0445x + 1,5458	0,9827		
Hexânica	y = 0,024x + 3,2557	0,9886	y = 0,0371x - 3,8531	0,9958		
FP	y = 0,0701x - 0,1332	0,9133	y = 0,0336x + 6,1831	0,8685		
F1A	y = 0,158x + 4,5091	0,9539	y = 0,0471x + 4,7245	0,9145		
F2A	y = 0,1394x + 5,0953	0,8968	y = 0,0495x + 7,5692	0,9641		
F3A	y = 0,2742x - 13,568	0,9975	y = 0,0816x + 5,3582	0,9944		
F4A	y = 0,1838x + 0,8506	0,7262	y = 0,0773x - 1,9196	0,9895		
1	y = 0,0605x + 15,201	0,9861	y = 0,0686x + 2,7378	0,9193		
2	y = -0,0068x + 4,8864*	1,000	y = 0,1168x + 2,659	0,9943		

*: Curvas não utilizadas.

Tabela A4- Curvas de porcentagem de atividade antioxidante utilizadas para cálculo de EC₅₀ dos padrões.

Padrões	Ensaio					
	DPPH*		ABTS*		FRAP	
	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²
Trolox	y = 0,3644x - 5,4439	0,997	y = 0,387x + 2,974	0,994	y = 0,4246x + 0,7937	0,997
Quercetina	y = 0,7614x - 2,0986	0,996	y = 0,6706x + 14,639	0,992	y = 1,2476x - 0,5858	0,995
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-

Padrões	β-caroteno/ ácido linoleico		Quelante de metais	
	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²
Trolox	y = -0,0039x + 83,681	0,011	-	-
Quercetina	y = 0,2757x + 26,285	0,844	y = 0,068x + 5,9007	0,972
Ácido gálico	-	-	y = 1,4928x - 8,6595	0,977

Tabela A5- Curvas de porcentagem de atividade antimicrobiana utilizadas para cálculo de MIC₅₀ dos extratos, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Amostras	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>	
	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²
Quercetina	y = 0,0095x - 22,819*	0,8965	y = 0,0913x - 9,5886	0,999
Etanólico	y = 0,0047x + 17,874*	0,129	y = 0,0407x + 20,092	0,826
Metanólica	y = 0,019x + 8,0851	0,989	y = 0,1143x - 5,365	0,941
Hexânica	y = -0,0051x + 17,301*	0,220	y = 0,1984x - 1,031	0,997
FP	y = 0,033x - 0,6303	0,761	y = 0,1117x - 5,53	0,945
F1A	y = 0,0255x - 25,02*	0,856	y = 0,021x + 3,1679	0,772
F2A	y = 0,0246x - 25,697*	0,924	y = 0,045x + 0,9336	0,927
F3A	y = 0,0121x - 14,337*	0,103	y = 0,0329x + 0,9947	0,848
F4A	y = 0,0131x - 14,227*	0,089	y = 0,05x - 0,4442	0,715
1	y = 0,0082x + 5,1302	0,914	y = -0,004x - 23,275*	0,439
2	y = 0,0355x - 16,24*	0,429	y = 0,0704x - 8,6806	0,838

*: Curvas não utilizadas.

Tabela A6- Curvas de porcentagem de atividade anti-HIV utilizadas para cálculo de MIC₅₀ dos extratos, frações e subfrações de *C. sphaerogynus*.

Subfrações	Equação da reta	r ²
FP	y = -0,0106x + 47,621*	0,117
F1A	y = 0,0884x - 44,216*	1,000
F2A	y = 0,0295x - 8,2385*	0,814
F3A	y = 0,0163x + 16,428*	0,669
F4A	y = 0,0355x + 2,9357	0,773
1	y = 0,0081x + 21,709	0,995
2	y = 0,0091x + 14,298*	0,099

*: Curvas não utilizadas.