SARAH APARECIDA SOARES

Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de
Croton pallidulus var. *pallidulus* (Euphorbiaceae)

Isolation of bioactive compounds *from Croton*
pallidulus var. *pallidulus* (Euphorbiaceae)

Versão corrigida

São Paulo
2013

SARAH APARECIDA SOARES

**Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de
Croton pallidulus var. *pallidulus* (Euphorbiaceae)**

**Isolation of bioactive compounds from *Croton*
pallidulus var. *pallidulus* (Euphorbiaceae)**

Orientação: Profa Dra Maria Luiza Faria Salatino

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre
em Ciências, Área de Botânica.

**São Paulo
2013**

Ficha catalográfica

Soares, Sarah Aparecida

Isolamento biomonitorado de substâncias
ativas de *Croton pallidulus* var. *pallidulus*
(Euphorbiaceae)

96 páginas

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

1. *Croton pallidulus* var. *pallidulus* 2. Metabólitos
Secundários 3. Citotoxicidade 5. Antibacteriana 6.
Antioxidante

Versão corrigida. Original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa Dra Maria Luiza Faria Salatino
Orientadora

Aos meus pais, Helena e Custódio

.

EPÍGRAFE

Operagatos

Por Argos

A Desenhista

Ela desenha como se só contornasse as formas. Porque tudo está traçado. Cada espaço em branco numa página são centenas de milhares de desenhos, imagens, animais, plantas, crianças... Tudo está desenhado já em sua cabeça, basta contornar com tinta (uma que os outros também possam ver).

Às vezes, porém, ela tem preguiça de tanto contornar. Se já consegue ver todos os desenhos sem precisar de lápis e papel. Seu desenho animado particular (e que animado!).

Mas desenhista, querida, não seja tão egoísta! Faça contornos para nós!!! Eu não enxergo sua tinta mágica. O branco do mundo, para mim, não passa de vazio do mundo. E as minhas palavras, nem essas, são só passadas a limpo. Saio à busca das letras, uma a uma, penosamente unidas.

Por Maia

O que há além da floresta fechada das palavras? Imagino um campo aberto, onde consigo enxergar lá longe no horizonte, no fundo do meu ser.... mas como eu chego lá?

Por Chaves

Publicados em: *vagamentes*.
(vagamentes.blogspot.com.br)

AGRADECIMENTOS

Minha trajetória de vida mudou completamente quando entrei neste pedaço do céu chamado Universidade de São Paulo. Nenhuma palavra no mundo é capaz de descrever a gratidão e o carinho que tenho por esta instituição. Ainda assim gostaria de tentar, agradecendo por todo o suporte que recebi desde o início da graduação em Farmácia e Bioquímica, moradia, alimentação e bolsas; pelo verde, passáros, prédios e todos os outros elementos que compõem a Cidade Universitária, que tornavam as idas e vindas tão prazerosas; pelo CRUSP, o lugar mais lindo onde já morei, onde encontrei pessoas maravilhosas, onde aprendi tantas coisas que só podem ser aprendidas vivendo, e onde parte do meu coração vai ficar; pela praça do relógio, lugar de tantos acontecimentos importantes; pelos amigos que fiz, vocês são o tesouro mais precioso que levo comigo; por todos os professores da graduação e da pós graduação que me inspiraram a seguir a carreira acadêmica; pela Faculdade de Farmácia e Bioquímica e pelo Instituto de Biociências, por terem me proporcionado o melhor curso de graduação e de pós-graduação que eu poderia querer.

Gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças e conforto nos momentos difíceis e principalmente por ter me rodeado de pessoas boas que sempre me ajudam. Dentre elas agradeço:

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino, por todos seus ensinamentos. Por estar sempre disponível para tirar dúvidas, consolar e ouvir reclamações. Obrigada por ser essa pessoa tão amável e querida! Por ter me ajudado tanto no laboratório e na escrita da dissertação. Pelos constantes incentivos, serei sempre grata.

Ao Prof. Dr. Antônio Salatino, por ser um professor exemplar. Pela inspiração durante as aulas maravilhosas que o senhor ministrava, pelas conversas informais e por toda a sua ajuda no trabalho.

À querida Profa. Rosario Dominguez Crespo Hirata, por ter me orientado na iniciação científica, por todos os ensinamentos e pelo apoio que sempre me proporciona.

À querida Profa. Dra. Inês Cordeiro, pela viagem tão agradável à Campos do Jordão para a coleta do *Croton pallidulus* var. *pallidulus*, pelas conversas e ensinamentos.

À querida Dra. Giuseppina Negri pela identificação dos 8,9-secocauranos, por sempre estar disponível para nos ajudar e por ser tão solidária.

Ao Prof. Dr. Nilton Licopan por ter supervisionado os ensaios de atividade antibacteriana, pelo conhecimento transmitido, pela paciência e por sempre estar disponível para dúvidas. Ao Dr. Juan Gonzalo Aliaga Gamarra, pelo auxílio nos ensaios de atividade antibacteriana e nas muitas outras etapas do projeto. Por ser um amigo tão querido e sempre me ajudar e me ouvir.

À querida doutoranda Erika Stein pelo auxílio nos ensaios de atividade citotóxica e ao Prof. Dr. Pio Colepicolo por ter cedido o laboratório para a realização deste ensaio.

À Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi e ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato pela análise das amostras no CLAE-EM e por todo o suporte.

À equipe da fitoquímica por serem pessoas especiais e pelo ambiente agradável que todos vocês proporcionam. Em especial agradeço: às queridas Profa. Dra. Déborah Yara Alves Cursino dos Santos, Profa. Dra. Claudia Maria Furlan e Profa. Dra. Lucimar Barbosa da Motta pelas dicas valiosas durante a realização do projeto, por serem sempre abertas para dúvidas e por todo o apoio e incentivo; aos amigos do laboratório, Adne, Augusto, Fernanda A., Felipe, Janaina, Letícia, Marco Aurélio, Milena Timich, Rafael, Toshi, Wagner pela ajuda, conversas, risadas, conforto nos momentos difíceis, pelas trocas de artigos, entre outras centenas de coisas; aos queridos Jocimar, Carmen e Caroline, pela grande ajuda e apoio que me deram durante a escrita da dissertação e durante todos os momentos que os procurei, vocês são demais! À querida Alice pela sua amizade, por ser tão doce e sempre me auxiliar em tudo que precisei e tive dúvidas. Pelas conversas agradabilíssimas, pelas marmitas deliciosas, pelas caronas, pela ajuda nos ensaios de atividade antioxidante e na identificação de flavonoides; à Bruna, minha querida companheira de mestrado, obrigada pelas risadas, por sempre me animar e por toda a ajuda que você me deu, especialmente no final do trabalho; à querida Priscila, obrigada por fazer parte da minha vida, pela ajuda na estatística, no ensaio antioxidante e tantas outras coisas que eu não conseguiria enumerar; à querida Maria Pia, pelos doces e risadas, por ter me recebido tão bem quando cheguei; às queridas Dalila, Fernanda e Kátia por toda a ajuda e momentos prazerosos que vocês me proporcionaram; à querida Natália, pela ajuda na qualificação, com os ensaios antioxidantes e por todas as conversas; aos queridos técnicos, Mourisa, Aline, Paula, Maxuel e Leandro pelo suporte no laboratório e pelos ensinamentos.

Ao pessoal do LAM, especialmente Daniele e Janaina, pela amizade, e Profa. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho e Rosario pelo apoio no ensaio com as artemias.

À Aline pela companhia durante a representação discente e por toda a amizade e à Marcela, minha companheira monitora da disciplina Botânica para Farmácia, obrigada por todo o suporte e pela amizade.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, pela simpatia com que me receberam e por toda ajuda, especialmente Suzi, Rose, Sr. José, Sr. João e Homelhan.

Aos amigos da graduação, Raffaella, Marília, Carol, Vanessa, Bruno, André, Wilson e Sandro, pelos incentivos e amizade. Às amigas da Novartis, Carolina, Kuma, Silvia, Rossana, Andrea e Letícia, por sempre acreditarem em mim.

À "casa das sete mulheres", pelos anos maravilhosos que vocês me proporcionaram quando morávamos juntas. Pela amizade que transcende o tempo. Por estarem sempre presentes. Rizia, Marina, Ruthe, Ruama, Verônica e Juliana. Rizia, um agradecimento especial a você, a capa ficou linda! Às crianças da minha vida, Livia, Sarinha e Matheus, Ilana e Natan, por deixarem meus dias mais divertidos.

Ao amor da minha vida, Robson, por todo o suporte, carinho, companheirismo, por muitas vezes sacrificar o seu trabalho para me ajudar, pelas milhares de coisas que, sem a sua ajuda, eu não teria conseguido. Obrigada por tornar meus dias mais felizes.

À Elza e Isaias, por todo o carinho, ao Rodrigo, pelo apoio e pelas risadas, à Jackceley e Lelis, pela minha linda sobrinha Livia.

À minha família, por ser minha base. Agradeço aos meus pais Custódio e Helena, por todo o amor, pelo sacrifício feito para que eu e meus irmãos estudássemos, por serem pessoas tão boas e exemplos para mim. Agradeço à Cíntia por ser uma irmã tão maravilhosa de quem eu sempre me orgulho e ao Renato por ser meu irmãozinho que me inspira a levar a vida mais levemente. Ao meu tio Mauro, obrigada por todo apoio, pelos meus primeiros livros, pelas milhares de revistas e por sempre nos incentivar, saiba que essas atitudes fizeram toda a diferença nas nossas vidas. Às minhas avós Maria José e Geralda (*in memoriam*), por serem exemplos de mulheres fortes que passaram por tantas provações sem nunca se deixarem abater.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Plantas medicinais.....	1
1.2. Metabolismo secundário	3
1.3. Euphorbiaceae.....	11
1.3.1. <i>Croton</i> L.....	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Obtenção dos extratos	16
3.3. Obtenção das frações dos extratos hexânico e diclorometânico	16
3.5. Isolamento de substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência.....	17
3.6. Análise de flavonoides	17
3.8. Cromatografia em fase gasosa	18
3.11. Atividade antioxidante por DPPH	20
3.12. Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	20
3.14. Ensaio de atividade antibacteriana.....	22
3.15. Análises estatísticas	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Extração do material	24
4.2. Atividade antibacteriana dos extratos	24
4.4. Doseamento de fenóis totais, e de flavonóis e flavonas totais dos extratos.....	28
4.5. Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	30
4.6. Substâncias presentes nos extratos hexânico e diclorometânico (análise por CG-EM)	30
4.7. Isolamento biomonitorado	35
4.7.1. Extrato hexânico	35
4.7.2. Extrato diclorometânico.....	38
4.7.3. Extrato de acetato de etila	50
4.7.4. Extrato metanólico	62
5. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÕES	77
8. RESUMO.....	78
9. ABSTRACT.....	80
10. REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

As plantas formam a base de sofisticados sistemas da medicina tradicional que existem há milhares de anos e continuam a fornecer à humanidade novos medicamentos. Ayurveda na Índia e a medicina tradicional Chinesa são as mais antigas das tradições medicinais e continuam sendo usadas nos dias de hoje. Na África e nas Américas há culturas com conhecimento medicinal milenar e ainda pouco documentado, com um grande potencial para fornecer novos medicamentos. No mundo Ocidental antigo, os gregos contribuíram significativamente para o uso racional de plantas medicinais. Personagens importantes da história como Hipócrates e Aristóteles prescreviam o uso de plantas medicinais, com clara influência do Egito e da Índia. Os egípcios documentavam seu conhecimento, incluindo médico e farmacêutico, em pinturas de paredes e em papiros. Um dos mais importantes é o papiro de Eber, de 3500 A.P., que contém plantas medicinais utilizadas por eles, como a mirra (GURIB-FAKIM, 2006).

O registro mais antigo de uso de plantas medicinais data de 60000 A.P. Foram encontrados polens de muitas espécies de plantas, entre elas *Ephedra altissima* (Ephedraceae) e *Centaurea solstitialis* (Asteraceae), na caverna de Shanidar, Iraque, no sepulcro de um homem Neanderthal (Shanidar IV). Acredita-se que elas eram utilizadas como medicamentos (SOLECKI, 1975). Essas plantas poderiam ser típicas para o povo Neanderthal, e fazer parte de uma tradição, cujo Shanidar IV foi o primeiro registro disponível. Essas espécies são utilizadas ainda hoje na fitoterapia do Iraque (GURIB-FAKIM, 2006). Um dos registros mais importantes é a obra de Dioscórides, grego, médico do exército romano na época de Nero, século I. Dioscórides viajou por vários países e compilou informações sobre os medicamentos usados pelas populações locais. Essa obra foi traduzida para o latim como “*De Materia Medica*”, e pelos 1500 anos seguintes foi o livro mais importante para médicos e farmacêuticos. Dioscórides indicava a origem das drogas, tanto vegetal, quanto animal ou mineral, e descrevia seus usos (GURIB-FAKIM, 2006).

Até meados do século XX, produtos naturais foram as principais fontes de medicamentos (DE PASQUALE, 1984). Entretanto, com o desenvolvimento da química orgânica, medicamentos sintéticos passaram a ter a preferência da população (RATES, 2001). A partir da década de 1970, houve um ressurgimento do interesse em produtos naturais, incluindo plantas medicinais e seus derivados, e essa preferência vem aumentando (BATES, 1985). Várias são as razões para esse aumento. Uma delas é o interesse dos consumidores por terapias alternativas, ou devido aos efeitos adversos de vários medicamentos sintéticos e sua falta de eficácia para certas doenças, ou pela falta de acesso ao tratamento convencional para uma grande parte da população, além da crença de que

plantas medicinais são livres de efeitos colaterais (CALIXTO, 2000). A diversidade estrutural dos produtos naturais foi também uma forte razão para a retomada do uso de extratos de plantas, e de suas substâncias isoladas (BARATA, 2005).

Além do seu uso *in natura*, as plantas medicinais são importantes no desenvolvimento de novos fármacos. Aproximadamente 25% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de plantas (CALIXTO et al., 2001). Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são originados de plantas e um número significativo são medicamentos que, embora sejam atualmente sintéticos, foram inicialmente obtidos de precursores naturais (RATES, 2001).

Os sistemas de tratamento baseados em plantas continuam a ter um papel essencial na saúde. A OMS estima que de 65-80% da população de países em desenvolvimento depende principalmente da medicina tradicional no cuidado à saúde (CALIXTO, 2005). Embora, na maior parte das vezes, as plantas utilizadas pela medicina tradicional sejam eficazes, pesquisas são necessárias para comprovação dessa eficácia e segurança.

Um exemplo de intoxicação por planta medicinal ocorreu na década de 1980, quando muitas pessoas utilizaram confrei (*Symphytum officinale*), via oral, e acabaram apresentando problemas hepáticos graves. Essa planta era tida como cicatrizante, e seu chá era ingerido para minimizar problemas de úlceras gástricas. Naquele tempo não havia muitas pesquisas sobre ela. Entretanto, depois se descobriu que ela apresentava alcaloides pirrolizidínicos, que são hepatotóxicos (BACH et al., 1989). O confrei pode ser usado como cicatrizante, mas apenas externamente.

A necessidade de pesquisas é reforçada pelo fato de, no mercado brasileiro, a maioria dos produtos naturais ser constituída por cápsulas contendo pós de plantas, para os quais não existem comprovações de eficácia e segurança, e nem mesmo tradição de uso, já que a ingestão nessa forma é tradicional apenas entre os animais (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

Na Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata (Genebra, 1978), promovida pela OMS e pela UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) foi recomendado aos estados-membros proceder:

.....a formulação de políticas e regulamentações nacionais referentes à utilização de medicamentos tradicionais de eficácia comprovada, e exploração das possibilidades de se incorporar os detentores de conhecimento tradicional às atividades de atenção primária em saúde, fornecendo-lhes treinamento correspondente (OMS, 1979).

Em 1995, seguindo as recomendações da OMS, o Ministério da Saúde instituiu a Portaria nº 6 da SVS-MB (D.O.U. 31/01/95), que teve como objetivo aprimorar a qualidade dos produtos de origem vegetal comercializados. Desde então, para a obtenção de registro junto a ANVISA, as

plantas medicinais precisam ser validadas. Validar um fitoterápico consiste em confirmar suas propriedades farmacológicas e ausência de toxicidade. Em 2006, a Presidência da República publicou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que tem como uma das diretrizes, incentivar e fomentar estudos sobre plantas medicinais e fitoterápicos (Decreto nº 5.813).

A resolução de janeiro de 2009 da 62^a Assembleia Mundial de Saúde recomendava aos estados-membros, a elaboração de políticas de medicamentos tradicionais e o fortalecimento das relações entre os pesquisadores e a comunidade que utilizam estes medicamentos (OMS, 2009).

Com a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 49.520 espécies vegetais catalogadas (LEWINSOHN, 2005), as potencialidades de uso das plantas medicinais no Brasil encontram-se longe de estarem esgotadas.

1.2. Metabolismo secundário

As plantas sintetizam uma vasta gama de substâncias, com uma rica diversidade estrutural, e muitas dessas substâncias são associadas aos benefícios à saúde. Uma grande parte delas constitui-se nos chamados metabólitos secundários (BRIELMANN et al., 2006). Estes são produtos do metabolismo vegetal, não diretamente relacionados aos processos primários, como fotossíntese, respiração e formação de protoplasma (TAIZ & ZEIGER, 2002). Os metabólitos secundários são vitais para as plantas, apresentando funções como: defesa contra herbívoros e patógenos, proteção contra radiação e ar dessecante, atração de polinizadores e dispersores, regulação do metabolismo, sinalização molecular e alelopatia (TAIZ & ZEIGER, 2002).

Os precursores dos metabólitos secundários são derivados do metabolismo primário. O número de precursores é surpreendentemente pequeno, levando-se em conta a diversidade estrutural dos metabólitos secundários. São eles: acetato, formado pela descarboxilação do ácido pirúvico proveniente da glicólise; ácido chiquímico, formado pela combinação da eritrose 4-fosfato e do fosfoenolpiruvato; ácido mevalônico, formado a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA); metil-eritritol fosfato, formado a partir do ácido pirúvico e do gliceraldeído 3-fosfato (DEWICK, 2009) (**Figura 1**).

Muitos metabólitos secundários são característicos de determinados grupos de plantas, como uma ordem, uma família, um gênero, ou até mesmo exclusivos de uma espécie. Podemos citar como exemplo as betalainas, pigmentos encontrados apenas entre as Caryophyllales (BROCKINGTON et al., 2011).

Os metabólitos secundários podem ser classificados, de acordo com sua estrutura, em quatro grupos principais: os derivados de ácidos graxos, os terpenoides, as substâncias fenólicas e as substâncias nitrogenadas (TAIZ & ZEIGER, 2002).

Essas substâncias são sintetizadas pela via do acetato-malonato, cujo precursor é a acetil-CoA, formando principalmente os constituintes das ceras cuticulares. Os derivados de ácidos graxos presentes nas ceras são substâncias extremamente hidrofóbicas que mantêm as superfícies impermeáveis e restringem a perda de água da planta por transpiração. O surgimento dessa camada protetora foi um dos importantes fatores para a conquista do ambiente terrestre (BRIELMANN et al., 2006).

Do ponto de vista químico, as ceras são misturas complexas de compostos lipofílicos de peso molecular intermediário (200-700 unidades de massa atômica), podendo-se citar, os ésteres, os álcoois, os ácidos graxos, as cetonas, os aldeídos e os hidrocarbonetos (SAMUELS et al., 2008).

Terpenoides

Os terpenoides formam o maior grupo de produtos naturais, com mais de 35000 substâncias identificadas. Apesar de ser um grupo com grande diversidade estrutural, apresentam como unidade básica, o isopreno (DEWICK, 2009) (**Figura 2**). A classificação dos terpenos é feita pelo número de unidades de isopreno que eles contêm: hemiterpenos (1 un.), monoterpenos (2 un.), sesquiterpenos (3 un.), diterpenos (4 un.), triterpenos (6 un.), tetraterpenos (8 un.), politerpenos (> 8 un.)

Apesar do isopreno ser a unidade básica dos terpenoides, ele não está envolvido na formação desses compostos. Isopreno é um hemiterpeno volátil emitido especialmente por musgos, samambaias e plantas arbóreas (SHARKEY & YEH, 2001).

Figura 2. Exemplos de terpenos e suas respectivas classes.

O mentol e a matricina são mono e sesquiterpenos respectivamente. São compostos presentes nos óleos voláteis de *Mentha* sp. (mentol) e de *Matricaria chamomilla* (matricina) (BUCAR et al., 2013). O ácido giberélico é um diterpeno e faz parte da classe das giberelinas, que são compostos envolvidos no alongamento celular (SILVERSTONE & SUN, 2000). O sitosterol é um triterpeno presente nas membranas das células vegetais e tem a função de estabilizá-las, interagindo com

fosfolipídeos. O licopeno é um pigmento acessório, e tem atividade antioxidante (BRIELMANN et al., 2006).

As unidades formadoras dos terpenos são: o isopentenil-difosfato (IPP) e o dimetilalil-difosfato (DMAPP). Estes podem ser derivados do ácido mevalônico ou do metileritritol fosfato, como mostra a **Figura 3**. O IPP, formado no citossol, é proveniente da via do ácido mevalônico, e pode ser convertido em DMAPP. A formação do IPP e do DMAPP nos plastídeos é feita pela via do metileritritol fosfato (MEP). Essas duas formas podem se interconverter (DEWICK, 2009).

Figura 3. Biossíntese do isopentenil-difosfato (IPP) e do dimetilalil-difosfato (DMAPP) a partir de ácido mevalônico e metileritritol fosfato.

A conversão de IPP em DMAPP gera um eletrófilo, enquanto o IPP funciona como nucleófilo, devido a sua dupla ligação terminal. Essa diferença de reatividade é a base da biossíntese dos terpenos, pois, a partir daí, há adições eletrofílicas, proporcionando o alongando da cadeia (DEWICK, 2009). Como mostra a **Figura 4**, a perda do grupo fosfato do DMAPP, gerando um cátion alílico, é seguida pela adição eletrofílica e perda de um próton, dando origem ao geranyl-difosfato, a partir do qual os monoterpenos são sintetizados. Esse ciclo se repete com a síntese do farnesil-difosfato (precursor dos sesqui- e triterpenos) e geranylgeranyl-difosfato (precursor dos di- e tetraterpenos). Os mono-, di- e tetraterpenos são sintetizados preferencialmente pela via do ácido mevalônico, enquanto os sesqui- e triterpenos são sintetizados preferencialmente pela via do MEP. Entretanto, podem haver exceções (DEWICK, 2009).

Figura 4. Biossíntese de terpenos a partir do IPP e do DMAPP.

Substâncias nitrogenadas

As três classes mais importantes dos compostos nitrogenados são: alcaloides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos. Essas substâncias são formadas a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos. Neste texto daremos uma maior ênfase aos alcaloides.

Alcaloides tem baixo peso molecular e podem conter um ou mais átomos de nitrogênio que são tipicamente aminas primárias, secundárias ou terciárias (**Figura 5**). Com exceção de poucas classes de alcaloides, eles geralmente apresentam um caráter básico, o que facilita sua extração (DEWICK, 2009).

Figura 5. Estrutura básica de um alcaloide.

Poucos aminoácidos estão envolvidos na formação da cadeia carbônica dos alcaloides, sendo os principais: ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina.

Alguns alcaloides não tem sua cadeia carbônica proveniente de aminoácidos, obtendo apenas o átomo de nitrogênio do aminoácido, por meio de reações de transaminação. Esse grupo de alcaloides pode ser chamado de pseudoalcaloides (DEWICK, 2009).

Substâncias fenólicas

Substâncias fenólicas compreendem uma classe de compostos que apresentam pelo menos um anel aromático, no qual um ou mais hidrogênios foram substituídos por hidroxilas. Estão amplamente distribuídos entre vegetais e micro-organismos e são essenciais aos animais, que não possuem a capacidade de sintetizar o anel benzênico (SIMÕES et al., 2010). Essas substâncias são necessárias para o crescimento e reprodução das plantas, sendo sintetizadas como uma resposta a fatores ambientais (luz, frio, poluição, etc) e na defesa dos vegetais (GHASEMZADEH & GHASEMZADEH, 2011).

As substâncias fenólicas podem ser encontradas, ou na forma livre (agliconas) ou ligadas a açúcares (glicosídeos), proteínas e terpenos, entre outros. Dentre as substâncias fenólicas podem ser citados, os ácidos fenólicos, as quinonas, os fenilpropanoides, as cumarinas, os flavonoides, os taninos e as ligninas (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006) (**Figura 6**).

Figura 6. Exemplos de substâncias fenólicas e seus precursores (adaptado de DEWICK, 2009).

As substâncias fenólicas podem ser sintetizadas pelas vias do ácido chiquímico ou do acetato-malonato, ou pela combinação das duas, como é o caso dos flavonoides que têm biossíntese mista

(DEWICK, 2009) (**Figura 6**). Neste texto daremos uma maior atenção aos flavonoides, por sua abundância na espécie estudada neste trabalho.

Os flavonoides constituem-se num grupo notável de metabólitos de plantas. Nenhuma outra classe de metabólitos secundários foi creditada com tantas e tão diversas funções. Muitas dessas funções são críticas para a sobrevivência (GOULD & LISTER, 2006). Podem-se listar algumas:

- ação antioxidante e proteção contra raios UV;
- atração de polinizadores: os flavonoides, absorvendo no UV, são responsáveis pelo chamado guia de néctar, para atração de insetos polinizadores;
- defesa contra herbivoria: por exemplo, os rotenoides, que inibem a cadeia respiratória de insetos, entre eles, os afídeos;
- estimulam a bactéria *Rhizobium* para fixação de nitrogênio;
- complexam-se com metais, aumentando a tolerância da planta a metais pesados: por exemplo, o milho que em solo rico em alumínio secreta flavonoides;
- sinalização química: foram recentemente descritos como uma nova classe de hormônios.

A estrutura básica de um flavonoide é a de um fenilbenzopirano, com dois anéis aromáticos conectados por um anel pirano. Esses três anéis são chamados A, B e C, como mostrado na **Figura 7**. Dependendo do carbono ao qual o anel B está ligado, temos isoflavonoides, neoflavonoides ou flavonoides.

Figura 7. Estrutura básica de um flavonoide, isoflavonoide e neoflavonoide.

Como mencionado acima, os flavonoides são sintetizados pelas vias do chiquimato e do acetato-malonato. Um resumo desta biossíntese é apresentado na **Figura 8**.

Figura 8. Biossíntese de flavonoides.

O ácido corísmico é sintetizado a partir da adição de uma molécula de fosfoenol piruvato e uma desidratação. A partir do ácido corísmico, o ácido prefênico é sintetizado. Após uma transaminação obtida por meio da enzima piridoxal-fosfato é gerado o ácido arogênico. A partir deste, a fenilalanina é sintetizada. Após a desaminação da fenilalanina pela PAL, o ácido cinâmico é gerado, o qual passa por diversas reações, originando a coumaroil-CoA. A essa molécula, são adicionadas três unidades de malonil-CoA provenientes da via do acetato-malonato. Esta nova estrutura se fecha sobre si mesma, originando o anel A e gerando uma chalcona, que é precursora de flavonoides, como flavanonas, isoflavonas, flavonas, di-hidroflavonóis, antocianidinas, e flavonóis (DEWICK, 2009) (**Figura 9**).

Figura 9. Biossíntese de flavonoides a partir da chalcona.

1.3. Euphorbiaceae

Desde tempos imemoriais, espécies de Euphorbiaceae têm sido utilizadas para fins terapêuticos. Euphorbiaceae e depois *Euphorbia* foram nomeadas em homenagem a Euphorbus, médico grego do Rei Juba II da Mauritânia. Acredita-se que Euphorbus usava o látex de *Euphorbia resinifera* para curar distúrbios gastrointestinais (LOVELL, 1998). *Euphorbia polycarpa*, *Euphorbia hirta* e *Acalypha indica* eram utilizadas para o tratamento de diferentes doenças na Ayurveda antiga (HOOPER, 2002). LAI et al. (2004) relatam o uso de 33 espécies pertencentes a 17 gêneros de Euphorbiaceae na antiga medicina chinesa. Na medicina tradicional da península de Iucatã, diferentes espécies de Euphorbiaceae também são utilizadas. ANKLI et al. (1999) relatam o uso de *Euphorbia ptercineura* para a cura da asma e tosse, *Croton peraeuginosus* para espinhas, e *Phyllanthus micrandrus* para feridas, inflamações e infecções.

Pertencente à ordem Malpighiales (APG III, 2009), Euphorbiaceae é uma das maiores famílias das Angiospermas, com 317 gêneros e 8.000 espécies (WEBSTER, 1994). Os membros da família podem apresentar hábito arbóreo, arbustivo, herbáceo ou serem lianas, e são amplamente distribuídos em todo o planeta, tanto no velho mundo quanto no novo mundo (WEBSTER, 1994).

Euphorbiaceae possui também uma grande diversidade química. De acordo com SEIGLER (1994), a pluralidade de usos terapêuticos é devido à presença de uma grande variedade de metabólitos secundários incomuns, que torna tóxica a maioria das espécies. Como exemplos, pode-se citar a ricina encontrada em *Ricinus communis*, uma das substâncias mais tóxicas de origem vegetal (PALATNICK & TENENBEIN, 2000), e a curcina, presente em *Jatropha curcas* (MAMPANE et al.,

1987). Essas duas substâncias são lecitinas (proteínas tóxicas) capazes de inibir a síntese proteica, além de aglutinar hemácias (OLSNES & PIHL, 1973; LIN et al., 2010).

1.3.1. *Croton* L.

Croton é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae, com aproximadamente 1300 espécies. Apresentando hábito arbóreo, arbustivo ou herbáceo, as espécies de *Croton* se distribuem em zonas tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia (GOVAERTS et al. 2000). O gênero é muito promissor na pesquisa de compostos bioativos, tanto devido à sua variedade química, quanto pela sua diversidade de uso na medicina tradicional/popular. Conforme documentado no sistema de medicina Ayurveda indiana (KAPOOR, 1989), *Croton oblongifolius* já era utilizado no século 2 a.C. para o tratamento de doenças do fígado, entorses, picadas de serpente e como purgante, enquanto *Croton tiglium* era utilizado no tratamento de demência, convulsões, asma, tumores e reumatismo. No Brasil, duas espécies de *Croton* (*Croton cajucara* e *Croton zehntneri*) estão presentes na Renisus (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - Sistema Único de Saúde). Fazem parte dessa relação, no sistema de atenção farmacêutica desse órgão, 71 espécies vegetais para estudo e uso como fitoterápico.

Estudos farmacológicos de *Croton* comprovaram uma série de atividades de interesse, como propriedades antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antirreumáticas, antidiarreicas, anticancerígenas, citotóxicas e mutagênicas, entre outras (SALATINO et al., 2007).

Os flavonoides obtidos de *Croton* apresentam estruturas que podem variar desde agliconas de flavonóis altamente metoxilados, como a artemetina (BARRETO et al., 2013), até moléculas mais complexas, os cumaril glicosídeos, como, por exemplo, o tilirosídeo (**Figura 10**). Diversos trabalhos relatam a presença de tilirosídeo em *Croton* (ZOU et al., 2010; ADEROGBA et al., 2011; LOPES et al., 2012). MATOS (2011) sugere que a presença ou ausência dessa substância possa ser característica de determinadas espécies ou grupos infragenéricos.

Figura 10. Estrutura do tilirosídeo.

Podem ser citados vários trabalhos que relatam os efeitos de extratos e de substâncias isoladas de espécies de *Croton*. Por exemplo, o látex vermelho de *C. lechleri* apresenta atividade antibacteriana (CHEN et al., 1994) e atividade inibidora da proliferação de células da leucemia (ROSSI et al., 2003). Extratos aquosos e etanólicos de *C. schideanus* têm atividade vaso-relaxante e anti-hipertensiva (GUERRERO et al., 2002).

Inúmeras são as novas substâncias isoladas de espécies de *Croton*. Mais recentemente foi publicada a estrutura do flavonoide quercetina-3-O- β -(p-cumaroil) glucopiranosídeo-3'-metil éter (helicrisosídeo-3'-metil éter) de *Croton zambesicus* (**Figura 11.1**) (ADEROGBA et al., 2011); do diterpeno clerodânico 8-epicordatina de *Croton palanostigma* (**Figura 11.2**) (BRASIL et al., 2010); e de três novos diterpenos sarcoleptanos de *Croton sarcopetalus* (**Figura 11.3**) (DE HELUANI et al., 2000).

Figura 11. Estruturas de novas substâncias isoladas de *Croton*: (1) flavonoide quercetina-3-O- β -(p-cumaroil) glucopiranosídeo-3'-metil éter (helicrisosídeo-3'-metil éter); (2) diterpeno clerodânico 8-epicordatina; (3) três diterpenos sarcoleptanos.

A espécie estudada neste trabalho é *Croton pallidulus* Baill., que se encontra na seção *Lamprocroton*. Essa seção é formada por espécies predominantemente sul-americanas. A espécie tipo é *Croton ceanothifolius* Baill. São plantas arbustivas, monoicas ou dioicas que possuem estiletes bífidos, folhas sem glândulas e indumento lepidoto. Fazem parte desta seção 26 espécies: *C. argentinus*, *C. burchellii*, *C. ceanothifolius*, *C. chloroleucus*, *C. cinerellus*, *C. dichrous*, *C. dusenii*, *C. ehrenbergii*, *C. ericoides*, *C. erythroxyloides*, *C. eskuchei*, *C. hypoleucus*, *C. imbricatus*, *C. linearifolius*, *C. muellerianus*, *C. myrianthus*, *C. pallidulus*, *C. paraguayensis*, *C. perintrincatus*, *C. pseudoadipatus*, *C. pygmaeus*, *C. serpyllifolius*, *C. splendidus*, *C. subcinerellus*, *C. tenellus*, *C. uruguayensis* (LIMA & PIRANI, 2008).

C. pallidulus apresenta hábito arbustivo ou subarbustivo, altura variando de 0,3-1,5 m e possui caule alaranjado. É monoica e suas inflorescências são racemos bissexuados, sendo que as flores pistiladas têm as pétalas reduzidas e as flores estaminadas possuem de 12-15 estames. Os frutos são elipsoides e a dispersão das sementes é feita por autocoria. As folhas são elípticas ou ovais, sendo tomentosa na face abaxial, coberta por tricomas pseudo-lepidotos, e tomentosa ou glabra na face adaxial (LIMA & PIRANI, 2008) (**Figura 13**).

Croton pallidulus apresenta uma variedade descrita na literatura, *C. pallidulus* Baill. var. *glabrus* L.R, que difere morfológicamente da variedade tipo *Croton pallidulus* Baill. var. *pallidulus* (Baill.) L.B. Smith & S.F. Smith., popularmente conhecida como “velame do campo”, pela ausência ou quase ausência de indumento na face adaxial das folhas na var. *glabrus*. Na var. *pallidulus* essa região é sempre coberta por tricomas estrelados (LIMA & PIRANI, 2008).

C. pallidulus var. *glabrus* é encontrada nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Está presente em solo arenoso com baixa drenagem. *C. pallidulus* var. *pallidulus*, também é encontrada em São Paulo, Paraná e Santa Catarina, além de Minas Gerais (**Figura 12**). Essa variedade está presente em diversos habitat, como afloramentos rochosos, campos arenosos, cerrado pedregoso e campo sujo (LIMA & PIRANI, 2008).

Figura 12. Mapas de distribuição de *Croton pallidulus* var. *pallidulus* (A) e *Croton pallidulus* var. *glabrus* (B) (retirado de LIMA E PIRANI, 2008).

C. pallidulus foi pouco estudado quimicamente. Podem-se citar apenas dois trabalhos. VUNDA et al. (2012) mostram a composição do óleo volátil de *Croton pallidulus* e sua atividade sobre *Acanthamoeba polyphaga*, enquanto FELIU (2011) analisa os terpenoides das duas variedades. Não há artigos na literatura que descreveram qualquer flavonoide em *C. pallidulus*.

Figura 13. Eletromicrografias de varredura da superfície foliar abaxial (A) e da superfície adaxial (B) mostrando tricomas foliares; (C) flores estaminadas; (D) flores pistiladas; (E) frutos e folhas, (F) caule de *Croton pallidulus* var. *pallidulus* (G). Imagens: A e B = fotos de Bruna Pimentel; C-G = fotos de Sarah A. Soares.

2. OBJETIVOS

- Avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos fracionados de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.
- Isolar e identificar os principais constituintes, de acordo com os resultados das atividades biológicas dos ensaios de atividade antimicrobiana e de toxicidade frente à *A. salina*.
- Avaliar as atividades biológicas das substâncias isoladas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas folhas e caules de *C. pallidulus* Baill. var. *pallidulus* (Baill.) L.B. Smith & S.F. Smith, coletadas em Campos do Jordão - SP em 08/12/2011. Exsicatas do material coletado estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (SP), sob o número Cordeiro 3329. A espécie foi coletada e identificada pela Profa Dra Inês Cordeiro, professora e pesquisadora do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, especialista em Euphorbiaceae.

3.2. Obtenção dos extratos

As folhas e caules foram secos em estufa a 40°C por 72h e triturados até a obtenção de um pó fino. A extração foi realizada em Soxhlet por 10 horas, partindo de 496,80 g de material seco (folhas e caules). Foram utilizados os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Após a extração com um solvente, o material vegetal era seco e em seguida extraído com outro solvente. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador, sob pressão reduzida.

3.3. Obtenção das frações dos extratos hexânico e diclorometânico

Frações dos extratos hexânico e diclorometânico foram obtidas por cromatografia em coluna de sílica. As frações recolhidas das colunas foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel G 60 e reveladas com vanilina e ácido sulfúrico (com aquecimento). Após esse procedimento, foram reunidas de acordo com a semelhança das bandas.

Para o extrato hexânico foram utilizados 400 mL dos seguintes eluentes: hexano; hexano/diclorometano (gradiente de 9:1 a 1:9); diclorometano; diclorometano/acetato de etila (gradiente de 9:1 a 1:9); acetato de etila; acetato de etila/metanol (gradiente de 9:1 a 1:9); metanol.

Para o extrato diclorometânico foram utilizados 400 mL dos seguintes eluentes: hexano; hexano/diclorometano 1:1; diclorometano; diclorometano/acetato de etila (gradiente de 9:1 a 1:9);

acetato de etila; acetato de etila/metanol (gradiente de 9:1 a 1:9); metanol; metanol acidificado com ácido acético 0,1%.

Após a cromatografia em coluna, frações semelhantes, tanto da separação do extrato hexânico quanto do extrato diclorometânico, foram reunidas e submetidas aos ensaios biológicos. As frações que apresentaram atividade antibacteriana foram novamente fracionadas em coluna de sílica, utilizando 100 mL dos seguintes eluentes: diclorometano; diclorometano/acetato de etila (gradiente de 9:1 a 1:9); acetato de etila; acetato de etila/metanol (gradiente de 9:1 a 1:9); metanol.

3.4. Obtenção das frações dos extratos de acetato de etila e metanol

Frações dos extratos de acetato de etila e de metanol foram obtidos por cromatografia em coluna de polivinilpirrolidona (PVPP), utilizando metanol como eluente.

3.5. Isolamento de substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência

As frações dos extratos diclorometânico e de acetato de etila que apresentaram maior atividade nos ensaios de atividade biológica, tiveram suas substâncias majoritárias isoladas por cromatógrafo líquido de alta eficiência semipreparativo Agilent 1200-DAD, coluna Eclipse XDB-C18 (9,4 x 250mm, 5 µm).

Para a fração do extrato diclorometânico foi desenvolvido o seguinte método: temperatura da coluna: 40°C; fluxo: 0-24min: 2mL/min.; 24-25min: 2-4mL/min.; 25-40min: 4mL/min.; 40-41: 4-2mL/min.; gradiente: (A) água, (B) metanol: 0-3min: 30-50% B; 3-10min: 50-53% B; 10-15min: 53-70% B; 15-20min: 70-85% B; 20-21min: 85-95% B; 21-24min: 95-100% B; 24-38min: 100% B; 38-39min: 100-30% B; 39-41: 30% B. Volume de injeção: 15 µL; detecção em $\lambda = 230, 280, 352$ e 450 nm. Cada banda obtida no cromatograma foi submetida à varredura de 210 a 600 nm.

Para a fração do extrato de acetato de etila foi desenvolvido o seguinte método: temperatura da coluna: 40°C; fluxo: 0-18min: 2mL/min.; 18-19min: 2-4mL/min.; 19-33min: 4mL/min.; 33-34min: 4-2mL/min.; gradiente: (A) água, (C) acetonitrila: 0-5min: 12-20% C; 5-8min: 20-22% C; 8-18min: 22-23,5% C; 18-19min: 23,5-100% C; 19-30min: 100% C; 30-31min: 100-12,5% C; 31-34min: 12% C. Volume de injeção: 15 µL, detecção em $\lambda = 230, 280, 352$ e 450 nm. Foi obtido o espectro de absorção de cada banda do cromatograma.

3.6. Análise de flavonoides

Os flavonoides presentes nos extratos de acetato de etila e metanol foram analisados em cromatógrafo líquido analítico de alta eficiência Agilent 1260-DAD, utilizando-se coluna de fase reversa Zorbax C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm). O método de análise foi adaptado de FURLAN et al.

(2010): temperatura da coluna: 40°C; fluxo: 0-48 min.: 0,5 mL/min.; 48-50 min.: 0,5-1 mL/min.; 50-55 min.: 1 mL/min.; 55-56 min.: 1-0,5mL/min.; 56-60 min.: 0,5 mL/min.; gradiente: (A) água, (C) acetonitrila: 0-5 min.: 12% C; 5-8 min.: 12-20% C; 8-28 min.: 20% C; 28-38 min.: 29-50% C; 38-48 min.: 50-65% C; 48-50 min.: 65-100% C; 50-53 min.: 100% C; 53-54 min.: 100-12% C; 55-60 min.: 12% C; detecção em $\lambda = 230, 280, 352$ e 450 nm. Foi obtido o espectro de absorção de cada banda do cromatograma.

3.7. Identificação de flavonoides

Os flavonoides isolados foram hidrolisados em meio ácido, adicionando-se cerca de 4 mL de HCl 1N, sob aquecimento a uma temperatura de 95°C, por 1 hora. As agliconas foram então separadas dos açúcares através de três extrações com 2 mL de acetato de etila. A solução aquosa e a de acetato de etila foram secas em banho-maria.

Os açúcares foram ressuspensos com algumas gotas de água e cromatografados em CCD de celulose, tendo como fase móvel, piridina: acetato de etila: ácido acético: água (36:36:7:21), ao lado de amostras autênticas de ácido glucurônico, arabinose, galactose, glicose, ramnose e xilose (5 mg/mL). Após a corrida, a fase móvel foi evaporada e a placa foi nebulizada com solução de fosfato de anilina : acetona (2:3) e colocada em estufa a 100°C para visualização dos açúcares.

As agliconas foram identificadas por CLAE, por meio da comparação com amostras autênticas, utilizando o mesmo método descrito no item 3.6.

3.8. Cromatografia em fase gasosa

Os extratos hexânico e diclorometânico e suas respectivas frações provenientes das cromatografias em coluna foram analisadas em cromatógrafo a gás (CG) - Agilent Technologies 6890N, em modo *splitless*, acoplado ao espectrômetro de massas (EM) Agilent 5975. As frações hexânica e diclorometânica foram submetidas à seguinte programação de análise: temperatura inicial da coluna de 150°C por 4 minutos; aquecimento 6°C/min. até 320°C, mantendo-se esta última temperatura por 2 minutos. Tempo total de corrida 34,33 minutos. A coluna empregada foi a DB – 5 HT (30 m x 0,320 mm i.d. x 0,10 μ m de filme). O gás de arraste utilizado foi o Hélio, com fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 320°C. O espectrômetro de massas apresentou os seguintes parâmetros: temperatura da fonte: 230°C; temperatura do quadrupolo: 150°C; a voltagem da eletromultiplicadora (EM) foi de 70 eV; a amplitude de detecção de massa foi de 40 a 1000 unidades de massa atômica; com 2,62 scan/segundo.

3.9. Quantificação de fenóis totais

Os fenóis totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo

WATERMAN & MOLE (1994), adaptado para uso em microplaca. As amostras analisadas foram diluídas em metanol (0,6 mg/mL).

Curva de calibração: para a curva de calibração, foi feita uma solução de 1 mg/mL de ácido gálico. Após o preparo dessa solução foram feitas diluições em microtubos com as seguintes concentrações: 10, 20,, 110 µg/mL.

Montagem da microplaca: em cada poço da microplaca, foram adicionados 200 µL de água destilada. Em seguida foram adicionados 20 µL das amostras, 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 60 µL de uma solução saturada de Na₂CO₃. Para o controle negativo, no lugar da amostra, foi adicionado 20 µL de metanol. Para a curva de calibração, foram adicionados 20 µL das diluições de ácido gálico no lugar da amostra. Leituras da microplaca: as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro de microplacas UV/visível (Epoch Biotek, EUA), 30 minutos após a adição da solução saturada de Na₂CO₃, num comprimento de onda de 760 nm. Foram feitas triplicatas para todas as amostras e pontos da curva de calibração.

Cálculo da quantidade de fenóis totais: os teores de fenóis totais foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa do extrato ou da fração (gE_{AG}/100 g), ou em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa seca da planta (gE_{AG}/100 g MS), e calculados utilizando-se a equação da reta da curva de calibração.

3.10. Quantificação de flavonas e flavonóis totais

Os flavonoides totais foram quantificados pelo método descrito em WOISKY & SALATINO (1998), adaptado para uso em microplaca. As amostras analisadas foram diluídas em metanol: 0,3 mg/mL para os extratos de acetato de etila e metanólico, e suas respectivas frações; 0,5 mg/mL para os extratos hexânico e diclorometânico.

Curva de calibração: para a curva de calibração, foi feita uma solução de 2 mg/mL de quercetina em metanol. A partir desta, foram feitas diluições em microtubos para as concentrações de 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 25; 30; 35; 40 µg/mL.

Montagem da microplaca: em cada poço da microplaca, foram adicionados 100 µL de amostra e 100 µL de solução de AlCl₃ na concentração de 50 mg/mL. Para o controle negativo, no lugar da amostra, foram adicionados 100 µL de metanol. Para a curva de calibração, no lugar da amostra, foram adicionados 100 µL das diluições de quercetina. Foram feitas triplicatas para todas as amostras e pontos da curva de calibração.

Leitura da microplaca: as leituras das absorbâncias foram executadas em espectrofotômetro de microplacas UV/visível (Epoch Biotek, EUA) 15 minutos após a adição da solução de AlCl₃, num comprimento de onda de 420 nm.

Cálculo da quantidade de flavonas e flavonóis totais: os teores de flavonas e flavonóis totais, expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa do extrato ou da fração (gEq/100 g), ou em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa seca da planta (gEq/100 g MS), foram calculados utilizando-se a equação da reta da curva de calibração.

3.11. Atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada pelo método de sequestro do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH, Sigma), descrito em DUARTE-ALMEIDA et al. (2006), adaptado para uso em microplaca.

Preparo das amostras: as amostras a serem analisadas foram diluídas em metanol nas concentrações: 0,6; 0,3; 0,15; 0,075 mg/mL para as frações de acetato de etila e de metanol; 0,3; 0,15; 0,075; 0,030 mg/mL para as subfrações das frações de acetato de etila e metanol; 6,0; 3,0; 1,0; 0,5 mg/mL para as frações hexânica e diclorometânica.

Curva de calibração: para a curva de calibração, foi feita uma solução de quercetina a 1,0 mg/mL em metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições, em microtubos, com as seguintes concentrações: 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50 µg/mL.

Montagem da microplaca: em cada poço da microplaca, foram adicionados 20 µL de amostra e 200 µL de solução de DPPH (0,12 mM). Para o controle negativo, no lugar da amostra, foram colocados 20 µL de metanol. Para a curva de calibração, no lugar da amostra, foram colocados 20 µL das diluições de quercetina. Para o branco foi adicionado 220 µL de metanol, sem a adição de DPPH.

Leitura da microplaca: as leituras das absorbâncias foram executadas em espectrofotômetro de microplacas UV/visível (Epoch Biotek, EUA), 20 minutos após a adição da solução de DPPH, num comprimento de onda de 515 nm.

Cálculo da atividade antioxidante: os valores da atividade antioxidante, expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa do extrato ou da fração (gEq/100 g), foram calculados utilizando-se a equação da reta da curva de calibração. Foram feitas triplicatas para todas as amostras e pontos da curva de calibração.

3.12. Toxicidade frente à *Artemia salina*

Utilizou-se a metodologia descrita em SOLIS et al. (1993). Cistos de *A. salina* (Maramar Aquacultura Com. Imp. Exportação Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) foram colocados para eclodir em água do mar esterilizada (salinidade de 32), sob aeração, a 25°C e intensidade de iluminação de 100 µmol/m²s. Após 24 horas, foram adicionados 6,0 mg/L de levedura seca. Após 48 horas, os naupilius

foram coletados com uma pipeta Pasteur, depois de serem atraídos para um lado do recipiente com uma fonte de luz. Os naupilus foram separados dos cistos, pipetando-os 2-3 vezes para pequenos recipientes contendo água do mar.

Preparo das amostras: os extratos fracionados foram diluídos, inicialmente, a 100 mg/mL em DMSO. Foram adicionadas 20 µL destas soluções a 980µL de água do mar. Foram feitas, então, diluições seriadas até a concentração final de 125 µg/mL para os extratos, e 62,5 mg/mL para as subfrações provenientes das colunas. O controle negativo foi preparado adicionando-se 20 µL de DMSO a 980 µL de água do mar.

Montagem da microplaca: em cada poço da microplaca, foram adicionados, ou 100 µL de amostra, ou 100 µL do controle negativo (1% de DMSO em água do mar). Em seguida foram adicionados em cada poço, 100 µL da suspensão de naupilus, contendo de 10-30 indivíduos. A microplaca foi fechada e mantida por 25°C durante 24 horas.

Leitura da microplaca: após o período de 24 horas, a microplaca foi examinada sob um estereomicroscópio binocular (16 x) e foi registrado o número de naupilus mortos (não móveis) em cada poço. Após as contagens, foram adicionados 100 µL de metanol 80% e, após 30 minutos, foi contado o número total de indivíduos em cada poço.

Cálculo da CL₅₀: valores de CL₅₀ foram calculados pelo método de análise Probit (FINNEY, 1971). Foram feitas triplicatas para todas as amostras.

3.13. Ensaio de atividade citotóxica

Este ensaio foi realizado no departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, com o auxílio da doutoranda Érika Mattos Stein sob a supervisão do Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto.

Para o ensaio da atividade citotóxica, foram utilizadas linhagens celulares de sarcoma uterino humano: MES-SA (ATCC CRL-1976TM) e sua respectiva linhagem mutante droga-dependente, MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977TM). As células cresceram em microplaca, tendo 2000 células/poço de MES-SA, e 2500 células/poço de MES-SA/Dx5, em meio de cultura McCoy's 5A modificado, acrescido de 10% de soro fetal bovino, anfotericina B (0,63 µg/mL), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Doxorrubicina (0,5 µM) foi adicionada ao meio utilizado para o crescimento da linhagem mutante MES-SA/Dx5, para que fosse mantida a resistência fenotípica adquirida à doxorrubicina (HARKER et al., 1983; HARKER & SIKIC, 1985; LARROQUE-LOMBARD et al., 2010). A microplaca contendo as células foi incubada por 24 horas, a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂.

Após as 24 horas de incubação, as amostras a serem testadas foram diluídas em DMSO e adicionadas à microplaca, nas concentrações de 1000 - 62,5 µg/mL. A concentração final de DMSO foi de 1%. A microplaca contendo as células e as amostras foi incubada por 48 horas.

Depois de 48h de incubação, a viabilidade celular foi medida, usando o método MTT (brometo de tetrazólio, azul de tiazolina) (MOSMANN, 1983; GARCÍA-PÉREZ et al., 2010). O meio de cultura colocado para a incubação foi retirado da microplaca, cuidadosamente, para não deslocar as células aderidas ao fundo da placa. Adicionou-se solução de MTT (500 µg/mL em meio McCoy 5A modificado e PBS 10%) à microplaca, que foi incubada por 4 horas. Após esse tempo, o meio foi retirado e foi adicionado, em seu lugar, DMSO. A absorbância foi medida em leitor de microplaca modelo Infinite M200 da Tecan (Männedorf, Switzerland). Os poços que continham células expostas apenas ao meio de cultura e ao meio de cultura contendo DMSO, serviram como controles. A viabilidade celular foi calculada baseando-se no crescimento das células expostas ao meio de cultura e DMSO.

3.14. Ensaio de atividade antibacteriana

Este ensaio foi realizado no departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman e do Dr. Juan Gonzalo Aliaga Gamarra.

Preparação do inóculo: As linhagens bacterianas utilizadas foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (resistente à vancomicina); *Escherichia coli* ATCC 25922; e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi empregado o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas do CLSI, 2009 (Clinical and Laboratory Standards Institute). As colônias foram inoculadas em caldo *Miller-Hinton* cátion ajustado (MHCA - Difco, Le Pont de Claix, France), incubado a 35°C por 12 horas. Foram adicionados 50 µL dessa suspensão a 3 mL de MHCA e a nova suspensão foi incubada por mais 3 horas. Após o período de incubação, a densidade óptica foi verificada e a turbidez foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL). Após o ajuste, a suspensão de bactérias foi diluída 10 x em MHCA.

Preparação das amostras: as amostras, diluídas em DMSO, foram adicionadas à MHCA. As concentrações finais dos extratos fracionados variaram entre 2.028 - 256 µg/mL. Para as subfrações provenientes das colunas, as concentrações finais foram de 1.024 - 128 µg/mL. A porcentagem final de DMSO não foi maior que 10%.

Preparação da placa: em microplaca de 96 poços foi adicionado 100 µL de cada amostra, em triplicata, e 5 µL do inóculo. Além das amostras, também foram colocados controles: DMSO + MHCA + inóculo; DMSO + MHCA; MHCA. A placa foi incubada por 24 horas a 35°C.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): após a incubação da microplaca, foram adicionados 20 µL de solução aquosa 0,01% de Alamar Blue® (resazurina) (Sigma Chemical Co, St Louis, USA), preparado de acordo com NATECHE et al. (2006). A microplaca foi incubada por 1 hora. A mudança de coloração da resazurina, de azul para rosa, indicou crescimento bacteriano. Assim foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) que é a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento bacteriano.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM): após 24 horas de incubação, antes da adição de Alamar Blue® (resazurina), foi realizada uma subcultura, colocando-se uma alíquota de 5 µL de cada poço em placa de ágar MacConkey (Oxoid, Hampshire, England) para as amostras que continham *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*; e ágar Manitol (Difco, Le Pont de Claix, France) para as amostras que continham *Staphylococcus aureus*. Ágar nutriente foi utilizado para os controles negativos. As placas foram incubadas por 24 horas. Assim foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) que é a menor concentração da amostra capaz de reduzir a viabilidade do inóculo inicial em $\geq 99.9\%$ (LAURET & THRUPP, 1980).

3.15. Análises estatísticas

O valor de CI_{50} das amostras no ensaio de atividade citotóxica foi calculado transformando-se os dados de % de viabilidade celular x concentração da amostra em uma reta, pela transformação logarítmica. Para o ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi utilizado o método de análise Probit, descrito por FINNEY (1971), utilizando o software Minitab. Por esse método foi calculada a CL_{50} com um intervalo de confiança de 95%.

Os demais resultados apresentados neste trabalho correspondem à média de três repetições. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados com probabilidade de ocorrência de hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$), aplicando-se ANOVA, seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

Para a comparação da atividade antioxidante com os valores de fenóis totais e flavonóis e flavonas totais foi realizado o método do agrupamento hierárquico, visualizado no dendrograma agrupado por ligação simples (*single linkage*), com medida de distâncias por correlação de Pearson (1-r), utilizando o software Minitab.

4. RESULTADOS

4.1. Extração do material

Os extratos fracionados de folhas e caules (496,80 g) de *C. pallidulus* var. *pallidulus* foram preparados como descrito no item 3.2. Suas massas, bem como seus rendimentos relativamente à massa seca do material são apresentados na

Tabela 1.

Tabela 1. Massa (g), e rendimento (%) dos extratos fracionados, relativamente à massa seca do material de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

	FH	FD	FA	FM
Massa	29,20	6,85	22,91	50,27
Rendimento	5,88	1,38	4,61	10,12

FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica; FA: fração de acetato de etila; FM: fração metanólica.

4.2. Atividade antibacteriana dos extratos

As atividades antibacterianas serão descritas com os valores da Concentração Bactericida Mínima (CBM) que, neste trabalho, coincidiram com a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Exceções estarão claramente descritas no texto.

Os valores de CBM dos extratos fracionados são listados na **Tabela 2**. Com o método utilizado, os extratos hexânico, diclorometânico e de acetato de etila tiveram espectros de atividade antibacteriana idênticos, não apresentando atividade contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 (CBM > 2048 mg/L), enquanto apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213 (resistente à vancomicina), com CBM de 2048 mg/L. O extrato metanólico apresentou atividade apenas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com CBM de 2048 mg/L.

Tabela 2. Concentrações bactericidas mínimas (CBM: mg/L), obtidas por método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas do CLSI, 2009 (Clinical and Laboratory Standards Institute) dos extratos fracionados de *C. pallidulus* var. *pallidulus*

	FH	FD	FA	FM	AR
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>2048	>2048	>2048	>2048	0,125 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2048	2048	2048	2048	2 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2048	2048	2048	>2048	1 ^c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>2048	>2048	>2048	>2048	2 ^d
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	>2048	>2048	>2048	>2048	<0,065 ^e

FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica; FA: fração de acetato de etila; FM: fração metanólica; AR: antibióticos de referência, a: aztreonam; b: oxacilina, c: vancomicina, d: ceftazidime, e: ciprofloxacina.

Na **Figura 14** é apresentada uma microplaca na qual foi realizado o ensaio de atividade antibacteriana do extrato de acetato de etila contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pelo método de microdiluição em caldo. O corante resarsurina (forma oxidada, **azul**) converte-se em resorufina (forma reduzida, **rosa**) quando há crescimento bacteriano, permanecendo azul quando não há crescimento. É possível verificar que não houve crescimento apenas na coluna 4 da microplaca, na qual a concentração da amostra era de 2048 mg/L; esta foi considerada a CIM do extrato de acetato de etila.

Figura 14. Ensaio de atividade antibacteriana do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: azul: não houve crescimento bacteriano; rosa: houve crescimento bacteriano. Concentrações do extrato nos poços - coluna 1: 256 mg/L; coluna 2: 512 mg/L; coluna 3: 1024 mg/L; coluna 4: 2048 mg/L.

Na **Figura 15** são apresentadas placas de petri com meio seletivo (manitol ou MacConkey) onde foram realizadas as subculturas de alíquotas de 5 µL de cada poço da microplaca utilizada para a microdiluição em caldo do extrato de acetato de etila. Na **Figura 15A** vê-se o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em ágar manitol nos quadrantes 13-21, enquanto nos quadrantes 22-24 não é possível ver o crescimento da bactéria. Nesses quadrantes, a concentração da amostra foi de 2048 mg/L, sendo esta considerada a CBM do extrato de acetato de etila. Na **Figura**

15 B, C e D, vê-se o crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 respectivamente, em ágar MacConkey em todos os quadrantes. Como não houve inibição do crescimento, não foi possível determinar a CBM do extrato de acetato de etila.

Na **Figura 15 B, C e D** é possível verificar a diferença que o crescimento das várias espécies de bactérias produz no mesmo meio, neste caso, o ágar MacConkey. Ao utilizar a lactose disponível no meio, bactérias Lac +, como *Escherichia coli*, produzem substâncias ácidas, abaixando o pH do ágar para um valor menor que 6,8, resultando no aparecimento de colônias rosadas (**Figura 15 B**); os sais biliares são precipitados nas imediações da colônia, fazendo com que o meio circundante da colônia fique turvo. Bactérias não fermentadoras de lactose como espécies de *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa* não conseguem usar a lactose, utilizando em seu lugar a peptona; assim, há a formação de amônia, que aumenta o pH do ágar, conduzindo à formação de colônias incolores (**Figura 15 C e D**) (MACCONKEY, 1908).

Figura 15. Ensaio de atividade antibacteriana do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*: subculturas realizadas em meio seletivo: (A) ágar manitol com crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apenas nos quadrantes 13-21; (B) ágar MacConkey com crescimento de *E. coli* ATCC 25922; (C) ágar MacConkey com crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853; (D) ágar MacConkey com crescimento de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

4.3. Atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante dos extratos foi medida pelo método de sequestro de radicais livres, utilizando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O método se baseia na perda de coloração púrpura do DPPH quando este é reduzido por antioxidantes presentes na amostra. Com intuito de produzir dados comparáveis e reproduzíveis, independente da quantidade de DPPH utilizada na reação, os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de extrato (gEQ/100g). A curva padrão de quercetina utilizada se encontra na **Figura 16**.

Figura 16. Curva padrão de quercetina para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres, utilizando DPPH.

Tabela 3. Valores da atividade antioxidante (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de *C. pallidulus* var. *pallidulus* em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de extrato (gEQ/100 g).

Extratos fracionados	gEQ/100g
Hexânico	0,02 $\pm$ 0,01 ^C
Diclorometânico	2,61 $\pm$ 0,06 ^B
Acetato de etila	12,11 $\pm$ 0,76 ^A
Metanólico	11,77 $\pm$ 0,95 ^A

Letras diferentes representam diferenças significativas entre os valores de atividade antioxidante. (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Os valores de atividade antioxidante dos extratos fracionados variaram de $0,02 \pm 0,01$ gEQ/100 g, para o extrato hexânico, até $12,11 \pm 0,76$ gEQ/100 g, para o extrato de acetato de etila (**Tabela 3**). Os valores da atividade antioxidante dos extratos de acetato de etila e metanólico não diferiram entre si. Entretanto, os demais foram significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.4. Doseamento de fenóis totais, e de flavonóis e flavonas totais dos extratos.

Com o objetivo de comparar a atividade antioxidante dos extratos fracionados com a quantidade de fenóis totais e flavonóis e flavonas totais, esses extratos foram quantificados.

Para a quantificação de fenóis totais foi utilizada a curva padrão de ácido gálico apresentada na **Figura 17**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de extrato ($\text{gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$). Também foi calculada a quantidade de fenóis totais por extrato, relativo à massa seca da amostra, bem como o valor total de fenóis na amostra. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa seca da planta ($\text{gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g MS}$). Esses resultados são apresentados na **Tabela 4**.

Figura 17. Curva padrão de ácido gálico para a quantificação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

Tabela 4. Teores de fenóis totais (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de *C. pallidulus* var. *pallidulus* em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de extrato ($\text{gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$) e por 100 g de massa seca da planta ($\text{gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g MS}$).

Extratos fracionados	$\text{g E}_{\text{AG}}/100\text{g}^*$	$\text{g E}_{\text{AG}}/100\text{g MS}^{**}$
Hexânico	$0,84 \pm 0,05^{\text{D}}$	$0,05 \pm 0,00^{\text{C}}$
Diclorometânico	$6,00 \pm 0,48^{\text{C}}$	$0,08 \pm 0,01^{\text{C}}$
Acetato de etila	$14,52 \pm 0,59^{\text{A}}$	$0,67 \pm 0,03^{\text{B}}$
Metanólico	$11,32 \pm 0,47^{\text{B}}$	$1,15 \pm 0,05^{\text{A}}$
Amostra	--	$1,95 \pm 0,05$

*Letras diferentes representam diferenças significativas entre a quantidade de fenóis totais nos extratos (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

** Letras diferentes representam diferenças significativas entre a quantidade de fenóis totais por extrato, relativo à massa seca da amostra (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

A quantidade de fenóis dos extratos fracionados variaram de $0,84 \pm 0,05 \text{ g E}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$, para o extrato hexânico, até $14,52 \pm 0,59 \text{ gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$, para o extrato de acetato de etila (**Tabela 4**). A quantidade de fenóis totais foi significativamente diferente para todos os extratos ($p < 0.05$). Com relação à quantidade de fenóis totais em cada extrato relativos à massa seca da amostra, os valores

variaram desde $0,05 \pm 0,00$ E_{AG}/100 g MS para o extrato hexânico, até $1,15 \pm 0,05$ gE_{AG}/100 g MS, no extrato metanólico, sendo que os extratos hexânico e diclorometânico não diferiram entre si (**Tabela 4**). Os extratos de acetato de etila e metanólico foram diferentes dos demais e também entre si ($p < 0,05$). A quantidade total de fenóis na planta inteira foi de $1,95 \pm 0,05$ E_{AG}/100g MS (**Tabela 4**).

Para a quantificação de flavonóis e flavonas totais foi utilizada a curva padrão de quercetina apresentada na **Figura 18**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de extrato (gE_Q/100 g). Também foi calculada a quantidade de flavonóis e flavonas totais por extrato, relativo à massa seca da amostra, bem como o seu valor total na amostra. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa seca da planta (gE_Q/100 g MS) e são mostrados na **Tabela 5**.

Figura 18. Curva padrão de quercetina para a quantificação de flavonóis e flavonas.

Tabela 5. Teores de flavonóis e flavonas totais (média $\pm$ desvio padrão) dos extratos de *C. pallidulus* var. *pallidulus* em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de extrato (gE_Q/100g) ou por 100 g de massa seca da planta (gE_Q/100g MS).

Extratos fracionados	g E _Q /100g*	g E _Q /100g MS**
Hexânico	$0,79 \pm 0,06$ ^C	$0,05 \pm 0,00$ ^B
Diclorometânico	$1,64 \pm 0,11$ ^{C, B}	$0,02 \pm 0,00$ ^B
Acetato de etila	$5,18 \pm 0,64$ ^A	$0,24 \pm 0,03$ ^A
Metanólico	$2,51 \pm 0,16$ ^B	$0,25 \pm 0,02$ ^A
Amostra		$0,56 \pm 0,03$

*Letras diferentes representam diferenças significativas entre a quantidade de flavonóis e flavonas totais nos extratos (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0,05$).

** Letras diferentes representam diferenças significativas entre a quantidade de flavonóis e flavonas totais por extrato, relativo à massa seca da amostra (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0,05$).

A quantidade de flavonóis e flavonas totais dos extratos variaram de $0,79 \pm 0,06$ gE_Q/100 g, para o extrato hexânico, até $5,18 \pm 0,64$ gE_Q/100 g, para o extrato de acetato de etila (**Tabela 5**). A quantidade de flavonóis e flavonas totais do extrato de acetato de etila foi significativamente diferente dos demais ($p < 0,05$). Com relação à quantidade de flavonóis e flavonas totais por extrato, relativa à massa seca da amostra, os valores variaram desde $0,02 \pm 0,00$ E_Q/100g MS para o extrato hexânico, até $0,25 \pm 0,02$ g E_Q/100 g MS para o extrato metanólico, sendo que os extratos de acetato de etila e metanólico não diferiram entre si, mas foram maiores que os demais ($p < 0,05$). A quantidade total de flavonóis e flavonas na planta inteira foi $0,56 \pm 0,03$ E_Q/100g MS.

4.5. Toxicidade frente à *Artemia salina*

Este bioensaio é considerado um ensaio preliminar que indica especialmente a citotoxicidade de substâncias. MCLAUGHLIN & ROGERS (1998), observaram que a CL₅₀ para artemias era dez vezes maior que a DE₅₀ para células de linhagem tumorais.

Neste trabalho, foi utilizado o bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* com o objetivo de selecionar as frações com menor CL₅₀ para a realização do ensaio de atividade citotóxica. Foi avaliada a toxicidade dos extratos nas concentrações 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. Os resultados de CL₅₀ são apresentados na **Tabela 6**. Dos quatro extratos fracionados, apenas o extrato diclorometânico apresentou atividade, com CL₅₀ de 385 mg/L .

Tabela 6. CL₅₀ (mg/mL) dos extratos de *C. pallidulus* var. *pallidulus* frente à *A. salina*.

Extratos fracionados	CL ₅₀ (mg/L)	(IC 95%)
Hexânico	>1000	--
Diclorometânico	385	(144-1394)
Acetato de etila	>1000	--
Metanólico	>1000	--

CL₅₀: concentração letal média. IC: intervalo de confiança.

4.6. Substâncias presentes nos extratos hexânico e diclorometânico (análise por CG-EM)

O resultado obtido por CG-EM da análise das substâncias presentes nos extratos hexânico e diclorometânico são apresentados nas **Tabela 7** e **Tabela 8**. Os espectros de massas das substâncias foram comparados com os espectros do banco de dados disponíveis na biblioteca NIST 2.0.

No extrato hexânico (**Tabela 7**) pode-se observar uma grande quantidade de triterpenos pentacíclicos do grupo dos oleananos e ursanos (57% abundância relativa). Estes triterpenos são reconhecidos pelo pico base de 218 m/z (BUDZIKI et al., 1963). Outras substâncias abundantes nesse extrato é um alceno de cadeia linear com tempo de retenção (TR) de 18,82 min. (10,34% abundância relativa); a lup-20(29)-en-3-ona, com TR de 23,27 min. (9,10% abundância relativa); e a friedelan-3-ona, com TR de 24,72 min. (7,10% abundância relativa). Outras três substâncias não puderam ser identificadas.

No extrato diclorometânico (**Tabela 8**) as três substâncias mais abundantes foram: 1) um derivado de elemol, TR = 10,20 min. (22,95% abundância relativa); 2) uma substância não identificada com TR de 8,40 min. (19,59% abundância relativa); 3) um cembranolídeo (1R,2E,4R,7E,11E)-4-hidroxicembra-2,7,11-trieno, com TR de 7,25 min. (10,45% abundância relativa). Outras 12 substâncias que apareceram no cromatograma não puderam ser identificadas.

Tabela 7. Substâncias analisadas por CG-EM do extrato hexânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*

Tempo de retenção (min.)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
7,90	0,76	69 (999), 81 (448), 41 (440), 93 (431), 43 (280), 67 (255), 107 (236), 55 (220), 95 (215), 71 (201)	N.I.
8,15	1,23	81 (999), 43 (992), 93 (855), 41 (769), 107 (764), 79 (737), 67 (727), 91 (666), 55 (661), 121 (650)	N.I.
9,30	2,02	71 (999), 43 (965), 81 (896), 93 (727), 69 (488), 41 (451), 55 (437), 107 (428), 79 (404), 67 (393)	9-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-2,7-dimetilnona-2,6-dien-1-ol
11,14	3,25	93 (999), 43 (894), 107 (649), 81 (503), 55 (464), 95 (431), 67 (428), 79 (369), 41 (361), 69 (359)	derivado de elemol
17,96	3,91	69 (999), 81 (545), 41 (200), 95 (142), 68 (120), 67 (104), 93 (104), 121 (101), 136 (101), 137 (99)	esqualeno
18,82	10,34	57 (999), 71 (749), 85 (551), 43 (542), 55 (233), 69 (179), 41 (175), 99 (170), 83 (155), 56 (135)	alcano cadeia linear
20,97	0,66	57 (999), 71 (752), 43 (573), 85 (543), 207 (348), 55 (295), 44 (252), 41 (228), 69 (221), 97 (209)	alcano cadeia linear
21,29	0,44	221 (999), 178 (703), 43 (404), 150 (358), 165 (340), 149 (317), 55 (292), 95 (290), 69 (264), 81 (261)	N.I.
22,79	9,35	218 (999), 203 (570), 55 (231), 95 (227), 69 (213), 81 (196), 107 (185), 219 (179), 109 (175), 105 (172)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
23,02	10,04	218 (999), 203 (478), 95 (182), 69 (178), 219 (175), 55 (140), 81 (139), 189 (139), 107 (131), 119 (128)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
23,21	8,80	218 (999), 203 (263), 55 (238), 95 (228), 135 (228), 122 (227), 119 (210), 133 (210), 107 (194), 109 (188)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
23,27	9,10	109 (999), 95 (971), 205 (924), 81 (825), 107 (792), 93 (759), 121 (683), 55 (680), 67 (647), 69 (618)	Lup-20(29)-en-3-ona
23,48	29,59	218 (999), 95 (303), 135 (266), 81 (260), 189 (254), 107 (253), 109 (245), 69 (241), 203 (241), 93 (236)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
24,47	3,42	95 (999), 69 (903), 96 (812), 109 (810), 81 (772), 55 (635), 123 (605), 165 (598), 121 (545), 107 (543)	D:A-Friedooleanan-3-ol
24,72	7,10	69 (999), 95 (905), 109 (777), 81 (728), 123 (714), 55 (685), 96 (603), 125 (561), 67 (536), 107 (433)	Friedelan-3-ona

N. I.: não identificada.

Tabela 8. Substâncias analisadas por CG-EM do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*

Tempo de retenção (min)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
5,18	1,20	67 (999), 81 (874), 95 (672), 82 (667), 41 (653), 96 (627), 55 (598), 43 (471), 68 (437), 69 (405)	9,17-Octadecadienal (aldeído de cadeia linear)
5,24	1,85	55 (999), 83 (874), 69 (847), 41 (803), 43 (786), 57 (748), 97 (732), 67 (627), 81 (483), 56 (464)	N. I.
7,06	8,88	69 (999), 81 (448), 93 (404), 41 (357), 107 (252), 67 (208), 43 (186), 95 (186), 55 (184), 71 (159)	Geranil linalool (diterpeno linear)
7,27	10,45	81 (999), 43 (983), 93 (755), 107 (696), 95 (660), 67 (648), 41 (626), 69 (624), 55 (611), 79 (591)	1R,2E,4R,7E,11E)-4-hidroxicembra-2,7,11-trieno (diterpeno - cembranolideo)
8,15	5,99	71 (999), 81 (363), 57 (355), 43 (350), 69 (328), 55 (324), 41 (289), 95 (288), 123 (278), 68 (242)	fitol
8,40	19,59	71 (999), 43 (946), 81 (945), 93 (803), 107 (491), 55 (431), 79 (401), 69 (395), 41 (385), 67 (383)	N.I.
9,32	1,58	93 (999), 81 (855), 43 (578), 55 (566), 69 (545), 41 (507), 71 (416), 107 (365), 95 (320), 135 (297)	N. I.
10,09	2,56	81 (999), 55 (607), 95 (551), 93 (534), 67 (433), 43 (398), 69 (391), 41 (383), 107 (348), 71 (327)	N. I.
10,20	22,95	93 (999), 43 (786), 107 (664), 81 (468), 95 (416), 55 (408), 67 (375), 79 (342), 41 (321), 69 (314)	derivado de elemol
10,43	2,64	43 (999), 93 (868), 55 (625), 69 (576), 81 (545), 107 (533), 41 (471), 67 (458), 95 (457), 79 (408)	N. I.
10,59	1,70	71 (999), 43 (945), 57 (904), 81 (559), 55 (520), 41 (463), 93 (451), 85 (419), 69 (375), 67 (301)	N. I.
10,93	0,77	95 (999), 81 (964), 93 (404), 107 (387), 189 (370), 41 (359), 44 (352), 55 (345), 91 (342), 43 (338)	N. I.

N. I.: não identificada.

Tabela 8 (Continuação)

Tempo de retenção (min.)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
11,18	0,79	93 (999), 81 (887), 55 (687), 43 (673), 107 (553), 41 (533), 95 (527), 79 (488), 67 (485), 44 (460)	N. I.
11,41	0,64	93 (999), 43 (991), 107 (655), 81 (529), 44 (468), 67 (432), 55 (421), 41 (381), 79 (381), 91 (344)	N. I.
11,766	0,83	81 (999), 95 (693), 93 (546), 91 (528), 189 (512), 105 (507), 44 (492), 41 (476), 119 (418), 96 (411)	N. I.
16,934	3,02	69 (999), 81 (579), 41 (204), 95 (167), 137 (129), 93 (124), 121 (120), 136 (120), 68 (119), 123 (104)	esqualeno
17,415	0,83	315 (999), 43 (735), 44 (382), 81 (379), 95 (340), 91 (325), 105 (245), 107 (229), 201 (210), 316 (207)	Cauren-18-ol-5,7,10-trimetil-17-acetil-oxi
20,072	0,77	165 (999), 430 (401), 164 (290), 43 (143), 44 (130), 431 (126), 166 (110), 205 (99), 57 (91), 55 (68)	alfa-tocoferol
21,683	5,04	43 (999), 55 (706), 107 (669), 95 (667), 105 (655), 81 (626), 57 (611), 145 (604), 91 (572), 93 (502)	beta-sitosterol
21,767	4,86	57 (999), 43 (611), 85 (445), 81 (303), 95 (253), 109 (244), 41 (186), 83 (186), 55 (177), 135 (176)	N. I.
22,269	2,21	218 (999), 95 (255), 207 (253), 203 (240), 135 (224), 55 (218), 44 (217), 122 (213), 119 (210), 133 (206)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
26,851	0,84	69 (999), 81 (451), 207 (351), 44 (225), 41 (173), 95 (162), 73 (154), 121 (135), 93 (122), 281 (117)	N. I.

N. I.: não identificada.

4.7. Isolamento biomonitorado

Os extratos hexânico e diclorometânico tiveram suas frações separadas por cromatografia em coluna de sílica, enquanto para os extratos de acetato de etila e metanólico, a coluna utilizada foi a de PVPP. As frações resultantes dessas separações foram submetidas aos ensaios de atividades biológicas.

O isolamento biomonitorado das substâncias foi realizado levando-se em conta os resultados dos ensaios de atividades biológicas dos extratos fracionados. Assim, as frações do extrato hexânico foram submetidas apenas ao ensaio de atividade antibacteriana; as frações do extrato diclorometânico foram submetidas aos ensaios de atividade antibacteriana, de toxicidade frente à *A. salina*, e do ensaio de atividade citotóxica; as frações dos extratos de acetato de etila e metanólico foram submetidas aos ensaios de atividade antibacteriana e antioxidante.

4.7.1. Extrato hexânico

Foi feita cromatografia em coluna de sílica do extrato hexânico, resultando em 85 frações. Estas, após cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel G, e revelação com vanilina e ácido sulfúrico (com aquecimento) foram reunidas em oito frações, de acordo com suas semelhanças. As frações reunidas foram chamadas: FH-1A, FH-2A, FH-3A,...FH-8A.

A **Figura 19** mostra uma placa de CCD com as frações 20 - 38, antes de serem reunidas. Pode-se observar nela, bandas com diferentes padrões.

Figura 19. Cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel G e revelação com vanilina e ácido sulfúrico (com aquecimento), mostrando as frações 20-38 do extrato hexânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* antes de serem reunidas.

As oito frações (FH-1A - FH-8A) foram submetidas ao ensaio de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Apenas a FH-5A apresentou atividade com CBM de

256 mg/L. As demais frações não apresentaram atividade, uma vez que a CBM foi maior que 1024 mg/L (concentração máxima testada).

A fim de prosseguir com o fracionamento biomonitorado, a FH-5A foi submetida a uma nova separação por cromatografia em coluna de sílica, como descrito no item 3.3. Foram recolhidas 25 subfrações que foram reunidas em 8 subfrações, de acordo com suas semelhanças quando cromatografadas por CCD de sílica gel G, como descrito acima. Essas frações foram chamadas: FH-5A-1B, FH-5A-2B,...FH-5A-8B. Cada uma delas foi submetida ao ensaio de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As cinco primeiras (FH-5A-1B a FH-5A-5B) apresentaram atividade antibacteriana com CBM de 1024mg/L. Essas frações tiveram um valor de CBM maior do que o da fração FH-5A que as gerou (CBM = 256 mg/L). Por esse motivo, não se prosseguiu com o isolamento biomonitorado de substâncias das subfrações.

Na **Figura 20** é apresentado um esquema da obtenção das frações do extrato hexânico por cromatografia em coluna de sílica. São apresentados também os valores de CBM para ensaios de atividade antibacteriana.

Figura 20. Esquema da obtenção das frações do extrato hexânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* por cromatografia em coluna de sílica. São apresentados também os valores de CBM para os testes microbiológicos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Frações e respectivos valores de CBM são representados pela mesma cor.

Substâncias presentes nas frações ativas

As frações ativas FH-5A, e as de FH-5A-1B à FH-5A-5B foram submetidas à CG-EM, a fim de se analisar seus perfis em substâncias possivelmente ativas. Seus espectros de massas foram comparados com os espectros do banco de dados disponíveis na biblioteca NIST 2.0.

Na **Tabela 9** são mostradas as substâncias analisadas das frações FH-5A, e as de FH-5A-1B à FH-5A-3B. As frações FH-5A-4B e FH-5A-5B não apresentaram nenhuma banda nos

cromatogramas de CG-EM. Nota-se que na fração FH-5A, que apresentou maior atividade antibacteriana (CBM: 256 mg/mL, **Figura 20**), a substância mais abundante é o β -sitosterol (69% abundância relativa).

As subfrações provenientes de FH-5A não foram tão ativas quanto a fração que lhes deu origem (**Figura 20**). Entretanto, apresentam algumas substâncias que não foram detectadas na FH-5A. Dez substâncias foram detectadas na FH-5A-1B, sendo as mais abundantes, o β -sitosterol, e dois triterpenos pentacíclicos do grupo dos oleananos e ursanos. A subfração FH-5A-2B contém o óxido de cariofileno, e a FH-5A-3B apresenta outras duas substâncias (**Tabela 9**).

Provavelmente, o β -sitosterol é a substância predominante na fração FH-5A porque as outras substâncias detectadas nas suas subfrações devem estar em quantidades tão baixas que só foram detectadas quando as subfrações foram isoladas.

Tabela 9. Substâncias obtidas por CG-EM das frações e subfrações ativas do extrato hexânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Fração	Tempo de retenção (min)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
FH-5A	8,732	14	81 (999), 43 (988), 71 (827), 93 (768), 41 (662), 69 (638), 55 (580), 79 (493), 67 (439), 107 (438)	N.I.
	22,081	69	43 (999), 55 (712), 107 (659), 105 (648), 57 (623), 145 (584), 95 (582), 81 (561), 91 (541), 79 (488)	β -sitosterol
	22,248	17	218 (999), 203 (612), 207 (561), 44 (422), 55 (401), 41 (382), 43 (344), 135 (331), 95 (322), 69 (314)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
FH-5A-1B	4,401	1,91	91 (999), 109 (917), 159 (875), 79 (766), 41 (745), 93 (695), 105 (660), 43 (645), 81 (597), 77 (571)	2-(3-(3-hidroxibutil)-2,2-dimetilciclopropil)ciclopent-2-eno-1-ona
	21,83	1,78	221 (999), 178 (775), 165 (536), 43 (487), 44 (476), 207 (451), 150 (335), 57 (282), 55 (241), 180 (231)	N. I.
	22,478	2,13	43 (999), 95 (757), 400 (740), 55 (707), 107 (702), 81 (668), 105 (644), 145 (605), 91 (594), 159 (591)	N. I.
	22,834	3,69	55 (999), 83 (860), 81 (751), 69 (636), 255 (561), 97 (530), 95 (502), 133 (492), 159 (480), 271 (480)	N. I.
	23,42	47,45	43 (999), 107 (718), 55 (693), 145 (686), 414 (686), 105 (665), 95 (661), 57 (656), 81 (645), 91 (564)	β -sitosterol
	23,629	11,44	218 (999), 203 (463), 219 (185), 69 (164), 95 (157), 55 (138), 189 (138), 81 (137), 107 (124), 119 (116)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos
	24,089	16,73	218 (999), 95 (305), 189 (287), 135 (273), 81 (258), 203 (250), 107 (246), 93 (242), 109 (242), 69 (239)	Triterpeno pentacíclico do grupo dos oleananos e ursanos

Tabela 9. (Continuação).

Fração	Tempo de retenção (min)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
FH-5A-1B	25,679	3,93	135 (999), 232 (962), 273 (701), 207 (512), 95 (452), 69 (402), 55 (347), 41 (291), 81 (285), 123 (283)	N. I.
	26,035	3,31	273 (999), 135 (795), 207 (637), 232 (619), 95 (322), 55 (308), 69 (261), 121 (226), 149 (221), 274 (215)	N. I.
FH-5A-2B	6,514	100	79 (999), 43 (940), 93 (903), 91 (737), 81 (553), 41 (541), 105 (498), 77 (452), 55 (440), 107 (436)	óxido de cariofileno
FH-5A-3B	5,154	70,99	43 (999), 91 (614), 105 (573), 107 (540), 41 (516), 119 (442), 93 (436), 175 (414), 79 (411), 145 (399)	7-isopropenil-1,4a-dimetil-3,4,5,6,7,8-hexahidro-2-naftalenona
	5,698	29,01	43 (999), 91 (615), 41 (553), 79 (517), 145 (489), 105 (479), 55 (461), 107 (441), 95 (428), 93 (407)	biciclo[4.4.0]dec-2-eno-4-ol, 2-metil-9-(prop-1-en-3-ol-2-il)

N. I. = não identificada

4.7.2. Extrato diclorometânico

Foi feita cromatografia em coluna de sílica do extrato diclorometânico, resultando 27 frações. Estas, após cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel G e revelação com vanilina e ácido sulfúrico (com aquecimento), foram reunidas em dez frações, de acordo com a semelhança no padrão das bandas. As subfrações reunidas foram chamadas: FD-1A, FD-2A, FD-3A,...FD-10A.

A **Figura 21** mostra a placa de CCD com as frações de 1 a 17, antes de serem reunidas. Pode-se observar nela, os diferentes padrões de bandas das frações.

Figura 21. Cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel G e revelação com vanilina e ácido sulfúrico (com aquecimento), mostrando as frações 1-17 do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*, antes de serem reunidas.

As dez subfrações (FD-1A - FD-10A) foram submetidas ao ensaio de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ao ensaio de toxicidade frente à *A. salina*.

Atividade antibacteriana

Na **Figura 22** é apresentado um esquema da obtenção das subfrações da fração diclorometânica por cromatografia em coluna de sílica. São apresentados também os valores de CBM para os testes microbiológicos.

Figura 22. Esquema da obtenção das frações do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* por cromatografia em coluna de sílica. São apresentados também os valores de CBM para os testes microbiológicos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Frações e respectivos valores de CBM são representados pela mesma cor.

Nenhuma das dez frações mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pois apresentaram CBM maior que 2048mg/L. Por esse motivo, o isolamento biomonitorado visando obter as substâncias ativas antibacterianas do extrato diclorometânico foi interrompido.

Na **Tabela 10** são mostradas as substâncias analisadas das frações FD-3A, FD-4A, FD-5A e FD-8A por CG-EM. As demais frações do extrato diclorometânico não apresentaram nenhuma banda nos cromatogramas de CG-EM. Comparando-se as **Tabelas 8** (substâncias obtidas por CG/EM do extrato diclorometânico) e **Tabela 10** (substâncias obtidas das frações do extrato diclorometânico) verifica-se que, dentre todas as substâncias presentes no extrato diclorometânico, apenas uma aparece nas frações deste extrato, que é a substância não identificada com TR: 11,41 min. Esta substância é detectada apenas na fração FD-4A (Tabela 10). Todas as substâncias detectadas nas frações do extrato diclorometânico (**Tabela 10**) não foram detectadas no extrato que lhes deu origem (**Tabela 8**). Provavelmente, isso se deve ao fato de que essas substâncias estariam em quantidades tão baixas no extrato diclorometânico que só foram detectadas quando as frações foram separadas.

As frações do extrato diclorometânico não apresentaram atividade antibacteriana (**Figura 22**). Assim, pode-se sugerir que o motivo da falta de atividade dessas frações é devido ao fato de que a substância ou as substâncias responsáveis pela atividade do extrato diclorometânico não apareceram nas frações, por ser volátil, por ter sido degradada, ou por ter sido perdida no processo de

fracionamento. O sinergismo entre as substâncias do extrato diclorometânico pode também ser o responsável pela atividade desse extrato, em detrimento à não atividade das frações.

Tabela 10. Substâncias analisadas por CG-EM das frações do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*, depois de fracionamento por cromatografia em coluna de sílica.

Fração	Tempo de retenção (min)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
FD-3A	4,296	30,63	107 (999), 91 (741), 123 (717), 41 (600), 93 (590), 81 (585), 109 (559), 105 (533), 79 (492), 119 (447)	N. I.
	4,401	10,96	44 (999), 91 (993), 159 (931), 105 (747), 43 (702), 79 (696), 93 (686), 41 (674), 109 (641), 77 (573)	N. I.
	4,61	41,66	93 (999), 91 (818), 105 (642), 79 (631), 84 (567), 107 (506), 41 (481), 121 (468), 133 (466), 77 (439),	N. I.
	8,376	3,37	69 (999), 44 (852), 81 (469), 93 (404), 41 (400), 95 (225), 67 (215), 107 (214), 79 (213), 43 (190)	Farnesol
	8,648	11,13	93 (999), 81 (971), 44 (872), 91 (866), 107 (809), 105 (783), 121 (740), 79 (723), 41 (648), 119 (647)	N. I.
	11,661	2,26	93 (999), 107 (628), 43 (565), 55 (484), 81 (472), 95 (450), 69 (414), 67 (389), 71 (367), 79 (356)	N.I.
FD-4A	11,41	100	93 (999), 43 (811), 107 (654), 81 (604), 95 (467), 67 (458), 55 (452), 41 (388), 69 (388), 79 (380)	N.I.
FD-5A	4,715	27,71	43 (999), 93 (523), 105 (395), 162 (393), 91 (389), 107 (386), 119 (375), 79 (371), 95 (357), 121 (350)	N. I.
	4,966	11,08	43 (999), 119 (624), 93 (586), 79 (573), 162 (555), 107 (547), 105 (529), 159 (514), 69 (468), 77 (462)	N. I.
	5,175	8,54	43 (999), 105 (643), 107 (598), 41 (540), 91 (518), 93 (473), 79 (469), 77 (442), 145 (440), 85 (431)	N. I.
	5,384	12,88	124 (999), 43 (188), 79 (154), 122 (104), 77 (103), 125 (102), 107 (95), 135 (92), 111 (85), 41 (82)	Meta-metoxifenol
	5,635	11,33	55 (999), 109 (890), 123 (889), 81 (802), 43 (770), 69 (730), 127 (713), 95 (704), 79 (694), 41 (688)	N. I.
	5,97	5,45	59 (999), 105 (840), 162 (779), 147 (746), 93 (593), 81 (538), 95 (510), 123 (497), 43 (486), 91 (480),	N. I.
	7,037	5,37	74 (999), 87 (684), 55 (224), 43 (215), 69 (190), 75 (186), 57 (185), 41 (152), 143 (128), 83 (106)	Ácido pentadecanoico, 14-metil-, metil ester
	12,079	17,63	81 (999), 71 (800), 43 (734), 93 (650), 69 (502), 59 (438), 107 (406), 55 (381), 67 (374), 41 (340)	9-(3,3-Dimetiloxiran-2-il)-2,7-dimetilnona-2,6-dien-1-ol

Tabela 10. (Continuação).

Fração	Tempo de retenção (min.)	% relativa	m/z (intensidade)	Identificação proposta
	5,426	7,19	55 (999), 57 (871), 97 (846), 69 (803), 83 (750), 70 (548), 43 (531), 56 (477), 41 (463), 71 (388)	N. I.
	7,037	52,93	74 (999), 87 (635), 75 (207), 43 (202), 55 (193), 143 (180), 41 (163), 57 (131), 69 (119), 227 (95)	Ácido pentadecanoico, 14-metil-, metil ester
FD-8A	9,255	17,26	67 (999), 81 (821), 55 (590), 95 (547), 68 (489), 82 (480), 41 (409), 54 (396), 96 (379), 79 (377)	Metil linoleaidato
	9,339	17,18	55 (999), 67 (708), 69 (680), 79 (674), 81 (661), 95 (580), 74 (556), 41 (536), 83 (447), 97 (393)	Z-7-Tetradecenal
	9,694	5,45	74 (999), 87 (636), 55 (316), 75 (271), 69 (194), 143 (182), 59 (170), 57 (163), 67 (141), 41 (120)	Ácido tridecanoico, metil éster

Toxicidade frente à *A. salina*.

A toxicidade frente à *A. salina* foi avaliada para as dez frações do extrato diclorometânico (FD-1A à FD-10A) nas concentrações: 500; 250; 125; 62,5 µg/mL. Os resultados da CL₅₀ (mg/L) das frações são apresentados na **Tabela 11**, de acordo com o descrito em **3.12**. Não foi possível realizar o ensaio com FD-1A, pois a fração não forneceu quantidade de material suficiente.

Tabela 11. CL₅₀ (µg/mL) das subfrações do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* frente à *Artemia salina*.

Frações	CL ₅₀ (µg/mL)	(IC 95%)*
2A	148	(123-184)
3A	>500	--
4A	101	(85-118)
5A	>500	--
6A	392	(325- 496)
7A	>500	--
8A	>500	--
9A	>500	--
10A	>500	--

O menor valor de CL₅₀ foi alcançado pela fração FD-4A (CL₅₀: 101 µg/mL, **Tabela 11**). Por essa razão, esta foi a fração selecionada para o ensaio de atividade citotóxica com as linhagens MES-SA (ATCC CRL-1976TM) e MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977TM).

Atividade citotóxica

A atividade citotóxica do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* (FD) e da subfração FD-4A foi avaliado e o resultado é mostrado em diferentes concentrações de FD e FD-4A na **Figura 23**.

Figura 23. Atividade citotóxica do extrato diclorometânico (FD) e da subfração FD-4A de *C. pallidulus* var. *pallidulus* para diferentes linhagens de células tumorais: linhagem celular de sarcoma uterino humano (MES-SA) (A) e a sua linhagem mutante droga-dependente (MES-SA/Dx5) (B).

Na **Figura 23** observa-se um ligeiro aumento da viabilidade celular em concentrações maiores que 125 µg/mL. Isso se deve à coloração das amostras, que interferiram no resultado. Dessa maneira, esses valores foram excluídos para o cálculo da CI₅₀, mostrados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Valores de CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ do extrato diclorometânico (FD) de *C. pallidulus* var. *pallidulus* e de sua fração FD-4A.

Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)MES-SA	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) MES-SA/Dx5
FD	66,14	60,25
FD-4A	20,65	18,94

Os valores de CI_{50} da fração FD-4A foram menores que aqueles do extrato diclorometânico (FD), em ambas as linhagens. Esse fato indica que o ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi eficiente ao indicar a fração com maior potencial citotóxico. A CI_{50} foi menor para a linhagem celular resistente a doxorrubicina, tanto para FD, quanto para FD-4A.

Isolamento das substâncias majoritárias de FD-4A

Com o objetivo de isolar as substâncias com atividade citotóxica da fração FD-4A foi desenvolvido um método específico para CLAE-semipreparativo, descrito no item 3.5. As três substâncias majoritárias foram isoladas e designadas de FD-4A-1, FD-4A-2 e FD-4A-3. Na **Figura 24A** encontra-se o cromatograma da fração FD-4A com as três substâncias majoritárias em destaque. A **Figura 24B** mostra as bandas, como foram isoladas.

Figura 24. Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=230$ nm) da subfração FD-4A, separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*: (A) as três substâncias majoritárias: FD-4A-1 (TR: 14,922min.); FD-4A-2 (TR: 18,804min.); FD-4A-3 (TR: 21,910min.). (B) cromatograma mostrando, nas áreas cinzas, as bandas que foram recolhidas.

Após o isolamento, as substâncias foram analisadas por CLAE-DAD e, posteriormente, por CLAE-EM. A **Figura 25** mostra os cromatogramas das substâncias isoladas ($\lambda=230$ nm) e seus respectivos espectros de absorção, após a corrida em CLAE-DAD.

Figura 25. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=230\text{nm}$) das substâncias isoladas da subfração FD-4A (**A**, **B**, **C**) e respectivos espectros de absorção UV/vis (**D**, **E**, **F**), separadas do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*: (**A**) FD-4A-1 (TR: 17,310min.); (**B**) FD-4A-2 (TR: 20,271min.); (**C**) FD-4A-3 (TR: 23,214min.); (**D**) FD-4A-1; (**E**) FD-4A-2; (**F**) FD-4A-3.

Nota-se que os tempos de retenção (TR) das três substâncias apresentadas na **Figura 25** são diferentes daqueles TRs apresentados na **Figura 24**. Isso se deve ao fato de que a coluna utilizada no CLAE analítico foi diferente daquela utilizada no CLAE preparativo. Os cromatogramas da **Figura 25 A** e **C** mostram que o isolamento foi eficiente. Pelo cromatograma na **Figura 25 B** pode-se perceber que a substância isolada não estava pura, sendo contaminada com um pouco da substância FD-4A-1 (TR: 17,270 min.).

Os espectros de absorção UV/vis das três substâncias são muito parecidos (**Figura 25 D, E** e **F**), sendo pouco informativos. Portanto, as amostras foram analisadas por CLAE-EM. As **Figura 26**, **Figura 27** e **28** reproduzem os cromatogramas obtidos por CLAE e os espectros de massas EM e EM/EM das substâncias isoladas.

Figura 26. (A) Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=254$ nm) da substância isolada FD-4A-1 da subfração FD-4A separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. **(B)** Espectro de massas EM. **(C)** Espectro de massas EM/EM do fragmento 405 m/z.

Figura 27. (A) Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=254$ nm) da substância isolada FD-4A-2 da subfração FD-4A separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. A banda 1 é referente à substância FD-4A-1; a banda 2 é referente à substância FD-4A-2. **(B)** Espectro de massas EM da banda 2. **(C)** Espectro de massas EM/EM do fragmento 447 m/z.

Figura 28. (A) Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=254$ nm) da substância isolada FD-4A-3 da subfração FD-4A separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. A banda 2 é referente à substância FD-4A-2; a banda 3 é referente à substância FD-4A-3. (B) Espectro de massas EM da banda 3. (C) Espectro de massas EM/EM do fragmento 489 m/z.

Pode-se notar que a substância FD-4A-2, que aparece no cromatograma da **Figura 28.A**, não estava presente no cromatograma das substâncias isoladas da **Figura 25 C**. Sugere-se, portanto, que a substância FD-4A-3 com o passar do tempo se transforma na substância FD-4A-2.

Pelos cromatogramas e espectros de absorção UV/vis obtidos em CLAE-DAD, e pelos espectros de massas, verifica-se que: (a) as três substâncias apresentaram espectros de absorção UV muito semelhantes; (b) a diferença de m/z entre o pico molecular das três substâncias protonadas é de 42 u (grupo COCH₃); (c) sabe-se que a introdução de grupos acetila na molécula aumenta o tempo de retenção da substância.

YANG et al. (2009) isolaram, de *Croton kongensis*, um diterpeno conhecido como kongensina, com absorção máxima em 241 nm. Portanto, sugere-se neste trabalho que as substâncias isoladas podem ser derivadas desse diterpeno. A **Figura 29** mostra as estruturas propostas.

Figura 29. Kongensina (**1**) isolada por YANG et al. (2009) de *Croton kongensis*. Estruturas propostas para: FD-4A-1, PM: 404 u (**2**); FD-4A-2, PM: 446 u (**3**); e FD-4A-3, PM: 488 u (**4**).

Com o objetivo de se obter mais dados para a confirmação dessas estruturas, a substância FD-4A-1 foi submetida à análise por infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H). Na **Figura 30** é apresentado o espectro de IV e na **Tabela 13** a atribuição para cada banda é detalhada.

Figura 30. Espectro de Infra-vermelho da substância FD-4A-1, isolada da subfração FD-4A separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Tabela 13. Bandas do espectro de Infra-vermelho e a atribuição de cada banda para as ligações presentes na molécula da substância FD-4A-1, isolada da fração FD-4A.

Banda (cm ⁻¹)	Atribuição
3401,00	Grupo OH
2972,78; 2942,75; 2850,74	Estiramento de C-H (ligações saturadas)
1731,93	Ligação C=O de éster
1647,05	Ligação C=O conjugada com C=C
1375,12	Ligação C-O de éster
1244,34	Ligação C-O de éter
1029,49	Ligação C-O de álcool

As principais bandas de absorção no espectro de IV foram: 3401,00 cm⁻¹, que indica a presença de um grupo OH; 1731,93 cm⁻¹, que indica a presença do grupamento éster; 1647,05 cm⁻¹, que indica a presença do grupamento cetônico α,β -insaturado; e 1244,34 cm⁻¹, que indica uma ligação C-O de éter.

A **Figura 31**, apresenta o espectro de RMN ¹H e a **Tabela 14**, mostra a atribuição de cada deslocamento (ppm) para os prótons presentes na molécula. Os resultados obtidos da RMN ¹H são comparáveis àqueles obtidos para kongensina (YANG et al., 2009). Na **Figura 31** encontra-se a estrutura proposta para a substância FD-4A-1.

Figura 31. Espectro de RMN ¹H da substância FD-4A-1, isolada da subfração FD-4A, separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Figura 32. Estrutura proposta para a substância FD-4A-1, isolada da subfração FD-4A, separada do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Tabela 14. Deslocamento químico (ppm) da substância FD-4A-1, isolada da fração FD-4A, e a atribuição de deslocamento para os prótons presentes na molécula.

Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
7,46	H da dupla ligação que está no carbono 14
6.48	H da dupla ligação que está no carbono 17
5.91 (s)	Impureza (solvente)
5.68 (s)	H ligado ao carbono 9 que contém o grupo OH
5.15 – 5.11	H da dupla ligação que está no carbono 17
4.93 – 4.92	H ligado ao carbono 1, ligado ao oxigênio (grupo acetila)
4.84	Solvente (metanol deuterado)
3.57	H do carbono 7
3.53	H do grupo etoxila
3.50	Ha do carbono 13
2.76	Ha do carbono 3
2.73	Ha do carbono 6
2.64	Ha do carbono 11
2.60	Ha do carbono 12
2.28	Ha do carbono 2
2.23	Ha do carbono 3
2.11	CH ₃ do grupo metoxila
2.08	Hb do carbono 11
2.06	Hb do carbono 12
2.01	Hb do carbono 2
1.94	CH ₃ ligado ao carbono 4
1.93	CH ₃ ligado ao carbono 4
1.40	CH ₃ ligado ao carbono 10
1.18	CH ₃ ligado ao carbono 6

4.7.3. Extrato de acetato de etila

A extrato de acetato de etila teve suas frações separadas por cromatografia em coluna de polivinilpolipirrolidona (PVPP), utilizando-se o metanol como eluente. A visualização das faixas foi feita através de lâmpada UV, resultando em 14 subfrações, chamadas de: FA-1, FA-2, FA-3,...FA-14.

Todas as frações (FA-1 - FA-14) foram submetidas ao ensaio de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e aos ensaios de atividade antioxidante por DPPH, além da quantificação de fenóis totais, e flavonóis e flavonas totais.

Atividade antibacteriana

Apenas as frações FA-7 e FA-14 apresentaram atividade, com CIM = 256 mg/L e CBM = 1024mg/L. As demais frações não apresentaram atividade, pois a CBM foi superior a 2048 mg/L (concentração máxima testada). Como a substância majoritária da fração FA-14 é a quercetina (**Tabela 16 e Figura 43**) e tem atividade antibacteriana conhecida (KIM & KIM, 2006; LI & XU, 2008) não foi realizado o isolamento dessa substância.

A fração FA-7 foi selecionada para o isolamento das substâncias majoritárias, o que foi feito por CLAE semi-preparativo, de acordo com item 3.5. Foram isoladas sete substâncias, chamadas de: FA-7-1, FA-7-2,... FA-7-7. Nenhuma delas, entretanto, apresentou atividade antibacteriana com a concentração máxima testada, que foi de 256 mg/L; a CBM deveria ser, portanto, maior que 256 mg/L. Depois de recolhidas as substâncias majoritárias, as demais substâncias foram todas reunidas e o conjunto foi chamado de FA-R. Essa fração também foi testada, mas também não apresentou atividade, pois a CBM foi maior que 2048 mg/L (concentração máxima testada).

Na **Figura 33** é apresentado um esquema do fracionamento e isolamento da fração de acetato de etila com os valores de CIM e CBM.

Figura 33. Esquema da obtenção das frações do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* por cromatografia em coluna de PVPP e seus isolamentos por CLAE semi-preparativo. São apresentados também os valores de CBM e CIM para os testes microbiológicos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Frações e respectivos valores de CBM são representados pela mesma cor. O asterisco indica a CIM da FA-7 e FA-14, que neste caso foram diferentes da CBM.

Atividade antioxidante. Teores de fenóis totais. Teores de flavonóis e flavonas totais.

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando-se a curva padrão de quercetina apresentada na **Figura 16**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa da fração (gEq/100 g). Foram avaliadas as 14 frações quanto à atividade antioxidante, sendo que a FA-11 ($32,83 \pm 2,13$ gEq/100 g), foi a que resultou numa maior atividade, sendo também significativamente diferente (**Figura 34**). A atividade antioxidante da fração FA-11 ficou próxima ao triplo da atividade do extrato de acetato de etila ($12,11 \pm 0,76$ gEq/100 g, **Tabela 3**, pg. 27). A fração de menor atividade antioxidante foi a FA-2 com $0,36 \pm 0,13$ gEq/100 g.

Figura 34. Valores da atividade antioxidante das frações FA-1 – FA-14 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre valores de um mesmo ensaio (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Assim como para o extrato de acetato de etila, os fenóis totais, e flavonóis e flavonas totais foram quantificados, a fim de compará-los com a atividade antioxidante.

Os fenóis totais foram quantificados utilizando-se a curva padrão de ácido gálico apresentada na **Figura 17**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa da fração ($\text{gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$). Foram avaliadas as 14 frações e a FA-11 ($33,27 \pm 0,39 \text{ gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$) foi a que apresentou maior quantidade de fenóis totais, seguida pela FA-12 ($32,07 \pm 0,16 \text{ gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$) (**Figura 35**). FA-11 e FA-12 foram significativamente diferentes das demais frações. A quantidade de fenóis totais das frações FA-11 e FA-12 foi aproximadamente três vezes maior, quando comparada com a do extrato de acetato de etila ($14,52 \pm 0,59 \text{ gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$, **Tabela 3**, pg. 28). A fração com menor quantidade de fenóis totais foi a FA-1 com $0,65 \pm 0,03 \text{ gE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$.

Figura 35. Valores de fenóis totais das frações do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre valores de um mesmo ensaio (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0,05$).

Flavonóis e flavonas totais foram quantificados utilizando-se a curva padrão de quercetina apresentada na **Figura 18**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa da fração ($\text{gE}_{\text{Q}}/100 \text{ g}$). Foram avaliadas as 14 frações, e a FA-11 foi a fração que apresentou maior quantidade de flavonóis e flavonas ($20,56 \pm 0,84 \text{ gE}_{\text{Q}}/100 \text{ g}$) (**Figura 36**), sendo significativamente diferente das demais frações. A quantidade de flavonóis e flavonas totais da fração FA-11 foi cerca de quatro vezes maior, quando comparada ao extrato da fração de acetato de etila ($5,18 \pm 0,64 \text{ gE}_{\text{Q}}/100 \text{ g}$, **Tabela 5**, pg. 29). A fração FA-2 não apresentou quantidades detectáveis de flavonas e flavonóis.

Figura 36. Valores de flavonóis e flavonas das frações do extrato da fração de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre valores de um mesmo ensaio (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Para comparar a atividade antioxidante com os valores de fenóis totais e de flavonóis e flavonas totais, foi feita uma análise de agrupamento hierárquico, visualizada no dendrograma agrupado por ligação simples (*single linkage*) com medida de distâncias por correlação de Pearson (1-r) (**Figura 37**). Verifica-se que os valores da atividade anitoxidante das frações de acetato de etila estão mais próximos dos valores dos flavonóis e flavonas totais que dos fenóis totais.

Figura 37. Dendrograma do agrupamento hierárquico gerado a partir dos valores de fenóis totais, flavonóis e flavonas totais e atividade antioxidante das frações FA-1 - FA-14 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Identificação de flavonoides

O cromatograma obtido por CLAE-DAD para o isolamento das substâncias majoritárias de FA-7 é mostrado na **Figura 38**. O método desenvolvido para esse isolamento foi descrito no item **3.5**.

Figura 38. Cromatograma obtido por CLAE-DAD ($\lambda=280$) mostrando as sete bandas correspondentes às substâncias isoladas da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. (1) FA-7-1; (2) FA-7-2; (3) FA-7-3; (5) FA-7-4; (6) FA-7-5; (6) FA-7-6; (7) FA-7-8.

Pelos espectros UV/vis verifica-se que seis das sete substâncias isoladas são flavonoides (FA-7-1; FA-7-3; FA-7-4; FA-7-5; FA-7-6; FA-7-7) (**Figura 39**).

Figura 39. Espectro de absorção UV/vis dos flavonoides isolados da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Para a identificação das agliconas dos flavonoides foi feita uma hidrólise ácida, seguida de extração líquido/líquido, para separar a aglicona dos açúcares. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD, pelo método descrito no item **3.6**. Foi possível visualizar apenas as agliconas dos flavonoides FA-7-5, FA-7-6 e FA-7-7. Os flavonoides FA-7-1, FA-7-3 e FA-7-4 não foram

hidrolisados, portanto são C-glicosídeos. Foi feita também uma CCD de celulose das substâncias antes e depois da hidrólise, com fase móvel de ácido acético 15%, e verificou-se que as duas bandas ficavam praticamente na mesma altura, corroborando, portanto, a sugestão acima. Pelo espectro de absorção UV/vis apresentado na **Figura 39**, sugere-se que sejam derivados de apigenina.

Os tempos de retenção e os espectros de UV/vis das agliconas, que foram isoladas após a hidrólise, foram comparados com os padrões de campferol e isoramnetina. A aglicona da subfração FA-7-5 mostrou ser a do campferol (**Figura 40 B, C e D**), enquanto às dos flavonoides FA-7-6 e FA-7-7 (**Figura 41**), coincidiram com o tempo de retenção da isoramnetina.

Figura 40. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=352\text{nm}$) (**A, B, C**) e espectros de absorção UV/vis (**D**) das subfrações da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. (**A**) Flavonoide FA-7-5 (TR: 17,187min.) isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila. (**B**) Aglicona do flavonoide FA-7-5 (TR: 44,091min.). (**C**) Padrão de campferol (TR: 44,074min.). (**D**) Sobreposição dos espectros de absorção UV/vis da aglicona de FA-7-5 e do padrão de campferol.

Figura 41. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=352\text{nm}$) das subfrações da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* (A, B, C, D), do padrão de isoramnetina (E) e seu espectro de absorção UV/vis (F). (A) Cromatograma do flavonoide FA-7-6 (TR: 24,013min.). (B) Cromatograma da aglicona do flavonoide FA-7-6 (TR: 44,591min.). (C) Cromatograma do flavonoide FA-7-7 (TR: 24,907min.). (D) Cromatograma da aglicona do flavonoide FA-7-7 (TR: 44,569min.). (E) Cromatograma do padrão de isoramnetina (TR: 44,554min.). (F) Sobreposição dos espectros de absorção UV/vis das agliconas de FA-7-6 e FA-7-7 e do padrão de isoramnetina.

Da fase aquosa da hidrólise ácida foi possível recuperar os açúcares ligados aos flavonoides. Dessa maneira, foi possível identificá-los por cromatografia em camada delgada utilizando placa de celulose. A cromatografia foi desenvolvida como indicado em 3.7. Observando-se a **Figura 42**, pode-se sugerir que os açúcares presentes nos flavonoides isolados são: FA-7-5: glicose; FA-7-6: galactose; FA-7-7: glicose e ramnose.

Figura 42. Cromatograma da porção aquosa da hidrólise ácida das subfrações FA-7-5, FA-7-6 e FA-7-7 da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Foi utilizada placa de celulose com amostras autênticas de açúcares. GAL=galactose; GLI=glicose; ARA=arabinose; XIL=xilose; RAM=ramnose; GLU=ácido glucurônico.

A fim de se obter maiores informações quanto a estrutura dos flavonoides foram realizadas reações de deslocamento. Os resultados são apresentados no Anexo I. Não foi realizada reações de deslocamento para o flavonoide FA-7-4, pois estava contaminado com FA-7-3. A partir dos resultados de deslocamento pode-se concluir que:

- FA-7-1 contém: 4'-OH e 7-OH; não contém grupos álcali-sensíveis.
- FA-7-3 não contém: 7-OH e grupos álcali-sensíveis.
- FA-7-5 contém: 4'-OH e 7-OH; não contém grupos álcali-sensíveis.
- FA-7-6: contém: 4'-OH e 7-OH; não contém grupos álcali-sensíveis.
- FA-7-7: contém: 4'-OH e 7-OH; não contém grupos álcali-sensíveis.

A **Tabela 15** mostra as informações de todos os flavonoides isolados, inclusive dados da espectrometria de massas. Não foi possível obter o espectro de massas dos flavonoides FA-7-6 e FA-7-7, pois estes apresentaram tempos de retenção muito próximos.

Tabela 15. Flavonoides isolados da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Flavonoi de isolado	TR (min.) *	Bandas (nm) †	Cor UV/ UV+NH ₃	RF HOAc 15%	m/z (%)	Caracterização
FA-7-1	14,960	272, 337	Púrpura/ amarela	0,575	595 (100), 577, 559, 541, 523, 511, 499, 481, 457, 426, 409, 379,	C-glicosídeo de apigenina
FA-7-3	16,019	273, 330	Púrpura/ amarela	0,575	609 (100)	C-glicosídeo de apigenina
FA-7-4	16,182	272, 334	Púrpura/ amarela	0,5	565 (100), 547, 529, 511, 499, 481, 457, 427, 408	C-glicosídeo de apigenina
FA-7-5	17,188	267, 297 (om), 344	Púrpura/ amarela	-	764 (100), 735, 617, 477, 330	Campferol glucosídeo
FA-7-6	24,013	255, 266 (om), 357	Púrpura/ amarela	0,650	-	Isoramnetina galactosídeo
FA-7-7	24,907	255, 266 (om), 357	Púrpura/ amarela	0,625	-	Isoramnetina rutinosídeo (glicose, ramnose)

* Tempo de retenção (TR) em CLAE utilizando o método descrito no item 3.6. † bandas relativas aos espectros de absorção UV/vis em MeOH, exceto para FA-7-4, cujas bandas foram verificadas a partir de espectro de absorção obtido após cromatografia em CLAE-DAD.

Análise de flavonoides

Os flavonoides presentes no extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* e nas suas frações, foram analisados por CLAE-DAD (método descrito em 3.6) e seus TRs e espectros de absorção em UV/vis foram comparados aos de amostras autênticas de flavonoides. O resultado dessa análise é apresentado na **Tabela 16**. Para aquelas substâncias, das quais não se dispunha de amostras autênticas, foram feitas sugestões de identificação levando-se em conta os espectros de absorção em UV-vis. A **Figura 43** apresenta os cromatogramas do extrato de acetato de etila e de suas frações; os números que representam as bandas, nos cromatogramas, correspondem aos principais flavonoides presentes naquela fração, e que são nomeados na **Tabela 16**. Observa-se que no cromatograma do extrato são representados apenas dez dos 26 flavonoides; estes correspondem aos que apresentaram maiores abundâncias. Os outros, por estarem numa abundância muito baixa, só foram visíveis após o fracionamento do extrato.

Tabela 16. Flavonoides presentes nas frações de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* e sugestão de identificação. As substâncias em **negrito** foram confirmadas por amostras autênticas. Os números apresentados aqui são apontados nos cromatogramas na **Figura 43**.

	TR (min.)	Bandas (nm)	Sugestão de identificação
1	14,960	270, 336	C-glicosídeo de apigenina (FA-7-1)
2	16,019	272, 336	C-glicosídeo de apigenina (FA-7-3)
3	16,033	256, 266 (om), 300 (om), 354	Derivado de quercetina
4	16,182	272, 334	C-glicosídeo de apigenina (FA-7-4)
5	17,188	264, 294 (om), 348	Campferol glicosídeo (FA-7-5)
6	18,237	256, 266 (om), 300 (om), 356	Derivado de quercetina
7	18,984	256, 266 (om), 300 (om), 356	Rutina
8	19,875	270, 338	Vitexina
9	20,673	256, 266 (om), 300 (om), 356	Quercetina 3-o-galactosídeo
10	21,250	256, 266 (om), 300 (om), 354	Derivado de quercetina
11	21,719	264, 298 (om), 348	Derivado de campferol
12	23,592	266, 296 (om), 352	Derivado de campferol
13	24,281	256, 266 (om), 296 (om), 354	Isoramnetina galactosídeo (FA-7-6)
14	24,911	256, 266 (om), 296 (om), 354	Isoramnetina rutinosídeo (FA-7-7)
15	24,976	264, 296 (om), 348	Derivado de campferol
16	27,260	264, 296 (om), 348	campferol-3-o-galactosídeo
17	28,093	256, 264 (om), 302 (om), 350	quercitrina
18	37,853	264, 292 (om), 342	Derivado de campferol
19	38,416	254, 266 (om), 298 (om), 348	Derivado de quercetina
20	38,805	256, 266(om), 300 (om), 354	Derivado de quercetina
21	40,153	256, 266 (om), 296 (om), 354	Derivado de quercetina
22	40,459	266, 298 (om), 314, 356 (om)	Coumaroil glicosídeo de campferol
23	40,587	266, 298 (om), 314, 356 (om)	Tilirosídeo
24	40,861	266, 298 (om), 314, 352 (om)	Coumaroil glicosídeo de campferol
25	41,017	256, 266 (om), 300 (om), 372	Quercetina
26	44,128	256, 298 (om), 322 (om), 366	Campferol

Figura 43. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=352\text{nm}$) do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* e das suas frações após cromatografia em coluna de PVPP. Os números mostram os flavonoides descritos na Tabela 16. Os cromatogramas das frações FA-1, FA-2, FA-4 e FA-5, não foram apresentados, pois essas frações não mostraram bandas significativas de flavonoides. Números em vermelho correspondem aos flavonoides identificados por comparação com amostras autênticas.

Figura 43 (Continuação)

4.7.4. Extrato metanólico

O extrato metanólico teve suas frações separadas também por cromatografia em coluna de polivinilpolipirrolidona (PVPP), utilizando-se o metanol como eluente. A visualização das faixas foi feita por meio de lâmpada UV, resultando em nove frações, chamadas de: FM-1, FM-2,...FM-9.

Assim como a fração de acetato de etila, as nove frações (FM-1 - FM-9) foram submetidas ao ensaio de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e aos ensaios de atividade antioxidante por DPPH, além da quantificação de fenóis totais, e flavonóis e flavonas totais.

Atividade antibacteriana

Apenas as frações FM-4 e FM-7 apresentaram atividade antibacteriana com CBM de 2048 mg/L. As demais frações não apresentaram atividade, pois o CBM foi superior a 2048 mg/L (concentração máxima testada). Portanto, não se prosseguiu ao isolamento biomonitorado. Na **Figura 44** é apresentado um esquema do fracionamento da fração metanólica, com os valores de CBM.

Figura 44. Esquema da obtenção das frações do extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* por cromatografia em coluna de PVPP com valores de CBM contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Frações e respectivos valores de CBM são representados pela mesma cor.

Atividade antioxidante. Teores de fenóis totais. Teores de flavonóis e flavonastotais.

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando-se a curva padrão de quercetina apresentada na **Figura 16**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa da fração (gE_Q/100 g). Foram avaliadas as nove frações quanto às suas atividades antioxidantes, sendo que a FM-7 ($20,36 \pm 0,48$ gE_Q/100 g) foi significativamente diferente das demais (**Figura 45**). A atividade antioxidante da fração FM-7 foi quase duas vezes maior que aquela do extrato metanólico que lhe deu origem ($11,77 \pm 0,95$ gE_Q/100 g; **Tabela 3**, pg. 27). As frações FM-1 e FM-2 não apresentaram atividade antioxidante (**Figura 45**).

Figura 45. Valores da atividade antioxidante das frações do extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre valores de um mesmo ensaio (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Assim como para os extratos fracionados, os fenóis totais, e flavonóis e flavonas totais das subfrações foram quantificados, a fim de serem comparadas com suas atividades antioxidantes.

Os fenóis totais foram quantificados utilizando-se a curva padrão de ácido gálico apresentada na **Figura 17**. Os valores foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de massa da fração (gE_{AG}/100 g). Foram avaliadas as nove frações e a FM-7 ($15,59 \pm 0,65$ g E_{AG}/100 g) foi a que apresentou maior quantidade de fenóis totais (**Figura 46**), sendo significativamente diferente das demais frações. As frações que apresentaram menor quantidade de fenóis totais foram a FM-1 e FM-2 ($2,28 \pm 0,16$ g E_{AG}/100 g e $2,24 \pm 0,24$ g E_{AG}/100 g, respectivamente) (**Figura 46**).

Figura 46. Valores de fenóis totais das frações do extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre valores de um mesmo ensaio (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Flavonóis e flavonas totais foram quantificados utilizando-se a curva padrão de quercetina apresentada na **Figura 18** (pg. 29). Os valores foram expressos em gramas equivalentes de quercetina por 100 g de massa da fração (gE_Q/100 g). Foram avaliadas as nove frações, e a FM-7 ($14,96 \pm 0,44$ gE_Q/100 g) foi a fração que apresentou maior quantidade de flavonóis e flavonas

(Figura 47), sendo significativamente diferente das demais frações. A quantidade de flavonóis e flavonas totais da fração FM-7 foi mais que seis vezes maior, quando comparada ao extrato metanólico ($0,51 \pm 0,16$ g EQ/100 g). As frações FM-1, FM-2 e FM-3 não apresentaram quantidades detectáveis de flavonóis e/ou flavonas.

Figura 47. Valores de flavonóis e flavonas das frações do extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Letras diferentes representam diferenças significativas entre valores de um mesmo ensaio (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Para comparar a atividade antioxidante com os valores de fenóis totais e de flavonóis e flavonas totais, foi feita uma análise de agrupamento hierárquico, visualizada no dendrograma agrupado por ligação simples (*single linkage*) com medida de distâncias por correlação de Pearson (1-r) (**Figura 48**). Verifica-se que os valores da atividade anitoxidante das frações do extrato metanólico, assim como as frações do extrato de acetato de etila, estão mais próximos dos valores dos flavonóis e flavonas totais que dos fenóis totais.

Figura 48. Dendrograma do agrupamento hierárquico gerado a partir dos valores de fenóis totais, flavonóis e flavonas totais e atividade antioxidante das frações FA-1 - FA-14 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Análise de flavonoides

Os flavonoides presentes no extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* e nas suas frações, foram analisados por CLAE-DAD (método descrito em 3.6) e seus TR e espectros de absorção em UV/vis foram comparados aos de amostras autênticas de flavonoides. O resultado dessa análise é apresentado na **Tabela 17**. Para aquelas substâncias, das quais não se dispunha de amostras autênticas, foram feitas sugestões de identificação levando-se em conta os espectros de absorção em UV-vis. A **Figura 49** apresenta os cromatogramas do extrato metanólico e de suas frações; os números que representam as bandas, nos cromatogramas, correspondem aos principais flavonoides presentes naquela fração, e que são nomeados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Flavonoides presentes nas frações do extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus*, e sugestões de identificação. As substâncias em negrito foram confirmadas por amostras autênticas.

Os números apresentados aqui são apontados nos cromatogramas na **Figura 49**.

	TR (min.)	Bandas (nm)	Sugestão de identificação ou padrão
1	13,573	272, 332	Derivado de apigenina
2	13,763	272, 336	Derivado de apigenina
3	15,024	272, 336	Derivado de apigenina
4	15,992	256, 266 (om), 298 (om), 354	Derivado de quercetina
5	16,524	256, 266 (om), 298 (om), 352	Derivado de quercetina
6	16,62	270, 338	Derivado de apigenina
7	16,971	272, 334	Derivado de apigenina
8	17,529	256, 266 (om), 298 (om), 352	Derivado de quercetina
9	17,858	256, 266 (om), 298 (om), 354	Derivado de quercetina
10	18,964	256, 266 (om), 298 (om), 356	Rutina
11	20,71	256, 266 (om), 296 (om), 356	Derivado de quercetina
12	21,296	256, 266 (om), 298 (om), 356	Derivado de quercetina
13	23,183	256, 266 (om), 300 (om), 354	Derivado de quercetina
14	23,337	252, 264 (om), 344	NI
15	23,949	256, 266 (om), 298, 354	Derivado de quercetina
16	25,06	256, 266 (om), 298 (om), 354	Derivado de quercetina
17	28,229	256, 264 (om), 300 (om), 350	Quercitrina
18	30,18	266, 296 (om), 348	Derivado de campferol
19	30,835	256, 264 (om), 300 (om), 348	Derivado de quercetina
20	34,151	256, 266 (om), 300 (om), 356	Derivado de quercetina
21	36,245	256, 266 (om), 298 (om), 354	Derivado de quercetina
22	39,643	258, 266 (om), 298 (om), 314, 362 (om)	Coumaroil glicosídeo de quercetina
23	40,453	266, 298 (om), 314, 356 (om)	Coumaroil glicosídeo de campferol
24	40,58	266, 298 (om), 314, 356 (om)	Tilirosídeo
25	40,757	256, 266 (om), 298 (om), 314, 360 (om)	Coumaroil glicosídeo de quercetina
26	40,856	266, 298 (om), 314, 352 (om)	Coumaroil glicosídeo de campferol
27	41,013	256, 266 (om), 300 (om), 372	Quercetina
28	42,504	258, 268, 296 (om), 316, 356 (om)	Coumaroil glicosídeo de quercetina

Figura 49. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=352\text{nm}$) do extrato metanólico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* e das suas frações após cromatografia em coluna de PVPP. Os números mostram os flavonoides descritos na **Tabela 17**.

Os cromatogramas das frações FM-1 e FM-2 não foram apresentados, pois essas frações não mostraram bandas significativas de flavonoides. Números em vermelho correspondem aos flavonoides identificados por comparação com amostras autênticas.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho pretendeu isolar substâncias ativas presentes nos extratos fracionados de *C. pallidulus* var. *pallidulus* por meio de isolamento biomonitorado utilizando os ensaios de atividade antibacteriana e toxicidade frente à *A. salina*. Além de avaliar o potencial de atividade antioxidante dos extratos e das frações dos extratos com maior poder antioxidante. A seguir serão discutidos os resultados dos ensaios de atividade biológica dos extratos, das suas frações e das substâncias isoladas.

Atividade antibacteriana

Milhares de plantas são utilizadas para a prevenção e tratamento de todos os tipos de problemas de saúde, incluindo o tratamento de doenças infecciosas (ANKLI et al., 1999; TOMAZZONI et al., 2006; MAGASSOUBA et al., 2007). Apesar do grande número de substâncias antibacterianas disponível atualmente, as doenças infecciosas permanecem sendo a segunda principal causa de morte em todo o mundo (SPELLBERG et al., 2008). Isso se deve, em grande parte, aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias logo que os antibacterianos começam a ser utilizados, resultando nas suas resistências. Estes mecanismos são conhecidos como multirresistências a drogas. Cepas resistentes apareceram inicialmente em hospitais, onde os antibacterianos foram amplamente utilizados. Por exemplo, *Streptococcus pyogenes* que surgiu em hospitais militares na década de 1930, tornou-se resistente à sulfonamida (LEVY, 1982). Até agora, foram encontradas cepas multirresistentes, provenientes de hospitais e comunidades, de quase todas as bactérias patogênicas (LEVY & MARSHALL, 2004; GIEDRAITIENE et al., 2011).

Os extratos fracionados hexânico, diclorometânico e de acetato de etila de *Croton pallidulus* var. *pallidulus* apresentaram atividade bactericida contra duas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 29213 resistente à vancomicina), mostrando Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 2048 mg/L (**Tabela 2**). O extrato fracionado metanólico apresentou atividade apenas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com CBM de 2048 mg/L. Nenhum desses extratos mostraram atividade bactericida ou bacteriostática contra as bactérias gram negativas testadas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

Existem muitos casos clínicos de infecções intra-hospitalares causados por *Staphylococcus aureus* multirresistentes, com poucas alternativas terapêuticas (KUROSU et al., 2013). A atividade bactericida dos extratos de *C. pallidulus* var. *pallidulus* contra *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina indica uma potencial alternativa de tratamento, sendo necessário, entretanto, maiores estudos a respeito.

Outros estudos similares foram realizados com espécies de *Croton*: PEIXOTO et al. (2013) avaliaram os extratos hexânico e metanólico de *Croton pullei*, sendo que o extrato metanólico apresentou maior atividade bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268 (CBM: 2500 mg/L), *Escherichia coli* CCMB 261 (CBM: 5000 mg/L) e *Staphylococcus aureus* CCMB 262 (CBM: 2500 mg/L). SELOWA et al. (2010) observaram que extratos de *Croton megalobotrys* apresentaram atividades contra *Staphylococcus aureus* na Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 625 mg/L, *Pseudomonas aeruginosa* com CIM de 313 mg/L, e contra *E. coli*, com CIM de 125 mg/L. Apesar de as cepas utilizadas nestes estudos não serem as mesmas, verificamos que a atividade bactericida contra *S. aureus* dos extratos de *C. pallidulus* var. *pallidulus* pode ser comparada à atividade bactericida do extrato metanólico de *C. pullei*.

O fato dos extratos fracionados de *C. pallidulus* var. *pallidulus* terem atividade bactericida apenas contra *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva, e não ter atividade contra as bactérias gram-negativas estudadas, já foi observado antes em outros trabalhos (PRETTO et al., 2004). Segundo SCHAECHTER et al. (2002), esse fenômeno é observado para a maioria dos antimicrobianos. A explicação pela falta de atividade dos extratos fracionados de *C. pallidulus* var. *pallidulus* para bactérias Gram-negativas pode estar na estrutura da célula bacteriana. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa formada por uma dupla camada lipídica que dificulta a entrada na célula da molécula do antimicrobiano. As enzimas que podem estar presentes no espaço periplasmático, como por exemplo, beta-lactamases, proteases e nucleases, entre outras, inativam agentes antimicrobianos, sendo, portanto, outra característica das bactérias Gram-negativas (SCHAECHTER et al., 2002).

O extrato fracionado hexânico contém uma grande quantidade de triterpenos pentacíclicos do grupo dos oleananos e ursanos (57% em abundância relativa) (**Tabela 7**). Esse grupo de substâncias possui atividade antibacteriana relatada em diversos trabalhos (VIEIRA FILHO et al., 1999; KATERERE et al., 2003; FONTANAY et al., 2008). Assim sendo, essas substâncias do extrato fracionado hexânico poderiam ser, em parte, responsáveis pela atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*.

Em contrapartida, a fração do extrato hexânico com maior atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, foi a fração FH-5A (CBM = 256 mg/L, **Figura 20**), cuja substância de maior abundância é o β -sitosterol (69% de abundância relativa) (**Tabela 9**). Estudos anteriores mostram que o β -sitosterol tem atividade bactericida (JAIN et al., 2001; SULTANA et al., 2011; CHO et al., 2013), podendo ser, portanto, essa substância a responsável pela atividade bactericida da fração FH-5A. A mesma substância aparece apenas na subfração FH-5A-1B, com 47% de abundância relativa. A menor abundância relativa do β -sitosterol na subfração de FH-5A-1B

e sua ausência nas demais subfrações pode ser uma possível explicação para a menor atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CBM: 1024 mg/L, **Figura 20**) em relação à fração que as originou. Substâncias de FH-5A que não foram detectadas pelo CG-EM, e sim nas suas subfrações depois de separadas por cromatografia e coluna, deveriam estar em concentrações muito baixas em FH-5A, e provavelmente, foram concentradas nessas subfrações e dessa maneira, se tornaram visíveis após separação. Uma hipótese que não pode ser excluída é a de sinergismo entre substâncias presentes em determinado extrato. Esta suposição é reforçada por trabalhos como o de MUROI & KUBO (1993), que demonstraram o efeito sinérgico de diferentes substâncias presentes no chá verde contra *Streptococcus mutans*. Isso pode ter acontecido também com a fração FH-5A.

A substância mais abundante do extrato fracionado de diclorometano foi um derivado de elemol (23% de abundância relativa) (**Tabela 98**). O elemol é um sesquiterpeno, com atividade antimicrobiana, que foi encontrado em outras espécies de *Croton* (FRANCO et al., 2011; ROSSI et al., 2011; DE ALMEIDA et al., 2013) e em grandes quantidades, em óleos voláteis (CHA et al., 2007; MEVY et al., 2007). O derivado de elemol pode ser um dos responsáveis pela atividade bactericida do extrato diclorometânico contra *Staphylococcus aureus* (**Tabela 2**). Esse derivado de elemol não foi encontrado nas subfrações do extrato diclorometânico. Esse fato pode ser devido à volatilidade dessa substância, e talvez seja essa a explicação para que nenhuma dessas subfrações tenha apresentado atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

A atividade bactericida dos extratos fracionados de acetato de etila e de metanol contra *Staphylococcus aureus* podem ser devido à grande quantidade de substâncias fenólicas presentes em seus extratos (14,52 gE_{AG}/100 g e 11,32 gE_{AG}/100 g, respectivamente; **Tabela 4**), além de altos teores de flavonóis e flavonas presentes, principalmente na fração de acetato de etila (5,18 gE_Q/100g, **Tabela 5**). A atividade antibacteriana de flavonoides é relatada em um grande número de trabalhos (CUSHNIE & LAMB, 2005). Alguns flavonoides são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções e têm atividade contra um grande número de micro-organismos (GOULD & LISTER, 2006). Os flavonoides agem sobre as bactérias, inibindo a síntese de seus ácidos nucleicos, alterando suas membranas citoplasmáticas e inibindo o seu metabolismo energético. (CUSHNIE & LAMB, 2005).

As frações FA-7 e FA-14 do extrato de acetato de etila foram aquelas com maior atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CBM: 1024 mg/L, **Figura 33**). Ambas as frações apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 256 mg/L (**Figura 33**). A fração FA-7 contém derivados de apigenina e de isoramnetina, enquanto a fração FA-14 contém quercetina. As substâncias majoritárias da fração FA-7 foram isoladas, mas nenhuma delas apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na concentração máxima testada de 256

mg/L (**Figura 33**). RIGANO et al. (2007) isolaram dois derivados de isoramnetina de *Marrubium globosum*; um deles, a isoramnetina 3-O- β -D-glucosídeo apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 13709 (CIM: 32 mg/L), enquanto o outro, isoramnetina-3-O- β -D-rutinosídeo, não apresentou atividade; o extrato bruto de *Marrubium globosum* teve uma atividade antibacteriana ainda maior, com CIM = 16 mg/L. Esse fato pode ser explicado pelo sinergismo entre os flavonoides, relatado por ARIMA et al. (2002). Esses autores mostraram que embora a rutina não apresentasse atividade antibacteriana, essa substância, quando presente, aumentava a atividade antibacteriana da quercetina e da quercitrina. A fração FA-7 do extrato de acetato de etila não apresentou atividade antibacteriana na quantidade máxima testada (2048 mg/L). Depois de recolhidas as substâncias majoritárias da fração FA-7, as demais substâncias foram todas reunidas e o conjunto foi chamado de FA-R. Essa mistura também foi testada em relação a sua atividade antibacteriana, apresentando um CBM maior que 2048 mg/L. Este fato exclui a hipótese de que a substância com atividade antibacteriana seria uma substância minoritária não isolada. Portanto, é mais provável que as substâncias presentes em FA-7 estivessem agindo em sinergismo.

Surpreendentemente, nenhuma das frações do extrato metanólico apresentou maior atividade antibacteriana que o próprio extrato, sendo as frações FM-4 e FM-8 as únicas que apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, com CBM de 2048 mg/L (**Figura 44**), mesma CBM do extrato metanólico (**Tabela 2**).

Atividade citotóxica

Neste trabalho foi utilizado o ensaio de avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*, a fim de monitorar o fracionamento dos extratos de *Croton pallidulus* var. *pallidulus*, com o objetivo de selecionar frações com maior atividade citotóxica. Estas seriam então submetidas ao ensaio de atividade citotóxica *in vitro*, utilizando as linhagens celulares de sarcoma uterino humano: MES-SA (ATCC CRL-1976TM) e sua respectiva linhagem mutante droga-dependente, MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977TM).

O ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi utilizado por vários autores com a mesma finalidade (ALVES et al., 2000; KIVÇAK et al., 2002; MOREIRA et al., 2003; KRISHNARAJU et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2008), pois é um ensaio rápido, barato e simples, em oposição aos ensaios de atividade citotóxica com células, que são mais caros e mais trabalhosos.

Os extratos fracionados hexânico, diclorometânico, de acetato de etila e metanólico tiveram sua toxicidade avaliada frente à *A. salina* pelo método modificado de SOLIS et al. (1993). Dos quatro extratos, apenas o extrato de diclorometano foi ativo, com CL₅₀: 385 mg/L (**Tabela 6**). O **Quadro 1** mostra a CL₅₀ de extratos de várias espécies de *Croton*, cuja toxicidade foram avaliadas

frente à *A. salina*. Os valores da CL_{50} vão desde 0,15 mg/L para o extrato etanólico de caules de *C. rhamnifolius*, até 562 mg/L para o extrato etanólico de folhas do *C. zenhtneri*. Sendo assim, o valor da CL_{50} do extrato diclorometânico de *C. pallidulus* var. *pallidulus* se encontra dentro da faixa de toxicidade encontrada para outras espécies de *Croton*, comparável, por exemplo, ao extrato hexânico de folhas de *C. micans* ($CL_{50} = 333,71$ mg/L; RAMOS et al., 2009).

Quadro 1. Toxicidade frente à *Artemia salina* de extratos de espécies de *Croton*.

Espécie	Extrato	CL_{50} (mg/L)	Referência
<i>Croton zenhtneri</i>	Etanólico de folhas	562	(DA COSTA et al., 2010)
<i>Croton sellowii</i>	Hexânico de folhas	>250	(RAMOS et al., 2009)
	Etanólico de folhas	32,28	
	Hexânico de caules	31,25	
	Etanólico de caules	53,84	
<i>Croton rhamnifolius</i>	Hexânico de folhas	215,47	(RAMOS et al., 2009)
	Etanólico de folhas	>250	
	Hexânico de caules	148,32	
	Etanólico de caules	0,15	
<i>Croton jacobinensis</i>	Hexânico de folhas	>250	(RAMOS et al., 2009)
	Etanólico de folhas	>250	
	Hexânico de caules	322,97	
	Etanólico de caules	6,37	
<i>Croton micans</i>	Hexânico de folhas	333,71	(RAMOS et al., 2009)
	Etanólico de folhas	203,78	
	Hexânico de caules	238,27	
	Etanólico de caules	>250	
<i>Croton floribundus</i>	Hexânico de folhas	481,5	(MEDINA et al., 2009)
	Etanólico de folhas	230,7	
	Metanólico de casca	237,7	
<i>Croton cajucara</i>	Metanólico de folhas	26,1	(QUIGNARD et al., 2004)
	Metanólico de caule	4,2	

A fração FD-4A do extrato diclorometânico foi a mais ativa desse extrato, com $CL_{50} = 101$ mg/L (**Tabela 11**), cerca de 3,8 vezes mais ativa que o extrato diclorometânico ($CL_{50} = 385$ mg/L; **Tabela 6**). FD-4A, portanto, foi selecionada para o ensaio de atividade citotóxica com as linhagens celulares de sarcoma uterino MES-SA (ATCC CRL-1976TM) e sua linhagem mutante droga-dependente MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977TM). No ensaio de citotoxicidade, a fração FD-4A foi 3,2 vezes mais ativa que o extrato diclorometânico (FD) para ambas as linhagens (**Tabela 12; Figura 23**). Enquanto para a linhagem MES-SA, a CI_{50} do extrato diclorometânico foi de 66,14 µg/mL, a CI_{50} da fração FD-4A foi de 20,65 µg/mL. Do mesmo modo, para a linhagem MES-SA/Dx5, a CI_{50} do extrato diclorometânico foi de 60,25 µg/mL, enquanto a CI_{50} da fração FD-4A foi de 18,94 µg/mL. A CI_{50} da doxorubicina (potente fármaco anti-câncer) é de 0,03 µg/mL para a linhagem MES-SA, e de 2,4 µg/mL, para MES-SA/Dx5 (STEIN et al., 2011). Isso significa que a subfração

FD-4A é 630 vezes menos potente contra a linhagem MES-SA que a doxorubicina. Entretanto, os valores da CI_{50} de FD-4A para MES-SA/Dx5 foi aproximadamente oito vezes menor que a CI_{50} da doxorubicina, havendo uma diminuição significativa daquele valor em relação a CI_{50} do extrato diclorometânico (cerca de 27 vezes menos potente que a doxorubicina). Esses valores demonstram que o ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* foi eficiente na indicação da fração com maior potencial de atividade citotóxica.

Para o isolamento das substâncias majoritárias foi desenvolvido o método descrito em 3.5, que se mostrou eficiente, uma vez que possibilitou uma boa separação das substâncias majoritárias presentes nessa fração (**Figura 24**). As frações foram coletadas e foram analisados seus espectros de absorção UV/vis (**Figura 25**) e de EM/EM (**Figura 26, Figura 27 e 28**). A partir desses dados, foram propostas as estruturas apresentadas na **Figura 29**, ou seja, diterpenos derivados da kongensina F, cuja molécula foi inicialmente isolada de *C. kongensis* por YANG et al. (2009). A fim de confirmar a estrutura das moléculas, foi analisado o espectro de IV (**Figura 30 e Tabela 13**) e de RMN 1H (**Figura 31 e Tabela 14**) da substância FD-4A-1, uma vez que, pelo cromatograma obtido por CLAE, esta era a mais pura (**Figura 25**). Verificou-se pelos espectros de IV e de RMN 1H que as bandas obtidas eram compatíveis com a estrutura proposta.

A kongensina F é um diterpeno 1-oxigenado *ent*-8,9-secocaurano. FUJITA & NODE (1984) foram os primeiros a relatar 8,9-secocauranos em *Rabdosia* ssp. (Lamiaceae). Após esse trabalho, substâncias dessa classe foram isoladas da hepática *Lepidolaena taylorii* (Lepidolaenaceae) e tiveram avaliadas as suas atividades citotóxicas (PERRY et al., 1996; PERRY et al., 1999). Os 8,9-secocauranos isolados por PERRY et al. (1999) apresentaram atividade citotóxica contra 60 linhagens de células tumorais humanas. Os autores verificaram que os 8,9-secocauranos eram os principais agentes citotóxicos em *L. taylorii*. No artigo foi apresentado também o mecanismo de ação dessas substâncias. Elas agem como aceptores de Michael para nucleófilos biológicos. Essa afirmação foi suportada pela fácil adição de um tiol na dupla ligação entre C16 - C17 (ver estrutura na **Figura 32**). A interação entre substâncias orgânicas reativas e macromoléculas frequentemente envolvem ligação covalente em sítios nucleofílicos celulares, suscetíveis ao ataque por um substrato eletrofílico, através da reação de Michael (COLES, 1984). A reação de Michael é a adição de um nucleófilo a um grupo carbonila α,β -insaturado (LITTLE et al., 2004). AHN (1996) afirmou que a ligação covalente é uma das mais importantes estratégias no desenvolvimento de novas drogas antitumorais. A presença do grupo carbonila α,β -insaturado (C16-C17 - **Figura 32**) na substância FD-4A-1 leva-nos a sugerir que essa substância possa ser a responsável pela atividade citotóxica da fração FD-4A, com o mesmo mecanismo de ação dos 8,9-secocauranos relatados por PERRY et al. (1999). Em uma busca minuciosa na literatura não foram encontrados relatos da substância FD-4A-1.

Por isso, pode-se sugerir que FD-4A-1 seja um novo 1-oxigenado *ent*-8,9-secocaurano. Apesar disso, mais análises serão necessárias para a confirmação de sua estrutura.

Em *Croton*, os 8,9-secocauranos foram primeiramente relatados no artigo de THONGTAN et al. (2003) e, até o momento, só haviam sido detectados em *Croton kongensis* (THONGTAN et al., 2003; CHEN et al., 2006, 2007; YANG et al., 2009).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de acetato de etila ($12,11 \pm 0,76$ gEQ/100g) e de metanol ($11,77 \pm 0,95$ gEQ/100g) foram significativamente maiores que a atividade dos extratos hexânico ($0,02 \pm 0,01$ gEQ/100g) e diclorometânico ($2,61 \pm 0,06$ gEQ/100g) (**Tabela 3**). Resultado esperado, uma vez que os teores de fenóis totais nestes últimos extratos foram muito menores ($0,84 \pm 0,05$ g E_{AG}/100 g, para o extrato hexânico e $6,00 \pm 0,48$ gE_{AG}/100 g para o diclorometânico) do que os de acetato de etila e de metanol ($14,52 \pm 0,59$ gE_{AG}/100 g e $11,32 \pm 0,47$ gE_{AG}/100 g, respectivamente) (**Tabela 4**). Deve-se levar em conta também que os teores de flavonóis e flavonas foram menores no extrato hexânico ($0,79 \pm 0,06$ gEQ/100 g) e de diclorometânico ($1,64 \pm 0,11$ gEQ/100 g), embora este último não variou significativamente do extrato metanólico ($2,51 \pm 0,16$ gE_{AG}/100g) (**Tabela 5**).

O teor de fenóis totais é maior no extrato de acetato de etila do que nos demais extratos (**Tabela 4**). Entretanto, quando se leva em conta a quantidade de fenóis presentes nos extratos, relativamente à massa seca da amostra, verifica-se que a quantidade de fenóis totais do extrato metanólico foi maior que a dos demais ($1,15 \pm 0,05$ g E_{AG}/100g MS, **Tabela 4**). É fácil perceber o porquê dessa conclusão, quando se verifica os valores de rendimento de cada extrato (**Tabela 1**); o rendimento do extrato metanólico (10,12%) foi aproximadamente duas vezes maior do que o do extrato de acetato de etila (4,61%), que em termos de concentração, continha maior quantidade de fenóis ($14,52 \pm 0,59$ g E_{AG}/100g, **Tabela 4**). Essa comparação é válida ao verificar a eficiência da extração de fenóis, ou seja, o metanol extraiu mais fenóis em termos absolutos ($1,15 \pm 0,05$ g E_{AG}/100g MS) em relação ao acetato de etila ($0,67 \pm 0,03$ g E_{AG}/100g MS) (**Tabela 4**). A quantidade de fenóis na massa seca de *C. pallidulus* var. *pallidulus* foi de $1,95 \pm 0,05$ g E_{AG}/100g MS.

Quando se leva em conta a quantidade de flavonóis e flavonas presentes nos extratos, relativamente à massa seca da amostra, verifica-se que os teores nos extratos de acetato de etila ($0,24 \pm 0,03$ gEQ/100 g MS) e de metanol ($0,25 \pm 0,02$ gEQ/100 g MS) não diferiram entre si, mas foram significativamente maiores que os demais ($0,05 \pm 0,00$ gEQ/100 g MS para o extrato hexânico e $0,02 \pm 0,00$ gEQ/100 g para o extrato diclorometânico). Do mesmo modo como foi discutido para os

fenóis totais, essas diferenças se devem aos valores de rendimento de cada extrato (**Tabela 1**). Pode-se concluir que o acetato de etila e o metanol extraíram uma quantidade maior de flavonóis e flavonas em termos absolutos (**Tabela 5**). A quantidade de flavonóis e flavonas na massa seca de *C. pallidulus* var. *pallidulus* foi de $0,56 \pm 0,03$ g E_Q/100g MS.

As diferenças nos valores de fenóis totais, e flavonóis e flavonas totais entre os extratos é um reflexo da polaridade dos solventes e a ordem em que foram utilizados.

Foram encontrados no banco de dados do Web of Science, 99 trabalhos sobre a identificação de flavonoides em *Croton*. Entretanto, apenas um trabalho diz respeito a flavonoides de espécies de *Croton* da sessão *Lamprocroton* (SAVIETTO, 2011). Nele, foram estudados extratos metanólicos de *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. dichrous* e *C. splendidus*, nos quais foram encontrados derivados de apigenina, quercetina, campferol, luteolina e tilirosídeo em todas essas espécies. O trabalho aqui apresentado é o primeiro que trata de flavonoides em *C. pallidulus* var. *pallidulus*. Nos extratos dessa espécie foram encontrados 26 flavonoides nas frações do extrato de acetato de etila (**Tabela 16**) e 28 flavonoides nas frações do extrato metanólico (**Tabela 17**). Dentre esses flavonoides, a maioria é derivado de quercetina, embora tenham sido encontrados também derivados de apigenina e campferol; dentre eles, oito foram identificados pela comparação com amostras autênticas: rutina, quercitrina, tilirosídeo e quercetina, presentes nas frações de ambos os extratos. Vitexina, campferol-3-*O*-galactosídeo, quercetina-3-*O*-galactosídeo e campferol estiveram presentes somente nas frações de acetato de etila. Comparando-se os TRs e os espectros de absorção de todas as bandas de ambos os extratos e suas respectivas frações, obtidos por CLAE ($\lambda=352\text{nm}$), encontrou-se 42 estruturas diferentes e outras seis que foram comuns aos dois extratos, perfazendo um total de 48 flavonoides. A maior quantidade de flavonoides encontrada em *C. pallidulus* var. *pallidulus* provavelmente se deve ao fato de que neste trabalho os extratos foram fracionados em coluna. Desse modo, bandas com baixa abundância no extrato inicial, puderam ser visualizadas depois do fracionamento, aumentando substancialmente o número de estruturas encontradas.

Um resultado que chama a atenção é que a quantidade de fenóis totais, e de flavonóis e flavonas totais do extrato de acetato de etila foram significativamente maiores do que a do extrato metanólico (**Tabelas 4 e 5**), o que não aconteceu para a atividade antioxidante (**Tabela 3**). Pode-se ligar esse resultado ao fato de que a capacidade antioxidante dos flavonoides está relacionada à sua estrutura química. O número, a posição, e os tipos de substituições influenciam sua atividade; vários grupos hidroxila conferem à molécula substancial capacidade antioxidante, quelante e pró-oxidante (HEIM et al., 2002). Segundo HEIM et al. (2002), grupos metoxila produzem efeitos estéricos desfavoráveis; a ligação dupla e a carbonila no heterociclo aumentam a atividade antioxidante por

proporcionar um radical de flavonoide mais estável através da conjugação de elétrons. TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU (2006) verificaram que cada molécula de quercetina e de fisetina sequestravam quatro radicais, enquanto cada molécula de luteolina, taxifolina, eriodictiol, rutina, (+)-catequina, (-)-epicatequina e campferol sequestravam apenas dois radicais. Os autores verificaram ainda que a atividade antioxidante de flavonoides era bastante dependente das substituições no anel C. Outro dado interessante é que derivados de campferol apresentaram menor capacidade antioxidante que derivados de quercetina (RICE-EVANS et al., 1996).

Quanto à atividade antioxidante das frações dos extratos de acetato de etila e de metanol, verifica-se que os valores da atividade antioxidante das frações de ambos os extratos estão mais próximos dos valores dos flavonóis e flavonas totais que dos fenóis totais (**Figuras 37 e 48**), indicando que os flavonóis e flavonas, dentre as substâncias fenólicas, foram os principais contribuintes para a atividade antioxidante dos extratos.

A fração do extrato de acetato de etila que apresentou maior atividade antioxidante foi a FA-11. Como esperado, essa fração apresentou maiores valores de flavonóis e flavonas totais, sendo que, dentre os valores de fenóis totais de todas as frações, os maiores foram a FA-11 e FA-12. Com relação à composição qualitativa, os flavonoides presentes na fração FA-11 foram a quercitrina, quercetina-3-*O*-galactosídeo e dois outros derivados de quercetina não identificados.

Dentre as frações do extrato metanólico, a que apresentou maior atividade antioxidante foi a fração FM-7. Essa fração também apresentou o maior teor de flavonóis e flavonas totais, e de fenóis totais. Com relação à composição qualitativa, os flavonoides presentes na fração FM-7 foram a rutina, sete derivados de quercetina não identificados e um derivado de campferol não identificado.

Os flavonoides detectáveis de FA-11 foram apenas derivados de quercetina e FM-7 apresentou, qualitativamente, 90% de derivados de quercetina. Entretanto esse fato não permite que se tire qualquer conclusão, pois para se verificar a influência da composição qualitativa dos flavonoides na atividade antioxidante, seria necessária a quantificação de cada flavonoide, o que não foi feito. Como já citado muito se tem pesquisado sobre a maior capacidade antioxidante da quercetina e seus derivados (POLLASTRI; TATTINI, 2011).

7. CONCLUSÕES

1. Os extratos fracionados de hexano, de diclorometano e de acetato de etila apresentam atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*, cepas sensível e resistente à vancomicina, enquanto o extrato fracionado de metanol apresentou atividade apenas contra *Staphylococcus aureus* sensível. Nenhum dos extratos apresentou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*.

2. O extrato fracionado de diclorometano foi o único ativo no ensaio de toxicidade frente à *A. salina*.

3. As substâncias majoritárias na fração do extrato de diclorometano com maior atividade no ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foram identificadas como sendo diterpenos do tipo 8,9-secocauranos.

4. A estrutura da substância FD-4A-1 identificada como sendo um derivado de kongensina F não foi relatada anteriormente, portanto é um novo 8,9-secocaurano. Entretanto, serão feitas outras análises a para confirmação da estrutura.

5. O ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi eficaz ao indicar a fração com maior potencial citotóxico.

6. Os extratos de acetato de etila e de metanol apresentaram maior atividade antioxidante.

7. Os flavonoides são as substâncias fenólicas que mais influenciaram na atividade antioxidante das frações dos extratos de acetato de etila e de metanol.

8. RESUMO

Croton (Euphorbiaceae), é um gênero promissor para pesquisa de compostos bioativos, tanto pela variedade de compostos químicos encontrados, quanto pela diversidade de uso na medicina tradicional/popular. Estudos farmacológicos comprovaram atividades antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes e citotóxicas. Neste trabalho, foram obtidos extratos fracionados em Soxhlet (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) de folhas e caules de *C. pallidulus* Baill var. *pallidulus* (Baill.) L.B. Smith & S.F. Smith. Esses extratos foram avaliados quanto às atividades 1) antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo, utilizando *Staphylococcus aureus* - cepas sensível e resistente à vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*; 2) antioxidante (sequestro do radical livre DPPH); e quanto à toxicidade frente à *Artemia salina*. A fração mais ativa neste último ensaio foi selecionada para a avaliação da atividade citotóxica utilizando as células de sarcoma uterino humano. Os fenóis totais, e flavonóis e flavonas totais foram quantificados por métodos colorimétricos. O fracionamento dos extratos hexânico e diclorometânico foi feito por cromatografia em coluna de sílica, enquanto o dos extratos de acetato de etila e metanol, em coluna de PVPP. O isolamento das substâncias das frações ativas nos ensaios de atividade antibacteriana (*S. aureus* - sensível) e de toxicidade frente à *A. salina* foi realizado por CLAE semipreparativo. O teor de fenóis totais de *C. pallidulus* var. *pallidulus* foi de 1,95 g E_{AG}/100g MS e de flavonóis e flavonas totais foi de 0,56 g E_Q/100g MS. Todos os extratos apresentaram atividade contra *S. aureus* (sensível e resistente), com CBM de 2048 mg/L, exceto o extrato metanólico que apresentou atividade apenas contra *S. aureus* (sensível). Nenhum extrato apresentou atividade contra as demais cepas. As frações FH-5A - hexano (CBM de 256mg/L) e FA-7 - acetato de etila (CBM de 1024mg/L) foram as que apresentaram maior atividade antibacteriana. A fração FH-5A foi separada em coluna de sílica, e suas subfrações apresentaram atividades antibacterianas menores que a fração que lhe deu origem. Das sete substâncias majoritárias isoladas da fração FA-7, nenhuma apresentou atividade antibacteriana. Seis delas são flavonoides: três C-glicosídeos de apigenina, um O-glucosídeo de campferol, um O-galactosídeo de isoramnetina e um O-rutinosídeo de isoramnetina. Apenas o extrato diclorometânico apresentou atividade no ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, com CL₅₀ de 385mg/L. A fração com maior toxicidade foi a FD-4A, com CL₅₀ de 101mg/L. As substâncias mais abundantes nesta fração foram isoladas e identificadas como 8,9-secocauranos, derivados da kongensina F. Quanto a atividade citotóxica, a atividade de FD-4A foi três vezes maior que a atividade do extrato diclorometânico. Os extratos de acetato de etila e de metanol apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante: 12,11 e 11,77 gE_Q/100g, respectivamente. Verificou-se que os flavonoides foram as substâncias fenólicas que mais influenciaram na atividade antioxidante das frações dos extratos de acetato de etila e de metanol.

Com esses resultados verifica-se que *C. pallidulus* var. *pallidulus* possui ação antibacteriana, citotóxica e antioxidante, sendo uma potencial fonte para novos fármacos para tratamento de doenças infecciosas e câncer. Conseguiu-se também isolar três 8,9-secocauranos, derivados da kongensina F, que aparentemente não haviam ainda sido descritos.

9. ABSTRACT

Croton (Euphorbiaceae), is a promising genre for investigation of bioactive compounds, both for the variety of compounds, as for the diversity of use in traditional medicine. Pharmacological studies have demonstrated antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, cytotoxic, and antioxidant activities. In this study, fractionated extracts of leaves and stems of *C. pallidulus* Baill var. *pallidulus* (Baill.) L.B. S.F. Smith & Smith were obtained through Soxhlet (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol). The following activities of these extracts were tested: 1) antibacterial activity, through microbroth dilution assay using: *Staphylococcus aureus* - sensitive and vancomycin-resistant strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis*; 2) antioxidant activity (free radical DPPH scavenging) and *Artemia salina* toxicity evaluation. The most active fraction in the latter test was selected to evaluate the cytotoxic activity using human uterine sarcoma cells. The total phenols, and total flavonols and flavones were quantified by colorimetric methods. The fractionation of hexane and dichloromethane extracts was done through silica column chromatography, while PVPP column was used for the ethyl acetate and methanol extracts. The isolation of the active fractions major compounds in the antibacterial activity (*S. aureus* - sensitive) and *A. salina* toxicity assays were performed by semipreparative HPLC. The total phenolic content of *C. pallidulus* var. *pallidulus* was 1.95 g GAE/100g DM and total flavonols and flavones was 0.56 g QE/100g MS. All extracts showed activity against *S. aureus* (sensitive and resistant), with MBC of 2048 mg/L, except for the methanol extract, which showed activity only against *S. aureus* (sensitive). Extracts showed no activity against the other strains. Fractions FH-5A-hexane (MBC: 256mg/L) and FA-7-ethyl acetate (MBC: 1024mg/L) showed the highest antibacterial activity. The fraction FH-5A was separated on a silica column, and its subfractions showed smaller antibacterial activity than FH-5A. The seven major compounds isolated from the FA-7 fraction, showed no antibacterial activity. Six of them are flavonoids, three apigenin C-glycosides, one kaempferol O-glucoside, one isorhamnetin O-galactoside and one isorhamnetin O-rutinoside. Only the dichloromethane extract showed activity in the *A. salina* toxicity assay, LC₅₀: 385mg/L. The fraction with the highest toxicity was the FD-4A, LC₅₀: 101mg/L. The most abundant substances in this fraction were isolated and identified as 8,9 - secokauranes derived from kongensin F. As for the cytotoxic activity, the FD-4A activity was three times higher than the dichloromethane extract activity. The extracts of ethyl acetate and methanol showed the highest antioxidant activity: 12.11 and 11.77 gQE/100g, respectively. It was observed that flavonoids were the phenolic substances that most influenced the antioxidant activity of the fractions of the ethyl acetate and methanol extracts. With these results we suggest that *C. pallidulus* var. *pallidulus* has antibacterial activity, cytotoxic and antioxidant properties, being a potential source of new drugs for treatment of infectious diseases

and cancer. We also isolated three 8,9-secokauranes derived from kongensin F, which apparently had not been described yet.

.

10. REFERÊNCIAS

- _____. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_N_5813.pdf
- ADEROGBA, M. A.; MCGAW, L. J.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M. Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. **Natural Product Research**, v. 25, n. 13, p. 1224–1233, 2011.
- AHN, B.-Z. Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. **Current Pharmaceutical design**, v. 2, p. 247–262, 1996.
- ALVES, T. M. D. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. DE F. A.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367–373, 2000.
- ANKLI, A.; STICHER, O.; HEINRICH, M. Medical Ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers' Consensus as a Quantitative Criterion. **Economic Botany**, v. 53, n. 2, p. 144–160, 1999.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105–121, 2009.
- ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1009–1014, maio 2002.
- BACH, N.; THUNG, S. N.; SCHAFFNER, F. Comfrey herb tea-induced hepatic veno-occlusive disease. **The American journal of medicine**, v. 87, n. 1, p. 97–9, jul. 1989.
- BARATA, L. Empirismo e ciencia: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 57, n. 4, p. 2–5, 2005.
- BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; DE FREITAS, J. V. B.; PINTO, F. DAS C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; CARNEIRO TORRES, D. S. Flavonoids and Terpenos from *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 675–679, 2013.
- BATES, D. M. Plant Utilization : Patterns and Prospects. **Economic Botany**, v. 39, n. 3, p. 241–265, 1985.
- BRASIL, D. S. B.; GUILHON, G. M. S. P.; PERIS, G.; LLUSAR, R.; MOLINER, V. Isolation, X-ray Crystal Structure and Theoretical Calculations of the New Compound 8-Epicordatin and Identification of others Terpenes and Steroids from the Bark and Leaves of. **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 21, n. 4, p. 731–739, 2010.
- BRIELMANN, H. L.; SETZER, W. N.; KAUFMAN, P. B.; KIRAKOSYAN, A.; CSEKE, L. J. Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. In: CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. (Eds.). **Natural Products from Plants**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. p. 1–49.

BROCKINGTON, S. F.; WALKER, R. H.; GLOVER, B. J.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. **New Phytologist**, v. 190, p. 854–864, 2011.

BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation - how to get from biological material to pure compounds. **Natural product reports**, v. 30, n. 4, p. 525–45, abr. 2013.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, n. 4, p. 3688–3699, 1963.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179–189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 22 ago. 2005.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion on Emergin Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261–279, 2001.

CHA, J.-D.; JEONG, M.-R.; JEONG, S.-I.; MOON, S.-E.; KIL, B.-S.; YUN, S.-I.; LEE, K.-Y.; SONG, Y.-H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 3, p. 295–299, mar. 2007.

CHEN, W.; YANG, X.; ZHAO, J.; YANG, J.; ZHANG, H.; L. Z.-Y.; LI, L. Three New , 1-Oxygenated ent -8 , 9-Secokaurane Diterpenes from *Croton kongensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, p. 16–20, 2006.

CHEN, W.; YANG, X.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; LI, L. Two New , 1-Oxygenated ent -Kaurane-Type Diterpenes from *Croton kongensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, p. 1554–1558, 2007.

CHEN, Z.; CAI, Y.; PHILLIPSON, D. Studies on the antitumor, antibacterial and wound-healing properties of dragon's blood. **Planta medica**, v. 60, p. 541–545, 1994.

CHO, E. J.; CHOI, J. Y.; LEE, K. H.; LEE, S. Isolation of antibacterial compounds from *Parasenecio pseudotaimingasa*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 561–564, 11 jan. 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – 8ed. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: 2009.

COLES, B. Effects of Modifying Structure on Electrophilic Reactions with Biological Nucleophiles. **Drug Metabolism Reviews**, v. 15, n. 7, p. 1307–1334, 1984.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, nov. 2005.

DA COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; BRITO, S. A.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 24, p. 2724–2728, 2010.

DE ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; DA COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630–633, jan. 2013.

DE HELUANI, C. S.; CATALÁN, C. A.; HERNÁNDEZ, L. R.; BURGUEÑO-TAPIA, E.; JOSEPH-NATHAN, P. Three New Diterpenoids Based on the Novel Sarcopetalane Skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal of natural products**, v. 63, p. 222–225, 2000.

DE PASQUALE, A. PHARMACOGNOSY: THE OLDEST MODERN SCIENCE. **Journal of ethnopharmacology**, v. 11, p. 1–16, 1984.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. DOS; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciencia e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

FELIU, D. A. **Análise de terpenóides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulonic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, p. 272–6, 20 dez. 2008.

FRANCO, M. S.; CORDERO, C. P.; MORANTES, S. J.; ARISTIZABAL, F.; OSORIO, C. Cytotoxic labdane diterpenoids isolated from the hexane fraction of the *Croton stipuliformis* stem bark. **Vitae, Revista de la Facultad de química farmacéutica**, v. 18, n. 2, p. 173–182, 2011.

FUJITA, E.; NODE, M. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. New York: Springer-Verlag, 1984. p. 77–157

FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; MOTTA, L. B.; DOMINGOS, M.; SALATINO, A. Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. **Atmospheric Pollution Research**, v. 1, p. 30–35, 2010.

GARCÍA-PÉREZ, M.-E.; ROYER, M.; DUQUE-FERNANDEZ, A.; DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T.; POULIOT, R. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, p. 251–258, 28 out. 2010.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 31, p. 6697–6703, 2011.

GOULD, K. S.; LISTER, C. Flavonoid Functions in Plants. In: ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. (Eds.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. p. 397–442.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae) v. 2 Euphorbiaceae: Croton to Excoecariopsis**. Royal Botanical Gardens, Kew: [s.n.].

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; ARTEAGA, L.; ROMÁN, L. S. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 80, p. 37–42, abr. 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, p. 1–93, fev. 2006.

HARKER, W. G.; MACKINTOSH, F. R.; SIKIC, B. I. Development and Characterization of a Human Sarcoma Cell Line, MES-SA, Sensitive to Multiple Drugs. **Cancer Research**, v. 43, n. 10, p. 4943–4950, 1983.

HARKER, W. G.; SIKIC, B. I. Multidrug (Pleiotropic) Resistance in Doxorubicin-selected Variants of the Human Sarcoma Cell Line MES-SA. **Cancer Research**, v. 45, n. 9, p. 4091–4096, 1985.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002.

HOOVER, M. **Major herbs of Ayurveda**. The Netherlands: Elsevier Health Sciences, 2002. p. 340

JAIN, S. C.; SINGH, B.; JAIN, R. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 666–8, ago. 2001.

KAPOOR, L. D. **Handbook of Ayurvedic medicinal plants**. 1. ed. New Jersey: CRC Press Taylor & Francis Group, 1989. p. 424

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p. 81–88, maio 2003.

KIM, S. J.; KIM, G. H. Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. **Food science and biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 39–43, 2006.

KIVÇAK, B.; MERT, T.; ÖZTÜRK, H. T. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts. **Turkish Journal of Biology**, v. 26, p. 197–200, 2002.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H.-S.; SUBBARAJU, G. V. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 115–125, 2006.

KUROSU, M.; SIRICILLA, S.; MITACHI, K. Advances in MRSA drug discovery: where are we and where do we need to be? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p. 1095–1116, 2013.

LAI, X. Z.; YANG, Y. B.; SHAN, X. U. L. The Investigation of Euphorbiaceus Medicinal Plants in Southern China. **Economic Botany**, v. 58, p. S307–S320, 2004.

LARROQUE-LOMBARD, A.-L.; TODOROVA, M.; GOLABI, N.; WILLIAMS, C.; JEAN-CLAUDE, B. J. Synthesis and uptake of fluorescence-labeled Combi-molecules by P-glycoprotein-proficient and -deficient uterine sarcoma cells MES-SA and MES-SA/DX5. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 5, p. 2104–2113, 11 mar. 2010.

LAURET, D.; THRUPP, M. D. **Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine manual of clinical microbiology**. London: Williams e Wilkins, American Society for Microbiology, 1980.

LEWINSOHN, T. M. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36–42, 2005.

LI, M. Y.; XU, Z. T. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. **Archives of pharmacal research**, v. 31, n. 5, p. 640–644, 2008.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de Croton sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 177–231, 2008.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de Croton sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 177–231, 2008.

LIN, J.; ZHOU, X.; WANG, J.; JIANG, P.; TANG, K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 107–118, 2010.

LITTLE, R. D.; MASJEDIZADEH, M. R.; WALLQUIST, O.; MCLOUGHLIN, J. I. The Intramolecular Michael Reaction. In: **Organic Reactions**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 315–552.

LOPES, E. L.; NETO, M. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2169–2172, 2012.

LOVELL, C. R. Some Biblical Plants of Dermatological Importance. **Clinics in Dermatology**, v. 16, n. 1, p. 33–40, 1998.

MACCONKEY, A. T. Bile Salt Media and their advantages in some Bacteriological Examinations. **The Journal of Hygiene**, v. 8, n. 3, p. 322–334, 1908.

MAMPANE, K. J.; JOUBERT, P. H.; HAY, I. T. *Jatropha curcas*: Use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. **Phytotherapy Research**, v. 1, p. 50–51, 1987.

MATOS, L. M. M. **Química de espécies nativas de Croton L. (Euphorbiaceae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513–524, 1998.

MEDINA, J. M.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, A. A.; HARAGUCHI, S. K.; FALAVIGNA, D. L. M.; ZAMUNER, M. L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 207–211, 2009.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; MILLOGO, J.; VIANO, J. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 682–685, jan. 2007.

MOREIRA, F. D. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; BALPARDA, M. S.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309–311, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MUROI, H.; KUBO, I. Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1102–1105, 1993.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach . de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145–150, 2008.

NATECHE, F.; MARTIN, A.; BARAKA, S.; PALOMINO, J. C.; KHALED, S.; PORTAELS, F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. **Journal of medical microbiology**, v. 55, p. 857–860, jul. 2006.

OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. **Biochemistry**, v. 12, n. 16, p. 3121–6, 31 jul. 1973.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/UNICEF. Cuidados Primários de Saúde. Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da Saúde, 1979. 64p.

PALATNICK, W.; TENENBEIN, M. Hepatotoxicity from castor bean ingestion in a child. **Clinical toxicology**, v. 38, n. 1, p. 67–9, jan. 2000.

PERRY, N. B.; BURGESS, E. J.; BAEK, S. H.; WEAVERS, R. T.; GEIS, W.; MAUGER, A. B. 11-oxygenated cytotoxic 8,9-secokauranes from a New Zealand liverwort, *Lepidolaena taylorii*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 3, p. 423–33, mar. 1999.

PERRY, N. B.; BURGESS, E. J.; TANGNEY, R. S. Cytotoxic 8,9-Secokaurane Diterpenes from a New Zealand Liverwort, *Lepidolaena taylorii*. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 52, p. 9387–9390, 1996.

POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonols: old compounds for old roles. **Annals of botany**, v. 108, n. 7, p. 1225–33, dez. 2011.

PRETTO, J. B.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; CRUZ, A. B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59C, p. 657–662, 2004.

QUIGNARD, J. E. L.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M.; ALECRIM, A. M.; PINTO, A. C. DA S.; PORTELA, C. N.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. DE C.; SILVA, L. F. R. E.; HENRIQUE, M. C.; DOS SANTOS, M.; PINTO, P. DE S.; SILVA, S. G. Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 3, p. 253–257, jan. 2004.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S. DE; CÂMARA, C. A. G. DA; CASTELAR, I.; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 376–381, 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.

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

RIGANO, D.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; LAVITOLA, A.; SENATORE, F.; ROSSELLI, S.; BRUNO, M. Antibacterial Activity of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 395–397, 2007.

ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine**, v. 10, p. 139–144, mar. 2003.

ROSSI, D.; GUERRINI, A.; MAIETTI, S.; BRUNI, R.; PAGANETTO, G.; POLI, F.; SCALVENZI, L.; RADICE, M.; SARO, K.; SACCHETTI, G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**, v. 126, p. 837–848, jun. 2011.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 18, n. 1, p. 11–33, 2007.

SAMUELS, L.; KUNST, L.; JETTER, R. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 683–707, jan. 2008.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SEIGLER, D. S. Phytochemistry and Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 2, p. 380–401, 1994.

SELOWA, S. C.; SHAI, L. J.; MASOKO, P.; MOKGOTHO, M. P.; MAGANO, S. R. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF THREE CROTON SPECIES COLLECTED IN MPUMALANGA REGION IN SOUTH AFRICA. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 7, n. 2, p. 98–103, 2010.

SHARKEY, T. D.; YEH, S. Isoprene emission from plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 407–436, 2001.

SILVERSTONE, A. L.; SUN, T. Gibberellins and the green revolution. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 1–2, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais : a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35–40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. [s.l.] Editora da UFSC, 2010.

SOLECKI, R. S. Shanidar IV , a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. **Science**, v. 190, n. 4217, p. 880–881, 1975.

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, J. D. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). **Planta Medica**, v. 59, p. 250–252, 1993.

STEIN, E. M.; ANDREGUETTI, D. X.; ROCHA, C. S.; FUJII, M. T.; BAPTISTA, M. S.; COLEPICOLO, P.; INDIG, G. L. Search for cytotoxic agents in multiple Laurencia complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian State of Espírito Santo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 239–243, abr. 2011.

SULTANA, N.; RAHMAN, M. M.; AHMED, S.; AKTER, S.; HAQUE, M. M.; PARVEEN, S.; MOEIZ, S. M. I. Antimicrobial compounds from the rihzomes of *Sansevieria hyacinthoides*. **Bangladesh journal of scientific and industrial research**, v. 46, n. 3, p. 329–332, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2002.

THONGTAN, J.; KITTA KOOP, P.; RUANGRUNGSI, N.; SAENBOONRUENG, J.; THEBTARANONTH, Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. **Journal of natural products**, v. 66, p. 868–70, jun. 2003.

TSIMO GIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, p. 140–146, jun. 2006.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2006. p. 276

VIEIRA FILHO, S. A.; DUARTE, L. P.; PAES, H. C. S.; SILVA, G. D. F.; SOUSA, J. R. DE; LANNA, M. C. S. Antibacterial activity of pentacyclic triterpenes from *Austroplenckia populnea*. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 501, p. 199–204, 1999.

VUNDA, S. L. L.; SAUTER, I. P.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S. A. L.; ROTT, M. B.; APEL, M. A.; VON POSER, G. L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Parasitology research**, v. 111, n. 3, p. 961–6, set. 2012.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p. 238

WEBSTER, G. L. SYNOPSIS OF THE GENERA AND SUPRAGENERIC TAXA OF EUPHORBIACEAE. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 33–144, 1994.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

YANG, X.-D.; CHEN, W.; ZHAO, J.-F.; YANG, L.-J.; ZHANG, H.-B.; LI, L. Ent-kaurane diterpenes and phenolic compounds from *Croton kongensis* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 237–240, jul. 2009.

ZOU, G.; SU, Z.; ZHANG, H.; WANG, Y.; YANG, J.; ZOU, Z. Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. **Molecules**, v. 15, p. 1097–1102, 2010.

ANEXO

Resultados das reações de deslocamento para identificação dos flavonoides isolados da subfração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Resultados das reações de deslocamento para identificação do flavonoide **FA-7-1** isolado da subfração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus*.

Reagentes	Mudança observada (em nm)	Interpretação
KOH	+ 65 nm na banda I (sem decréscimo de intensidade)	4'-OH
	Nova banda em 334 nm	7-OH
KOH (5min)	Sem alterações	Não contém: 3,4'-OH; anel A: orto-diOH no anel; anel B: 3 OH adjacentes
AlCl ₃ /HCl	+11 nm na banda I	Não contém: 5-OH
AlCl ₃ (em relação ao AlCl ₃ /HCl)	Sem alteração	Não contém: 3-OH (possivelmente); anel B: orto-diOH; anel A: orto-diOH.
NaOAc	+8 nm na banda II	7-OH
NaOAc (5min)	Sem decréscimo de intensidade	Sem grupos alcali-sensíveis
NaOAc/H ₃ BO ₃	+ 9 nm na banda I	anel A: orto-diOH

Bandas ($\lambda_{\max}$ nm)

MeOH: 272, 337
 KOH: 278, 334 (om), 402
 AlCl₃: 278, 304 (om), 348
 AlCl₃/HCl: 278, 304 (om), 348
 NaOAc: 280, 385
 NaOAc/H₃BO₃: 273, 322(om), 346

Espectro de absorção UV/vis de **FA-7-1** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* com diferentes reagentes de deslocamento.

Resultados das reações de deslocamento para identificação do flavonoide **FA-7-3** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila.

FA-7-3	Mudanças observadas	Interpretação
KOH	+ 70 nm na banda I (sem decréscimo de intensidade)	Sem referência
	Sem nova banda em 320-335 nm	Não contem 7-OH
KOH (5min)	Sem alterações	Não contem: 3,4'-OH; anel A: orto-diOH no anel; anel B: 3 OH adjacentes
AlCl ₃ /HCl	+12 nm na banda I	Não contem: 5-OH
AlCl ₃ (em relação ao AlCl ₃ /HCl)	Sem alteração	Não contem: 3-OH (possivelmente); anel B: orto-diOH; anel A: orto-diOH.
NaOAc	+10 nm na banda II	7-OH
NaOAc (5min)	Estável, sem decréscimo de intensidade	Sem grupos alcali-sensíveis
NaOAc/H ₃ BO ₃	A banda I desapareceu	Sem referência

Bandas ($\lambda_{\max}$ nm)

MeOH: 273, 330

KOH: 283, 400

AlCl₃: 266, 304 (om), 346, 380 (om)

AlCl₃/HCl: 274, 304 (om), 342

NaOAc: 283, 387

NaOAc/H₃BO₃: 274

Espectro de absorção UV/vis de **FA-7-3** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* com diferentes reagentes de deslocamento.

Resultados das reações de deslocamento para identificação do flavonoide **FA-7-5** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila.

FA-7-5	Mudança observada	Interpretação
KOH	+ 49 nm na banda I (sem decréscimo de intensidade)	4'-OH
	Nova banda em 323	7-OH
KOH (5min)	Sem alterações	Não contem: 3,4'-OH; anel A: orto-diOH no anel; anel B: 3 OH adjacentes
AlCl ₃ /HCl	+46 nm na banda I	5-OH
AlCl ₃ (em relação ao AlCl ₃ /HCl)	Sem alteração	Não contem: 3-OH (possivelmente); anel B: orto-diOH; anel A: orto-diOH.
NaOAc	+7 nm na banda II	7-OH
NaOAc (5min)	Estável, sem decréscimo de intensidade	Sem grupos alcali-sensíveis
NaOAc/H ₃ BO ₃	+3 nm na banda I	anel A: orto-diOH

Inflexões ($\lambda_{\max}$ nm)

MeOH: 267, 297 (om), 344

KOH: 274, 323 (om), 393

AlCl₃: 275, 304 (om), 349, 394 (om)

AlCl₃/HCl: 276, 302 (om), 347, 390 (om)

NaOAc: 274, 300 (om), 373

NaOAc/H₃BO₃: 267, 347

Espectro de absorção UV/vis de **FA-7-5** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* com diferentes reagentes de deslocamento.

Resultados das reações de deslocamento para identificação do flavonoide **FA-7-6** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila.

FA-7-6	Mudança observada	Interpretação
KOH	+ 57 nm na banda I (sem decréscimo de intensidade)	4'-OH
	Nova banda em 329	7-OH
KOH (5min)	Sem alterações	Não contem: 3,4'-OH; anel A: orto-diOH no anel; anel B: 3 OH adjacentes
AlCl ₃ /HCl	+42 nm na banda I	5-OH
AlCl ₃ (em relação ao AlCl ₃ /HCl)	Sem alteração	Não contem: 3-OH (possivelmente); anel B: orto-diOH; anel A: orto-diOH.
NaOAc	+20 nm na banda II	7-OH
NaOAc (5min)	Estável, sem decréscimo de intensidade	Sem grupos alcali-sensíveis
NaOAc/H ₃ BO ₃	+3 nm na banda I	anel A: orto-diOH

Inflexões ($\lambda_{\max}$ nm)

MeOH: 255, 357

KOH: 271, 329 (om), 414

AlCl₃: 266, 301 (om), 400

AlCl₃/HCl: 268, 361 (om), 399

NaOAc: 275, 322 (om), 396

NaOAc/H₃BO₃: 223, 256 (om), 360

Espectro de absorção UV/vis de **FA-7-6** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* com diferentes reagentes de deslocamento.

Resultados das reações de deslocamento para identificação do flavonoide **FA-7-7** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila.

FA-7-7	Mudança observada	Interpretação
KOH	+ 57 nm na banda I (sem decréscimo de intensidade)	4'-OH
	Nova banda em 330	7-OH
KOH (5min)	Estável, sem decréscimo de intensidade	Não contem: 3,4'-OH; anel A: orto-diOH no anel; anel B: 3 OH adjacentes
AlCl ₃ /HCl	+43 nm na banda I	5-OH
AlCl ₃ (em relação ao AlCl ₃ /HCl)	Sem alteração	Não contem: 3-OH (possivelmente); anel B: orto-diOH; anel A: orto-diOH.
NaOAc	+20 nm na banda II	7-OH
NaOAc (5min)	Estável, sem decréscimo de intensidade	Sem grupos alcali-sensíveis
NaOAc/H ₃ BO ₃	+3 nm na banda I	anel A: orto-diOH

Inflexões ($\lambda_{\max}$ nm)

MeOH: 255, 357
 KOH: 272, 330 (om), 414
 AlCl₃: 268, 301 (om), 367 (om), 401
 AlCl₃/HCl: 268, 299 (om), 362 (om), 400
 NaOAc: 275, 323 (om), 396
 NaOAc/H₃BO₃: 256, 360

Espectro de absorção UV/vis de **FA-7-7** isolado da fração FA-7 do extrato de acetato de etila de *C. pallidulus* var. *pallidulus* com diferentes reagentes de deslocamento.