

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Programa de Pós-Graduação em Química

Francieli Kanumfre de Carvalho

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Croton antisiphiliticus* Martius E *Croton heterodoxus* Baillon**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

**Orientador:** Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carvalho, Francieli Kanumfre de  
ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE Croton  
antisyphiliticus Martius E Croton heterodoxus Baillon /  
Francieli Kanumfre de Carvalho ; orientador, Moacir  
Geraldo Pizzolatti - Florianópolis, SC, 2013.  
224 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Estudo Fitoquímico. 3. Atividades  
Biológicas. 4. Gênero Croton. I. Pizzolatti, Moacir  
Geraldo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Francieli Kanumfre de Carvalho

**“ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
*Croton antisiphiliticus* Martius E *Croton heterodoxus* Baillon.”**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Doutor em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 06 de dezembro de 2013.

---

Hugo A. Gallardo Olmedo  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti  
(DQ-UFSC)  
Orientador

---

Prof. Dr. Ademir F. Morel  
(DQ-UFSM)  
Relator

---

Prof. Dr. Anderson Barison  
(DQ – UFPR)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento  
(DQ – UFSC)

---

Prof. Dr. Miguel S. Balparda Caro  
(DQ - UFSC)

---

Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
(DQ - UFSC)

***Dedicatória***

*Ao meu amado marido Edson Luiz de  
Carvalho, pelo seu amor, dedicação, e apoio  
em todos os momentos, e pela linda família  
que estamos construindo.*

*Te Amo!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, “porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

Ao meu marido Edson Luiz de Carvalho por ser meu refúgio, me apoiar em tudo, me amar e me fazer a pessoa mais feliz da Terra. Você é muito mais do que eu pedi a Deus.

Aos meus pais Germano e Vilma, pelo amor, apoio em todas as decisões e por me ensinarem a ser uma pessoa de caráter.

Aos nossos Pastores, Líderes e irmãos em Cristo, Pr. Sílvio e Pra. Kellen, Pr. Zildemar e Pra Sheila, e Ana Paula Glinski, e à amada Igreja do Senhor Jesus em Ponta Grossa (ICP) pela cobertura espiritual.

A toda a minha família, irmãos, cunhadas e sobrinhos pela compreensão e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr Moacir Geraldo Pizzolatti, pela orientação, amizade e pelo privilégio de ser sua aluna. Obrigada pela compreensão, e por ter sido um verdadeiro Mestre.

Às minhas grandes amigas Luciana de Carvalho Tavares e D alila Venzke. Obrigada pela ajuda fundamental ao trabalho, cuidado e carinho com a minha vida. A amizade de vocês foi um presente de Deus, e a minha principal conquista destes anos em Florianópolis.

Aos queridos amigos Leko e Evelyn, Baiano e Juzinha, Lu e Vini. Jamais esqueceremos o carinho de vocês em partilhar conosco a alegria do dia mais importante das nossas vidas.

A todos os pesquisadores e alunos que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho:

- *Ao Tiago Katu Pereira e à Professora Rosemeri Segecin Moro, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pelo auxílio na identificação botânica e coleta do material vegetal.*

- *Ao pesquisador Eduardo Monguilhott Dalmarco, do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau - SC, e Juliana Dalmarco pela avaliação da atividade antibacteriana.*

- *À pesquisadora Susana Johann, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela avaliação da atividade antifúngica e citotóxica.*

- *Ao Gustavo Oliveira dos Reis e à Professora Tânia Sílvia Fröde, do Laboratório de Imunologia Clínica (UFSC), pela determinação da atividade antiinflamatória.*

- Ao doutorando Allisson Jhonatan Gomes Castro e à Professora Fátima R. M. Barreto Silva, do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais (UFSC), pela determinação da atividade anti-hiperglicêmica.

- À mestrandia Catharina Nucci e ao Professor Adair R. S. Santos pelos ensaios de atividade antinociceptiva, realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) da UFSC.

- Aos doutorandos Melina Heller e Daniel Spudeit, e ao Professor Gustavo Amadeu Micke pelas análises de eletroforese capilar e CG-MS realizadas no Laboratório de Eletroforese Capilar, Departamento de Química – UFSC.

- Ao Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi pelas análises de difração de raios-X.

- Ao Paulo C. Leal, CEBIME-UFSC, pelas análises de HRMS.

- Ao Professor Raimundo Braz Filho, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo auxílio na elucidação estrutural dos compostos.

- Aos colegas de laboratório Leandro Espindola, Rafael Padoveze e Mayan pelas reações com os compostos isolados, e Tiago Schambach pelas colunas cromatográficas.

- Aos colegas de laboratório Dalila Venzke, Heros Horst e Lizandra Bretanha pelo auxílio nas análises de CG, RMN e HPLC.

- Aos alunos Guilherme Colla, Aldo Sena e Gustavo Silva Queiroz e à Professora Inês Maria Costa Brighente, do Laboratório de Química de Produtos Naturais (UFSC), pela realização dos ensaios antioxidantes, toxicidade frente à *Artemia salina*, inibição da enzima acetilcolinesterase e tratamento estatístico dos dados.

- À todos os colegas do LQPN que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho. Jamais vou esquecer a alegria de compartilhar estes anos com vocês!

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Química pela oportunidade de executar este Projeto e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

À Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pela obtenção dos espectros.

Aos funcionários da coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da UFSC, Jadir e Grace, pelas orientações no decorrer do curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC pelo aprendizado nestes anos.

Aos professores membros da banca examinadora, Prof. Dr. Ademir F. Morel, Prof. Dr. Anderson Barison, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria da Graça Nascimento, Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro, Prof. Dr. Ricardo José Nunes pelas sugestões ao trabalho.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho,

***Muito Obrigada!***

*“Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam; se o Senhor não guardar a cidade, em vão vigia a sentinela. Inútil vos será levantar de madrugada, repousar tarde, comer o pão que penosamente granjeastes; aos seus amados Ele o dá enquanto dormem.”*

***Sf 127: 1-2***



## RESUMO

Neste trabalho realizou-se o estudo fitoquímico das espécies vegetais *Croton antispyhiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon. Os flavonoides *O*-glicosilados rutina, isoquercitrina e quercitrina e o flavonoide *C*-glicosilado vitexina foram identificados por eletroforese capilar na espécie *C. antispyhiliticus*. Os compostos vitexina e ácido quínico foram isolados como compostos majoritários, e quercetina como um artefato de isolamento. Os triterpenos fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo, 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno, fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno, o esteroide  $\beta$ -sitosterol, os flavonoides pachypodol, catequina, astragalina e a mistura de flavonoides quercetina (~83%) – canferol (~13,5%) foram isolados de *C. heterodoxus*. Todos os compostos isolados da espécie *C. heterodoxus* foram relatados pela primeira vez para esta espécie vegetal, sendo que o triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo é inédito na literatura. Os triterpenos fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno foram analisados por difração de raios-X, confirmando de maneira inequívoca as estruturas dos compostos. Os extratos brutos, frações e compostos isolados das duas espécies vegetais foram submetidos a ensaios para verificação de atividades biológicas, apresentando resultados em diferentes níveis. O conteúdo de compostos fenólicos e o teor de flavonoides dos extratos e frações foram avaliados, mostrando que as frações acetato de etila são ricas fontes destas classes de compostos. Em geral, a espécie *C. antispyhiliticus* foi a mais ativa nos ensaios antioxidantes de inibição da peroxidação lipídica, DPPH e potencial redutor. Dos compostos isolados, a quercetina e a mistura quercetina/canferol apresentaram as melhores capacidades de sequestro de radicais DPPH e as maiores capacidades redutoras. Ensaios de citotoxicidade sobre linhagens de células tumorais humanas e toxicidade sobre *A. salina*, inibição da AChE e av aliação da atividade antimicrobiana também foram realizados. A fração aquosa de *C. antispyhiliticus* e os compostos vitexina, ácido quínico e quercetina apresentaram ação anti-inflamatória em modelos de inflamação induzida pela carragenina em camundongos. Os triterpenos fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo, 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno, fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno apresentaram ação antihiperlicemiante aguda. Os triterpenos fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno apresentaram

efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sobre a nocicepção induzida pela formalina em camundongos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Croton heterodoxus*, *Croton antisiphiliticus*, triterpenos, flavonoides, atividades biológicas.

## ABSTRACT

In this work the phytochemical study of the plant species *Croton antisiphiliticus* Martius and *Croton heterodoxus* Baillon was performed. Flavonoids *O*-glycosylated rutin, isoquercitrin, quercitrin and *C*-glycoside vitexin were identified by capillary electrophoresis in *C. antisiphiliticus*. The compounds vitexin and quinic acid were isolated as major compounds and quercetin as an artifact of isolation. Triterpenes fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ -ol-3-oxo, 3 $\beta$ -hidroxyhop-22(29)ene, fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol and 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxyolean-12-ene, sterol  $\beta$ -sitosterol, flavonoids pachypodol, catechin, astragalin and a mixture of flavonoids quercetin (~ 83%) - kaempferol (~ 13.5% ) were isolated from *C. heterodoxus*. All compounds isolated from *C. heterodoxus* were first reported for this plant species, and the triterpene fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ -ol-3-oxo is unpublished in the literature. Triterpenes fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol and 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxyolean-12-ene were analyzed by X-ray diffraction, confirming unequivocally the structures of compounds. The extracts, fractions and isolated compounds from the two plant species were submitted to biological activities verification assays and presenting results at different levels. The content of phenolic and flavonoid compounds of extracts and fractions were evaluated, showing that the ethyl acetate fractions are rich sources of these compounds. In general *C. antisiphiliticus* was the most active in the antioxidants assays of lipid peroxidation inhibiting, DPPH and reducing potential. Between the isolated compounds, quercetin and the mixture quercetin/kaempferol showed the best DPPH scavenger ability and higher reducing capacity. Cytotoxicity assays on human tumor cell lines and toxicity against *A. salina*, inhibition of AChE and antimicrobial activity were also conducted. The aqueous fraction of *C. antisiphiliticus* and compounds vitexin, quinic acid and quercetin showed anti-inflammatory action in inflammation models carrageenan-induced in mice. Triterpenes fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ -ol-3-oxo, 3 $\beta$ -hidroxyhop-22(29)ene, fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol and 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxyolean-12-ene had acute antihyperglycemic action. Triterpenes fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol and 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxyolean-12-ene showed antinociceptive and anti-inflammatory action on the formalin-induced nociception in mice .

**KEYWORDS:** *Croton heterodoxus*, *Croton antisiphiliticus*, triterpenes, flavonoids, biological activities.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Domínios e sua localização no território brasileiro.....	29
Figura 02: (a) <i>Croton antisiphiliticus</i> e (b) <i>Croton heterodoxus</i> .....	39
Figura 03: Biossíntese dos terpenos (Fonte: BREITMAIER, 2006).....	42
Figura 04: Epoxidação do esqualeno (Fonte: CAREY, 2000).....	42
Figura 05: Ciclização do esqualeno e do 2,3-epóxido esqualeno para formação dos triterpenos policíclicos (Fonte: WENDT et al., 2000).....	43
Figura 06: Biossíntese dos flavonoides (Fonte: DEWICK, 2002).....	45
Figura 07: Biossíntese dos flavonoides, continuação (Fonte: DEWICK, 2002).....	45
Figura 08: Estabilização do radical livre DPPH na presença de um flavonoide.....	48
Figura 09: Representação espacial das taxas brutas da incidência de câncer por 100 mil habitantes no Brasil, para homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012/2013. (Fonte: INCA 2013).....	53
Figura 10. Pontos de coleta das espécies vegetais no entorno do manancial de Alagados, Ponta Grossa – PR – BR. (a) Usina São Jorge e (b) Abrigo Rio Pitangui.....	61
Figura 11: Obtenção e fracionamento dos extratos das espécies vegetais <i>C. antisiphiliticus</i> e <i>C. heterodoxus</i> .....	63
Figura 12: Fracionamento cromatográfico do extrato CATW.....	93
Figura 13: Eletroferogramas dos extratos CAEBT (A) e CATW (B) de <i>C. antisiphiliticus</i> . Rutina (1); isoquercitrina (2); vitexina (3) e quercitrina (4).....	93

Figura 14: Estruturas químicas dos compostos identificados na espécie <i>Croton antisiphiliticus</i> . Rutina (1), isoquercitrina (2), vitexina (3), quercitrina (4), ácido quínico (5) e quercetina (6).....	94
Figura 15: Eletroferogramas A – CAEBT; B – CAEBT adicionado dos padrões de rutina (1), isoquercitrina (2), vitexina (3) e quercitrina (4) na concentração de 20 mg L <sup>-1</sup> aproximadamente.....	95
Figura 16: Eletroferogramas A – CATW; B – CATW adicionado dos padrões de rutina (1), isoquercitrina (2), vitexina (3) e quercitrina (4) na concentração de 20 mg L <sup>-1</sup> aproximadamente.....	95
Figura 17: Eletroferogramas CAEBT antes e depois da hidrólise.....	96
Figura 18: Eletroferogramas CATW antes e depois da hidrólise.....	96
Figura 19: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto <b>3</b> .....	97
Figura 20: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz em Pir) do composto <b>3</b> .....	98
Figura 21: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz em Pir) do composto <b>3</b> .....	98
Figura 22: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto <b>5</b> .....	99
Figura 23: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto <b>6</b> .....	99
Figura 24: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz em Pir) do composto <b>6</b> .....	100
Figura 25: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz em Pir) do composto <b>6</b> .....	100
Figura 26: Fracionamento cromatográfico da fração CHCH.....	102
Figura 27: Triterpenos isolados da fração CHCH de <i>Croton heterodoxus</i> . Fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7), 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno	

(8), fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10) e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroiolean-12-eno (11).....102

Figura 28: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto 7.....103

Figura 29: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto 7.....103

Figura 30: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto 7.....104

Figura 31: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 7.....104

Figura 32: Correlações de RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (negrito) e HMBC (H  $\rightarrow$  C) dos compostos 7, 8, 10 e 11.....106

Figura 33: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto 8.....107

Figura 34: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto 8.....108

Figura 35: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto 8.....108

Figura 36: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 8.....109

Figura 37: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto 9.....111

Figura 38: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto 9.....112

Figura 39: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto 9.....113

Figura 40: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 9.....113

Figura 41: Estrutura do esterol isolado de <i>Croton heterodoxus</i> .....	115
Figura 42: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto <b>10</b> .....	115
Figura 43: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto <b>10</b> .....	116
Figura 44: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto <b>10</b> .....	116
Figura 45: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>10</b> .....	117
Figura 46: Estrutura de raio-X em perspectiva para o composto <b>10</b> . Elipsóides foram desenhadas com um nível de 50% de probabilidade. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	118
Figura 47: Estrutura de raio-X para o composto <b>10</b> .....	119
Figura 48: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto <b>11</b> .....	120
Figura 49: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto <b>11</b> .....	120
Figura 50: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto <b>11</b> .....	121
Figura 51: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>11</b> .....	121
Figura 52: Estrutura de raio-X em perspectiva para o composto <b>11</b> . Elipsóides foram desenhadas com um nível de 50% de probabilidade. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	122
Figura 53: Fracionamento cromatográfico da fração CHCA.....	123
Figura 54: Espectro de IV (em pastilha de KBr) do composto <b>12</b> .....	124

Figura 55: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) para o composto <b>12</b> .....	124
Figura 56: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) para o composto <b>12</b> .....	125
Figura 57: Estrutura do c omposto <b>12</b> (5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetóxi-flavona).....	126
Figura 58: Espectro de IV (em pastilha de KBr) do composto <b>13</b> .....	127
Figura 59: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz em Acetona) para o composto <b>13</b> .....	128
Figura 60: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz em Pir) para o composto <b>13</b> .....	129
Figura 61: Estrutura do composto <b>13</b> (catequina).....	129
Figura 62: Fracionamento cromatográfico da fração CHCW.....	130
Figura 63: Espectro de IV (em pastilha de KBr) do c anferol glicosilado.....	130
Figura 64: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz em MeOD) do canferol glicosilado .....	131
Figura 65: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz em MeOD) do canferol glicosilado .....	132
Figura 66: Estrutura da astragalina ( <b>14</b> ).....	132
Figura 67: Fracionamento cromatográfico da fração CHFH.....	134
Figura 68: Fracionamento cromatográfico da fração CHFA.....	134
Figura 69: Espectro de IV (em pastilha de KBr) da mistura de flavonoides quercetina e canferol ( <b>15</b> ).....	135
Figura 70: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) com expansão da mistura de flavonoides quercetina-canferol ( <b>15</b> ).....	136



Figura 71: Eletroferograma da mistura de flavonoides quercetina-canferol ( <b>15</b> ). Análise qualitativa ( <b>A</b> ) sem adição dos padrões e ( <b>B</b> ) com adição dos padrões.....	137
Figura 72: Sobreposição dos espectros de UV dos flavonoides detectados por eletroforese capilar. Linha azul = amostra HFA-M1, linha vermelha = flavonoide padrão ( <b>A</b> ) quercetina e ( <b>B</b> ) canferol.....	137
Figura 73: Eletroferograma da mistura de flavonoides antes e após a hidrólise ácida.....	138
Figura 74: Estruturas químicas dos flavonoides presentes na mistura isolada de CHFA: quercetina ( <b>A</b> ) e canferol ( <b>B</b> ).....	139
Figura 75: Fracionamento cromatográfico da fração CHFW.....	139
Figura 76: Complexo formado entre um flavonoide e o reagente $AlCl_3$ .....	141
Figura 77. Ação protetora contra peroxidação lipídica dos extratos e frações de <i>C. heterodoxus</i> .....	144
Figura 78. Ação protetora contra peroxidação lipídica dos extratos e frações de <i>C. antisiphiliticus</i> .....	145
Figura 79: Efeito dos triterpenos HCH18 ( <b>7</b> ) (A), HCH25 ( <b>8</b> ) (B), HCH70 ( <b>10</b> ) (C) e HCH115 ( <b>11</b> ) (D) testados nas doses de 0,1; 1 e 10 $mg\ kg^{-1}$ nos níveis séricos de glicose.....	164
Figura 80: Efeito dos triterpenos HCH18 ( <b>7</b> ) (A), HCH25 ( <b>8</b> ) (B), HCH70 ( <b>10</b> ) (C) e HCH115 ( <b>11</b> ) (D) no conteúdo de glicogênio hepático. Triterpenos testados nas doses de 0,1; 1 e 10 $mg\ kg^{-1}$ .....	165
Figura 81: Efeito dos triterpenos HCH18 ( <b>7</b> ) (A), HCH25 ( <b>8</b> ) (B), HCH70 ( <b>10</b> ) (C) e HCH115 ( <b>11</b> ) (D) nas dissacaridasas intestinais lactase (1), maltase (2) e sacarase (3). Triterpenos testados nas doses de 0,001; 0,01; 0,1 e 10 $mg\ mL^{-1}$ .....	167
Figura 82: Efeito do triterpeno HCH70 ( <b>10</b> ) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	169

Figura 83: Efeito do triterpeno HCH115 ( <b>11</b> ) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	169
Figura 84: Efeito do triterpeno HCH70 ( <b>10</b> ) na contagem total de leucócitos (A), contagem diferencial de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	170
Figura 85: Efeito do triterpeno HCH115 ( <b>11</b> ) na contagem total de leucócitos (A), contagem diferencial de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	171
Figura 86: Níveis de TNF- $\alpha$ (A), IL-1 $\beta$ (B) e IL-10 (C) em exsudato pleural de camundongos tratados com o triterpeno HCH70 ( <b>10</b> ) (3,10 e 30 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.).....	172
Figura 87: Níveis de TNF- $\alpha$ (A), IL-1 $\beta$ (B) e IL-10 (C) em exsudato pleural de camundongos tratados com o triterpeno HCH115 ( <b>11</b> ) (3,10 e 30 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.).....	172

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Rendimentos dos extratos brutos e das frações obtidas a partir das espécies <i>C. heterodoxus</i> e <i>C. antisiphiliticus</i> .....	91
Tabela 02: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para os compostos <b>3</b> e <b>6</b> isolados de <i>Croton antisiphiliticus</i> ( $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	101
Tabela 03: Dados de RMN para os compostos <b>7</b> , <b>10</b> e <b>11</b> ( $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	105
Tabela 04: Dados de RMN para o composto <b>8</b> ( $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz)..	110
Tabela 05: Dados espectroscópicos de RMN para o composto <b>9</b> .....	114
Tabela 06: Dados do cristal e refinamento das estruturas para os compostos <b>10</b> e <b>11</b> .....	118
Tabela 07: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o composto <b>12</b> , isolado da fração CHCA ( $\delta$ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	126
Tabela 08: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, Acetona) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz, Pir) para a catequina ( <b>13</b> ).....	128
Tabela 09: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a astragalina ( <b>14</b> ).....	133
Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ para a mistura de flavonoides ( <b>15</b> ).....	136
Tabela 11: Teor de compostos fenólicos totais* e flavonoides**, capacidade sequestrante do radical livre DPPH ( $\text{CI}_{50}^{***}$ - $\mu\text{g/mL}$ ), potencial redutor*** e inibição da peroxidação lipídica***** dos extratos e frações das espécies estudadas (letras diferentes diferem estatisticamente).....	145
Tabela 12: Capacidade sequestrante do radical livre DPPH ( $\text{CI}_{50}^*$ - $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial redutor** dos compostos isolados das espécies estudadas (letras diferentes diferem estatisticamente).....	146

Tabela 13: Correlação entre as atividades antioxidantes de sequestro de radicais DPPH, potencial redutor e peroxidação lipídica com os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides. Os valores apresentados referem-se ao coeficiente de correlação $R^2$ .....	147
Tabela 14: Atividade tóxica frente à <i>Artemia salina</i> .....	149
Tabela 15: Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.....	151
Tabela 16: Atividade inibitória dos compostos frente à enzima acetilcolinesterase.....	152
Tabela 17: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da atividade antibacteriana* dos extratos e frações das duas espécies de <i>Croton</i> ....	153
Tabela 18: Atividade antibacteriana* dos compostos das duas espécies de <i>Croton</i> .....	155
Tabela 19: Porcentagem de inibição dos extratos e frações contra leveduras patogênicas.....	156
Tabela 20: Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g ml}^{-1}$ dos extratos e frações estudados.....	157
Tabela 21: Porcentagem de inibição dos compostos contra leveduras patogênicas.....	158
Tabela 22: Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g ml}^{-1}$ dos compostos estudados.....	158
Tabela 23: Porcentagem de inibição dos extratos e frações contra células tumorais.....	160
Tabela 24: Porcentagem de inibição dos compostos contra células tumorais MCF-7.....	161
Tabela 25: Efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico obtido das partes aéreas da espécie <i>Croton antisiphiliticus</i> Mart., suas frações e compostos isolados, sob a migração de leucócitos e exsudação, no modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	162

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AA** – Ácido ascórbico  
**AChE** – Acetilcolinesterase  
**AcOEt** – Acetato de etila  
**ADA** – Adenosina deaminase  
**AG** – Ácido gálico  
**ANOVA** – *Analysis of variance*  
**ATCC** – *American Type Culture Collection*  
**CC** – Cromatografia em coluna  
**CCD** – Cromatografia em camada delgada  
**CLAE/EM** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas  
**Cg** – Carragenina  
**CI<sub>50</sub>** – Concentração inibitória de 50%  
**CIM** – Concentração inibitória mínima  
**CLSI** – *Clinical Laboratory Standards Institute*  
**COSY** – *Correlation Spectroscopy*  
**d** – Duplete  
**DL<sub>50</sub>** – Dose letal a 50%  
**DMSO** – Dimetilsulfóxido  
**DPPH** – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil  
**EDTA** – Ácido etileno-diamino-tetracético  
**ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**ESI-QTOF** – *Electrospray Ionization – Quadrupole Time-of-Flight*  
**HIV** – Vírus da imunodeficiência  
**HMBC** – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*  
**HMQC** – *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*  
**HRMS - ESI** – *High Resolution Mass Spectrometry – Electrospray Ionization*  
**Hz** – Hertz  
**i.p.** – Intraperitoneal  
**i.pl.** – Intrapleural  
**i.v.** – Intravenoso  
**INCA** – Instituto Nacional do Câncer  
**IV** – Infravermelho  
**J** – Constante de acoplamento  
**Ldet** – Distância do ponto de injeção até o ponto de detecção  
**Ltot** – Comprimento do capilar  
**m** – Multiplete

**MCF-7** – Linhagem de célula humana de câncer de mama  
**MeOH** – Metanol  
**MHz** – Mega hertz  
**MPO** – Enzima mieloperoxidase  
**p.f.** – Ponto de fusão  
**PBS** – Tampão fosfato de sódio  
**ppm** – Partes por milhão  
**q** – Quarteto  
**Rf** – Fator de retenção (cromatografia)  
**RMN de <sup>13</sup>C** – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
**RMN de <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear  
**s** – Simpleto  
**SDS-PAGE** – Dodecil sulfato de sódio  
**sl** – Simpleto largo  
**t** – Triplete  
**TK-10** – Linhagem de célula humana de câncer renal  
**TMS** – Tetrametilsilano  
**UFC** – Unidade formadora de colônia  
**UTM** – Universal Transversa de Mercator  
**UV** – Ultravioleta  
**UV-VIS** – Ultravioleta Visível  
**Δ** – Deslocamento químico relativo ao padrão  
**μM** – Micromolar  
**μg** – Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	29
2.1	DOMÍNIOS BRASILEIROS	29
2.2	REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS, PARANÁ	31
2.3	PLANTAS MEDICINAIS	31
2.3.1	Plantas medicinais do Cerrado	33
2.3.2	Família Euphorbiaceae	34
<b>2.3.2.1</b>	<b>Gênero <i>Croton</i></b>	34
2.3.2.1.1	<i>Croton antisiphiliticus</i>	37
2.3.2.1.2	<i>Croton heterodoxus</i>	39
2.4	BIOSSÍNTESE DE TERPENÓIDES E FLAVONOÍDES	39
2.4.1	Terpenóides	40
2.4.2	Flavonóides	44
2.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	46
2.5.1	Ensaio antioxidante	46
<b>2.5.1.1</b>	<b>Conteúdo de compostos fenólicos totais</b>	46
<b>2.5.1.2</b>	<b>Conteúdo de flavonóides</b>	47
<b>2.5.1.3</b>	<b>Ação sequestradora de radicais livres DPPH</b>	47
<b>2.5.1.4</b>	<b>Potencial redutor do íon férrico</b>	48
<b>2.5.1.5</b>	<b>Inibição da peroxidação lipídica</b>	49
2.5.2	Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	49
2.5.3	Inibição da enzima acetilcolinesterase	50
2.5.4	Atividade antibacteriana	50
2.5.5	Atividade antifúngica	51
2.5.6	Citotoxicidade	52

2.5.7	Atividade anti-inflamatória	54
2.5.8	Atividade anti-hiperglicêmica	55
2.5.9	Atividade antinociceptiva	56
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>59</b>
4.1	MATERIAIS	59
4.1.1	Materiais utilizados e equipamentos	59
4.1.2	Material vegetal	60
4.2	MÉTODOS	61
4.2.1	Preparação dos extratos vegetais	61
4.2.2	Fracionamento cromatográfico	62
<b>4.2.2.1</b>	<b>Separação cromatográfica das frações de <i>C. antisiphiliticus</i> e <i>C. heterodoxus</i></b>	<b>63</b>
4.2.2.1.1	<i>Extrato Bruto Aquoso Total de Croton antisiphiliticus (CATW)</i>	63
4.2.2.1.2	<i>Fração Hexano dos Caules de C. heterodoxus (CHCH)</i>	64
4.2.2.1.3	<i>Fração Acetato de Etila dos Caules de C. heterodoxus (CHCA)</i>	67
4.2.2.1.4	<i>Fração Aquosa dos Caules de C. heterodoxus (CHCW)</i>	68
4.2.2.1.5	<i>Fração Hexano das Folhas de C. heterodoxus (CHFH)</i>	69
4.2.2.1.6	<i>Fração Acetato de Etila das Folhas de C. heterodoxus (CHFA)</i>	69
4.2.2.1.7	<i>Fração Aquosa das Folhas de C. heterodoxus (CHFW)</i>	69
4.2.3	Identificação de compostos isolados das frações obtidas de <i>C. antisiphiliticus</i> e <i>C. heterodoxus</i>	70
<b>4.2.3.1</b>	<b>Espectrometria de massas</b>	<b>70</b>
<b>4.2.3.2</b>	<b>Eletroforese capilar</b>	<b>71</b>



<b>4.2.3.3</b>	<b>Difração de raios-X</b>	72
4.2.4	Ensaio para verificação de atividades biológicas	73
<b>4.2.4.1</b>	<b>Ensaio antioxidantes</b>	73
4.2.4.1.1	<i>Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais</i>	73
4.2.4.1.2	<i>Determinação do teor de flavonoides</i>	73
4.2.4.1.3	<i>Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH</i>	74
4.2.4.1.4	<i>Determinação do potencial redutor</i>	74
4.2.4.1.5	<i>Determinação do potencial inibidor contra a peroxidação lipídica</i>	75
<b>4.2.4.2</b>	<b>Toxicidade usando larvas de <i>Artemia salina</i></b>	76
<b>4.2.4.3</b>	<b>Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase</b>	76
<b>4.2.4.4</b>	<b>Determinação da atividade antimicrobiana</b>	77
4.2.4.4.1	<i>Atividade antibacteriana</i>	77
4.2.4.4.2	<i>Atividade antifúngica</i>	78
<b>4.2.4.5</b>	<b>Determinação da atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas humanas</b>	81
4.2.4.5.1	<i>Linhagens celulares</i>	81
4.2.4.5.2	<i>Ensaio com linhagens celulares de câncer humano</i>	81
<b>4.2.4.6</b>	<b>Determinação da atividade anti-inflamatória</b>	82
4.2.4.6.1	<i>Animais</i>	82
4.2.4.6.2	<i>Modelo de inflamação</i>	83
4.2.4.6.3	<i>Contagem total de leucócitos</i>	84
4.2.4.6.4	<i>Determinação da exsudação</i>	84
<b>4.2.4.7</b>	<b>Determinação da atividade anti-hiperglicêmica</b>	84
4.2.4.7.1	<i>Animais</i>	84
4.2.4.7.2	<i>Teste oral de tolerância à glicose</i>	85
4.2.4.7.3	<i>Atividade das dissacaridases intestinais</i>	85

4.2.4.7.4	<i>Determinação do conteúdo de glicogênio hepático</i>	86
<b>4.2.4.8</b>	<b>Determinação da atividade antinociceptiva</b>	86
4.2.4.8.1	<i>Animais</i>	86
4.2.4.8.2	<i>Drogas utilizadas</i>	87
4.2.4.8.3	<i>Nocicepção induzida pela formalina</i>	87
4.2.4.8.4	<i>Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto (Open-field)</i>	88
4.2.4.8.5	<i>Indução da pleurisia</i>	88
4.2.4.8.6	<i>Contagem celular de leucócitos</i>	89
4.2.4.8.7	<i>Determinação dos níveis de TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math> e IL-10 no lavado pleural</i>	89
4.2.5	Análise estatística	90
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	91
5.1	ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES <i>C. antisiphiliticus</i> E <i>C. heterodoxus</i>	91
5.1.1	<i>Croton antisiphiliticus</i> Martius	92
5.1.1.1	<b>Extrato Bruto Total Aquoso de Croton antisiphiliticus (CATW)</b>	92
5.1.2	<i>Croton heterodoxus</i> Baillon	101
5.1.2.1	<b>Fração hexano dos caules (CHCH)</b>	101
5.1.2.2	<b>Fração acetato dos caules (CHCA)</b>	123
5.1.2.3	<b>Fração aquosa dos caules (CHCW)</b>	129
5.1.2.4	<b>Fração hexano das folhas (CHFH)</b>	133
5.1.2.5	<b>Fração acetato das folhas (CHFA)</b>	134
5.1.2.6	<b>Fração aquosa das folhas (CHFW)</b>	139
5.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	140
5.2.1	Ensaio antioxidantes	140
5.2.1.1	<b>Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais</b>	140
5.2.1.2	<b>Avaliação do conteúdo de flavonoides</b>	140

<b>5.2.1.3</b>	<b>Avaliação da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</b>	<b>141</b>
<b>5.2.1.4</b>	<b>Determinação do potencial redutor</b>	<b>142</b>
<b>5.2.1.5</b>	<b>Inibição da peroxidação lipídica</b>	<b>143</b>
5.2.2	Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	148
5.2.3	Inibição da enzima acetilcolinesterase	150
5.2.4	Atividade antibacteriana	152
5.2.5	Atividade antifúngica	155
5.2.6	Citotoxicidade	159
5.2.7	Atividade anti-inflamatória	161
5.2.8	Atividade anti-hiperglicêmica	163
5.2.9	Atividade antinociceptiva	168
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>175</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>179</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>205</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em território brasileiro encontram-se áreas de grande biodiversidade, dentre as quais o Cerrado merece lugar de destaque. Apesar de incompletamente conhecida, a flora do Cerrado é riquíssima, sendo superada apenas pelas Florestas Amazônica e Atlântica. Outra característica da flora do Cerrado é a heterogeneidade de sua distribuição, apresentando espécies particulares para cada região. Todavia, esta biodiversidade encontra-se ameaçada por atividades econômicas como a monocultura de grãos e a pecuária extensiva. Ainda, a carência de estudos voltados para a identificação de plantas com potencial terapêutico representa um risco de extinção dos recursos naturais oferecidos pelo Cerrado.

As espécies vegetais *Croton antisiphiliticus* e *Croton heterodoxus* (Euphorbiaceae) podem ser encontradas em diversas regiões dos Cerrados brasileiros, como na região dos Campos Gerais do Paraná.

O gênero *Croton*, Família Euphorbiaceae, possui espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. O gênero é conhecido por possuir espécies com uma grande variedade de propriedades biológicas. A espécie *C. antisiphiliticus*, conhecida como pé-de-perdiz, perna de perdiz, canela de perdiz e curraleira, é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras, eczemas, infecções de útero e o vário, como anti-inflamatório, depurativo do sangue e anti-sifilítico (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Compostos como triterpenos e flavonoides foram detectados e identificados para esta espécie, todavia, com relação à espécie *C. heterodoxus*, não se encontram na literatura estudos sobre seu uso na medicina popular ou estudo fitoquímico detalhado. Desta forma, este estudo visa o isolamento e identificação dos metabólitos secundários majoritários das espécies vegetais citadas, e avaliação de seu potencial terapêutico para fins medicinais.

*Croton* possui uma composição química bastante variada, sendo que os terpenoides são os metabólitos secundários predominantes. Triterpenoides pentacíclicos ou esteroidais são frequentemente encontrados em diversas espécies, assim como flavonoides e compostos fenólicos em geral (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Os triterpenos pentacíclicos são conhecidos pela diversidade de atividades biológicas que apresentam, incluindo propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva (NARDI et al., 2007). A estrutura única e complexa de

moléculas de origem natural não pode ser obtida facilmente pela química sintética, sendo assim a natureza representa uma rica fonte na pesquisa por novos compostos ativos candidatos a fármacos. A exemplo da galantamina, inibidor da enzima AChE (VIEGAS JUNIOR et al., 2004) e do taxol (CORRÊA, 1995), agente utilizado no tratamento do câncer, produtos naturais desempenham um importante papel na pesquisa de novos fármacos. Os estudos farmacológicos com extratos vegetais tem mostrado grande variedade de atividades com potencial terapêutico para diversos males, mostrando a importância da pesquisa com produtos naturais.

Durante a última década o uso da medicina tradicional tem expandido globalmente e adquirido popularidade, não apenas em países em desenvolvimento, mas também em países onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde, o que evidencia uma mudança de perfil das populações em geral. Todavia, pesquisa científica é necessária para fornecer evidências adicionais de sua segurança e eficácia.

Atualmente já é grande o número de espécies citadas como medicinais em levantamentos etnobotânicos nos Cerrados brasileiros. No entanto, maior ainda deve ser a relação de plantas que não foram listadas, mas que têm possibilidades de uso pela humanidade. Com o desenvolvimento deste projeto, pretende-se mostrar a importância da preservação de espécies da flora do importante Bioma do Cerrado, além de identificar compostos com possível ação medicinal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DOMÍNIOS BRASILEIROS

O espaço geográfico brasileiro apresenta uma grande diversidade de clima, solos, vegetação e fauna. Em território brasileiro encontram-se sete áreas de grande biodiversidade, conhecidos como Domínios, sendo eles: Domínio Amazônico, Domínio da Mata Atlântica, das Caatingas, dos Cerrados, do Pantanal, dos Campos Sulinos e a Zona Costeira (Figura 01). Como tais espaços não têm limites lineares na natureza, faixas de transição, mais ou menos amplas, existem entre eles (COUTINHO, 2000).



Figura 01: Domínios e sua localização no território brasileiro.

Dentre estas áreas, o Cerrado merece lugar de destaque por sua expressiva biodiversidade. A porcentagem de espécies brasileiras que ocorrem nesta área pode representar algo entre 20 e 50% (MACHADO et al., 2004).

O Domínio do Cerrado encontra-se representado, em sua maior extensão, nos estados do Planalto Central Brasileiro, podendo ser encontrado também em outras regiões do país (COUTINHO, 2000). A área "core" estimada é de aproximadamente 1,5 milhão de km<sup>2</sup>, porém, levando em consideração áreas periféricas, que se acham encravadas em

outros domínios vizinhos e nas faixas de transição, este valor pode alcançar 1,8 ou 2,0 milhões de km<sup>2</sup> (MACHADO et al., 2004).

O Cerrado é uma região muito diferenciada com seus principais condicionantes sendo o clima e a natureza do solo. Possui uma aparência árida decorrente, em parte, de solos pobres e ácidos e da ocorrência de apenas duas estações climáticas: uma seca e outra chuvosa (OLIVEIRA FILHO; LIMA, 2002).

A vegetação do Cerrado não possui uma fisionomia única em toda a sua extensão, apresentando-se na natureza como um mosaico de formas fisionômicas, ora manifestando-se como campo sujo, ora como cerrado, ora como campo cerrado, ora como cerrado *sensu stricto* ou campo limpo. Apesar de incompletamente conhecida, a flora do Cerrado é riquíssima, sendo superada apenas pelas florestas Amazônica e Atlântica. Outra característica é a heterogeneidade de sua distribuição, apresentando espécies específicas e particulares para cada região. Por esta razão, unidades de conservação, com áreas significativas, deveriam ser criadas em antidas nas mais diversas regiões do domínio do Cerrado, a fim de garantir a preservação do maior número de espécies da flora deste Bioma, bem como da fauna a ela associada (COUTINHO, 2000).

O Cerrado apresenta grande diversidade de espécies endêmicas, compartilhadas com outros Biomas. Para alguns grupos, como as plantas herbáceas, o nível de endemismo pode chegar a mais de 70% (MACHADO et al., 2004). Todavia, apesar da biodiversidade do Bioma, esta encontra-se ameaçada principalmente por três atividades econômicas: a monocultura intensiva de grãos, principalmente a soja; os investimentos em infra-estrutura e a pecuária extensiva de baixa tecnologia (OLIVEIRA FILHO; LIMA, 2002; MACHADO et al., 2004). O Cerrado é uma área que apresenta fragilidades, e a devastação que vem ocorrendo ao longo dos anos compromete sua integridade, podendo gerar impactos ambientais irreversíveis (OLIVEIRA FILHO; LIMA, 2002).

Apesar de ser apontado como grande detentor de diversidade biológica, ainda há carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. Os recursos naturais, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações, entre estes, o potencial terapêutico oferecido pelas plantas medicinais. Segundo Guarim Neto e Moraes (2003), por suas características, o Cerrado deveria ser considerado área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais.

## 2.2 REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS, PARANÁ

A presença de Cerrado no Paraná ocorre na forma de fragmentos isolados, chamados encraves, como disjunções na periferia da área “core” do Bioma. O Estado é o limite meridional de ocorrência do Cerrado, a formação florística mais antiga ou primária do estado do Paraná (MAACK, 1968).

Os Campos Gerais fazem parte do Planalto Meridional do Brasil, no segundo planalto paranaense, limitados à leste pela escarpa Devoniana e à oeste pela escarpa da Esperança (Serra Geral), e apresenta encraves de Cerrado disjuntos à Florestas Ombrófila Mista e Campos (RITTER; MORO, 2007). Esta região compreende os campos limpos e campos cerrados naturais e caracteriza-se pela vegetação dominante de campos em solos rasos, derivados do Arenito Furnas e unidades arenosas do Subgrupo Itararé. No relevo movimentado característico, sobressai a Escarpa Devoniana, o *Canyon* do Guartelá e outros sítios singulares, com arroios em leito rochoso, cachoeiras, matas-ciliares, furnas, relevos ruiformes, gargantas e despenhadeiros. Alguns dos sítios naturais são objeto de unidades de conservação já implementadas ou em implementação (MELO; MATIAS, 2003).

A vegetação desta região encontra-se preservada devido aos solos pobres, rasos e arenosos, e, principalmente, graças ao isolamento imposto pela barreira geomorfológica representada pela Escarpa Devoniana (MELO; MATIAS, 2003). Todavia, a diversidade da vegetação da região dos Campos Gerais apresenta-se ameaçada devido à agricultura e pastagens extensivas, manejadas através de queimadas periódicas (TAKEDA; TAKEDA; FARAGO, 2001).

Através de coletas botânicas e levantamento bibliográfico, Ritter e Moro (2007) estimaram 344 espécies de Cerrado para oito áreas estudadas na região dos Campos Gerais do Paraná. Diversas espécies foram identificadas no entorno do manancial Alagados, entre elas as espécies de interesse neste estudo, *Croton antisiphiliticus* e *Croton heterodoxus* (Euphorbiaceae).

## 2.3 PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional envolve o uso de plantas medicinais, partes de animais e minerais, e é empregada para manutenção da saúde, prevenção, diagnóstico, melhoramento ou tratamento de doenças físicas e mentais. Tal prática varia de região para região, e é influenciada por fatores como cultura, história, atitudes pessoais e filosofia. O uso



histórico da medicina tradicional, incluindo experiências passadas de geração em geração, demonstra sua segurança e eficiência. Todavia, investigação científica é necessária para fornecer evidências adicionais e confiáveis de seus riscos e benefícios. Desta forma, a pesquisa que envolve a medicina tradicional deve respeitar o conhecimento e a experiência transmitidos ao longo dos anos (WHO, 2000).

Segundo a WHO (2005), podem-se considerar plantas medicinais os materiais derivados de plantas ou preparações com benefícios terapêuticos ou outros benefícios para a saúde humana, que contém ingredientes brutos ou processados de uma ou mais plantas, sendo que em algumas tradições, materiais de origem inorgânica ou animal, podem também estar presentes. As plantas medicinais são divididas nas seguintes categorias: plantas medicamentosas, alimentos funcionais, probióticos, substâncias bioativas e cosméticos (WHO, 2005).

Para ser considerado como produto natural, o medicamento deve apresentar como ingrediente ativo parte da planta considerada medicinal e com atividade terapêutica. Em casos onde não é possível identificar os ingredientes ativos, toda a planta medicinal pode ser considerada como um ingrediente ativo. A atividade terapêutica se refere ao sucesso na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas e mentais, melhoramento de sintomas de doenças, bem como alteração benéfica ou regulação dos níveis físicos e mentais do corpo (WHO, 2000).

Durante a última década o uso da medicina tradicional tem expandido globalmente e adquirido popularidade. Ela tem sido usada não apenas como cuidado básico da saúde em países pobres em desenvolvimento, mas também em países onde a medicina convencional é predominante no sistema nacional de cuidado da saúde (WHO, 2000).

A medicina tradicional é usada por cerca de 60% da população mundial e em alguns países é incorporada no sistema público de saúde (WHO, 2000). Na África, mais de 80% da população usa a medicina tradicional para auxiliar no cuidado de suas necessidades de saúde. Na Ásia e América Latina, as populações continuam a usar a medicina tradicional como um resultado de circunstâncias históricas e crenças culturais. Na China, a medicina tradicional conta com cerca de 40% do sistema de cuidado à saúde. A porcentagem da população que usa a medicina tradicional menos uma vez é de 48% na Austrália, 70% no Canadá, 42% nos Estados Unidos, 38% na Bélgica e 75% na França (WHO, 2002).

No Brasil, não existe uma política nacional sobre a medicina tradicional. Todavia, regulação de plantas medicinais existe desde 1967, com a versão das normas RDC 48/2004 publicada em 2004, que é praticamente a mesma legislação de produtos farmacêuticos convencionais (WHO, 2005). Com a expansão do uso da medicina tradicional no mundo, a segurança, eficiência e o controle de qualidade de plantas medicinais e terapias baseadas em procedimentos tradicionais se tornam importantes atribuições das autoridades públicas e da saúde (WHO, 2000).

### 2.3.1 Plantas medicinais do Cerrado

Algumas plantas da região do Cerrado são conhecidas pelo seu valor medicinal (DE PAULA et al., 2009). Estudos mostram a utilização das plantas para fins medicinais por populações locais. Rodrigues e Carvalho (2001) identificaram 167 espécies de plantas medicinais, das quais 118 são de formações vegetais de Cerrado e campos cerrados. As espécies mais utilizadas na medicina popular são: *Baccharis trimera* (carqueja), *Banisteriopsis argyrophylla* (cipó-prata), *Bauhinia holophylla* (unha-de-vaca), *Bidens pilosa* (picão), *Brosimum gaudichaudii* (mamacadela), *Cayaponia tayuya* (taiuiá), *Caryocar brasiliense* (pequi), *Croton antisiphiliticus* (canela-de-perdiz), *Dorstenia brasiliensis* (carapiá), *Herreria salsaparilha* (salsaparilha), *Heteropteris anceps* (guiné-do-campo), *Jacaranda decurrens* (carobinha), *Lychnophora pinaster* (arnica), *Mikania smilacina* (guaco), *Rudgea viburnoides* (bugre), *Smilax campestris* (japecanga), *Strychnos brasiliensis* (quina-cruzeiro), *Strychnos pseudo-quina* (quina-mineira), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e *Vernonia polyanthes* (assapeixe). As plantas são utilizadas principalmente para afecções dos rins, reumatismo, facilitar a secreção urinária, diabetes, má circulação do sangue, arterosclerose, depurativo do sangue, inflamações, sífilis, colesterol alto, hemorragias, hemorroidas, dores estomacais, cicatrização, paralisias, dores lombares, úlceras, afecções do aparelho respiratório, hematomas, contusões, pancadas, anestésico, moléstias do fígado, doenças venéreas, afecções do aparelho urinário, diarreias, febres, regular ciclos menstruais, afecções da pele e vermes, sendo utilizadas na forma de chás, em decocto ou infuso.

Rodrigues et al. (2002) coletaram e identificaram 124 espécies de plantas, das quais 74 são consideradas pela população como medicinais no município de Luminárias, MG. Em um levantamento

bibliográfico, Guarim Neto e Morais (2003) constataram o total de 509 espécies de plantas medicinais no Cerrado Mato-Grossense. Botrel et al. (2006) verificaram que, de 144 espécies investigadas em regiões de Cerrado e campo cerrado, 53, ou seja, 37,06%, foram indicadas pela população local como sendo medicinais. Pereira et al. (2007) realizaram um levantamento de 60 espécies no Cerrado da região de Dourados, MS, distribuídas em 23 famílias e 53 gêneros. As famílias mais representativas da flora medicinal foram, respectivamente, Asteraceae, Leguminosae, Bignoniaceae, Rubiaceae e Anacardiaceae.

Apesar da grande diversidade de espécies citadas como plantas medicinais em levantamentos etnobotânicos nos Cerrados brasileiros, maior ainda deve ser a relação de plantas que não foram listadas, mas que apresentam potencial terapêutico e possibilidade de uso pela humanidade. Devido à escassez de estudos, espécies reconhecidamente terapêuticas correm o risco de desaparecer, devido à coleta desenfreada e manejo inadequado do solo para outras finalidades (PEREIRA et al., 2007).

### 2.3.2 Família Euphorbiaceae

Euphorbiaceae é uma das famílias de maior importância econômica entre as Angiospermas. A família Euphorbiaceae está representada nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta por um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. Estes estão agrupados em 49 tribos e cinco subfamílias, segundo o sistema de classificação proposto por Webster (1994).

#### 2.3.2.1 Gênero *Croton*

*Croton* é um grande gênero da Família Euphorbiaceae com cerca de 1300 espécies (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). O gênero apresenta flores estaminadas com filamentos inflexíveis no broto, e flores pistiladas com pétalas geralmente reduzidas. A maioria das espécies apresenta um habitat característico (WEBSTER, 1993).

A grande variedade de propriedades biológicas é uma característica marcante do gênero *Croton*. Gamboa-Angulo et al. (2008) verificaram que o extrato bruto de *Croton chichenensis* apresenta um vasto espectro de atividade contra diversos patógenos estudados, entre eles *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus* sp., *Fusarium*

*oxysporum*, com percentagens de inibição maiores de 60%. Dados de espectrometria de massas sugerem que os compostos responsáveis pela atividade antifúngica presentes no extrato são derivados do estigmasterol.

Pieters et al. (1993) isolaram o composto 3',4'-dimetilcedrusina, uma lignina dihidrobenzofurano, como o princípio biologicamente ativo *in vitro* do “sangue de dragão”, um látex vermelho viscoso produzido por várias espécies de *Croton* e usado na medicina popular da América do Sul para diversas finalidades.

A composição e a atividade antimicrobiana do óleo da casca de *Croton stellulifer*, uma espécie rara e endêmica das Ilhas de São Tomé e Príncipe, foi reportada por Martins et al. (2000). O óleo essencial apresentou atividade contra fungos e bactérias, e os principais constituintes encontrados foram  $\alpha$ -phellandreno, p-cimeno, linalool e  $\alpha$ -pineno. Kessano, um óxido sesquiterpenoide, também foi identificado por RMN. Atividade antimicrobiana também foi verificada por Abo, Ogunleye e Ashidi (1999) para *Croton zambesicus*. O extrato da casca do caule exibiu efeito antibacteriano comparável à ampicilina e gentamicina. O efeito antifúngico foi comparável ao do tioconazol. As classes de compostos encontrados neste estudo foram taninos, saponinas, antraquinonas e alcalóides. Os resultados justificaram o uso da espécie na medicina tradicional para o tratamento de desenterias e várias doenças intestinais.

Estudos mostram que *Croton cajucara* apresenta atividade leishmanicida devido à presença de linalool no óleo essencial (ALVIANO et al., 2005; ROSA et al., 2003). O óleo essencial apresenta ainda atividade gastroprotetiva (HIRUMA-LIMA et al., 2000), sendo utilizado na medicina popular brasileira como infusões da casca e das folhas para tratar diversos sintomas gastrointestinais (HIRUMA-LIMA et al., 1999). Estudos mostraram ainda que esta espécie possui efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelos de inflamação agudos e crônicos (BIGHETTI et al., 1999).

*Croton urucurama* é uma espécie empregada na medicina popular do Brasil devido aos seus efeitos analgésico e anti-inflamatório. Estudos mostram que os compostos responsáveis pela atividade analgésica são campesterol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ácido acetil aleurítico, catequina, galocatequina e  $\beta$ -sitosterol-O-glucosídeo (PERES, et al., 1997; PERES, et al., 1998a). *Croton tonkinensis* também apresenta forte atividade anti-inflamatória atribuída a dois diterpenoides isolados das folhas da planta medicinal endêmica Vietnamita (THUONG et al., 2009). A lém de significativa atividade anti-

inflamatória, frações de *Croton celtidifolius* também apresentaram propriedades antioxidantes (NARDI et al., 2003; NARDI et al., 2007), e potencial aplicação para prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, uma vez que apresenta efeito vasorelaxante (DALBÓ et al., 2008). Estudos demonstraram que o extrato etanólico das cascas de *Croton celtidifolius*, as frações acetato de etila, butanólica e aquosa (NARDI et al., 2006), e algumas subfrações (DALBÓ et al., 2006) possuem efeitos antinociceptivos. Além disso, a fração acetato de etila e algumas subfrações apresentaram efeitos anti-inflamatórios na pleurisia induzida pela carragenina em ratos (NARDI et al., 2007).

Algumas espécies de *Croton* apresentam atividade anticancerígena. Compostos isolados do óleo essencial das folhas de *Croton flavens*, uma planta nativa do C aribe usada na medicina tradicional (SYLVESTRE et al., 2006), e da casca do caule de *Croton oblongifolius* apresentaram forte citotoxicidade contra linhagens de células tumorais humanas (ROENGSUMRAN et al., 2009).

O extrato aquoso de *C. malambo* possui efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios significativos (SUÁREZ et al., 2003), assim como o extrato metanólico das folhas de *C. pullei* (ROCHA et al., 2008). O óleo essencial de espécies como *C. nepetaefolius* (ABDON et al., 2002) e *C. zehntneri* (OLIVEIRA et al., 2001) também apresentaram efeitos antinociceptivos.

O gênero *Croton* possui uma composição química bastante variada. Porém, apesar da diversidade de compostos encontrados no gênero, os terpenoides são os metabólitos secundários predominantes, sendo os diterpenoides os compostos de maior ocorrência. Triterpenoides pentacíclicos ou esteroidais são também frequentemente encontrados em diversas espécies, principalmente triterpenos de esqueleto lupano, hopano, oleanano, e derivados da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Os triterpenos pentacíclicos são conhecidos pela diversidade de atividades biológicas que apresentam, incluindo propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva. Estudos mostram que os triterpenos 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (PIETROVSKI et al., 2006), urs-12-eno-3 $\beta$ -16 $\beta$ -diol (OTUKI et al., 2001), ácido acetil aleuritólico (PERES et al., 1997),  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (LIMA-JUNIOR et al., 2007) e o derivado semi-sintético octanoato de amirina (SOLDI et al., 2008; MARCON et al., 2009) apresentam efeitos significativos na nocicepção.

Brasil et al. (2010) isolaram o diterpeno 8-epicordatina das cascas de *Croton palanostigma*, além de outros seis diterpenos e os triterpenos ácido acetil aleuritólico (AAA), 11 $\alpha$ -hidroxiurs-12-en-3-ona,

$\alpha$ -amirenona, 24-metilenocicloartenona e lupenona. Os triterpenos lupenona, lupeol, 3-oxo-22-hidroxihipano, 3-oxo-20- $\beta$ -hidroxitaraxastano, 3-oxo-20-hidroxilupano, ácido 3-oxo-olean-12-en-28-óico, ácido 3-oxo-olean-18-en-28-óico, e ácido 3-oxo-cicloart-24E-en-26-óico foram isolados do extrato hexano das folhas de *Croton betulaster*, uma espécie do nordeste brasileiro (BARBOSA et al., 2003). O triterpeno AAA foi isolado de diversas espécies de *Croton* nativas do Brasil, como *C. cajucara* (MACIEL, et al., 2000; SAN GIL et al., 2008; MACIEL et al., 1998), *C. urucurana* (PERES et al., 1997; PERES et al., 1998 a, b) e *C. palanostigma* (BRASIL et al., 2010). Os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, lupeol e hop-22(29)-en-3 $\beta$ -ol foram encontrados nos brotos de *C. hieronymi*, uma espécie nativa do noroeste da Argentina (CATALÁN et al., 2003). De *C. pullei*, um cipó que cresce em outras árvores encontradas na Amazônia brasileira, o triterpeno lupeol também foi isolado (ABREU et al., 2001; BARBOSA et al., 2007).

Além de terpenoides (ADELEKAN et al., 2008; SANTOS et al., 2009; YANG et al., 2009; MARTINSEN et al., 2010; MOTTA et al., 2011), flavonoides podem também ser encontrados. Zou et al. (2010) detectaram dez flavonoides, isolados dos caules de *Croton caudatus*: crotoncaudatina, 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona, tangeretina, nobiletina, 5,6,7,4'-tetrametoxi-flavone, sinensetina, kaempferol, tilirosida, kaempferol-3-O-rutinosida e rutina. O flavonoide canferol-3-O-(6''-O-*p*-cumaroil)- $\beta$ -D-glicopiranosose, comumente conhecido como tilirosídeo, foi isolado do extrato etanólico das partes aéreas de *Croton gnaphalii* (LENCINA et al., 2001). Do extrato butanólico de *Croton campestris*, espécie encontrada no nordeste e sudeste brasileiro, foram isolados os flavonoides 3-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-galactopiranosil quercetina, 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil quercetina, 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil quercetina e 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil quercetina (SANTOS; SCHRIPEMA; KUSTER, 2005).

### 2.3.2.1.1 *Croton antisiphiliticus*

A espécie *Croton antisiphiliticus* Martius (Figura 02, a) é citada na literatura como planta medicinal (RODRIGUES et al., 2002; PEREIRA et al., 2007). É conhecida no planalto central brasileiro como pé-de-perdiz, perna de perdiz, canela de perdiz e curraleira, e utilizada para o tratamento de úlceras, eczemas, como anti-inflamatório, depurativo do sangue e anti-sifilítico (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Além destes usos, Botrel et al. (2006) verificaram que a

população de Ingaí, Minas Gerais – BR utiliza a espécie *Croton antisiphiliticus* para tratamento de infecções de útero e ovário. Extratos etanólicos de *Croton antisiphiliticus*, também apresentaram atividade nematocida *in vitro* (SLOMP et al., 2009).

Serra et al. (2005) demonstraram que o extrato etanólico de *Croton antisiphiliticus* apresenta potencial inibidor contra a enzima conversora de angiotensina (ACE), o que se torna interessante como princípio terapêutico no tratamento de hipertensão. Todavia, os compostos responsáveis por esta atividade não foram isolados e identificados. Pereira et al. (2012) isolaram o diterpeno ácido *ent*-kaur-16-en-18-óico como componente majoritário do extrato clorofórmico das raízes de *C. antisiphiliticus*. O estudo avaliou ainda a atividade antimicrobiana do extrato bruto, das frações e do di terpeno isolado, mostrando uma CIM de 0,250 mg mL<sup>-1</sup> para o ácido *ent*-kaur-16-en-18-óico frente à *Staphylococcus aureus*, em comparação com o ácido kaurenóico, que apresentou uma CIM de 0,125 mg mL<sup>-1</sup>. A atividade citotóxica e apoptótica do epímero do ácido kaurenóico, um diterpeno do tipo kaurano, isolado de *Croton antisiphiliticus* foi avaliada frente à linhagens de células tumorais HeLa e B-16 e fibroblastos normais 3T3. Apesar do composto isolado não ter se mostrado seletivo entre células cancerígenas e normais, os resultados mostraram que o di terpeno isolado foi capaz de induzir a apoptose das células (FERNANDES et. al, 2013).

Os óleos voláteis de sete espécies vegetais de *Croton* foram analisados por CG/EM, entre elas *C. antisiphiliticus*. Os monoterpênos β-pineno (50,67%) e sabineno (49,33%) foram os componentes majoritários do óleo do caule, enquanto o sesquiterpeno elixeno (98%) foi o componente majoritário do óleo das folhas de *C. antisiphiliticus*. Além destes compostos, o monoterpêno α-pineno e o sesquiterpeno espatulenol também foram detectados. Os extratos hidroalcoólicos foram analisados por CLAE/EM para detecção de flavonoides. Os flavonoides vitexina, orientina e isoorientina foram identificados nas folhas, enquanto rutina, quercitrina e tilirosídeo foram encontrados tanto nas folhas como nos caules desta espécie vegetal. No extrato etanólico bruto analisado por CG/EM foi detectada a presença de grande diversidade de esteroides e terpenos (sitosterol, campesterol, estigmaesterol, α-amirina, β-amirina, estigmast-4-en-3-ona), fitol e ésteres metílicos de ácidos graxos, como éster metílico do ácido n-hexadecanóico e do ácido octadecanóico, principalmente nas folhas (MATOS, 2011).

### 2.3.2.1.2 *Croton heterodoxus*

Com relação à espécie *Croton heterodoxus* Baillon (Figura 02, b), podendo também ser encontrada como *Croton debilis* Müll. Arg. (TROPICOS, 2013), não foram encontrados na literatura, até o presente momento, estudos sobre seu uso na medicina popular bem como estudos fitoquímicos. Apenas estudos de levantamento de espécies vegetais como o de Ritter e Moro (2007), Caruzo e Cordeiro (2007) e Dalazoana, Silva e Moro (2007) foram encontrados.



Figura 02: (a) *Croton antisiphiliticus* e (b) *Croton heterodoxus*.

Dada a escassez de estudos com relação à espécie *Croton heterodoxus* e ao pequeno número de informações encontrados referentes à *Croton antisiphiliticus*, torna-se relevante o estudo fitoquímico e avaliação de suas possíveis atividades biológicas, uma vez que fazem parte do amplo e diverso gênero *Croton* e que, rotineiramente, diversas plantas são utilizadas pelas populações como medicinais, entre elas uma das espécies objeto deste estudo.

## 2.4 BIOSÍNTESE DE TERPENÓIDES E FLAVONOÍDES

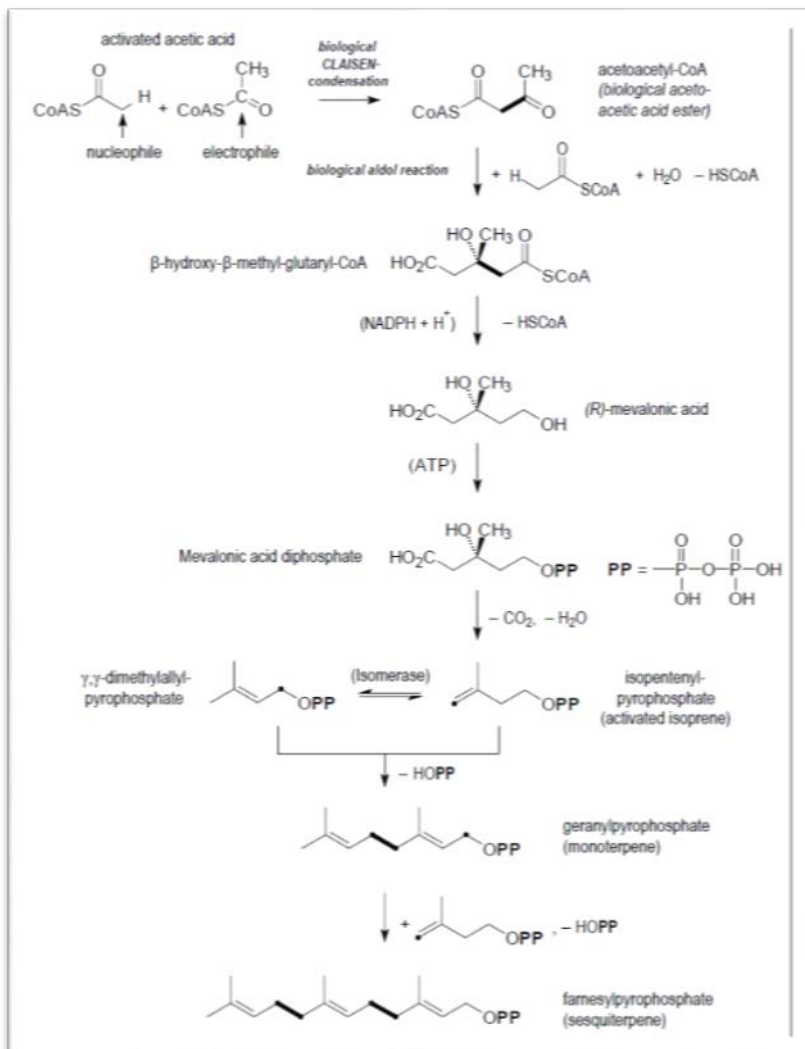
O gênero *Croton* apresenta uma grande diversidade de compostos, sendo que os terpenóides são frequentemente encontrados na maioria das espécies vegetais pertencentes ao gênero. Além de terpenóides, o gênero é bastante rico em flavonóides e compostos fenólicos em geral. Em síntese, pode-se afirmar que a origem dos metabólitos secundários nas espécies vegetais está no metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. Do ácido chiquímico formam-se os aminoácidos aromáticos precursores de grande parte dos metabólitos secundários aromáticos. Já



os derivados do acetato podem ser classificados de acordo com a via metabólica que seguem: derivados do acetato via ciclo do ácido cítrico, via mevalonato ou por produtos da condensação do acetato. Alguns metabólitos secundários podem ainda ser resultado da combinação de uma unidade de ácido chiquímico com uma ou mais unidades de acetato ou derivados, como por exemplo as antraquinonas, flavonoides e taninos condensados (SANTOS, 2003).

#### 2.4.1 Terpenoides

A acetil coenzima-A, também conhecida como ácido acético ativado, é o precursor biogenético dos terpenos. Duas moléculas de acetil-CoA se ligam para formar a acet oacetil-CoA em uma condensação de Claisen. A acetoacetil-CoA reage então com outra molécula de acetil-CoA atuando como nucleófilo em uma reação do tipo aldol para formar o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, seguido de uma redução enzimática com NADPH (dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo) na presença de água, dando origem ao (*R*)-ácido mevalônico. A fosforilação do ácido *R*-mevalônico por ATP (trifosfato de adenosina) origina o difosfato do ácido mevalônico que é descarboxilado e desidratado para formar o isopentenilpirofosfato (IPP), ou isopreno ativo, a unidade básica de formação dos terpenos. Posteriormente ocorre uma isomerização na presença de uma isomerase contendo grupos SH para formar o  $\gamma,\gamma$ -dimetilalilpirofosfato. O grupo  $\text{CH}_2$  alílico eletrofilico de  $\gamma,\gamma$ -dimetilalilpirofosfato e o grupo metileno nucleofilico de isopentenilpirofosfato se ligam para formar o geranylpirofosfato. A reação seguinte de geranyldifosfato com uma molécula de isopentenildifosfato forma o farnesildifosfato, um sesquiterpeno (Figura 03). Uma ligação cauda-cauda de duas moléculas de farnesilpirofosfato, que requer um NADPH, leva ao esqualeno, precursor dos triterpenos, Figura 03 (BREITMAIER, 2006).



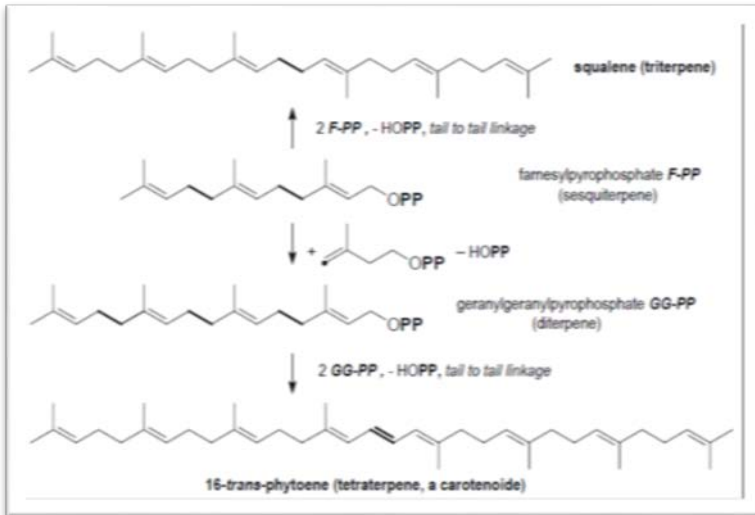


Figura 03: Biossíntese dos terpenos (Fonte: BREITMAIER, 2006).

Os triterpenos policíclicos podem ser originados a partir da ciclização do esqualeno ou do 2,3-epóxido esqualeno (WENDT et al., 2000; WENDT, 2005). O 2,3-epóxido esqualeno é formado no meio biológico através da epoxidação do esqualeno por uma enzima monoxigenase, que utiliza oxigênio molecular e a coenzima NADH, Fig. 04 (CAREY, 2000).

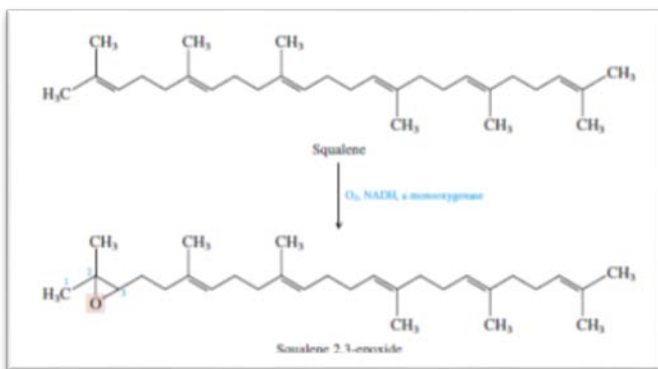


Figura 04: Epoxidação do esqualeno (Fonte: CAREY, 2000).

As poliolefinas são estereoseletivamente ciclizadas e rearranjadas em reações catalisadas enzimaticamente para formar os triterpenoides tetra e pentacíclicos, Figura 05. As enzimas esqualeno hopeno ciclase e oxidoesqualeno lanosterol ciclase são responsáveis pela ciclização do esqualeno e do 2,3-epóxido esqualeno, respectivamente, originando triterpenoides de vários tipos de esqueleto, além de precursores dos esteroides (WENDT et al., 2000).

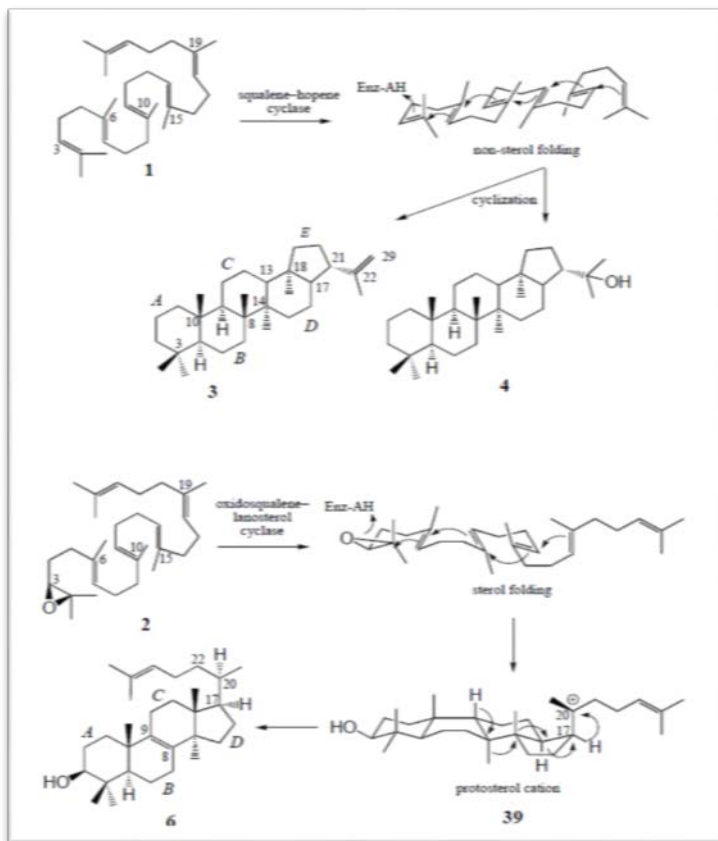


Figura 05: Ciclização do esqualeno e do 2,3-epóxido esqualeno para formação dos triterpenos policíclicos (Fonte: WENDT et al., 2000).

A ciclização enzimática do esqualeno ou do 2,3-epóxido esqualeno para formar triterpenos policíclicos é até hoje de grande

interesse para a ciência dos produtos naturais e incompletamente compreendida (WENDT et al., 2000).

#### 2.4.2 Flavonoides

Os flavonoides são originados nas plantas a partir de cinamoil-CoA e malonil-CoA, formando um policetídeo que, de acordo com a enzima envolvida na etapa posterior, pode seguir por dois diferentes caminhos: reações do tipo aldol ou Claisen. As enzimas estilbeno sintase e chalcona sintase ligam uma molécula de cinamoil-CoA com três moléculas de malonil-CoA, originando os estilbenos como o resveratrol, ou as chalconas como a naringenina-chalcona, respectivamente. As chalconas atuam como precursoras de um grande número de flavonoides. A maioria contém um anel heterocíclico de seis membros formado pelo ataque nucleofílico tipo Michael de um grupo fenol sobre a cetona insaturada, formando uma flavanona, como a naringenina, Figura 06. Em condições ácidas a flavanona é favorecida, e em condições básicas a chalcona. Porém, na natureza a reação é estereoespecífica e catalisada enzimaticamente, resultando na formação de apenas um enantiômero da flavanona. As flavanonas podem então originar muitos derivados deste esqueleto básico, como flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas, Figura 07. Modificações nos padrões de hidroxilação dos dois anéis aromáticos podem ocorrer, assim como reações de metilação, glicosilação e dimetilalilação, aumentando assim a gama de compostos que podem ser encontrados na natureza (DEWICK, 2002).

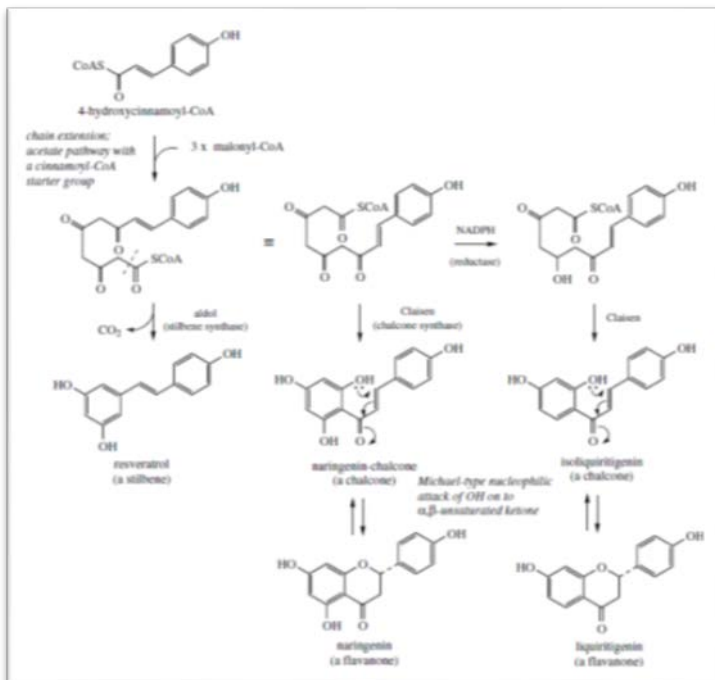


Figura 06: Biossíntese dos flavonoides (Fonte: DEWICK, 2002).

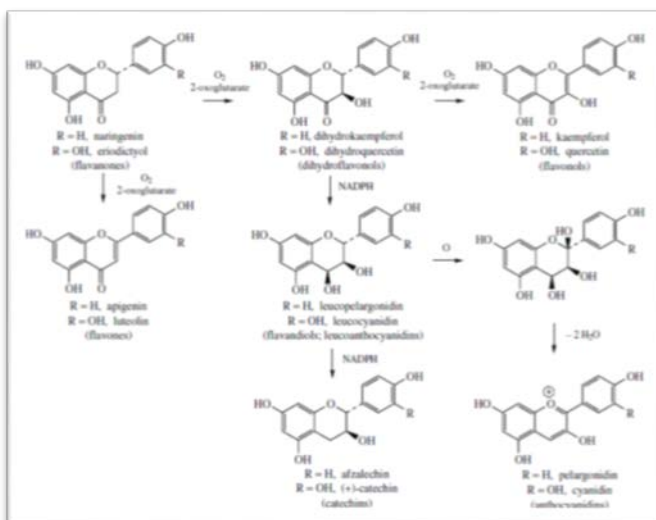


Figura 07: Biossíntese dos flavonoides, continuação (Fonte: DEWICK, 2002).

## 2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 2.5.1 Ensaio antioxidantes

O estresse oxidativo está relacionado com diversos estados patológicos, como arteriosclerose, processos inflamatórias, certos tipos de câncer e o envelhecimento (YOUNG; WOODSIDE, 2001). O conhecimento dos processos dependentes de espécies reativas é essencial para compreender sua ação na fisiopatologia dessas e de outras doenças (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999). Os antioxidantes previnem a formação de radicais livres consumindo-os ou promovendo a sua decomposição, evitando desta forma o dano produzido aos tecidos por estes radicais (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Desta forma, ensaios que avaliem a capacidade antioxidante de diferentes compostos podem revelar novos antioxidantes que auxiliem no combate ao estresse oxidativo.

A atividade antioxidante de extratos, frações e compostos isolados de espécies vegetais pode ser avaliada por meio de diferentes ensaios, escolhidos de acordo com as características das amostras em estudo. Os ensaios a seguir aplicados a este trabalho são de uso rotineiro em laboratórios de produtos naturais.

#### 2.5.1.1 Conteúdo de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos estão presentes nas espécies vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas, podendo também se apresentarem na forma de polímeros como taninos condensados e ligninas. Fazem parte deste grupo de compostos os fenóis simples, os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, taninos, ligninas, flavonoides e derivados, ácidos fenólicos e cumarinas (SOARES, 2002). De maneira geral, existe uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico de espécies vegetais e a atividade antioxidante, porém, esta correlação algumas vezes é contraditória. Enquanto alguns autores (XI; SHOUQIN, 2007; BENZIE; SZETO, 1999; ZARDO et al., 2009; ROESLER et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2007; BERETTA et al., 2005) observaram uma alta correlação entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante, Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008) encontraram a menor atividade sequestrante de radicais DPPH para um tipo de *C. quinoa* que apresentou o maior conteúdo fenólico. Segundo Roesler et al. (2007), a correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante pode

dependem do método escolhido e também das características hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema teste e dos antioxidantes testados. Segundo Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008), os baixos valores de correlação entre o total fenólico e a atividade antioxidante sugerem que os principais compostos antioxidantes dos sistemas de *Chenopodium quinoa* e *Amaranthus* spp. estudados podem ser não-fenólicos, como ácido ascórbico, ácido fítico, tocoferóis, esteróis, carotenóides e saponinas. Desta forma, é importante que os resultados de ensaios antioxidantes determinados a partir de diferentes métodos sejam interpretados com cautela (NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008).

### **2.5.1.2 Conteúdo de flavonoides**

Nas plantas, os flavonoides apresentam diversas funções, entre elas, pode-se citar a proteção contra raios ultravioleta e microrganismos patogênicos, ação antioxidante e alelopática, e inibição enzimática. A atividade antioxidante dos flavonoides é consequência das suas propriedades de óxido-redução. Eles apresentam estruturas químicas de anéis conjugados, ricas em grupos hidroxilas, que tem potenciais ações antioxidantes por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singleto, radicais peróxido e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (MACHADO et al., 2008). Grandes quantidades de flavonoides são consumidos diariamente na nossa dieta vegetal, não apresentando efeitos adversos significativos para o homem. Pelo contrário, os flavonoides são benéficos à saúde atuando como antioxidantes e prevenindo contra doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e degeneração de componentes celulares (DEWICK, 2002).

### **2.5.1.3 Ação sequestradora de radicais livres DPPH**

A produção de radicais livres ocorre continuamente em todas as células do organismo como parte do metabolismo normal. Todavia o excesso na produção de radicais livres originados de fontes endógenas ou exógenas pode estar relacionado com diversas doenças. Além do sistema de defesa natural do organismo contra os radicais livres, os antioxidantes da dieta encontrados naturalmente nos alimentos representam importantes componentes de defesa para o organismo. Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas do substrato



oxidável, diminui significativamente ou inibe a oxidação do substrato (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

O ensaio do DPPH é uma metodologia simples, rápida e sensível (ROESLER et al., 2007), e estável à temperatura ambiente, evitando desta forma a degradação térmica das substâncias (PETERSON, 2001). Os ensaios são baseados na transferência de elétrons de uma molécula doadora ao referido radical. O radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável e é difícilmente oxidado. Devido ao seu elétron desemparelhado, o DPPH mostra uma forte banda de absorção em 517 nm e suas soluções apresentam coloração violeta intenso. Com o emparelhamento dos elétrons, a absorção desaparece e a descoloração resultante é estequiométrica com o respectivo número de elétrons recebidos (Figura 08) (BLOIS, 1958).

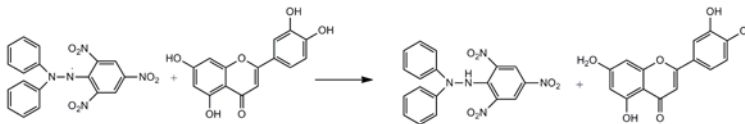


Figura 08: Estabilização do radical livre DPPH na presença de um flavonoide.

#### 2.5.1.4 Potencial redutor do íon férrico

A peroxidação lipídica pode ser influenciada por diversos fatores que agem cataliticamente neste processo como luz, temperatura, íons metálicos, radicais livres e pH (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). O potencial redutor de uma amostra indica a presença de compostos doadores de elétrons capazes de reagir com radicais livres a fim de convertê-los a produtos mais estáveis e finalizar a reação radicalar em cadeia ou reduzir íons metálicos, catalisadores da peroxidação lipídica (YEN; CHEN, 1995). O método utilizado para a determinação do potencial redutor baseia-se no fato de que redutores presentes nas amostras analisadas são oxidadas enquanto os íons férricos, adicionados à solução na forma de  $\text{FeCl}_3$ , são reduzidos para íons ferrosos, e detectados a partir da formação de um complexo azul ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) com o reagente ferricianeto de potássio, a 720 nm (WATERMAN; MOLE, 1994).

### 2.5.1.5 Inibição da peroxidação lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERM (Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio), porém a membrana é um dos mais atingidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) devido a grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999). A fluidez da membrana está relacionada diretamente à presença de cadeias insaturadas dos fosfolípidios e do colesterol, e danos a esta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. O ataque de algumas ERM abstrai um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, iniciando desta forma o processo de peroxidação lipídica (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (LIMA; ABDALLA, 2001). A reação inicia-se com o sequestro de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado da membrana celular pelos radicais hidroxila ou alcóxila, com conseqüente formação do radical lipídico. Na primeira equação de propagação, o radical lipídico reage rapidamente com o O<sub>2</sub>, resultando no radical peróxila, que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o radical lipídico na segunda equação de propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais lipídico e peróxila produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

### 2.5.2 Toxicidade frente à *Artemia salina*

*Artemia salina* Leach, de acordo com conhecimento popular, é um microcrustáceo de água salgada comumente utilizado como alimento para peixes ornamentais por não apresentar carapaça rígida e ser rico em proteínas. O bioensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* é um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo, sendo de uso rotineiro em laboratórios de pesquisa de produtos naturais (MEYER et al., 1982).

A toxicidade frente à *Artemia salina* pode ser correlacionada com diversas atividades biológicas, como atividade larvicida (LUNA et al., 2005) e moluscicida (SILVA et al., 2007). A baixa toxicidade frente à *Artemia salina* pode também ser interessante em alguns casos, como em ensaios de atividade antiulcerogênica, mostrando que os extratos analisados podem ser utilizados devido à sua ação gastroprotetora e

atóxica (MOTA et al., 2008). Desta forma, o ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* configura-se como um ensaio preliminar de atividade biológica, que além de avaliar a toxicidade geral de extratos também fornece a oportunidade de monitorar e selecionar extratos bioativos para o fracionamento inicial e posteriores estudos farmacológicos (COSTA et al., 2009; ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010).

### 2.5.3 Inibição da enzima acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE) catalisa a hidrólise da ligação éster da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor que participa dos processos cognitivos e de memória, exercendo uma função essencial como enzima regulatória dos eventos fisiológicos promovidos por este neurotransmissor. A Doença de Alzheimer (DA), associada com a disfunção da neurotransmissão colinérgica, é uma patologia neurodegenerativa progressiva, que afeta principalmente a população idosa e é responsável por 50-60% dos casos de demência em pessoas com mais de 65 anos de idade. Os principais sintomas associados a DA envolvem deficiência orgânica cognitiva, principalmente perda de memória. Uma das formas de tratar a doença é aumentar o nível de ACh na fenda sináptica usando inibidores da AChE. Estes inibidores podem interagir com o sistema colinérgico central para melhorar os déficits de memória e cognitivos de pacientes pela diminuição da hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica no cérebro (BARBOSA FILHO et al., 2006). Diversos inibidores da AChE estão disponíveis no mercado, como tacrina (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) e, por último, a galantamina (Reminyl®), um produto natural. Todavia, tais fármacos podem apresentar alguns efeitos colaterais, além de possuírem elevado custo (VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

### 2.5.4 Atividade antibacteriana

A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial, mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

O desenvolvimento da resistência bacteriana observada nos últimos anos é uma consequência do uso indiscriminado de

antimicrobianos com espectro maior do que necessário, apesar da diversidade de mecanismos de ação destes antimicrobianos; o esquema posológico inadequado e o tempo prolongado do tratamento com antibióticos (HOEFEL; LAUTERT, 2006; OLIVEIRA; SILVA, 2008). Uma vez observada a resistência ao antibiótico, faz-se necessário o uso de outras alternativas para combater os microrganismos, que frequentemente estão associadas a maior toxicidade para os pacientes (HOEFEL; LAUTERT, 2006). Todavia, estudos mostram que a utilização de extratos vegetais ou fitofármacos em pequenas concentrações, associados à antibióticos, podem potencializar a ação de fármacos já ineficazes sobre algumas bactérias resistentes. A eficácia da utilização de pequenas quantidades de extratos vegetais associadas à antibióticos é um efeito interessante, uma vez que pode minimizar possíveis efeitos tóxicos. Extratos vegetais apresentam grande potencial antimicrobiano contra diversos microrganismos; desta forma, estudos sobre o uso terapêutico das plantas, seja em sua ação individual ou em baixas concentrações associadas à antibióticos, sobre bactérias, devem ser intensificados. Vale lembrar que estudos de toxicidade *in vivo* devem ser realizados para o propósito do desenvolvimento de novos fármacos (NASCIMENTO et al., 2000).

### 2.5.5 Atividade antifúngica

Nas últimas décadas foi observado um aumento drástico de casos severos de infecção fúngica devido ao aumento da população imunocomprometida, principalmente resultantes de transplantes de órgãos, tratamento de câncer e infecção HIV (LIN, 2009; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010). Candidoses são as micoses emergentes com maior efeito, devido a sua frequência e gravidade de suas complicações (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010). Meningites criptocócicas, causadas por *Cryptococcus neoformans*, são observadas na maioria dos pacientes imunocomprometidos e são responsáveis pela morte de cerca de 624.000 pessoas por ano. Representam, ainda, o principal fator de mortalidade em pacientes com AIDS (LIN, 2009). *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo de ocorrência na América Central e do Sul, é responsável pela Paracoccidioidomicose (PCM), uma infecção pulmonar caracterizada por lesões cutâneas e de mucosas, que afeta 10 milhões de pessoas na América Latina (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; LORTHOLARY; DENNING; DUPONT, 1999). Os fármacos mais comumente utilizados para tratamento de pacientes com PCM são sulfonamidas, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, todavia, longos

períodos de tratamento podem representar um aumento na toxicidade e custo do tratamento (PANIAGO et al., 2003; TRAVASSOS; TABORDA; COLOMBO, 2008).

Infelizmente, poucas classes de antifúngicos estão atualmente disponíveis, os quais apresentam lacunas em seu espectro de ação ou são tóxicos para o homem (LIN, 2009). Um novo desafio no tratamento de micoses consiste no desenvolvimento de resistência apresentada pelos microrganismos aos agentes antifúngicos, principalmente ao fluconazol e itraconazol (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

Em virtude do aumento e da gravidade das infecções fúngicas, e dos efeitos colaterais dos fármacos utilizados para o tratamento, a pesquisa por novos agentes antifúngicos tem se intensificado nos últimos anos. Estudos mostram que diferentes espécies vegetais atuam como importantes inibidores de leveduras patogênicas como as do gênero *Candida* (LIMA et al., 2006) e criptococose causadas por *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* (PASSOS et al., 2002).

#### 2.5.6 Citotoxicidade

O crescimento desordenado (anormal) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo é conhecido como câncer. A metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer. Estas células que se dividem e se multiplicam rapidamente são incontroláveis e agressivas, originando a formação de tumores ou neoplasias malignas, como atualmente é conhecido. O câncer se forma a partir de uma única célula. A transformação de uma célula normal numa célula cancerosa é um processo de múltiplos estágios, geralmente uma progressão de uma lesão pré-cancerosa a um tumor maligno, como resultado da interação entre fatores genéticos da pessoa e três categorias de agentes externos: carcinógenos físicos (radiação ultravioleta e ionizante), químicos (amianto, componentes da fumaça do tabaco, aflatoxina e arsênico) e carcinógenos biológicos (infecções por alguns tipos de vírus, bactérias ou parasitas). O uso de álcool e cigarro, a ausência de uma dieta alimentar saudável e a falta de atividade física são os principais fatores de risco do câncer ao redor do mundo (OMS, 2013). O câncer pode ter início em diferentes células do corpo. Quando ocorre em tecidos epiteliais como pele ou mucosas, é denominado carcinoma. Em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma (INCA, 2013).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva, no Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer. Os tumores mais incidentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão o câncer de próstata (60 mil) e de pulmão (17 mil) para o sexo masculino, mama (53 mil) e colo do útero (18 mil) para o sexo feminino. A distribuição dos novos casos de câncer entre homens e mulheres no Brasil pode ser observada na representação espacial da Figura 09.

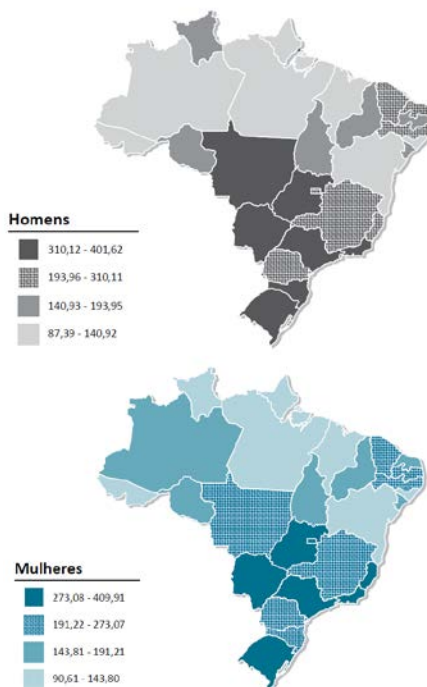


Figura 09: Representação espacial das taxas brutas da incidência de câncer por 100 mil habitantes no Brasil, para homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012/2013. (Fonte: INCA 2013).

O câncer da mama é o tipo de câncer que mais atinge as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Em 2012-2013, esperam-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. A idade é o principal fator de risco para

esta neoplasia, sendo que as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. Outros fatores de risco como aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), história familiar de câncer da mama, alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) e exposição à radiação ionizante também estão relacionados ao câncer de mama.

O câncer tem se tornado um problema de saúde pública mundial nas últimas décadas devido à precariedade no tratamento, gravidade dos casos e das estimativas assustadoras para a incidência de casos de câncer nos próximos anos. A exemplo do taxol, importante agente utilizado no tratamento de câncer e isolado primeiramente de *Taxus brevifolia*, produtos naturais são uma rica fonte de pesquisa de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (CORRÊA, 1995; CRAGG, 1998).

#### 2.5.7 Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório é uma tentativa do organismo de se defender de qualquer agressão externa, que envolve um conjunto de reações celulares do sistema imunológico e vascular. Está associado a várias doenças de origem infecciosa ou ao sistema imunológico (NEWTON; DIXIT, 2012). Contudo, quando esta resposta se torna exacerbada, pode lesionar severamente o tecido causando disfunção do órgão envolvido neste processo (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os sinais visíveis característicos da inflamação são rubor, calor, edema e dor. Além de eventos celulares como migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e mononucleares e fagocitose (GILROY et al., 2004; PHILLIPSON; KUBES, 2011; SHI; PAMER, 2011). Juntamente com a migração de leucócitos para o local da inflamação, ocorre a passagem de proteínas plasmáticas, dando origem ao edema ou inchaço do local (POBER; SESSA, 2007).

A inflamação pode ser dividida em aguda e crônica, dependendo do tempo de duração dos eventos relacionados ao processo inflamatório e características patológicas (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A inflamação aguda compreende algumas horas até dias e é caracterizada pelo aparecimento dos sinais clínicos como vermelhidão, calor e formação do edema (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY,

2004; LAWRENCE; GILROY, 2007; NEWTON; DIXIT, 2012). A inflamação crônica tem duração prolongada, estendendo-se de semanas a meses (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004), e caracteriza-se por processo inflamatório ativo com tentativas seguidas de reparo dos tecidos lesionados (GILROY et al., 2004).

A inflamação pleural ou pleurisia pode ser reproduzida experimentalmente em roedores através da administração de agentes pró-inflamatórios na cavidade pleural, como a carragenina, extraída de algas marinhas, que uma vez administrada desencadeia eventos característicos do processo inflamatório (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; MOORE, 2003; MOORE; AYOUB; SEED, 2010). Este modelo experimental reproduz os eventos principais da inflamação aguda de forma similar à humana (JANTZ, ANTONY, 2008; MOORE; AYOUB; SEED, 2010), sendo útil para investigar o papel dos mediadores e vias envolvidas na inflamação e os efeitos anti-inflamatórios de novos agentes terapêuticos (MOORE, 2003; MOORE; AYOUB; SEED, 2010).

#### 2.5.8 Atividade anti-hiperglicêmica

O diabetes mellitus é uma doença que ocorre quando o organismo deixa de produzir insulina ou quando esta deixa de atuar de forma eficaz. Como consequência, há o aumento da taxa de glicose no sangue, o que é conhecido como hiperglicemia (BRASIL, 2013).

Há três tipos de diabetes: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e diabetes gestacional. No diabetes tipo 1, conhecido como diabetes insulino dependente, a produção de insulina do pâncreas é insuficiente, sendo necessário que os portadores deste tipo de diabetes administrem injeções diárias de insulina para manter a glicose no sangue em valores normais. É mais comum em crianças, adolescentes ou adultos jovens. Diabetes tipo 2, ou não insulino dependente, corresponde a 90% dos casos de diabetes. Ocorre geralmente em pessoas obesas com mais de 40 anos de idade embora também seja comum em pessoas com maus hábitos alimentares, sedentarismo e estresse. O terceiro tipo, o diabetes gestacional, pode ser observado pela elevação da glicose no sangue durante a gravidez, o que geralmente é normalizado após o parto. No entanto as mulheres que apresentam ou apresentaram diabetes gestacional, possuem maior risco de desenvolverem diabetes tipo 2 tardiamente, o mesmo ocorrendo com os filhos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013).



O diabetes é uma epidemia que já afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo. Até 2025, a previsão é de que esse número chegue a 380 milhões. A doença apresenta altos índices de novos casos e mortalidade, que além do impacto social, representa um elevado custo financeiro para os sistemas de saúde (BRASIL, 2013).

### 2.5.9 Atividade antinociceptiva

A dor é um dos sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia corporal, sendo um sintoma clinicamente importante para detecção e aviação de diversas doenças no homem (WALL, 1999; LOESER; TREEDE, 2008). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008).

A percepção da dor é complexa, pois é influenciada por fatores fisiológicos e psicológicos, sendo, portanto, avaliada em animais de forma indireta. O componente fisiológico da dor é conhecido como nociceção, que pode ser então avaliado em modelos animais após o estímulo nociceptivo (JULIUS; BASBAUM, 2001; TJØLSEN; HOLE, 1997).

Os nociceptores, receptores dos estímulos nociceptivos localizados na epiderme são sensíveis a diferentes estímulos que podem ser térmicos, mecânicos ou químicos (BESSON; CHAOUCH, 1987; DRAY, 1997; BESSON, 1999; KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003; MILLAN, 1999), sendo a duração do evento de ativação destes nociceptores o fator determinante para a dor ser chamada de aguda ou crônica. Na dor aguda, a ativação dos nociceptores ocorre em resposta a alguma lesão tecidual. Se a dor persistir mais que alguns dias ou semanas, então passa a ser considerada como dor crônica (LOESER; MELZACK, 1999).

Atualmente, a indústria farmacêutica conta com um número crescente de princípios ativos isolados de plantas medicinais para elucidação e tratamento de diversas doenças. Desta forma, a pesquisa e a busca de novos compostos com interesse terapêutico a partir dos recursos naturais tem adquirido popularidade.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado das espécies *Croton antisiphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon. Isolar e caracterizar os metabólitos majoritários através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, respectivamente, e avaliar as atividades biológicas dos extratos, frações e compostos isolados através de diversos ensaios.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar as espécies para o estudo na região dos Campos Gerais, Ponta Grossa – PR – BR e realizar a identificação botânica.
- Obter e fracionar os extratos brutos das espécies selecionadas.
- Isolar, através de métodos cromatográficos, metabólitos secundários presentes nas espécies selecionadas.
- Identificar os metabólitos isolados através das técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio, na região do infravermelho e espectrometria de massas.
- Identificar os metabólitos presentes nos extratos e frações através da técnica de eletroforese capilar.
- Analisar alguns dos compostos isolados através de cristalografia de raios-X.
- Avaliar os parâmetros relacionados à atividade antioxidante tais como conteúdo fenólico, teor de flavonoides, potencial redutor do íon férrico, inibição da peroxidação lipídica e ensaio de DPPH dos extratos, frações e compostos isolados das duas espécies vegetais.
- Correlacionar os resultados dos ensaios antioxidantes ao conteúdo de compostos fenólicos e teor de flavonoides presentes nos extratos vegetais e frações.
- Avaliar a toxicidade dos extratos e frações das duas espécies vegetais através do teste de letalidade utilizando larvas de *Artemia salina*.
- Avaliar o potencial inibitório frente à enzima acetilcolinesterase dos extratos, frações e compostos isolados das espécies vegetais.

- Avaliar o potencial antimicrobiano através de testes antibacteriano e antifúngico dos extratos, frações e compostos isolados e identificar os compostos bioativos das duas espécies de *Croton* estudadas.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos, frações e compostos isolados das duas espécies vegetais frente à diferentes linhagens de células tumorais humanas.
- Avaliar os efeitos dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *Croton antisiphiliticus* em modelos *in vivo* de atividade anti-inflamatória e identificar os principais compostos responsáveis pela ação.
- Avaliar os efeitos de triterpenos bioativos isolados da espécie *Croton heterodoxus* em modelos *in vivo* de atividade anti-hiperglicêmica.
- Avaliar os efeitos de triterpenos bioativos isolados da espécie *Croton heterodoxus* em modelos *in vivo* de atividade antinociceptiva.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Materiais utilizados e equipamentos

Todos os solventes e reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico PA. O reagente de Folin-Ciocalteu, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e tween 80 (polioxietilenosorbitano monoleato), utilizados nos bioensaios foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os cistos de *Artemia salina* e o sal marinho foram adquiridos em lojas de aquário. A enzima acetilcolinesterase foi adquirida da Sigma na forma de pó liofilizado do peixe elétrico tipo VI-S.

Para o procedimento de isolamento e purificação dos compostos por cromatografia em coluna (CC) no modo gradiente de polaridade utilizou-se como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 mm (70-230 *mesh*) e para cromatografia em coluna relâmpago no modo isocrático, sílica gel 0,04 - 0,063 mm (230-400 *mesh*).

As frações e compostos obtidos foram analisados através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio recobertas com sílica gel 60 (5 a 40  $\mu\text{m}$ ) GF254, Merck, e 0,25 mm de espessura. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários reveladores: visualização sob lâmpada de UV 254 nm e 365 nm, revelação em câmara de iodo, revelação com reagente cloreto férrico 5% e com reagente anisaldeído-sulfúrico (ácido sulfúrico concentrado, ácido acético glacial e anisaldeído 5:1:5 v/v/v em etanol) seguido de aquecimento a 110° C. Para evaporação dos solventes utilizou-se um evaporador rotatório Fisatom-802; (Fisatom) sob pressão reduzida (460 mm Hg; Vacuum Q-355A2; Quimis).

Para determinação dos pontos de fusão dos compostos isolados, utilizou-se um aparelho digital Micro Química MQA PF – 301. Este equipamento é provido de lupa para a visualização da fusão da amostra e uma chapa aquecida, sobre o qual é colocada a amostra entre a lâmina e lamínula.

Para a obtenção dos espectros dos compostos isolados na região do infravermelho (IV), utilizou-se o espectrômetro Perkin Elmer FTIR

16 PC, com as amostras preparadas em pastilhas de KBr, grau espectroscópico, sendo os valores registrados de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Varian AS-400, operando em 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . As amostras foram dissolvidas em metanol, clorofórmio, dimetilsulfóxido e piridina deuterados, de acordo com a solubilidade, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em valores adimensionais, a constante de acoplamento  $J$  em Hz, e a multiplicidade dos sinais foram indicadas como s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto e m = multiplete.

Para a espectroscopia na região do ultravioleta utilizou-se o aparelho espectrofotômetro da Perkin Elmer UV-VIS, com varredura entre 300 e 700 nm e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

As análises de eletroforese capilar foram realizadas em um equipamento HP $^{3\text{D}}$ CE (Agilent Technologies), equipado com um detector UV de arranjo de diodo, ajustado em 390 nm. A aquisição dos dados foi realizada com o software HP Chem Station, rev. B.04.03. A cela do capilar foi ajustada para 25° C em todos os experimentos. As análises ESI-Q-TOFMS foram realizadas em um espectrômetro de massas micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics Inc.) equipado com uma bomba de seringa automática para injeção da amostra (KD Scientific). Os dados foram processados utilizando o software Bruker Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics Inc.). As análises de CLAE foram realizadas utilizando um equipamento Shimadzu (Shimadzu Corporation) com detector UV/vis SPD-10AV-VP (monitorando a 280 nm), um injetor manual e software Shimadzu Class-VP.

#### 4.1.2 Material vegetal

A espécie *Croton antisiphiliticus* Martius foi coletada na Usina São Jorge, de coordenadas UTM 594048 e 7231888 (Figura 10, a), e a espécie *Croton heterodoxus* Baillon no Abrigo Rio Pitangui sob as coordenadas UTM 593095 e 7231847 (Figura 10, b), na região dos Campos Gerais, no município de Ponta Grossa, Paraná – BR, nos meses de abril, junho e novembro de 2010, e abril de 2011 em parceria com o projeto "Identificação de espécies para restauração de ecossistemas impactados pela silvicultura no entorno do manancial de Alagados", sob a coordenação de Rosemeri Segecin Moro, da Universidade Estadual de Ponta Grossa. As espécies foram coletadas por comparação com

exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, indexado no Index Kewensis como HUPG, com tombos de número 1576 para *C. antisiphiliticus* e 11759 para *C. heterodoxus*. As espécies coletadas foram identificadas pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, por comparação com exsicatas já depositadas no herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina, no Departamento de Botânica, com códigos FLOR 37688 e FLOR 37689, respectivamente.

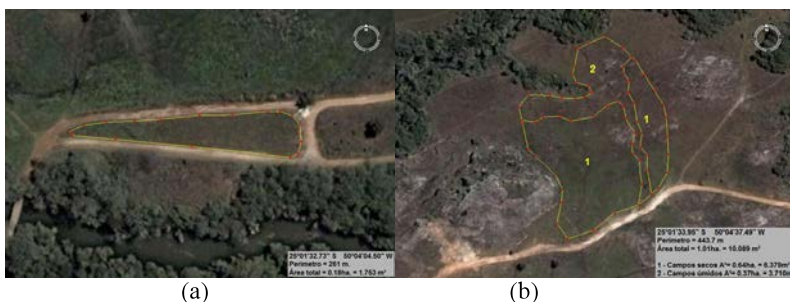


Figura 10. Pontos de coleta das espécies vegetais no entorno do manancial de Alagados, Ponta Grossa – PR – BR. (a) Usina São Jorge e (b) Abrigo Rio Pitangui.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparação dos extratos vegetais

O material vegetal (folhas e caules de *C. antisiphiliticus* e *C. heterodoxus*), após coleta e identificação, foi seco em estufa com circulação de ar a 50° C. Após a secagem, as folhas foram separadas dos caules e trituradas em liquidificador comum devidamente limpo e seco, e submetido ao procedimento de maceração em etanol hidratado 96% durante sete dias. Os caules foram cortados manualmente em partes menores e submetidos à maceração também em etanol hidratado 96% durante sete dias. Os extratos totais das partes aéreas das duas espécies foram preparados da mesma maneira. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado sob vácuo em rota-evaporador (à temperatura de 60° C) até 1/3 do volume inicial. O solvente evaporado foi recuperado e posteriormente reutilizado para nova maceração. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes durante sete dias para as folhas, e por mais quatro vezes durante sete dias para os caules,

resultando no Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBH) das Folhas e Extrato Bruto Hidroalcoólico dos Caules, respectivamente, para *C. heterodoxus* e *C. antisiphiliticus*. Além dos extratos citados anteriormente, preparouse também o Extrato Bruto Aquoso (EBW) Total de *C. antisiphiliticus*. As partes aéreas de *C. antisiphiliticus* (2051,0 g) secas e trituradas foram submetidas à extração com etanol a 96% durante o período total de 21 dias, sendo removido o etanol a cada 7 dias. O extrato bruto hidroalcoólico obtido foi reservado. Em seguida, realizou-se nova extração com uma mistura etanol:H<sub>2</sub>O (1:1) durante sete dias. O Extrato Bruto Aquoso (EBW) foi então submetido ao fracionamento cromatográfico.

#### 4.2.2 Fracionamento cromatográfico

Os extratos brutos hidroalcoólicos (EBH) obtidos no procedimento anterior foram submetidos a um fracionamento por particionamento líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e água) resultando nas frações hexano, acetato de etila e aquosa, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 11. As frações obtidas foram submetidas a bioensaios e reservadas para posterior fracionamento cromatográfico. Devido às suas características, o extrato bruto aquoso (EBW) de *Croton antisiphiliticus* foi submetido diretamente ao fracionamento cromatográfico. As frações aquosas obtidas a partir dos EBH de *C. heterodoxus* e o EBW de *Croton antisiphiliticus* foram submetidos ao fracionamento cromatográfico com sílica gel desativada com 15% de água. Para cada 100 g de sílica, adicionaram-se 15 mL de água destilada que foi submetida, em balão de fundo redondo, à pressão reduzida com temperatura ambiente em evaporador rotatório para adsorção da água.

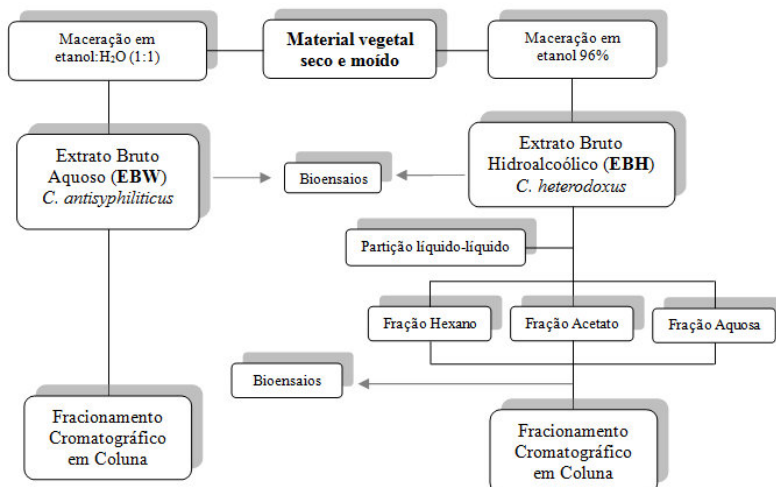


Figura 11: Obtenção e fracionamento dos extratos das espécies vegetais *C. antisiphiliticus* e *C. heterodoxus*.

#### 4.2.2.1 Separação cromatográfica das frações de *C. antisiphiliticus* e *C. heterodoxus*

As seguintes frações foram submetidas à cromatografia em coluna para separação dos compostos:

##### 4.2.2.1.1 Extrato Bruto Aquoso Total de *Croton antisiphiliticus* (CATW)

De 2051 g de planta obteve-se 157,17 g do extrato bruto total aquoso (EBW) de *C. antisiphiliticus*. Parte deste extrato (55 g) foi solubilizado em uma mistura etanol:água (1:1) e adsorvido em sílica, e em seguida submetido ao fracionamento cromatográfico em uma coluna de sílica gel 60 desativada com 15% de água. A pastilha foi preparada na proporção de 2:1 (sílica:fração). A coluna foi eluída com acetato de etila e quantidades crescentes de etanol (0-100%) e metanol, resultando em 46 frações (125 mL cada). As frações 2-3 (100% acetato de etila) foram reunidas e a pós sucessivas lavagens com acetato de etila forneceram 0,7865 g (1,43%) de quercetina (6) na forma de um fino sólido amarelo. As frações 12-24 (85:15 acetato de etila-etanol) foram reunidas e purificadas com acetato de etila, e forneceram 1,8205 g



(3,31%) de vitexina (**3**) também na forma de um fino sólido amarelo. As frações 45-47 (100% metanol) foram reunidas e purificadas com etanol, fornecendo 2,3265 g (4,23%) de ácido quínico (**5**) na forma de um fino sólido marrom claro.

**Vitexina (3)**: Pó amarelo; pf. >280° C; CCD Rf 0,8 (75:20:3:2 acetato de etila-H<sub>2</sub>O-ácido fórmico-ácido acético); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3380, 3261, 2961, 1652, 1612, 1363. RMN <sup>1</sup>H (Pir, ppm)  $\delta$  6,84 (s, H-3); 6,73 (s, H-6); 8,30 (d, H-2', H-6')  $J=8,30$  Hz; 7,30 (d, H-3', H-5')  $J=8,30$  Hz; 5,97 (d, H-1'')  $J=9,55$  Hz; 4,24 (*nd\**, H-3'', H-4'', H-5''); 4,57 (*nd\**, H-2'', H-6''); 13,97 (s, OH quelado). RMN <sup>13</sup>C (Pir, ppm)  $\delta$  162,4 (C-2); 103,4 (C-3); 183,3 (C-4); 165,1 (C-5); 99,4 (C-6); 164,8 (C-7); 106,3 (C-8); 157,5 (C-9); 105,5 (C-10); 122,7 (C-1'); 129,9 (C-2', C-6'); 117,1 (C-3', C-5'); 162,9 (C-4'); 75,7 (C-1''); 73,2 (C-2''); 81,0 (C-3''); 72,5 (C-4''); 83,7 (C-5''); 63,2 (C-6''). *nd\** não definido.

**Ácido Quínico (5)**: Pó marrom claro; pf 165,8-167,2° C; IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3412, 2926, 1612. RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C não resolvidos. HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z: calculado para C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 191.0561; encontrado, 191.0556.

**Quercetina (6)**: Pó amarelo; pf. >280° C; CCD Rf 0,5 (60:40 acetato de etila-hexano); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3413, 3295, 2924, 1664, 1610, 1261. RMN <sup>1</sup>H (Pir, ppm)  $\delta$  6,78 (d, H-6)  $J=2,34$  Hz; 6,75 (d, H-8)  $J=2,34$  Hz; 8,14 (dd, H-2')  $J=8,60$  e  $2,34$  Hz; 7,42 (d, H-3')  $J=8,60$  Hz; 8,66 (d, H-6')  $J=1,95$  Hz; 13,38 (s, OH quelado). RMN <sup>13</sup>C (Pir, ppm)  $\delta$  146,3 (C-2); 136,5 (C-3); 175,8 (C-4); 161,0 (C-5); 97,7 (C-6); 164,1 (C-7); 92,8 (C-8); 156,0 (C-9); 103,0 (C-10); 122,6 (C-1'); 121,6 (C-2'); 119,6 (C-3'); 147,9 (C-4'); 145,6 (C-5'); 115,2 (C-6').

#### 4.2.2.1.2 Fração Hexano dos Caules de *C. heterodoxus* (CHCH)

De 1628,5 g de caules obteve-se 152,51 g do extrato bruto dos caules. Este extrato foi submetido ao fracionamento líquido-líquido, resultando nas frações hexano, acetato de etila e aquosa.

Parte da fração hexano dos caules de *C. heterodoxus* (25 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60. A pastilha foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 2:1 (sílica:amostra) e a coluna foi eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila (0-100%), resultando em 155 frações de 125 mL cada. As frações 17-20 (85:15 hexano:AcOEt) foram reunidas e após sucessivas lavagens com AcOEt forneceram 1,1026 g de fern-

9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7) na forma de um fino sólido branco. Frações 24-25 (80:20 hexano:AcOEt) foram reunidas, lavadas com AcOEt e forneceram 0,6231 g de 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno (8) na forma de um fino sólido branco. As frações 37-40 (80:20 hexano:AcOEt) foram reunidas, lavadas com hexano e forneceram 0,6012 g de cristais em forma de agulhas de  $\beta$ -sitosterol (9). Frações 69-75 (70:30 hexano:AcOEt) foram reunidas, lavadas com AcOEt e forneceram 3,7428 g de fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10) inicialmente na forma de um fino sólido branco. Após recristalização em mistura de hexano AcOEt (70:30), obteve-se cristais adequados para análise por cristalografia de raios-X. As frações 115-116 (60:40 hexano:AcOEt) foram reunidas, lavadas com AcOEt e forneceram 1,6100 g de 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11) na forma de um fino sólido branco, que após recristalização em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> forneceu cristais adequados para análise por cristalografia de raios-X.

**Fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7):** Fino sólido branco; HRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z: calculado para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 463,3547; encontrado 463,3545. pf. 184,8-186,3°C; CCD Rf 0,63 (80:20 hexano-acetato de etila); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3500, 3431, 2971, 2958, 2944, 2877, 1709, 1644, 1472, 1389, 1379, 1002. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  2,64 (dd) *J*=12,89 e 6,25; 1,41 (m) (H-1); 4,59 (m) *J*=12,83 e 6,28 (H-2); 1,72 (m) (H-5); 1,76 (m) (H-6); 1,65 (m) (H-7); 2,07 (d) *J*=13,67 (H-8); 5,42 (dd) *J*=5,08 e 2,73 (H-11); 1,65 (d) *J*=2,34 (H-12); 1,25 (m) (H-15); 1,42 (m); 1,37 (m) (H-16); 1,55 (m) (H-18); 1,33 (m); 1,21 (m) (H-19); 1,79 (m) (H-20); 0,95 (d) *J*=9,96 (H-21); 1,42 (m) (H-22); 1,13 (s) (H-23); 1,18 (s) (H-24); 1,39 (s) (H-25); 0,76 (s) (H-26); 0,78 (s) (H-27); 0,75 (s) (H-28); 0,84 (d) *J*=6,44 (H-29); 0,90 (d) *J*=6,64 (H-30). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  49,7 (C-1); 69,3 (C-2); 216,4 (C-3); 37,6 (C-4); 47,2 (C-5); 17,5 (C-6); 19,0 (C-7); 39,6 (C-8); 148,4 (C-9); 47,1 (C-10); 117,5 (C-11); 36,5 (C-12); 38,2 (C-13); 36,7 (C-14); 29,2 (C-15); 36,0 (C-16); 42,8 (C-17); 51,8 (C-18); 20,0 (C-19); 28,1 (C-20); 59,5 (C-21); 30,7 (C-22); 24,1 (C-23); 21,6 (C-24); 25,1 (C-25); 15,3 (C-26); 15,8 (C-27); 13,9 (C-28); 22,9 (C-29); 22,0 (C-30).

**3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno (8):** Fino sólido branco (80:20 hexano:AcOEt); p.f. 244,5-252,3° C; CCD Rf 0,50 (80:20 hexano:AcOEt); MM 426,72 g mol<sup>-1</sup>. IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3422; 2917-2849; 1733cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  1,68 (m) (H-1); 0,95 (m) (H-2); 3,20 (dd) *J*=11,52 e 5,27 (H-3); 0,67 (m) (H-5); 1,68 (m) (H-6); 2,34 (m) (H-7); 1,25 (H-9); 2,12 (m) (H-11); 1,55 (m) (H-12); 1,22 (H-13);

1,38 (m) (H-15); 0,90 (m) (H-16); 0,65 (m) (H-17); 2,00 (m) (H-19); 1,43 (m) (H-20); 1,45 (m) (H-21); 1,03 (s) (H-23); 0,76 (s) (H-24); 0,79 (s) (H-25); 0,97 (s) (H-26); 0,94 (s) (H-27); 0,72 (s) (H-28); 4,78 (sl) (H-29); 1,75 (s) (H-30). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  38,8 (C-1); 31,9 (C-2); 79,0 (C-3); 29,4 (C-4); 55,1 (C-5); 18,4 (C-6); 33,3 (C-7); 41,7 (C-8); 50,3 (C-9); 37,1 (C-10); 21,0 (C-11); 22,7 (C-12); 49,4 (C-13); 42,0 (C-14); 33,6 (C-15); 21,6 (C-16); 54,8 (C-17); 44,8 (C-18); 41,9 (C-19); 23,9 (C-20); 46,4 (C-21); 148,7 (C-22); 28,0 (C-23); 16,7 (C-24); 14,1 (C-25); 16,1 (C-26); 16,6 (C-27); 15,8 (C-28); 110,1 (C-29); 25,0 (C-30).

***$\beta$ -sitosterol (9)***: Cristais em forma de agulha incolores (80:20 hexano:AcOEt); p.f. 124,0-129,7 $^\circ$  C; CCD Rf 0,36 (80:20 hexano:AcOEt). IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3427; 2960-2850; 1639. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  1,02 (s) (H-18); 1,26 (s) (H-19); 0,69 (s) (H-21); 0,85 (s) (H-26); 0,83 (s) (H-27); 0,81 (s) (H-29). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  37,2 (C-1); 31,6 (C-2); 71,8 (C-3); 42,3 (C-4); 140,7 (C-5); 121,7 (C-6); 31,9 (C-7); 31,9 (C-8); 50,1 (C-9); 36,5 (C-10); 21,1 (C-11); 39,8 (C-12); 42,3 (C-13); 56,8 (C-14); 24,3 (C-15); 28,2 (C-16); 56,0 (C-17); 12,0 (C-18); 19,8 (C-19); 36,1 (C-20); 18,8 (C-21); 33,9 (C-22); 26,0 (C-23); 45,8 (C-24); 29,1 (C-25); 19,4 (C-26); 19,0 (C-27); 23,0 (C-28); 11,8 (C-29).

***Fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10)***: Cristais incolores (70:30 hexano-acetato de etila); HRMS (ESI $^+$ ) m/z: calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 465,3703; encontrado 465,3704; pf. 167,3-172,8 $^\circ$ C; CCD Rf 0,46 (60:40 hexano-acetato de etila); IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3557, 3395, 2949, 2867, 1642, 1471, 1454, 1379, 1054. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  2,25 (dd)  $J=12,50$  e  $4,30$ ; 1,22 (m) (H-1); 3,69 (m)  $J=11,87$ ; 9,31 e 4,37 (H-2); 3,01 (d)  $J=9,37$  (H-3); 1,35 (m) (H-5); 0,79 (m) (H-6); 1,63 (m) (H-7); 2,08 (d)  $J=11,32$  (H-8); 5,35 (dd)  $J=5,27$  e  $2,73$  (H-11); 1,64 (m); 1,41 (m) (H-12); 1,29 (m) (H-15); 1,66 (m) (H-16); 1,54 (m) (H-18); 1,25 (m) (H-19); 1,05 (m) (H-20); 0,98 (d)  $J=9,57$  (H-21); 1,44 (m) (H-22); 1,01 (s) (H-23); 0,91 (s) (H-24); 1,14 (s) (H-25); 0,74 (s) (H-26); 0,81 (s) (H-27); 0,76 (s) (H-28); 0,84 (d)  $J=6,64$  (H-29); 0,89 (d)  $J=6,44$  (H-30). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  47,2 (C-1); 69,2 (C-2); 83,5 (C-3); 39,2 (C-4); 44,3 (C-5); 17,7 (C-6); 18,9 (C-7); 39,8 (C-8); 150,1 (C-9); 39,0 (C-10); 116,6 (C-11); 36,6 (C-12); 36,7 (C-13); 37,6 (C-14); 29,2 (C-15); 36,1 (C-16); 42,9 (C-17); 51,9 (C-18); 20,1 (C-19); 28,2 (C-20); 59,6 (C-21); 30,7 (C-22); 27,9 (C-23); 16,2 (C-24); 26,1 (C-25); 15,3 (C-26); 15,8 (C-27); 13,9 (C-28); 23,0 (C-29); 22,1 (C-30).

**2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11):** Cristais incolores (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); HRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z: calculado para C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 481,3652; encontrado 481,3651. pf. 243,6-244,4°C; CCD Rf 0,26 (40:60 hexano-acetato de etila); IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3461, 3376, 3323, 2972, 2943, 2915, 2877, 2857, 1644, 1462, 1379, 1056. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  2,05 (m); 0,94 (m) (H-1); 3,90 (m) (H-2); 3,20 (d)  $J=8,99$  (H-3); 0,96 (m) (H-5); 1,62 (m) (H-6); 1,40 (m); 0,87 (m) (H-7); 1,92 (m) (H-11); 5,19 (dd)  $J=3,95$  e  $3,13$  (H-12); 1,25 (m) (H-15); 0,80 (m) (H-16); 1,94 (m) (H-18); 1,66 (m); 1,11 (m) (H-19); 1,22 (m) (H-21); 1,23 (m); 1,40 (m) (H-22); 4,10 (d)  $J=11,33$ ; 3,40 (d)  $J=11,33$  (H-23); 1,30 (s) (H-24); 0,97 (s) (H-25); 0,94 (s) (H-26); 1,13 (s) (H-27); 0,83 (s) (H-28); 0,88 (s) (H-29); 0,87 (s) (H-30). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  46,4 (C-1); 69,1 (C-2); 85,4 (C-3); 43,2 (C-4); 55,8 (C-5); 18,4 (C-6); 32,7 (C-7); 39,8 (C-8); 47,7 (C-9); 38,1 (C-10); 23,8 (C-11); 121,3 (C-12); 145,2 (C-13); 41,7 (C-14); 26,0 (C-15); 26,8 (C-16); 32,4 (C-17); 47,1 (C-18); 46,7 (C-19); 31,1 (C-20); 34,7 (C-21); 37,1 (C-22); 65,6 (C-23); 22,9 (C-24); 17,4 (C-25); 16,7 (C-26); 26,0 (C-27); 28,4 (C-28); 33,3 (C-29); 23,6 (C-30).

#### 4.2.2.1.3 Fração Acetato de Etila dos Caules de *C. heterodoxus* (CHCA)

Parte da fração acetato de etila dos caules de *C. heterodoxus* (40 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60. A pastilha foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 2:1 (sílica:amostra) e eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila (0–100%) e etanol (0-100%) resultando em 200 frações de 125 mL cada. As frações 55-61 (80:20 hexano:AcOEt) foram reunidas e após sucessivas lavagens com AcOEt forneceram 0,6022 g de pachypodol (**12**) na forma de um fino sólido amarelo claro. As frações 146-150 (100% AcOEt) foram reunidas, lavadas com AcOEt e forneceram 0,1021 g de catequina (**13**) na forma de um fino sólido amarelado.

**Pachypodol (12):** Fino sólido amarelo claro (80:20 hexano:AcOEt); p.f. 198,8-202,1°C. IV (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3559, 3420, 2950, 1646, 1636, 1383. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  12,65 (s) (H-5); 6,38 (d)  $J=2,21$  (H-6); 6,46 (d)  $J=2,21$  (H-8); 7,71 (d)  $J=1,95$  (H-2'); 7,07 (d)  $J=8,24$  (H-5'); 7,67 (dd)  $J=8,60$  e  $1,95$  (H-6'); 3,86 (s) H-(O-CH<sub>3</sub> – C3); 3,89 (s) H-(O-CH<sub>3</sub> – C7); 3,99 (s) H-(O-CH<sub>3</sub> – C3'). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, ppm)  $\delta$  156,0 (C-2); 139,6 (C-3); 162,0 (C-5); 97,8 (C-6); 165,4 (C-7); 92,2 (C-8); 156,7

(C-9); 106,4 (C-10); 122,4 (C-1<sup>°</sup>); 110,9 (C-2<sup>°</sup>); 146,3 (C-3<sup>°</sup>); 148,3 (C-4<sup>°</sup>); 114,6 (C-5<sup>°</sup>); 122,7 (C-6<sup>°</sup>); 60,2 (O-CH<sub>3</sub> – C3); 55,8 (O-CH<sub>3</sub> – C7); 56,1 (O-CH<sub>3</sub> – C3<sup>°</sup>).

**Catequina (13):** Fino sólido amarelado (100% AcOEt), p.f. 166,5-173,8° C. IV (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  3332, 2920-2850, 1621, 1200-1400. RMN <sup>1</sup>H (Acetona, ppm)  $\delta$  4,57 (d); J=7,88 Hz (H-2); 3,99 (m) (H-3); ax 2,58 (dd); J=16,00 e 8,49 Hz, eq ~ 2,85 (H-4); 6,03 (d); J=2,34 Hz (H-6); 5,88 (d); J=2,46 Hz (H-8); 6,89 (d); J=1,60 Hz (H-2<sup>°</sup>); 6,82 (d); J=7,75 Hz (H-5<sup>°</sup>); 6,77 (dd); J=8,37 e 1,72 Hz (H-6<sup>°</sup>). RMN <sup>13</sup>C (Pir, ppm)  $\delta$  83,5 (C-2); 68,5 (C-3); 30,3 (C-4); 97,0 (C-6); 96,5 (C-8); 101,3 (C-10); 131,0 (C-1<sup>°</sup>); 116,4 (C-2<sup>°</sup>); 147,4 (C-3<sup>°</sup>); 147,4 (C-4<sup>°</sup>); 116,6 (C-5<sup>°</sup>); 120,0 (C-6<sup>°</sup>).

#### 4.2.2.1.4 Fração Aquosa dos Caules de *C. heterodoxus* (CHCW)

A fração aquosa dos caules de *C. heterodoxus* (41,7 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel desativada com 15% de água. A pastilha foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 2:1 (sílica:amostra) e eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila (80–100%) e metanol (0–60%) resultando em 96 frações de 125 mL cada. As frações 14–18 (100% AcOEt) foram reunidas e após sucessivas lavagens com AcOEt forneceram 0,5052 g de astragalina (14) na forma de um fino sólido amarelo.

**Astragalina (14):** Fino sólido amarelo (100% AcOEt), p.f. 221,5 - 228,5° C. IV (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  3402, 2917, 2850, 1661, 1180. RMN <sup>1</sup>H (MeOD, ppm)  $\delta$  6,05 (d); J= 2,35 Hz (H-6); 6,25 (d); J= 2,34 Hz (H-8); 7,91 (d); J= 8,99 Hz (H-2<sup>°</sup>); 6,74 (d); J= 8,99 Hz (H-3<sup>°</sup>); 6,74 (d); J= 8,99 Hz (H-5<sup>°</sup>); 7,91 (d); J= 8,99 Hz (H-6<sup>°</sup>); 4,99 (d); J= 6,25 Hz (H-1<sup>°</sup>); 3,75 (dd); J=8,20 e 6,65 Hz (H-2<sup>°</sup>); 3,49 (dd); J=8,20 e 3,13 Hz (H-3<sup>°</sup>); 3,64 (dd); J=13,68 e 3,91 Hz (H-4<sup>°</sup>); 3,65(m) (H-5<sup>°</sup>); 3,26 (dd); J=13,68 e 3,91 Hz (H-6<sup>°</sup>). RMN <sup>13</sup>C (MeOD, ppm)  $\delta$  158,6 (C-2); 137,3 (C-3); 179,7 (C-4); 163,2 (C-5); 100,0 (C-6); 166,1 (C-7); 94,9 (C-8); 159,0 (C-9); 105,8 (C-10); 122,7 (C-1<sup>°</sup>); 132,4 (C-2<sup>°</sup>); 116,4 (C-3<sup>°</sup>); 161,7 (C-4<sup>°</sup>); 116,4 (C-5<sup>°</sup>); 132,4 (C-6<sup>°</sup>); 104,5 (C-1<sup>°</sup>); 72,8 (C-2<sup>°</sup>); 74,1 (C-3<sup>°</sup>); 69,1 (C-4<sup>°</sup>); 72,9 (C-5<sup>°</sup>); 66,9 (C-6<sup>°</sup>).

#### 4.2.2.1.5 Fração Hexano das Folhas de *C. heterodoxus* (CHFH)

De 1548,7 g de folhas obteve-se 409,92 g do extrato bruto das folhas. Este extrato foi submetido ao fracionamento líquido-líquido, resultando nas frações hexano, acetato de etila e aquosa.

Parte da fração hexano das folhas de *C. heterodoxus* (40 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60. A pastilha foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 2:1 (sílica:amostra) e eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila (0–100%), resultando em 110 frações de 125 mL cada. As frações 25-35 (80:20 hexano:AcOEt) foram reunidas, lavadas em hexano e forneceram 0,4236 g de cristais em forma de agulhas de  $\beta$ -sitosterol (**9**). As frações 63-80 (70:30 hexano:AcOEt) foram reunidas e após sucessivas lavagens em AcOEt forneceram 1,0036 g de fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**10**) na forma de um fino sólido branco.

#### 4.2.2.1.6 Fração Acetato de Etila das Folhas de *C. heterodoxus* (CHFA)

Durante o procedimento de particionamento líquido-líquido de parte do extrato bruto das folhas, observou-se no funil de separação a precipitação de um sólido amarelo ao adicionar acetato de etila. Este sólido foi separado para análise e lavado em AcOEt, fornecendo 2,0856 g de uma mistura de flavonoides identificados como quercetina-canferol (**15**).

**Quercetina-canferol (15):** Sólido amarelo (100% AcOEt), faixa de fusão 185,0-194,0° C. IV (KBr)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  3379, 3289, 2961, 1673, 1616, 1364. RMN  $^1\text{H}$  (DMSO, ppm) - QUERCETINA  $\delta$  6,72 (d, 2,0) (H-6); 6,97 (d, 2,0) (H-8); 8,28 (d, 2,1) (H-2'); 7,46 (d, 8,5) (H-5'); 8,17 (dd, 2,3; 8,6) (H-6'). RMN  $^3\text{H}$  (DMSO, ppm) – CANFEROL  $\delta$  8,58 (d, 2,1) (H-6); 8,63 (d, 2,1) (H-8); 7,49 (d, 9,0) (H-2'); 8,47 (sl) (H-3'); 8,47 (sl) (H-5'); 7,49 (d, 9,0) (H-6').

#### 4.2.2.1.7 Fração Aquosa das Folhas de *C. heterodoxus* (CHFV)

Parte da fração aquosa das folhas de *C. heterodoxus* (42 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel desativada com 15% de água. A pastilha foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 2:1 (sílica:amostra) e eluída com acetato de etila e quantidades crescentes de etanol (0-100%) resultando em 56 frações de

125 mL cada. As frações 7-14 (100% AcOEt) foram reunidas e após sucessivas lavagens com AcOEt também forneceram o flavonoide astragalina (**14**) (0,7724 g) na forma de um fino sólido amarelo.

Nestes procedimentos obtiveram-se compostos com quantidade suficiente para submissão aos ensaios de atividade biológica.

#### 4.2.3 Identificação de compostos isolados das frações obtidas de *C. antisiphiliticus* e *C. heterodoxus*

As estruturas dos compostos isolados através de cromatografia preparativa em coluna normal e relâmpago foram elucidadas através das análises dos respectivos espectros de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e dos mapas de correlação de RMN COSY, HMQC e HMBC. A confirmação das estruturas foi realizada através de comparação dos dados espectroscópicos com aqueles da literatura e por co-eluição em CCD com padrões. Eletroforese capilar, espectrometria de massas e difração de raios-X também foram utilizadas a fim de identificar os compostos isolados.

##### 4.2.3.1 Espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas foi realizada por Paulo C. Leal, no Laboratório Multiusuário CEBIME-UFSC.

A estrutura do ácido quínico foi elucidada com auxílio da espectrometria de massas com ionização por “electrospray” e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (ESI-Q-TOFMS) e através de comparação com a literatura (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004; SANTOS et al. 2011). As massas moleculares dos triterpenos também foram determinadas. As medidas ESI-Q-TOFMS foram realizadas em um espectrômetro de massas micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics Inc.) equipado com uma bomba de seringa automática para injeção da amostra (KD Scientific). O espectrômetro de massas ESI-QTOF operou no modo íon positivo a 4.5 kV e uma temperatura de dessolvatação de 180 °C. A fonte de íons “electrospray” padrão (ESI) foi utilizada para geração dos íons. As amostras foram injetadas utilizando uma razão de fluxo constante (3  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). Como solvente utilizou-se uma mistura acetonitrila/metanol. O instrumento ESI-Q-TOF MS foi calibrado na faixa de 50–3000 m/z utilizando um padrão de calibração interna (solução mista de baixa concentração) fornecida pela Agilent

Technologies. Os dados foram processados utilizando o software Bruker Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics Inc.).

#### 4.2.3.2 Eletroforese capilar

As análises de eletroforese capilar foram realizadas no Laboratório de Eletroforese Capilar, Departamento de Química – UFSC, sob orientação do Professor Gustavo Amadeu Micke.

As amostras EBH, EBW de *C. antisiphiliticus*, os compostos isolados e padrão foram injetados hidrodinamicamente (50 mbar por 5 s) e o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal e condições constantes de tensão +30 kV no lado da injeção. Em todos os experimentos foi utilizado capilar de sílica fundida (Polymicro) com revestimento externo de poliimida, dimensões: 40 cm  $L_{det}$ , 48,5 cm  $L_{tot}$ ; 50  $\mu\text{m}$  D. I.; 375  $\mu\text{m}$  D.E. Inicialmente o capilar foi condicionado por 30 min com hidróxido de sódio 1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , seguidos de 30 min de água desionizada. Diariamente os capilares foram condicionados por 5 min com hidróxido de sódio 1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , seguidos de 5 min de água deionizada e 5 min com o eletrólito de corrida. O eletrólito de corrida foi constituído de tetraborato de sódio 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  e metanol 10%, pH 9,3. O capilar foi lavado por 1 minuto com o eletrólito de corrida entre as corridas.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se 9,5 mg de EBH e 10,5 mg de EBW em 5 mL de metanol, respectivamente. As amostras foram sonicadas por 10 minutos e injetadas no sistema eletroforético sem qualquer diluição.

A determinação qualitativa dos flavonoides no EBH e EBW foi realizada pela comparação dos eletroferogramas gerados pelas amostras com os respectivos eletroferogramas da mistura de padrões analíticos a 50 ppm cada. Os parâmetros de tempo de migração e espectro de UV foram utilizados para confirmar a identificação dos compostos. Outros testes também foram realizados com flavonoides padrão para aumentar a credibilidade da análise. Flavonoides padrão foram misturados com as amostras de EBH e EBW e os eletroferogramas resultantes mostraram o aumento na altura dos picos sem formação de ombros. Os extratos também foram hidrolisados e analisados. 500  $\mu\text{L}$  de extrato foram transferidos para um tubo de ensaio com tampa, adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de água e 200  $\mu\text{L}$  de HCl 8 mol  $\text{L}^{-1}$  e o tubo foi colocado em estufa a 100° C durante 1 hora. Após o tempo de hidrólise, esperou-se arrefecer o tubo e adicionou-se 2 mL de água e 2 mL de acetato de etila para



extração. Depois da agitação e separação de fases, o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico e mais uma extração com 2 ml de acetato de etila foi feita. Em seguida, o sobrenadante foi seco sob fluxo de N<sub>2</sub> e aquecimento a 70°C e o resíduo foi ressuspensionado em 500 µL de uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O 50 %.

#### 4.2.3.3 Difração de raios-X

As análises por Difração de raios-X foram realizadas pelo Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi na Central Analítica do Departamento de Química-UFSC.

Os triterpenos HCH70 e HCH115 foram submetidos à cristalização e forneceram cristais adequados para análise de difração de raios-X. Para cada composto um cristal foi selecionado da amostra cristalina representativa. Os dados de intensidade para estes compostos foram coletados com um difratômetro APEX II DUO com radiação monocromada. As imagens foram adquiridas utilizando varreduras *fi* e *omega*. A estrutura foi resolvida por métodos diretos e refinada pelos métodos de matriz completa e mínimos quadrados usando os programas SIR97 (ALTOMARE et al., 1999) e SHELXL97 (SHELDRICK, 2008), respectivamente. Todos os átomos, com exceção do hidrogênio, foram refinados anisotropicamente. Átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono foram colocados em suas posições idealizadas, com distâncias C-H e valores U<sub>eq</sub> tomados a partir das configurações padrão do programa de refinamento. Os átomos de hidrogênio da água de solvatação e dos grupos álcool foram localizados no mapa de diferença de Fourier e tratados com o modelo de monta no composto **2**, e como átomos livres no composto **3**. Devido à ausência de uma fonte de dispersão anômala eficiente, a configuração absoluta das estruturas não pôde ser determinada. A obtenção de plots ORTEP bem como o procedimento de validação cif foram realizados utilizando o software PLATON. Outros dados cristalográficos obtidos a partir da análise dos compostos HCH70 e HCH115 estão resumidos na Tabela 06, pág. 137. Dados cristalográficos das estruturas foram depositados no Cambridge Crystallographic Data Centre como publicação suplementar número CCDC 950065 e CCDC 950066. Cópias dos dados podem ser adquiridas gratuitamente no endereço <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> ou no Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033. E-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

#### 4.2.4 Ensaios para verificação de atividades biológicas

Os ensaios antioxidantes, toxicidade frente à *Artemia salina* e inibição da enzima acetilcolinesterase foram realizados no grupo de estudos do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC, sob orientação da Professora Inês Maria Costa Brighente.

##### 4.2.4.1 Ensaios antioxidantes

###### 4.2.4.1.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou et al. (2006). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em etanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos adicionou-se 1,0 mL da solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , agitou-se e a solução permaneceu em repouso por 1 hora. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco, utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a solução da amostra. Um aparecimento de coloração azul-escura é indicativo da presença de fenólicos no extrato ou fração testados. Construiu-se uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluído em etanol, para comparação. Os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de amostra. A determinação dos polifenóis totais, por reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, baseia-se no princípio de que em meio alcalino os fenóis reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico a óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul (GUTFINGER, 1981).

###### 4.2.4.1.2 Determinação do teor de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides foi realizada conforme método descrito por Woisky e Salatino (1998). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm diluídos em etanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL

de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  2%. Após 1 hora, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco utilizou-se etanol. Um aparecimento de coloração verde-florescente é indicativo da presença de flavonoides. Uma curva de calibração foi construída com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluída em etanol, para comparação. Os testes foram realizados em triplicata. O teor de flavonoides foi determinado em mg de quercetina/g de extrato ou fração.

#### 4.2.4.1.3 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito por Cavin et al. (1998), com algumas modificações. Uma solução de DPPH 0,004 % foi adicionada à solução teste nas concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para extratos e frações e de 1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os compostos isolados. A absorvância das soluções foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (517 nm) após 30 minutos. Por meio da leitura da absorvância de uma solução de DPPH (2 mL de solução 0,004 %), acrescentado de 1 mL de etanol, obteve-se a absorvância no tempo inicial ( $A_0$ ). A cada uma das concentrações da solução teste em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorvância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorvância de uma solução teste (1 mL) em etanol (2 mL), foi subtraída da absorvância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência do extrato nesse comprimento de onda. A análise foi realizada em triplicata. Os valores obtidos para as absorvâncias das diferentes soluções testes foram plotados em gráficos na forma de % de decréscimo da absorvância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde determinou-se a concentração necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50 % ( $\text{CI}_{50}$ ) nas soluções testadas.

#### 4.2.4.1.4 Determinação do potencial redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações. A 100  $\mu\text{L}$  (extratos brutos e frações, diluídos em etanol, na concentração de 1000 ppm) e a 100  $\mu\text{L}$  (compostos isolados, diluídos em etanol, na

concentração de 500 ppm) das soluções teste foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 1,0 mL da solução de  $\text{FeCl}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferrocianeto de potássio  $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ , e misturou-se. Após 15 minutos, realizou-se a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. A análise foi realizada em triplicata. Como branco, utilizou-se uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Uma curva de calibração foi construída utilizando soluções padrões de ácido ascórbico nas concentrações de 0 a 1000 ppm. O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico/g de amostra.

#### 4.2.4.1.5 *Determinação do potencial inibidor contra a peroxidação lipídica*

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada através do modelo  $\beta$ -caroteno - ácido linoléico (MOKBEL; HASHINAGA, 2006). Uma emulsão foi preparada com 3,0 mg de  $\beta$ -caroteno, 1,0 mL de  $\text{CHCl}_3$ , 45 mg de ácido linoléico e 215 mg de tween-80. O clorofórmio foi removido em evaporador rotatório, durante 4 minutos, sob temperatura de  $45^\circ \text{C}$ . À mistura resultante foram adicionados 6,0 mL de água destilada, sob agitação, para fazer a emulsão.

A emulsão foi então dissolvida para 100 mL com peróxido de hidrogênio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Aliquotas desta emulsão (4,0 mL) foram adicionadas a tubos contendo 0,2 mL das soluções teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, dissolvidas em etanol). Como controle positivo utilizou-se uma solução de BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno) na concentração de 1000 ppm. Um controle negativo, contendo 0,2 mL de etanol e 4,0 mL da emulsão acima também foi preparado. Todos os tubos foram colocados em banho-maria, a  $50^\circ \text{C}$ , e as absorbâncias das soluções determinadas no tempo zero, e a cada 30 minutos, em espectrofotômetro a 470 nm, até a descoloração do tubo contendo o controle negativo (180 minutos). Como branco, utilizou-se uma emulsão preparada como descrita acima, porém sem a presença de  $\beta$ -caroteno. Os resultados dos ensaios foram expressos através de gráficos de absorbância das soluções testes em função do tempo de ensaio. A atividade antioxidante (AA) (potencial inibidor da peroxidação lipídica, em porcentagem) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$AA = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

Onde:

$A_0$  = Absorbância da amostra no tempo zero;

$A_t$  = Absorbância da amostra após 180 minutos;

$A_0^0$  = Absorbância do controle negativo no tempo zero;

$A_t^0$  = Absorbância do controle negativo após 180 minutos.

#### 4.2.4.2 Toxicidade usando larvas de *Artemia salina*

Para o bioensaio de letalidade frente à *A. salina*, utilizou-se a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com algumas modificações. Os extratos brutos e frações das duas espécies foram diluídos em água/etanol, a fim de obterem-se concentrações necessárias para o ensaio. O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi água salgada (19 g de sal marinho/L de água destilada). As larvas foram utilizadas nos ensaios 72 horas após a eclosão. Para realização do teste foram transferidas entre 6 e 10 larvas de *A. salina* para cada cavidade de uma placa de 24 poços, contendo solução marinha com 1 % de tween 80 (v/v) e os respectivos extratos em diferentes concentrações (100 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 horas da incubação das larvas com a solução teste. A dose necessária para matar 50 % das larvas ( $DL_{50}$ ) foi obtida através do gráfico da % de animais mortos em função do logaritmo da dose testada. Como controle positivo utilizaram-se soluções de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  cuja  $DL_{50}$  é de 20 a 40  $\text{g mL}^{-1}$  e como controle negativo empregou-se apenas o solvente utilizado para a preparação das soluções teste. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.2.4.3 Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase

O bioensaio de inibição da acetilcolinesterase foi realizado conforme Mata et al. (2007) com modificações. Em uma cubeta adicionou-se tampão Tris-HCl 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH = 8, as amostras a serem analisadas (0,1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e a enzima acetilcolinesterase. Após 15 min, à temperatura ambiente, adicionou-se nesta cubeta iodeto de acetiltiocolina e o reagente de Ellman. Após trinta minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS a 405 nm. Como controle positivo utilizou-se a galantamina, do fármaco comercial Remynil, (0,01  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e como controle negativo o mesmo solvente em que se dissolveu a amostra vegetal, onde a atividade enzimática foi considerada 100%. Na referência (ou branco) foram utilizados todos os reagentes exceto a

enzima. As amostras que apresentaram porcentagem de inibição enzimática acima de 50% foram submetidas à determinação da  $CI_{50}$  (Concentração da amostra capaz de inibir 50% da ação da enzima), utilizando-se o mesmo procedimento experimental com 100  $\mu$  L das amostras em diferentes concentrações.

#### **4.2.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana**

##### *4.2.4.4.1 Atividade antibacteriana*

Os experimentos para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos e frações foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Regional de Blumenau, sob a supervisão do professor Eduardo Monguilhott Dalmarco.

#### **CULTURA**

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC, Rochville, MD, EUA): bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978).

#### **DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)**

Para realização do bioensaio as amostras das duas espécies vegetais foram solubilizados em dimetil sulfoxido (DMSO) resultando em soluções na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup> para extratos e frações e soluções na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> para os compostos isolados. Posteriormente realizaram-se diluições seriadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) em diferentes concentrações. Em uma placa estéril contendo 96 micropoços adicionaram-se 100  $\mu$  L das soluções em diferentes concentrações e 5  $\mu$  L do inóculo bacteriano ( $5 \times 10^5$  UFC/mL de cada microrganismo testado) em cada orifício. As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 24h e, após este período inicial, adicionou-se 10  $\mu$  L de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (5% v/v) em metanol a cada micropoço da placa utilizada no experimento. Na sequência, realizou-se outra incubação em aerobiose a 37 °C por 30 min,

onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde houve presença de bactérias viáveis. Nestes micropoços os compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em duplicata. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração onde não se verificou crescimento bacteriano. Foi utilizado como controle positivo o antibiótico gentamicina. O teste do tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração celular, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazam (JOHNSON et al., 1985; RAHMAN et al., 2004).

#### 4.2.4.4.2 Atividade antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação da pesquisadora Susana Johann.

## SOLVENTES E MEIOS DE CULTURA

Para dissolver e diluir as amostras das plantas estudadas utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e a concentração final deste solvente no ensaio é de 0,002%. O meio de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), foram utilizados para a manutenção das culturas fúngica e o meio de RPMI 1640 (Sigma) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (Sigma) para os testes de microdiluição.

## CULTURA

Para a determinação da atividade antifúngica foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA): *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Cryptococcus gattii* (ATCC 32608) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608). O fungo isolado clínico *Paracoccidioides brasiliensis*-Pb18 foi cedido pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-S.P.

## INÓCULO

Para as espécies de *Candida* as amostras foram repicadas em estrias, 24 horas antes da realização dos testes e para as espécies de *Cryptococcus* 48 horas, em SB e mantidas à 35°C. O inóculo foi feito de acordo com o documento M27-A2 (CLSI, 2002).

O Pb18 nas formas de levedura foi repicado em tubos com meio YPD a 37°C.

Para o teste de microdiluição os fungos foram ressuspensas, com o auxílio de uma alça de Henle, em solução fisiológica esterilizada e homogeneizadas em vórtex e ajustadas à turbidez de 75-80% em espectrofotômetro a 70% em comprimento de onda de 530 nm, equivalente a  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  UFC/mL. A partir deste inóculo foram feitas diluições 1:50 e 1:20, correspondendo a um inóculo de  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$  UFC/mL para as amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*. Para o fungo dimórfico *P. brasiliensis* as células leveduriformes em fase exponencial foram coletadas assepticamente com alça de Henle e suspensas em 5ml de salina estéril (0,85%) (MANOCHA; SAN-BLAS; CENTENO, 1980). O inóculo foi homogeneizado em vortex e deixado em repouso para a decantação e somente após 5 minutos o sobrenadante foi coletado. A transmitância do sobrenadante foi medida com comprimento de onda de 520 nm e ajustada para 69-70% ( $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células por mL), contando o número de células viáveis em câmara de Neubauer. As suspensões foram então diluídas em RPMI (1:10) para obtenção do inóculo final  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  cel/mL (HAHN; HANDAM, 2000).

## TESTE DE TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para o teste de triagem todas as amostras foram diluídas a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  em RPMI. Posteriormente 100  $\mu\text{l}$  de cada amostra foi adicionada em um poço de duas placas de 96 poços. Foram feitos também os controles de toxicidade do DMSO na concentração de 0,002%, crescimento fúngico, esterilidade do meio de cultura e suscetibilidade ao itraconazol ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Posteriormente em cada poço teste e nos poços controles, exceto o controle de esterilidade do meio, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  do inóculo. Desta forma a concentração final das drogas nos poços foi de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Posteriormente as placas foram incubadas a  $\pm 37^\circ\text{C}$ . No ensaio utilizando as leveduras do gênero *Candida* as placas ficaram incubadas por 48h, para as espécies de *Cryptococcus* por 72 horas. Para o Pb18 as placas foram incubadas por 10 dias.



Após a incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), o conteúdo homogeneizado e as placas foram novamente incubadas à mesma temperatura de crescimento dos respectivos inóculos por 4 horas. Nas mitocôndrias das células alvos, o MTT é metabolizado em formazan, revelando a presença de células metabolicamente ativas. Após o metabolismo do MTT, foram adicionados 100 µL/poço de SDS/isopropanol (5%), que rompe a membrana celular dos microrganismos alvos e disponibiliza no meio o formazan.

A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), com a absorvância de 570 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do poço controle contendo apenas o microrganismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Densidade Óptica poço controle} - \text{DO poço tratado}}{\text{Densidade Óptica poço controle}} \times 100$$

As drogas foram consideradas ativas quando inibiram o crescimento fúngico em valor igual ou maior que 70%.

## TESTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Este teste foi feito utilizando a metodologia do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrito no documento M27-A2 do CLSI (2002). O teste de CIM para o Pb 18 foi feito conforme descrito por Johann et. al (2010). Primeiramente os extratos, frações e substâncias foram dissolvidos em DMSO e diluídos em caldo RPMI, mantendo o volume constante de 1000 µL em cada tubo. Foram testadas 10 concentrações que variaram de 250-0,45 µg/mL. A partir de cada diluição, alíquotas de 100 µL foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Como controle positivo foi utilizado o i traconazol (Sigma) nas concentrações de 8-0,007 µg mL<sup>-1</sup>.

Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento recebeu 100 µL do inóculo microbiano. O tempo e a temperatura de incubação, assim como a leitura das placas foram feitos como descrito acima no teste de triagem.

As CIMs foram consideradas como a menor concentração do produto natural, que inibiu o crescimento do microrganismo em pelo menos 90%, em relação ao controle de crescimento após a incubação e

foram expressas em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

#### **4.2.4.5 Determinação da atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas humanas**

Esse bioensaio foi realizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação da pesquisadora Susana Johann.

##### *4.2.4.5.1 Linhagens celulares*

As linhagens celulares MCF-7 (mama) e TK-10 (renal) foram adquiridas da National Cancer Institute (Maryland, EUA). Todas as linhagens foram cultivadas em fase logarítmica de crescimento em RPMI-1640 Sigma-Aldrich (St. Louis) suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY), enriquecido com 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. Todas as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### *4.2.4.5.2 Ensaio com linhagens celulares de câncer humano*

O efeito dos extratos, frações e compostos isolados sobre a sobrevivência e crescimento de linhagens de células humanas de câncer sólido MCF-7 (mama) e TK-10 (renal) foi determinado utilizando um método colorimétrico desenvolvido no Instituto Nacional do Câncer-EUA (MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006). Resumidamente, as células foram inoculadas em placas de 96 micropoços e incubadas a 37 °C durante 24 h em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As soluções das amostras foram adicionadas aos micropoços da cultura para alcançar as concentrações desejadas, e as placas incubadas por 48 h. Ácido tricloroacético foi adicionado a cada micropoço para precipitar as proteínas, as quais foram coradas com sulforodamina B.

Depois de lavar o corante, a proteína foi dissolvida com 10 mM Tris e a absorbância medida no comprimento de onda de 515 nm. Os resultados foram calculados utilizando o seu valor medido no test wells (T) em comparação com a dos micropoços de controle correspondente ao inóculo inicial da célula (Ti) e células cultivadas por 48 h sem a droga (Tf), utilizando a fórmula:  $[(T-Ti)/(Tf-Ti)] \times 100$ . Esta fórmula permite a quantificação da inibição do crescimento (valores entre zero e

100) e a morte celular (valores menores que zero). Cada amostra foi testada em duplicata, em dois experimentos independentes. Os experimentos para determinar as curvas de dose-resposta e metade da concentração máxima inibitória ( $CI_{50}$ ) foram executados como descrito acima, utilizando 01:02 diluições do teste (com as amostras) para alcançar as concentrações adequadas. Estes experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes.

Todos os compostos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) antes da diluição. A metade da concentração máxima inibitória ( $CI_{50}$ ) foi determinada por uma gama de concentrações (0,1-100  $\mu\text{g/mL}$ ). Todas as culturas celulares foram incubadas em atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$ / 95 % de ar umidificado a 37 °C por 48 h.

A viabilidade celular foi calculada medindo a taxa de redução mitocondrial do sal de tetrazólio (cor amarela) MTT (3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5 brometo difeniltetrazolím) para insolúveis cristais roxo de formazan (MOSMANN, 1983). Após a incubação com as amostras, a solução de MTT (20  $\mu\text{L}$ , 5  $\text{mg/mL}$ ) foi adicionada a cada micropoço e foram incubados por 4 h. Após este período de incubação, o sobrenadante foi removido e 200  $\mu\text{L}$  de HCl 0,04 M em álcool isopropílico foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 590 nm . Os resultados foram normalizados com o controle DMSO (0,05%) e expresso como porcentagem de inibição da viabilidade celular. Interações dos compostos e meios foram estimados com base nas variações entre o meio contendo a droga e meio sem a droga para controle de resultados falso-positivos ou falso-negativos. Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos graficamente a partir de curvas de dose-efeito usando Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Para comparação, a citotoxicidade do etoposideo foi avaliada sob as mesmas condições experimentais. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três dias diferentes.

#### **4.2.4.6 Determinação da atividade anti-inflamatória**

Os ensaios para determinação da atividade antinflamatória dos extratos, frações e compostos isolados foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica da UFSC, sob orientação da Professora Tânia Silvia Fröde

##### *4.2.4.6.1 Animais*

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* com 2 meses de idade, fêmeas, pesando entre 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais receberam a devida alimentação, com água <sup>ad libitum</sup> durante todo o experimento, acomodação à luz natural em gaiolas de plástico (40 x 32 cm), com temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UFSC) em 2011, sob o protocolo: PP00617/CEUA.

#### 4.2.4.6.2 Modelo de inflamação

Diferentes grupos de animais receberam tratamento prévio com diferentes doses do extrato bruto total hidroalcoólico - EBH (25 – 200 mg kg<sup>-1</sup>, via intraperitoneal - i.p.), frações hexano (10 – 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), acetato de etila - AcOEt (10 – 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e aquosa - Aq (10 – 50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e os compostos isolados quercetina (5 – 25 mg kg<sup>-1</sup>), vitexina (5 – 25 mg kg<sup>-1</sup>) e ácido quínico (5 – 25 mg kg<sup>-1</sup>) da espécie *Croton antisyphiliticus* Mart. Após um intervalo de 0,5 h da administração do material vegetal, a pleurisia foi induzida com uma injeção de 0,1 mL de Cg (1%) na cavidade pleural (i.pl.) (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Passadas 4 h horas da indução da pleurisia, os animais foram submetidos ao procedimento de morte indolor assistida, com overdose de pentobarbital (180 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Em seguida, a cavidade pleural foi aberta e lavada, com 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, composição mM: NaCl 130, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, em água destilada) e heparinizada (20 UI mL<sup>-1</sup>) para a determinação da migração leucocitária, exsudação, atividade das enzimas: MPO e ADA, e concentração dos mediadores inflamatórios: NOx, TNF- $\alpha$  e IL-17.

A fração Aq foi solubilizada apenas em solução salina (NaCl, 0,9%), o EBH, as demais frações e os compostos isolados foram solubilizados em uma mistura de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) em solução salina (NaCl, 0,9%).

Todos os experimentos foram acompanhados por controles positivo (animais que receberam somente a substância que gera inflamação - agente flogístico (carragenina, Cg) na cavidade pleural, i.pl.) e negativo (animais tratados somente com solução salina estéril - soro fisiológico NaCl 0,9%, i.pl.).

Em paralelo, diferentes grupos de animais foram tratados previamente com fármacos de referência com atividade anti-inflamatória: dexametasona (Dexa, 0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e indometacina (Indo, 5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Dexametasona e indometacina são dois anti-

inflamatórios conhecidos clinicamente e que apresentam diferentes mecanismos de ação. Por este motivo, ambos são utilizados para demonstrar os efeitos dos produtos naturais com relação aos fármacos de referência.

#### 4.2.4.6.3 Contagem total de leucócitos

Para a contagem de leucócitos totais, foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  do lavado da cavidade pleural, diluídos em líquido de Türk (1:20) e contados em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400 vezes). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos  $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ .

#### 4.2.4.6.4 Determinação da exsudação

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com uma solução do corante Azul de Evans ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ mL animal}^{-1}$ , i.v.), 10 minutos antes da indução da pleurisia (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Este corante se liga a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, permitindo avaliar o grau de extravasamento vascular. Após 4 horas de pleurisia, os animais foram mortos com overdose de pentobarbital e o lavado obtido da cavidade pleural foi aliqüotado ( $200 \mu\text{L}$ ) para a determinação da concentração do corante Azul de Evans com o auxílio de uma leitora de microplacas de enzaimunoensaio (ELISA) (Organon – Technica, Roseland, New Jersey, EUA). A leitura óptica foi realizada no comprimento de onda de 620 nm.

Para quantificar a concentração de Azul de Evans nas amostras, uma curva padrão, com diferentes concentrações do corante ( $0,1 - 25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi previamente realizada e lida no comprimento de onda de 620 nm, gerando uma equação da reta que permitiu a dosagem de Azul de Evans nas amostras desconhecidas. Os valores das concentrações de Azul de Evans foram expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.2.4.7 Determinação da atividade anti-hiperglicêmica

A determinação da atividade anti-hiperglicêmica foi realizada no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais da UFSC, sob orientação da Professora Fátima R. M. Barreto Silva.

##### 4.2.4.7.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 180-220 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* em sala climatizada ( $21 \pm 2$  °C) e submetidos a um ciclo normal de claro/escuro (luzes acesas das 6 às 18 horas). Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Utilizou-se o Protocolo PP00414 aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais/ UFSC - CEUA/UFSC em 05/03/2010.

#### 4.2.4.7.2 Teste oral de tolerância à glicose

Os animais foram divididos em 3 grupos (n=5) determinados como: Grupo controle hiperglicêmico (animais hiperglicêmicos não tratados); Grupo veículo (animais hiperglicêmicos que receberam Tween 80, 2,5%); Grupo tratado (animais hiperglicêmicos tratados com os triterpenos HCH18, HCH25, HCH70 e HCH115 nas doses de 0,1; 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup> em tween 80, 2,5%). Após jejum de 16 horas, os animais foram pré-tratados com os triterpenos em diferentes doses por via oral (tempo zero) e 15 minutos depois a hiperglicemia foi induzida com a administração de 4mg kg<sup>-1</sup> de glicose por meio de gavagem. Amostras de sangue foram coletadas 15, 30, 60 e 180 minutos após a indução da hiperglicemia, os níveis séricos de glicose foram determinados por meio do método da glicose oxidase em comprimento de onda de 500 nm e os resultados expressos em mg dL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4.7.3 Atividade das dissacaridases intestinais

Animais em jejum foram eutanasiados e a porção duodenal do intestino delgado removido, lavado com solução salina (0,9%), pesado e homogeneizado (400 mg de tecido por mL). Este homogeneizado foi centrifugado (8000 rpm 8 minutos<sup>-1</sup>) e o sobrenadante utilizado para os experimentos de determinação da atividade das dissacaridases Maltase, Lactase e Sacarase.

Aos grupos controle e tratado, os homogenatos foram pré-incubados por 5 minutos a 37°C em presença (tratado) ou não (controle) dos triterpenos nas concentrações de 1000, 100, 10 e 1 µg mL<sup>-1</sup> e em seguida adicionado ao meio 0,056 µM de sacarose, lactose ou maltose (em tampão maleato de sódio, pH 6,0) por 5 minutos a 37 ° C. A atividade das dissacaridases foi mensurada por meio do método de

glicose oxidase em comprimento de onda de 500 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu\text{M}$  de glicose por minuto sob as condições de ensaio. A atividade específica da enzima foi definida com a atividade desta por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (1951).

#### 4.2.4.7.4 Determinação do conteúdo de glicogênio hepático

O conteúdo de glicogênio hepático foi desenvolvido de acordo com o método de Krisman (1962). Ratos normais foram submetidos a um jejum de 16 horas e em seguida tratados com os triterpenos nas doses de 0,1; 1 e 10  $\text{mg kg}^{-1}$ . Três horas após indução da hiperglicemia os animais foram eutanasiados e o fígado removido, pesado e homogeneizado em KOH (33%) a 100 °C por 20 minutos. Após resfriamento do homogeneizado, adicionou-se 5 ml de etanol (96%) as amostras e estas foram aquecidas a 70 °C por 15 minutos e imediatamente inseridas em gelo para precipitação do glicogênio. Seguiu-se com centrifugação a 1300  $\times\text{g}$  por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado resolubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado por meio de reagente contendo Iodina e analisado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 460 nm. Os resultados foram expressos como mg de glicogênio g de tecido<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4.8 Determinação da atividade antinociceptiva

Os ensaios para determinação da atividade antinociceptiva dos triterpenos isolados foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) da UFSC, sob orientação do Professor Adair R. S. Santos.

##### 4.2.4.8.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços machos (25 a 35 g) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 6:00h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor

com animais de laboratório (ZIMMERNANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeito dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo protocolo PP00725.

#### *4.2.4.8.2 Drogas utilizadas*

As seguintes substâncias foram utilizadas neste ensaio: formalina (Merck, Darmstadt, Germany); carragenina lambda, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , aprotinina, PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridro, cloreto de benzametônio (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA); dexametasona (Aché, Guarulhos/SP, Brasil) éter etílico, tween 80 (Vetec, Duque de Caxias/RJ, Brasil); tween 20, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético, BSA – albumina de soro bovino (LGC Biotecnologia, São Paulo/SP, Brasil); cloreto de sódio (Labsynth, Diadema/SP, Brasil); heparina (Roche, São Paulo/SP, Brasil); PBS (Laborclin, Pinhais/PR, Brasil).

Nos experimentos as drogas foram dissolvidas em solução de NaCl a 0,9%, com exceção dos triterpenos HCH70 e HCH115, que foram dissolvidos em salina estéril (solução fisiológica - NaCl 0,9%) e tween 80 (5%, de modo a não influenciar na atividade exercida pelos triterpenos). Os triterpenos HCH70 e HCH115 foram administrados 30 min antes dos experimentos por via intraperitoneal (i.p.).

#### *4.2.4.8.3 Nocicepção induzida pela formalina*

Para confirmação e melhor compreensão do efeito antinociceptivo dos triterpenos HCH70 e HCH115 foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina. Esse é um modelo que permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992). O procedimento utilizado foi semelhante ao previamente descrito (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; NUCCI et al., 2012). Tanto os animais do grupo controle quanto os que foram tratados com os triterpenos HCH70 e HCH115 receberam na região intraplantar da pata posterior direita, uma injeção de 20  $\mu$ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) e o grupo salina recebeu uma injeção de 20  $\mu$ l de NaCl



a 0,9%. Após a injeção de formalina os animais foram colocados em funis de vidro individuais em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (primeira fase) e 15-30 min (segunda fase) após a injeção de formalina. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com os triterpenos HCH70 e HCH115 pela via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 mg Kg<sup>-1</sup>, 30 min antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com o veículo utilizado para diluir os triterpenos (10ml Kg<sup>-1</sup>, i.p.).

A diferença da espessura (mm) entre a pata direita, antes e depois da injeção de formalina, foi considerada como índice do edema, verificado através da medição imediatamente proximal à linha do 1º e 5º dedos do animal, utilizando um paquímetro digital Stainless Hardened (150 mm ou 6"). A diferença da temperatura (°C) entre a pata direita, antes e depois da injeção de formalina, foi considerada como índice da temperatura local dos animais, verificado através da medição na superfície ventral da pata. A diferença da temperatura (°C) da orelha direita, antes e depois do teste de formalina, foi considerada como índice da temperatura sistêmica nos animais, verificado através da medição dentro do pavilhão auditivo, imediatamente proximal ao meato acústico externo do animal. Em ambas avaliações de temperatura foi utilizado um Termosensor-Pró Mallory (10° C – 50° C).

#### *4.2.4.8.4 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto (Open-field)*

O teste do campo aberto foi usado para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva dos triterpenos HCH70 e HCH115 pudessem estar relacionadas com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente (MARTINS et al., 2011). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (crossing), foi contado cumulativamente durante 6 min. Os animais foram tratados com os triterpenos HCH70 e HCH115 (30 ou 100 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p.) ou veículo (10 ml Kg<sup>-1</sup>, i.p.) 30 min antes da realização do experimento.

#### *4.2.4.8.5 Indução da pleurisia*

Este modelo foi realizado conforme descrito anteriormente (HENRIQUES et al., 1992; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001) com algumas modificações. Neste modelo, inicialmente, diferentes grupos de animais foram tratados com o veículo utilizado para diluir os triterpenos (10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.), dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) ou com os triterpenos HCH70 e HCH115 (3, 10 e 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Após 30 min destes tratamentos foi realizada, através do espaço intercostal, a administração intrapleural de 0,1 ml de salina (NaCl 0,9%) no grupo salina (S) e 0,1 ml de carragenina (1%) nos grupos controle, dexametasona e tratados com os triterpenos HCH70 e HCH115.

Depois de 4 horas destas administrações, os animais foram mortos com uma overdose de éter etílico. A cavidade pleural foi acessada e lavada com 1,0 ml de PBS [NaCl (137 mM), KCl (2,5 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 mM), com pH 7,2 – 7,4] estéril heparinizado (20 UI/ml) e o líquido pleural foi coletado com auxílio de pipeta automática e processado para contagem total e diferencial de leucócitos e quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória.

#### *4.2.4.8.6 Contagem celular de leucócitos*

A contagem celular foi realizada de acordo com o descrito previamente (HENRIQUES et al., 1992; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001), com algumas adaptações. A contagem total de leucócitos foi realizada, utilizando-se a câmara de Neubauer e microscópio óptico (aumento de 400 vezes). Para tanto, as amostras foram previamente diluídas em líquido de Türk (2% de ácido acético) na proporção de 1:20. Para a contagem diferencial, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e o depósito de leucócitos formado foi ressuspenso em 200 µl de albumina bovina à 3%, sendo secados à temperatura ambiente e corados com auxílio do “kit” para coloração hematológica Instant Prov (Newprov LTDA, Pinhais, PR, Brasil). A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina.

#### *4.2.4.8.7 Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 no lavado pleural*

Para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatória (IL-10), amostras de exsudato pleural foram obtidas, utilizando uma solução tampão [cloreto de benzametônio (0,1 mM), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, 10 mM), BSA (albumina de soro bovino, 0,5%), Cloreto de sódio (0,4 M), tween 20 (0,05%), aprotinina (2  $\mu$ g/ml) e PMSF (fenilmetilsulfonilfluoridro, 0,1 mM), diluídos em 50 ml de PBS]. A coleta foi realizada 4 h após a injeção intrapleural de carragenina. As amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm a 4°C, por 10 min (MORONEY et al., 1988). Em seguida, o sobrenadante foi rapidamente congelado e estocado a - 80 25°C, para posterior quantificação. A determinação dos níveis de citocinas foi realizada pelo método imunoenzimático de ELISA, utilizando “kits” comercialmente disponíveis (BioLegend Inc., San Diego, CA, EUA e R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

#### 4.2.5 Análise estatística

Os resultados de alguns parâmetros estudados foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão da média. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher para múltiplas comparações. Para todas as análises estatísticas, valores de p menores que 0,05 indicam diferença significativa.

Para o ensaio de atividade anti-inflamatória os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), complementado com Newman-Keuls.

No ensaio de atividade anti-hiperglicêmica os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (Erro Padrão da Média). Análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni ou Teste t não emparelhado de Student foi utilizado para identificar grupos significativamente diferentes. Diferenças foram consideradas significativas para  $p \leq 0,05$ . O software InStat versão 3.05; GraphPad Software Inc., San Diego, CA foi utilizado para análise estatística.

No ensaio de atividade antinociceptiva os resultados comportamentais foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Todos os testes comportamentais foram realizados por análise de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman Keuls. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significantes. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida em duas partes, sendo a primeira o estudo fitoquímico das espécies *Croton antisiphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon e a segunda a discussão das atividades biológicas dos extratos brutos, frações e compostos isolados das duas espécies vegetais.

### 5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES *C. antisiphiliticus* E *C. heterodoxus*

Os extratos brutos hidroalcoólicos das diferentes partes das espécies *Croton antisiphiliticus* e *Croton heterodoxus* foram submetidos ao fracionamento líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, resultando nas respectivas frações hexano, acetato de etila e aquosa. Os rendimentos obtidos estão sumarizados na Tabela 01.

Tabela 01: Rendimentos dos extratos brutos e das frações obtidas a partir das espécies *C. heterodoxus* e *C. antisiphiliticus*.

FRAÇÕES	FOLHAS		CAULES		TOTAL*	
	Material seco (g)	Rendimento (%)	Material seco (g)	Rendimento (%)	Material seco (g)	Rendimento (%)
<i>Croton heterodoxus</i>						
Material vegetal	1548,7	-	1628,5	-	566,30	-
Extrato bruto	409,92	26,47	152,51	9,36	64,03	11,31
Fração hexano	83,87	20,76	30,43	20,50	5,09	23,90
Fração acetato	54,41	13,37	46,60	31,40	6,97	32,77
Fração aquosa	105,00	26,00	41,70	28,10	-	-
<i>Croton antisiphiliticus</i>						
Material vegetal	667,40	-	184,40	-	421,00	-
Extrato bruto	59,64	8,94	10,20	5,53	44,21	10,50
Fração hexano	22,92	38,43	0,88	8,62	5,07	25,25
Fração acetato	1,90	3,18	1,10	10,81	1,06	5,28
Fração aquosa	-	-	-	-	157,17**	7,66**

\*TOTAL refere-se ao extrato da planta inteira.

\*\*Valores obtidos partindo-se de 2051 g de planta seca (folhas e caules) e extração conforme descrição abaixo.

Como forma de apresentação e discussão dos resultados, os diferentes extratos e frações apresentados na Tabela 01 foram codificados da seguinte maneira: As iniciais CH e CA referem-se às espécies vegetais *Croton heterodoxus* e *Croton antisiphiliticus*, respectivamente. EB refere-se aos Extratos Brutos Hidroalcoólico, F e C

refere-se a folhas e caules, respectivamente e H, A e W fazem referência ao solvente extrator Hexano, Acetato de Etila e Água.

A análise por CCD dos extratos brutos das folhas e caules de *C. heterodoxus* mostrou uma composição complexa com uma gama variada de compostos. Assim, nossa estratégia de isolamento foi processar os extratos de folhas e caules separadamente. Por outro lado, a análise por CCD da espécie *C. antisiphiliticus* revelou uma composição micromolecular bem mais simples, e com menor rendimento, o que nos orientou a trabalhar com o extrato total das partes aéreas (caules e folhas juntos). Desta forma, as frações hexano (CHF<sub>H</sub>), acetato de etila (CHF<sub>A</sub>) e aquosa (CHF<sub>W</sub>) das folhas, e dos caules, CHCH, CHCA e CHCW de *C. heterodoxus* e extrato bruto aquoso das partes aéreas de *C. antisiphiliticus* (CATW) foram submetidos ao fracionamento cromatográfico para o isolamento dos constituintes químicos e determinação das suas respectivas estruturas. No entanto, todas as frações obtidas apresentadas na Tabela 01 foram testadas quanto a sua atividade biológica, com exceção das frações aquosas de *C. heterodoxus*. As frações aquosas de *C. heterodoxus* total, *C. antisiphiliticus* folhas e caules não foram utilizadas neste trabalho devido ao seu baixíssimo rendimento.

A espécie vegetal *C. antisiphiliticus* despertou maior interesse para a realização de estudos farmacológicos na área de inflamação por ser utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças de cunho inflamatório. Considerando o baixo rendimento obtido com esta espécie, os trabalhos de isolamento dos princípios ativos e o monitoramento de atividade anti-inflamatória, foram conduzidos com o extrato bruto total e suas frações. Orientados pelos resultados de atividade anti-inflamatória e dados encontrados na literatura (MATOS, 2011), que relatam a presença de compostos polares na espécie, nossa estratégia foi concentrar esforços na fração aquosa, preparando, assim, o extrato bruto total aquoso (EBW) tendo como solvente extrator uma mistura etanol:H<sub>2</sub>O (1:1). Os resultados apresentados para a fração CATW (Tabela 01) referem-se ao extrato bruto total aquoso de *C. antisiphiliticus*.

### 5.1.1 *Croton antisiphiliticus* Martius

#### 5.1.1.1 Extrato Bruto Total Aquoso de *Croton antisiphiliticus* (CATW)

A Figura 12 ilustra o fracionamento cromatográfico do extrato CATW e os compostos isolados através da cromatografia em coluna.

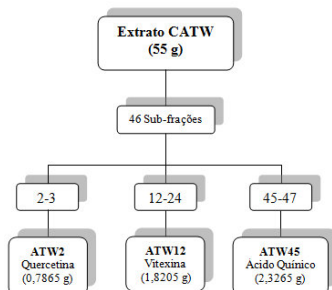


Figura 12: Fracionamento cromatográfico do extrato CATW.

A Figura 13 apresenta o eletroferograma capilar do extrato bruto total (CAEBT), Fig. 13A, e do extrato bruto total aquoso (CATW), Fig. 13B, de *C. antisiphiliticus*. A Figura revelou uma composição bastante similar para estes dois extratos. Com esta técnica analítica foram identificados três flavonoides *O*-glicosilados: rutina (1), isoquercitrina (2) e quercitrina (4) e um flavonoide *C*-glicosilado: vitexina (3), Figura 14. A identificação de 1-4 no eletroferograma foi realizada por comparação do perfil de migração e co-migração com os respectivos padrões de flavonoides, Figuras 15 e 16, pág. 111.

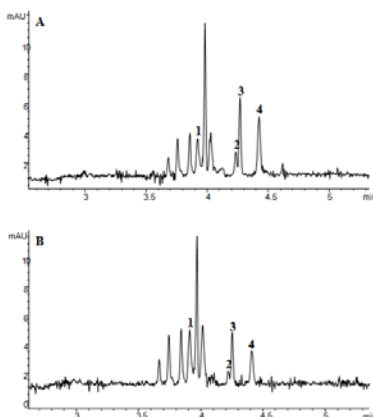


Figura 13: Eletroferogramas dos extratos CAEBT (A) e C ATW (B) de *C. antisiphiliticus*. Rutina (1); isoquercitrina (2); vitexina (3) e quercitrina (4). Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com dimensões de 40 cm L<sub>det</sub>, 48,5 cm L<sub>tot</sub>; 50 µm D.I. Tensão aplicada de +30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar, 25 °C. Detecção direta em 390 nm.

A análise dos eletroferogramas (Fig. 13 A e B) mostrou que o extrato CATW possui uma maior concentração dos compostos, orientando-nos a trabalhar no fracionamento do extrato aquoso com a expectativa de se obter maior quantidade dos flavonoides presentes na planta (Figura 13 B).

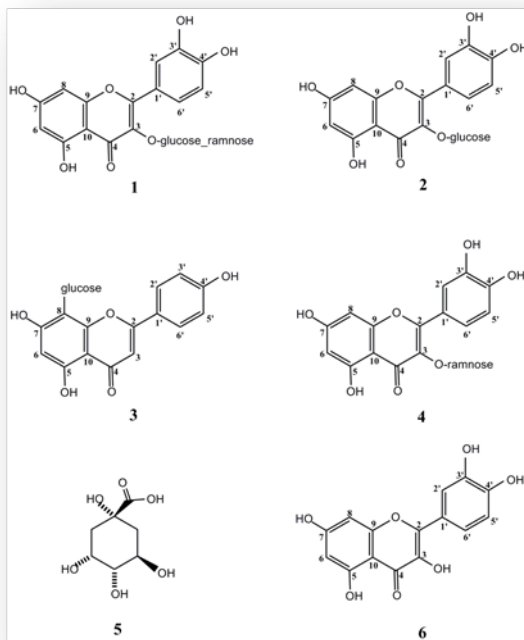


Figura 14: Estruturas químicas dos compostos identificados na espécie *Croton antisiphiliticus*. Rutina (1), isoquercitrina (2), vitexina (3), quercitrina (4), ácido quínico (5) e quercetina (6).

O fracionamento do extrato CATW em coluna de sílica gel desativada com 15% de água resultou no isolamento de vitexina (3) e ácido quínico (5), Figura 14, como compostos majoritários da fração. A quercetina (6), Figura 14, foi isolada em menor quantidade. Observou-se que a quercetina não aparece no perfil do eletroferograma de CATW, o que pode ser interpretado como um artefato de isolamento, resultado da hidrólise durante o processamento do CAEBT e CATW. De fato, experimentos de hidrólise com CAEBT e CATW, Figuras 17 e 18,

pág.112, respectivamente, mostraram claramente a presença de quercetina nas duas frações.

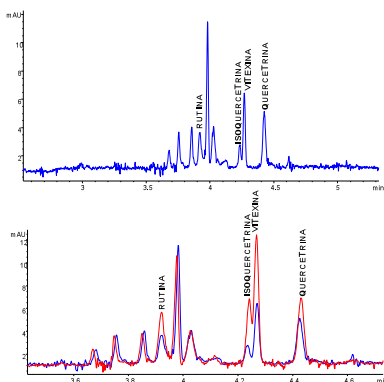


Figura 15: Eletroferogramas A – CAEBT; B – CAEBT adicionado dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercitrina e vitexina na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  aproximadamente. Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida, dimensões:  $40 \text{ cm L}_{\text{det}}$ ,  $48,5 \text{ cm L}_{\text{tot}}$ ;  $50 \text{ }\mu\text{m D}$ . I. Tensão aplicada 30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar  $25^\circ\text{C}$ . Detecção direta em 390 nm.

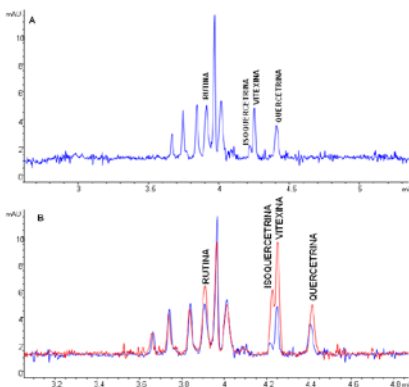


Figura 16: Eletroferogramas A – CATW; B – CATW adicionada dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercitrina e vitexina na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  aproximadamente. Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida, dimensões:  $40 \text{ cm L}_{\text{det}}$ ,  $48,5 \text{ cm L}_{\text{tot}}$ ;  $50 \text{ }\mu\text{m D}$ . I. Tensão aplicada 30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar  $25^\circ\text{C}$ . Detecção direta em 390 nm.



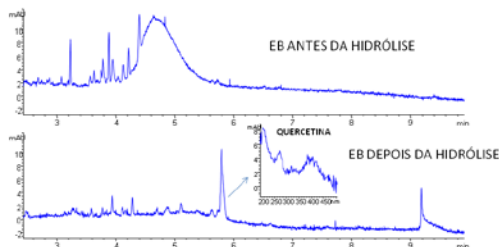


Figura 17: Eletroferograma CAEBT antes e depois da hidrólise. Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida, dimensões: 40 cm L<sub>det</sub>, 48,5 cm L<sub>tot</sub>; 50 µm D. I. Tensão aplicada 30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar 25°C. Detecção direta em 200 nm.

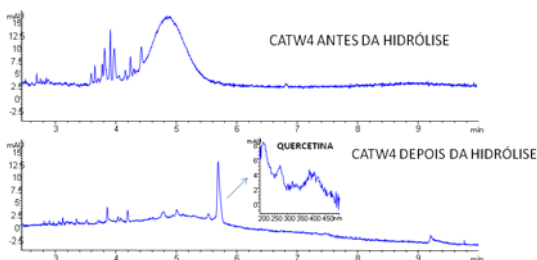


Figura 18: Eletroferograma CATW antes e depois da hidrólise. Condições analíticas: Eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> e metanol 10%, pH 9,3. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida, dimensões: 40 cm L<sub>det</sub>, 48,5 cm L<sub>tot</sub>; 50 µm D. I. Tensão aplicada 30 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 5 s. Temperatura do capilar 25°C. Detecção direta em 200 nm.

A identificação dos compostos isolados foi confirmada através da análise dos dados espectroscópicos e por comparação com dados previamente publicados na literatura (MIYAZAWA; HISAMA 2003; TANAKA et al. 2005).

O espectro de infravermelho do composto **3** (Figura 14, pág. 110) mostrou um perfil de absorção característico de flavonoides, Figura 19, pág. 114. Bandas de absorção em 3380 e 3261 cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento dos grupos OH livre e em ligação de hidrogênio foram observadas. Observou-se ainda uma banda em 1652 cm<sup>-1</sup>, característica de estiramento de ligações C=O (sistema α-β insaturado), uma banda em 1612 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento de ligações C=C, uma banda em 1363 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento da ligação C-O, e uma banda de

baixa intensidade em  $2961\text{ cm}^{-1}$ , estiramento característico de ligações C-H. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 20, apresentou um perfil característico de uma 4',5,7-tri-hidroxiflavona. A região de hidrogênios aromáticos apresentou um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}} 8,30$  (H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}} 7,30$  (H-3' e H-5') com constantes de acoplamento para hidrogênios *orto* relacionados ( $J=8,30\text{ Hz}$ ), estabelecendo o padrão de substituição 4'-hidroxi do anel B de flavonoides. Um simpleto em  $\delta_{\text{H}} 6,84$ , característico do H-3 de flavonas e um simpleto em  $\delta_{\text{H}} 6,73$  atribuído ao H-6 sugerem a C-8 glicosilação. Também foi observado em  $\delta_{\text{H}} 13,97$  a absorção característica da hidroxila quelada ligada ao carbono C-5. O duplete centrado em  $\delta_{\text{H}} 5,97$  com  $J=9,55\text{ Hz}$ , típico de acoplamento *trans*-diaxial, foi atribuído ao H-1'' do carbono anomérico. Os sinais observados entre  $\delta_{\text{H}} 3,00$  e  $5,00$  indicam a presença de uma unidade de açúcar na molécula, e, apesar de apresentarem-se como sinais mal resolvidos, a integração dos picos revelou um total de 6 átomos de hidrogênio, os quais juntamente com o hidrogênio anomérico totalizam 7 átomos de hidrogênio ligados a carbono para a porção glicosídica. Estes sinais combinados com os dados de  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura (BIANCO; SANTOS, 2003) sugerem a estrutura da  $\beta$ -glucose. A posição C-8 da unidade glicosídica foi confirmada pelo mapa de correlação HMBC (anexos, MS 01), principalmente através das correlações apresentadas entre H-1'' e o sinal em  $\delta_{\text{C}} 157,5$  (C-9), e entre H-6 e os carbonos do anel A, especialmente a correlação com os sinais em  $\delta_{\text{C}} 164,8$  (C-7),  $\delta_{\text{C}} 165,1$  (C-5),  $\delta_{\text{C}} 105,4$  (C-10). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , Figura 21, apresentou 19 sinais, dois dos quais apresentam-se em maior intensidade que foram atribuídos aos carbonos equivalentes C-2' e C-6' ( $\delta_{\text{C}} 129,9$ ) e C-3' e C-5' ( $\delta_{\text{C}} 117,1$ ), o que está de acordo com a literatura (TANAKA et al.; 2005). Estes dados podem ser observados na Tabela 02, pá g. 117, e confirmam a estrutura da vitexina para o composto isolado.

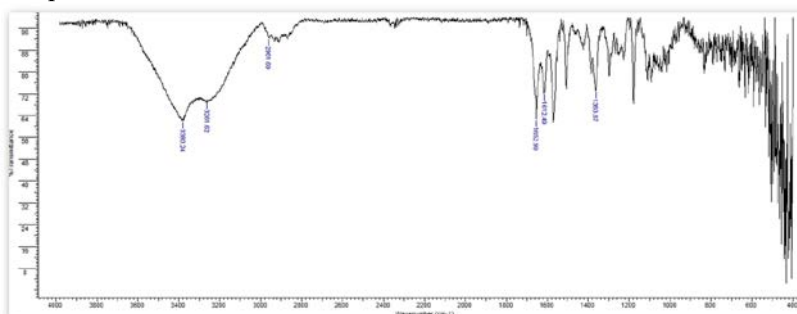


Figura 19: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto **3**.

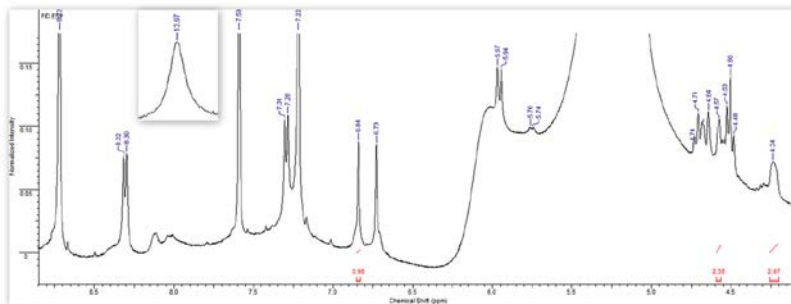


Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em Pir) do composto **3**.

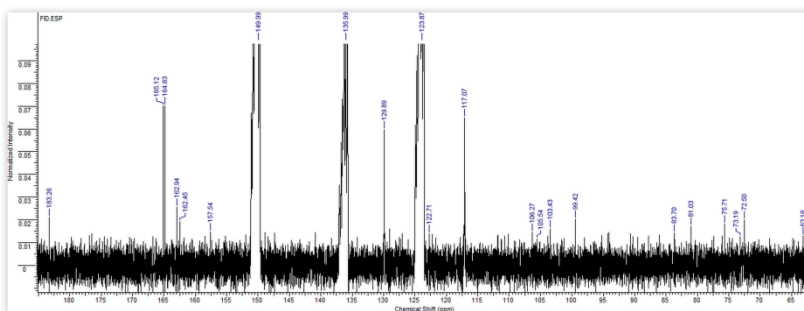


Figura 21: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em Pir) do composto **3**.

O composto **5** (Fig. 14, pá g. 110) apresentou bandas características de ácidos fenólicos no espectro de infravermelho. Foi observada uma banda de absorção em  $3412\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento de grupos OH livres. Também foram observadas uma banda em  $1612\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$ , e uma banda de baixa intensidade em  $2926\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento da ligação  $\text{C}-\text{H}$ , Figura 22. Apesar de não terem sido obtidos espectros claros de hidrogênio e carbono, foi possível identificar o composto **5** como sendo o ácido quínico através da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) (ESI), que forneceu a relação carga/massa para o íon molecular deprotonado de  $m/z$  191.0556 (anexos, MS 02) (calculado para  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 191.0561) e o padrão de fragmentação do íon de  $m/z$  173,  $m/z$  127 e  $m/z$  111, que estão de acordo com o perfil ESI-Q-TOFMS previamente publicado na literatura (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004; SANTOS et al. 2011).

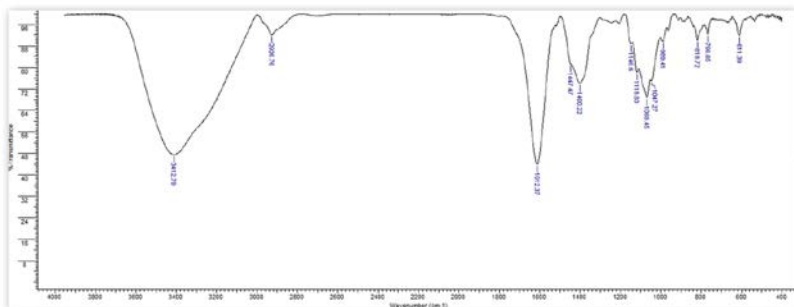


Figura 22: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto 5.

O composto 6 (Fig. 14, pág. 110) também apresentou um perfil de absorção característico de flavonoides no espectro de infravermelho. Pôde-se observar bandas de absorção referentes ao estiramento dos grupos OH livre e em ligação de hidrogênio ( $3413$  e  $3295\text{ cm}^{-1}$ ), e as bandas de absorção em  $1664\text{ cm}^{-1}$  (C=O de sistema  $\alpha$ - $\beta$  insaturado), em  $1610\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C=C, em  $1261\text{ cm}^{-1}$  (C-O) e uma banda de baixa intensidade em  $2924\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C-H, Figura 23.

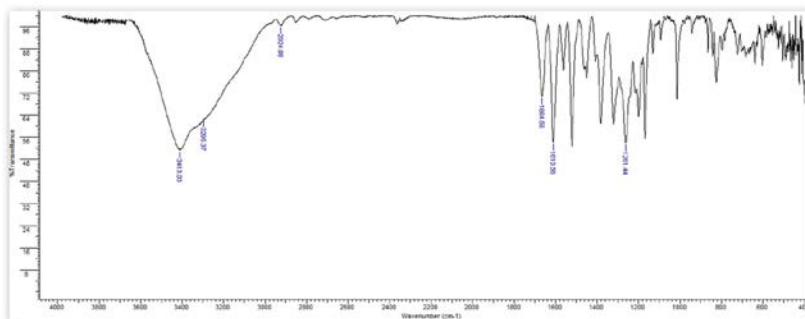


Figura 23: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto 6.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Fig. 24, mostrou um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6,78 e 6,75, com constante de acoplamento de 2,34 Hz, indicando um acoplamento *meta* entre eles, os quais foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C-6 e C-8 do a nel A dos flavonoides, respectivamente. Foram observados também outros dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,42 e 8,66, com constante de acoplamento de 8,60 (acoplamento *orto*) e 2,34 Hz (acoplamento *meta*), respectivamente, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C-5' e C-2' do anel B,

respectivamente. Finalmente, um duplo duplete foi observado em  $\delta_H$  8,14, com constantes de acoplamento de 8,60 e 2,34 Hz (sistema *orto-meta*), atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C-6' do anel B, Tabela 02.

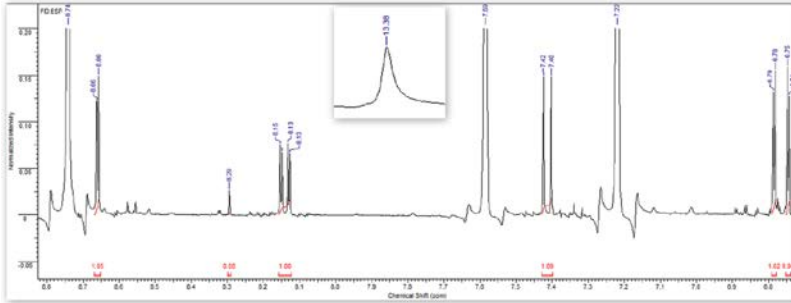


Figura 24: Espectro de RMN de  $^1H$  (400 MHz em Pir) do composto 6.

Foram contabilizados 15 sinais de carbono no espectro de RMN de  $^{13}C$ , Fig. 25, com deslocamentos químicos de acordo com valores encontrados na literatura para a 3,5,7,3',4'-penta-hidroxi flavona, ou quercetina (MIYAZAWA; HISAMA, 2003).

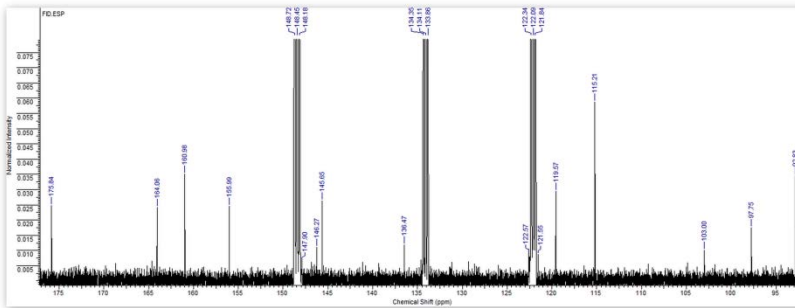


Figura 25: Espectro de RMN de  $^{13}C$  (100 MHz em Pir) do composto 6.

A quercetina está presente em uma quantidade considerável de espécies de plantas. Este flavonoide é um potente antioxidante, quelante metálico, sequestrador de radicais livres, além de prevenir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (DEWICK, 2002).

Tabela 02: Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os compostos **3** e **6** isolados de *Croton antisiphiliticus* ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz).

Posição	Vitexina ( <b>3</b> )		Quercetina ( <b>6</b> )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	162,4		146,3	
3	103,4	6,84 (s)	136,5	
4	183,3		175,8	
5	165,1	13,97 (s)	161,0	13,38 (s)
6	99,4	6,73 (s)	97,8	6,78 (d) $J=2,34$
7	164,8		164,1	
8	106,3		92,8	6,75 (d) $J=2,34$
9	157,5		156,0	
10	105,5		103,0	
1 $^{\circ}$	122,7		122,6	
2 $^{\circ}$	129,9	8,30 (d) $J=8,30$	115,2	8,66 (d) $J=2,34$
3 $^{\circ}$	117,1	7,30 (d) $J=8,30$	145,6	
4 $^{\circ}$	162,9		147,9	
5 $^{\circ}$	117,1	7,30 (d) $J=8,30$	119,6	7,42 (d) $J=8,60$
6 $^{\circ}$	129,9	8,30 (d) $J=8,30$	121,6	8,14 (dd) $J=8,60$ e $2,34$
1 $^{\prime\prime}$	75,7	5,97 (d) $J=9,55$	-	
2 $^{\prime\prime}$	73,2	4,57 <i>nd*</i>	-	
3 $^{\prime\prime}$	81,0	4,24 <i>nd*</i>	-	
4 $^{\prime\prime}$	72,5	4,24 <i>nd*</i>	-	
5 $^{\prime\prime}$	83,7	4,24 <i>nd*</i>	-	
6 $^{\prime\prime}$	63,2	4,57 <i>nd*</i>	-	

*nd\** não definido.

## 5.1.2 *Croton heterodoxus* Baillon

### 5.1.2.1 Fração hexano dos caules (CHCH)

A fração hexano do caule foi cromatografada em coluna de sílica gel, eluída com hexano/acetato de etila no modo gradiente de polaridade, resultando em 155 sub-frações. A análise por CCD, revelada em anisaldeído sulfúrico, permitiu reunir as frações em cinco grupos distintos, como mostra a Figura 26.

Dando continuidade à nossa investigação fitoquímica, cinco compostos foram isolados da fração hexano dos caules de *Croton heterodoxus*: quatro triterpenos e um esterol. Nas demais frações, foram detectados apenas compostos hidrocarbonados como, ácidos graxos, alcoóis graxos, ésteres de ácidos graxos e pigmentos, o que é esperado para a fração hexano.

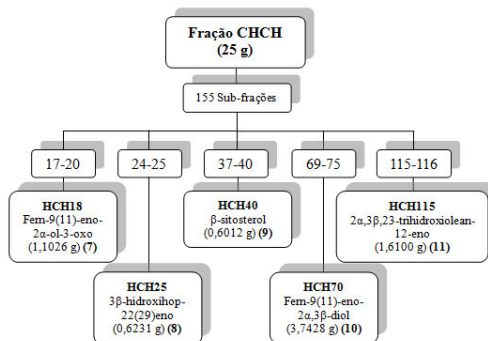


Figura 26: Fracionamento cromatográfico da fração CHCH.

O composto 7, Fig. 27, foi obtido inicialmente na forma de um pó verde claro que após sucessivas lavagens em AcOEt forneceu 1,1026 g do composto puro na forma de um fino sólido branco com p.f. 184,8-186,3° C e Rf 0,63 (80:20 hexano-AcOEt).

O espectro de infravermelho em pastilha de KBr (Figura 28) apresentou um perfil de absorção típico de estruturas triterpênicas ou esteroidais: a intensa absorção na região de  $\nu$  2971-2877  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à estiramentos C-H juntamente com um complexo grupo de absorções na região de deformações angulares é uma característica marcante de esqueleto hidrocarbonado de triterpenoides ou esteroides.

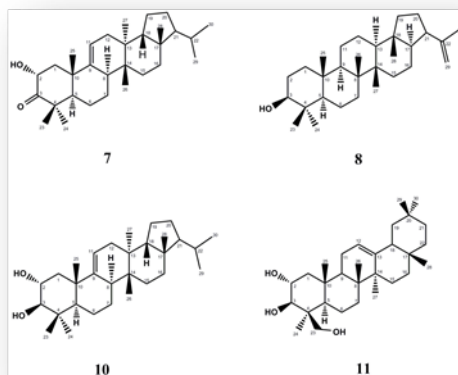


Figura 27: Triterpenos isolados da fração CHCH de *Croton heterodoxus*. Fern-





Figura 29: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **7**.

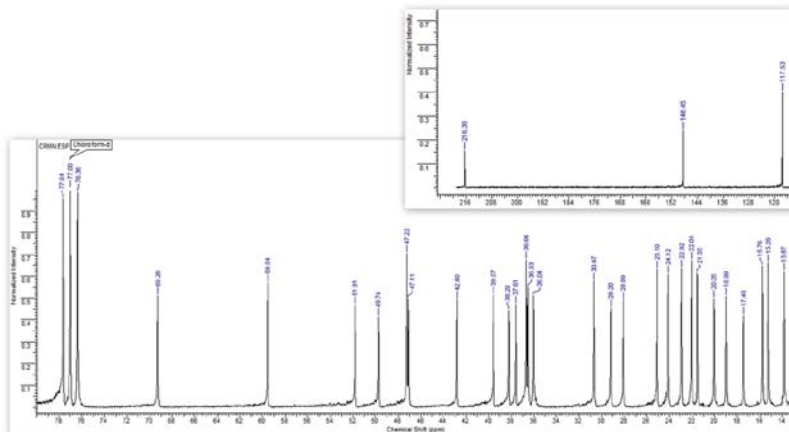


Figura 30: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **7**.

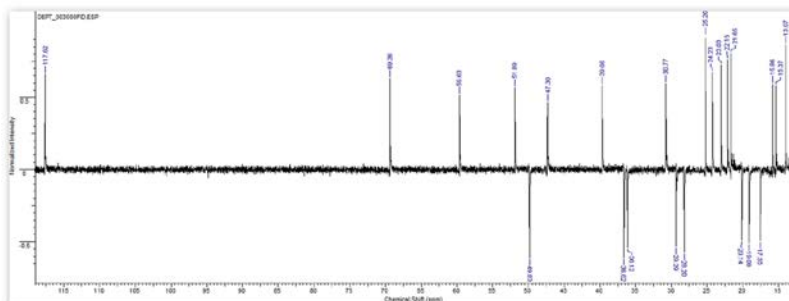


Figura 31: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **7**.

A análise conjunta dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT mostrou sinais para oito carbonos metílicos, oito metilênicos, cinco metínicos e cinco carbonos quaternários. Através dos valores de deslocamentos químicos, identificou-se uma ligação dupla trissubstituída através dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  148,4 (C) e  $\delta_{\text{C}}$  117,5 (CH) os quais foram atribuídos aos carbonos C9 e C11, respectivamente. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , o sinal centrado em  $\delta_{\text{H}}$  5,41 (dd,  $J = 5,08$  e  $2,73$  Hz) é devido ao átomo de hidrogênio olefínico H11. A localização da ligação dupla C9/C11 foi realizada através da análise dos mapas de correlação COSY, HMQC e HMBC.

Tabela 03: Dados de RMN para os compostos **7**, **10** e **11** ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz).

Posição	Composto <b>7</b>		Composto <b>10</b>		Composto <b>11</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	49,7	2,64 (dd) $J=12,89$ e $6,25$ ; 1,41 (m)	47,2	2,25 (dd) $J=12,50$ e $4,30$ ; 1,22(m) 3,69 (m)	46,4	2,05 (m); 0,94 (m)
2	69,3	4,59 (m) $J=12,83$ e $6,28$	69,2	$J=11,87$ ; $9,31$ e 4,37	69,1	3,90 (m)
3	216,4		83,5	3,01 (d) $J=9,37$	85,4	3,20 (d) $J=8,99$
4	37,6		39,2		43,2	
5	47,2	1,72 (m)	44,3	1,35 (m)	55,8	0,96 (m)
6	17,5	1,76 (m)	17,7	0,79 (m)	18,4	1,62 (m)
7	19,0	1,65 (m)	18,9	1,63 (m)	32,7	1,40 (m); 0,87 (m)
8	39,6	2,07 (d) $J=13,67$	39,8	2,08 (d) $J=11,32$	39,8	
9	148,4		150,1		47,7	
10	47,1		39,0		38,1	
11	117,5	5,42 (dd) $J=5,08$ e $2,73$	116,6	5,35 (dd) $J=5,27$ e $2,73$	23,8	1,92 (m)
12	36,5	1,65 (d) $J=2,34$	36,6	1,64(m); 1,41(m)	121,3	5,19 (dd) $J=3,95$ e $3,13$
13	38,2		36,7		145,2	
14	36,7		37,6		41,7	
15	29,2	1,25 (m)	29,2	1,29 (m)	26,0	1,25 (m)
16	36,0	1,42 (m); 1,37 (m)	36,1	1,66 (m)	26,8	0,80 (m)
17	42,8		42,9		32,4	
18	51,8	1,55 (m)	51,9	1,54 (m)	47,1	1,94 (m)
19	20,0	1,33 (m); 1,21 (m)	20,1	1,25 (m)	46,7	1,66 (m); 1,11 (m)
20	28,1	1,79 (m)	28,2	1,05 (m)	31,1	
21	59,5	0,95 (d) $J=9,96$	59,6	0,98 (d) $J=9,57$	34,7	1,22 (m)
22	30,7	1,42 (m)	30,7	1,44 (m)	37,1	1,23 (m); 1,40 (m)
23	24,1	1,13 (s)	27,9	1,01 (s)	65,6	4,10 (d) $J=11,33$ ; 3,40 (d) $J=11,33$
24	21,6	1,18 (s)	16,2	0,91 (s)	22,9	1,30 (s)
25	25,1	1,39 (s)	26,1	1,14 (s)	17,4	0,97 (s)
26	15,3	0,76 (s)	15,3	0,74 (s)	16,7	0,94 (s)
27	15,8	0,78 (s)	15,8	0,81 (s)	26,0	1,13 (s)
28	13,9	0,75 (s)	13,9	0,76 (s)	28,4	0,83 (s)
29	22,9	0,84 (d) $J=6,44$	23,0	0,84 (d) $J=6,64$	33,3	0,88 (s)
30	22,0	0,90 (d) $J=6,64$	22,1	0,89 (d) $J=6,44$	23,6	0,87 (s)

Dois carbonos oxigenados são mostrados pelos sinais em  $\delta_C$  216,4 (C) e  $\delta_C$  69,3 (CH) no espectro de RMN de  $^{13}C$ , que foram atribuídos aos carbonos 3 e 2, respectivamente. Esta atribuição foi feita através da observação do acoplamento entre os sinais do hidrogênio centrado em 4,59 ppm (dd,  $J = 12,83$  e  $6,28$  Hz), ligado ao C2, com os sinais dos hidrogênios  $CH_2$  em  $\delta_H$  2,64 e  $\delta_H$  1,41, ligados ao C1, pelo mapa de correlação COSY (anexos, MS 03).

O mapa de correlação COSY mostrou vários sistemas de spin, com destaque para CH (2)/ $CH_2$  (1) do anel A e CH (11)/ $CH_2$  (12) do anel C. Os valores de deslocamentos químicos relacionados à ligação dupla trissubstituída entre os carbonos C9 e C11 estão de acordo com dados da literatura para outros triterpenos:  $\delta_C$  151,6 a 153,4 para C9 e 115,5 a 120,9 para C11 (MAHATO; KUNDU, 1994).

A atribuição dos sinais das metilas foi realizada através das correlações a longa distância dos carbonos com os hidrogênios ligados à carbonos alifáticos no mapa de correlação HMBC (anexos, MS 5). Os grupos metila encontram-se ligados em C4 (C23 e C24), C10 (C25), C13 (C27), C14 (C26), C17 (C28) e C22 (C29 e C30), revelando o triterpeno com esqueleto do tipo fernano.

Esta atribuição foi confirmada pela presença de duas metilas duplete centradas em  $\delta_C$  22,9 e  $\delta_H$  0,84 (d,  $J = 6,4$  Hz) e  $\delta_C$  22,0 e  $\delta_H$  0,90 (d,  $J = 6,6$  Hz). A maioria dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}C$  foi atribuída através das múltiplas correlações heteronucleares (HMBC) e pode ser observada na Figura 32.

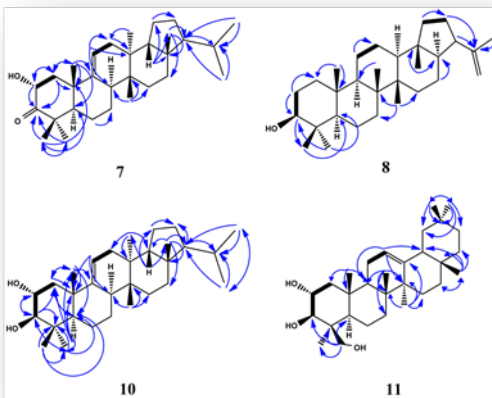


Figura 32: Correlações de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (negrito) e HMBC (H  $\rightarrow$  C) dos compostos **7**, **8**, **10** e **11**.

Estas análises nos levaram à identificação do triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo, confirmado através da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) (ESI $^+$ ), que forneceu a relação carga/massa para o íon molecular de  $m/z$  463,3545 (anexos, MS 06) (calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$  [M+Na] $^+$ : 463,3547). O triterpeno isolado, de acordo com pesquisa bibliográfica, é relatado pela primeira vez neste trabalho.

O composto **8** (0,6231 g), Figura 27, pág. 119, foi isolado na forma de um fino sólido branco com R<sub>f</sub> de 0,50 (80:20 hexano:AcOEt), com faixa de fusão de 244,5-252,3 $^\circ$  C e massa molecular de 426,72 g mol $^{-1}$ .

O espectro de infravermelho (Figura 33) apresentou um perfil de absorção característico de estruturas triterpênicas. Pode-se observar uma intensa absorção na região de  $\nu$  2917-2849  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à estiramentos C-H da cadeia triterpênica, absorção larga e intensa em  $\nu$  3422  $\text{cm}^{-1}$  característica do estiramento da ligação O-H, e a pequena banda de absorção em  $\nu$  1733  $\text{cm}^{-1}$  sugerindo a presença de uma ligação dupla C=C.

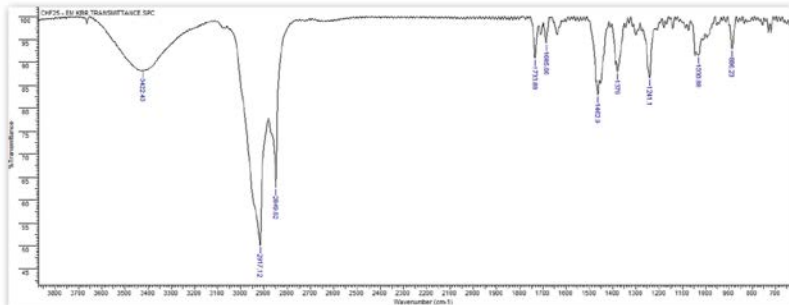


Figura 33: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto **8**.

A análise preliminar dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 34),  $^{13}\text{C}$  (Figura 35) e DEPT (Figura 36) sugere uma estrutura triterpênica. A atribuição completa dos sinais de RMN é apresentada na Tabela 04, pág. 128, e foi realizada através da análise conjunta dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT, e dos mapas de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (anexos, MS 07), HMQC (anexos, MS 08) e HMBC (anexos, MS 09).

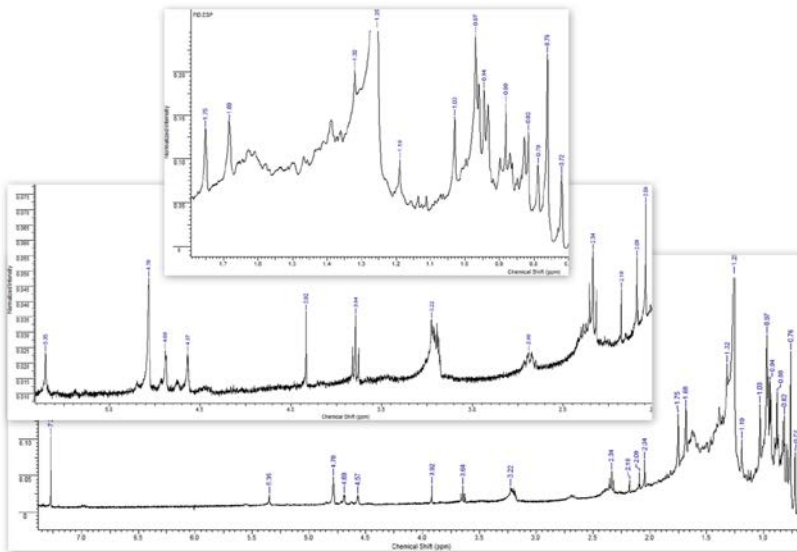


Figura 34: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **8**.

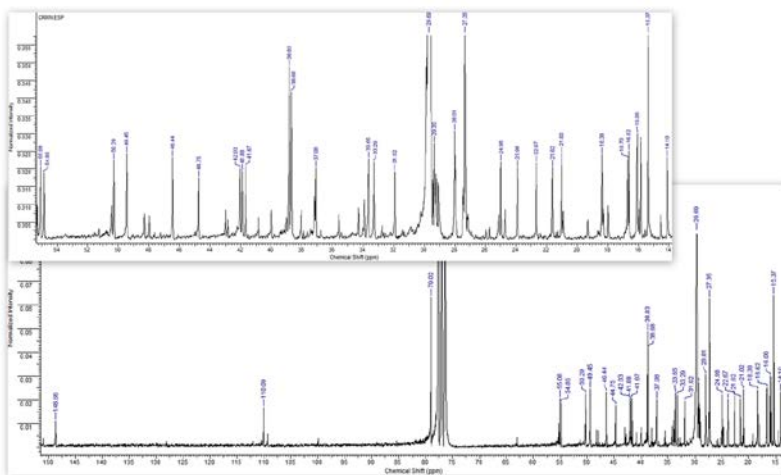


Figura 35: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **8**.

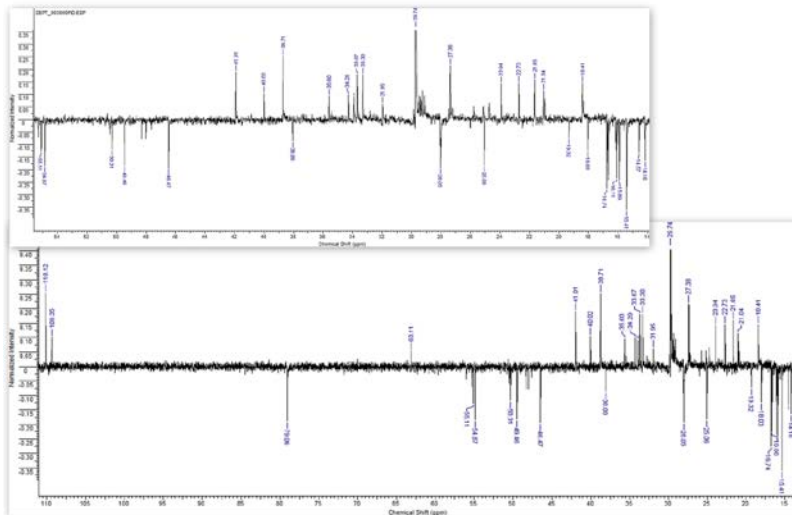


Figura 36: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **8**.

Trinta átomos de carbono foram contabilizados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 35) e o espectro DEPT (Fig. 36) mostrou sinais para sete carbonos metílicos, onze metilênicos, seis metínicos e seis carbonos quaternários. Através dos valores de deslocamento químico observa-se a presença de uma dupla ligação exocíclica através dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  148,7 (C) e  $\delta_{\text{C}}$  110,1 ( $\text{CH}_2$ ), que foram atribuídos aos carbonos C22 e C29, respectivamente, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ ; e do sinal centrado em  $\delta_{\text{H}}$  4,76, correspondente aos átomos de hidrogênio H29 no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Um carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado é mostrado pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  79,0 (CH) no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , atribuído ao carbono C3. Esta atribuição foi realizada através da observação do acoplamento entre os sinais do hidrogênio centrado em 3,20 ppm (dd,  $J = 11,52$  e  $5,27$  Hz), ligado ao C3, com os sinais dos hidrogênios  $\text{CH}_2$  em  $\delta_{\text{H}}$  0,95, ligados ao C2 do anel A do triterpeno, pelo mapa de correlação COSY (anexos, MS 07). A localização da ligação dupla e do grupo OH foi realizada pela análise dos mapas de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (anexos, MS 07), HMQC (anexos, MS 08) e HMBC (anexos, MS 09). Além dos sinais da amostra, foram detectados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT a presença de sinais menos intensos referentes ao triterpeno **7** discutido anteriormente. A atribuição completa dos sinais de RMN pode ser observada na Tabela 04.

Tabela 04: Dados de RMN para o composto **8** ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz).

Posição	Comp. 358*	Hopenol B**	Composto <b>8</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	40,4		38,8	1,68 (m)
2	18,7		31,9	0,95 (m)
3	42,2	3,19 (dd) $J=12,00$ e $6,00$	79,0	3,20 (dd) $J=11,52$ e $5,27$
4	33,3		29,4	-
5	56,2		55,1	0,67 (m)
6	18,7		18,4	1,68 (m)
7	33,3		33,3	2,34 (m)
8	41,9		41,7	-
9	50,4		50,3	1,25***
10	37,4		37,1	-
11	21,0		21,0	2,12 (m)
12	24,0		22,7	1,55 (m)
13	49,5		49,4	1,22***
14	42,1		42,0	-
15	33,7		33,6	1,38 (m)
16	21,7		21,6	0,90 (m)
17	54,9		54,8	0,65 (m)
18	44,8		44,8	-
19	41,9		41,9	2,00 (m)
20	27,4		23,9	1,43 (m)
21	46,5		46,4	1,45 (m)
22	148,7		148,7	-
23	33,4	0,98 (s)	28,0	1,03 (s)
24	21,6	0,76 (s)	16,7	0,76 (s)
25	15,9	0,82 (s)	14,1	0,79 (s)
26	16,7	0,98 (s)	16,1	0,97 (s)
27	16,8	0,93 (s)	16,6	0,94 (s)
28	16,1	0,72 (s)	15,8	0,72 (s)
29	110,7	4,78 (sl)	110,1	4,78 (sl)
30	25,0	1,75 (s)	25,0	1,75 (s)

\*(MAHATO; KUNDU, 1994).

\*\* (MATSUNAGA; MORITA, 1983).

\*\*\* oculo pelo sinal do hexano em 1.26 ppm presente na amostra.

Os valores de deslocamentos químicos relacionados à ligação dupla exocíclica entre os carbonos C22-C29 estão de acordo com dados da literatura para outros triterpenos:  $\delta_C$  148,7 para C22 e 110,7 para C29, bem como os valores de deslocamento químico para o carbono oxigenado: 79,0 para C3 (MAHATO; KUNDU, 1994).

A atribuição dos sinais das metilas bem como a sua localização foi realizada através das correlações observadas no mapa de correlação

HMBC (anexos, MS 09), e encontram-se ligadas em C4 (C23 e C24), C10 (C25), C8 (C26), C14 (C27), C18 (C28) e C22 (C30), revelando o triterpeno com esqueleto do tipo hopano. A atribuição completa dos sinais de RMN foi realizada através da análise dos mapas de correlação COSY e HMBC, e as correlações podem ser observadas na Fig. 32, pág. 123. Estes dados estão de acordo com a literatura (MATSUNAGA; MORITA, 1983) e nos levaram à identificação do triterpeno  $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno, Fig. 27, pág. 119, que já foi relatado também nas espécies *Euphorbia lathyris* (KOOPS; BAAS; GROENEVELD, 1991; GINER; DJERASSI, 1995) e *Rhododendron lepidotum* (ZHOU et al., 2012).

O composto **9** foi isolado na forma de agulhas cristalinas, que após o procedimento de purificação por sucessivas lavagens com hexano rendeu 0,6012 g de um sólido cristalino, que foi identificado por comparação com dados da literatura como o estero  $\beta$ -sitosterol, contendo traços de estigmasterol. O composto apresentou uma faixa de fusão de 124,0-129,7° C ( $\beta$ -sitosterol = 130-135° C (YUN-CHOI et. al., 2003), estigmasterol = 170-172° C (ABOU-DOUH et. al., 2005)) e Rf 0,36 (80:20 hexano-AcOEt).

Analisando o espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto obtido, Fig. 37, observa-se um perfil de absorção característico de estruturas triterpênicas ou esteroidais. Observa-se na região de  $\nu$  3427  $\text{cm}^{-1}$  a presença de uma banda intensa e larga característica do estiramento da ligação O-H, e banda em  $\nu$  1639  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação dupla C=C. O conjunto de bandas de absorção na região de  $\nu$  2960-2850  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a estiramentos C-H alifáticos, cuja alta intensidade indica a presença de uma cadeia hidrocarbonada longa e não linear.

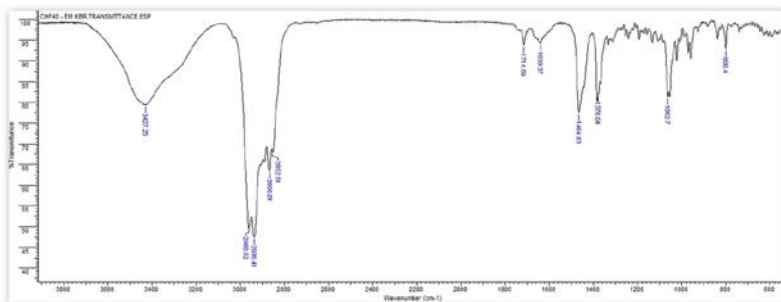


Figura 37: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto **9**.



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 38) pode-se observar um grupo de absorções na região de 0,7-2,4 ppm, típico de estruturas esteroidais. O multipletto centrado em 3,53 ppm sinalizando a presença do hidrogênio carbinólico típico da  $\beta$ -hidroxilação em C-3, e o sinal centrado em 5,35 ppm indicando a presença de uma ligação dupla endocíclica trissubstituída, são sinais característicos dos fitoesteróis e sugestivos da estrutura do  $\beta$ -sitosterol. Um grupo de sinais de baixa intensidade na região de 5,0-5,2 ppm, na forma de um duplo-dupletto pode ser observado, característico da ligação dupla *trans*-dissubstituída presente em alguns fitoesteróis como o estigmasterol, que apresenta uma ligação dupla entre os carbonos C22 e C23.

Na literatura frequentemente encontram-se relatos de que o fitosterol  $\beta$ -sitosterol geralmente vem acompanhado de pequenas quantidades de estigmasterol, ou até mesmo de outros esteróis.

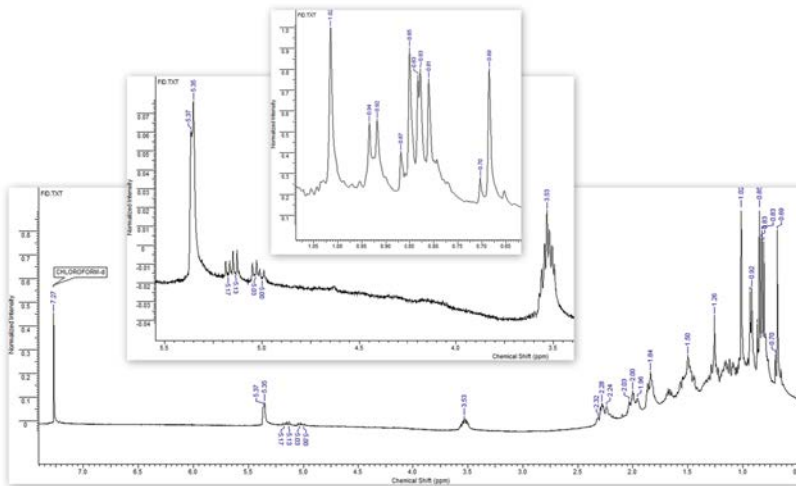


Figura 38: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **9**.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 39) e RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT (Figura 40) mostraram a presença de 27 sinais de maior intensidade, confirmando a estrutura de um esteroide.

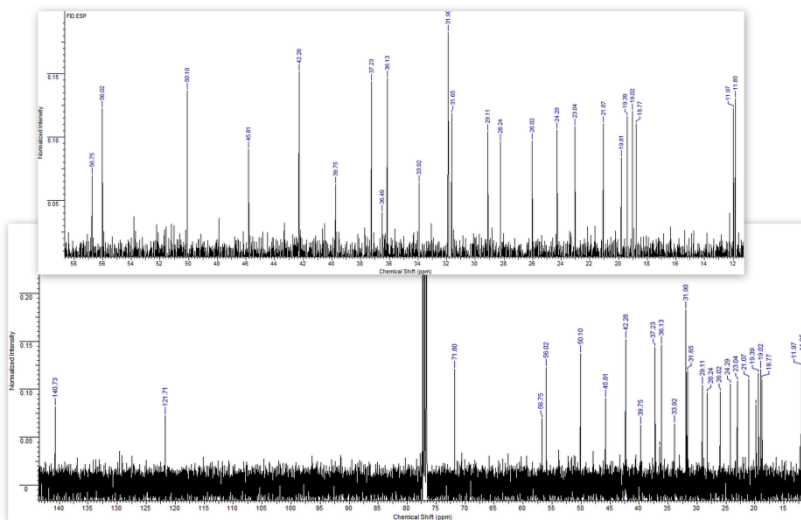


Figura 39: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **9**.

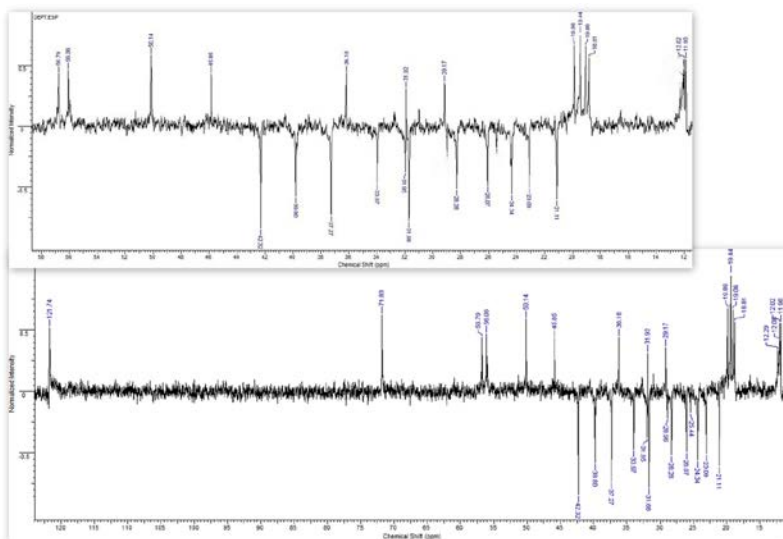


Figura 40: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **9**.

O sinal centrado em  $\delta_{\text{C}}$  42,3 corresponde aos carbonos C4 e C13, e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  31,9 aos carbonos C7 e C8, respectivamente.

Foram observados ainda sinais adicionais de menor intensidade referentes ao estigmasterol, confirmando a presença dos dois esteroides na amostra.

A atribuição completa dos sinais de RMN para os hidrogênios e carbonos do composto **9**, comparados com dados obtidos da literatura, estão descritos na Tabela 05.

De acordo com as análises espectroscópicas apresentadas e comparação com dados da literatura, o composto **9** foi finalmente identificado como o esterol  $\beta$ -sitosterol, com pequena quantidade de estigmasterol na amostra, Fig. 41.

Tabela 05: Dados espectroscópicos de RMN para o composto **9**.

Posição	Deslocamento químico (ppm)		
	C	$\delta_C^*$	$\delta_H$
1		37,3	37,2
2		31,6	31,6
3		71,8	71,8
4		42,3	42,3
5		140,8	140,7
6		121,7	121,7
7		32,1	31,9
8		32,1	31,9
9		50,2	50,1
10		36,5	36,5
11		21,1	21,1
12		39,8	39,8
13		42,3	42,3
14		56,8	56,8
15		24,3	24,3
16		28,3	28,2
17		56,1	56,0
18		12,0	12,0
19		19,1	19,8
20		36,2	36,1
21		18,8	18,8
22		34,0	33,9
23		26,2	26,0
24		45,2	45,8
25		29,2	29,1
26		18,9	19,4
27		19,1	19,0
28		23,1	23,0
29		11,9	11,8

\* (KOVGANKO; KASHKAN; BORISOV, 2000).

O esteroide  $\beta$ -sitosterol, com pequena quantidade de estigmasterol, foi isolado também das frações apolares de *Croton antisiphiliticus*, sendo denominado o composto de **ATH12** e submetido a ensaios de atividade biológica. Outras frações das duas espécies vegetais também apresentaram quantidades significativas de esteroide.

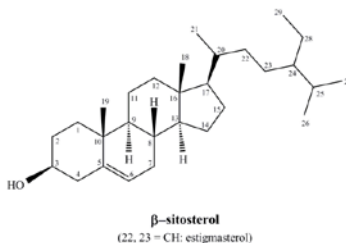


Figura 41: Estrutura do esteroide isolado de *Croton heterodoxus*.

O composto **10**, Fig. 27, pág 119, foi obtido inicialmente na forma de um pó verde e posteriormente purificado por sucessivas lavagens em AcOEt rendendo 3,7428 g de composto puro na forma de um fino sólido branco com p.f. 167,3-172,8° C e Rf 0,46 (60:40 hexano-AcOEt). Sua estrutura foi elucidada através do estudo detalhado dos espectros de infravermelho (Fig. 42), RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 43),  $^{13}\text{C}$  (Fig. 44) e  $^{13}\text{C}$  DEPT (Fig. 45, pág. 135), Tabela 03, pág. 122, e confirmada por cristalografia de raios-X (Tabela 06, pág. 137).

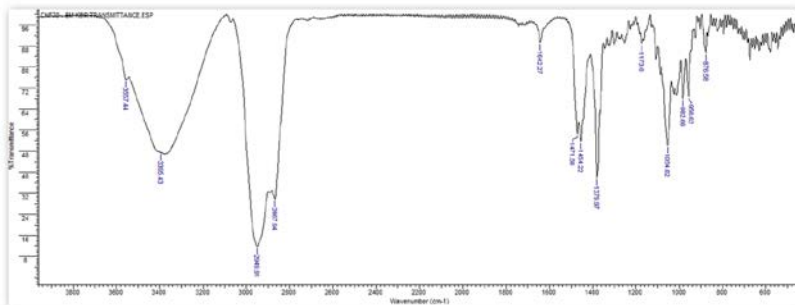


Figura 42: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto **10**.

O espectro de IV (Fig. 42) apresentou um perfil de absorção típico de estruturas triterpênicas. Bandas de absorção intensas foram observadas na região de  $\nu$  2949-2867  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à estiramentos C-H, em  $\nu$  3395  $\text{cm}^{-1}$  característica da ligação O-H e uma pequena banda de

absorção em  $\nu$  1642  $\text{cm}^{-1}$  sugerindo a presença de uma ligação dupla C=C.

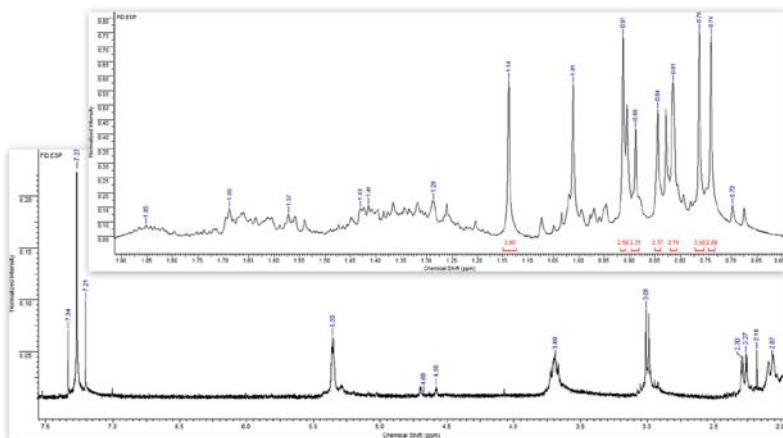


Figura 43: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **10**.

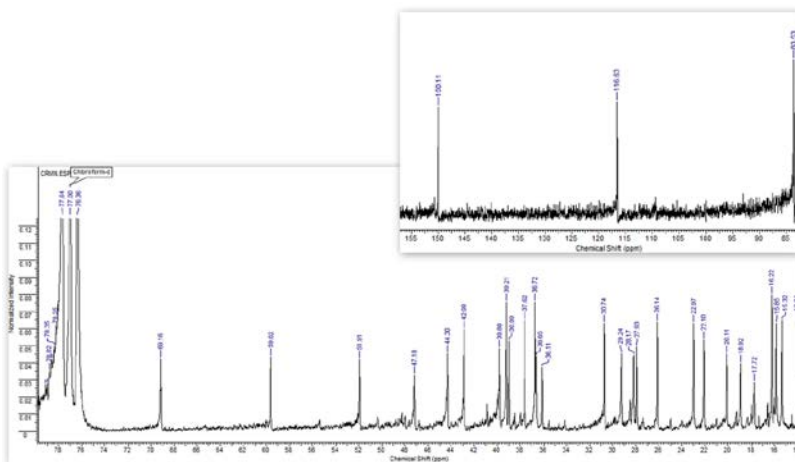


Figura 44: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **10**.

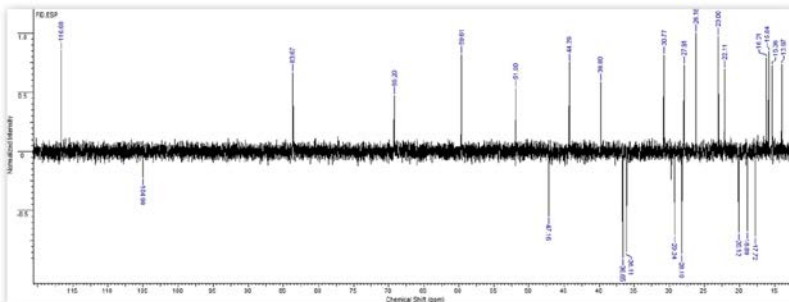


Figura 45: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **10**.

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram muito similares àqueles observados para o composto **7**, com exceção do sinal para o grupo carbonila que está ausente.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou dois carbonos oxigenados  $sp^3$  pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  83,5 (CH) e  $\delta_{\text{C}}$  69,2 (CH), atribuídos aos carbonos 3 e 2, respectivamente. Esta atribuição foi realizada pela observação do acoplamento entre os sinais de hidrogênio centrados em  $\delta_{\text{H}}$  3,01 (d,  $J = 9,37$  Hz) ligado ao C3, com os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,69 (m,  $J = 11,87; 9,31$  e  $4,37$  Hz) ligado ao C2, e deste com os sinais dos hidrogênios  $\text{CH}_2$  em  $\delta_{\text{H}}$  2,26 e 1,26, ligados ao C1, no mapa de correlação COSY (anexos, MS 10). Entre os sistemas de spin apresentados no mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY destacam-se os sistemas CH (3)/CH (2)/ $\text{CH}_2$  (1) do anel A e CH (11)/ $\text{CH}_2$  (12) do anel C, de acordo com a presença do diol nos carbonos 2 e 3 e a dupla ligação entre C9-C11, também observada para o composto **7**. A ligação dupla trissubstituída é confirmada pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  150,1 (C) C9 e  $\delta_{\text{C}}$  116,6 (CH) C11, e o sinal centrado em  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (dd,  $J = 5,27$  e  $2,73$  Hz) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , correspondente ao átomo de hidrogênio H11. Estes dados são consistentes com os valores de deslocamento químico apresentados por outros triterpenos na literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) contendo um sistema dihidroxi vicinal no anel A com sinais em  $\delta_{\text{C}}$  83,8 para C3  $\beta$ -OH e  $\delta_{\text{C}}$  68,9 para C2  $\alpha$ -OH, que reforça nosso argumento na atribuição destes sinais. A atribuição completa dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para este composto foi realizada através dos mapas de correlação HMQC (anexos, MS 11) e HMBC anexos, MS 12). Estes dados nos levaram a identificar o triterpeno fernenodiol, confirmado através da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) ( $\text{ESI}^+$ ), que forneceu a relação carga/massa para o íon molecular de  $m/z$  465,3704 (anexos, MS 13) (calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$

[M+Na]<sup>+</sup>: 465,3703), todavia, a confirmação inequívoca desta molécula foi possível somente através da análise de difração de raios-X, Fig. 46.

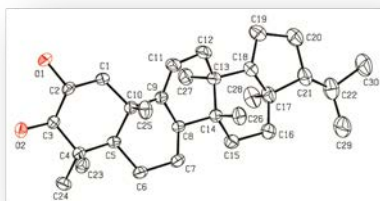


Figura 46: Estrutura de raio-X em perspectiva para o composto **10**. Elipsóides foram desenhadas com um nível de 50% de probabilidade. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

Tabela 06: Dados do cristal e refinamento das estruturas para os compostos **10** e **11**.

	Compound <b>10</b>	Compound <b>11</b>
Empirical formula	C <sub>30</sub> H <sub>51</sub> O <sub>2.50</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>
Formula weight	451.71	458.70
Temperature	190(2) K	173(2) K
Wavelength	1.54178 Å	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	C2	P2 <sub>1</sub>
Unit cell dimensions (Å, °)	a = 62.8991(12) b = 6.56940(10) c = 13.4860(3) β = 96.9720(10)	a = 12.7793(4) b = 7.1420(2) c = 29.2649(8) β = 97.3600(10)
Volume (Å <sup>3</sup> )	5531.33(18)	2648.99(13)
Z	8	4
Density (calculated) (Mg/m <sup>3</sup> )	1.085	1.150
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	0.505	0.072
F(000)	2008	1016
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	0.18 x 0.14 x 0.12	0.50 x 0.24 x 0.04
Theta range for data collection (°)	1.42 to 67.54	1.83 to 32.65
Index ranges	-72 ≤ h ≤ 74, -7 ≤ k ≤ 7, -16 ≤ l ≤ 16	-18 ≤ h ≤ 19, -10 ≤ k ≤ 10, -44 ≤ l ≤ 44
Reflections collected	38578	67948
Independent reflections	9372 [R(int) = 0.0823]	19360 [R(int) = 0.0263]
Absorption correction	None	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	9372 / 1 / 602	19360 / 1 / 633
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.907	1.065

Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0396, wR2 = 0.1128	R1 = 0.0367, wR2 = 0.0980
R indices (all data)	R1 = 0.0407, wR2 = 0.1146	R1 = 0.0416, wR2 = 0.1028
Largest diff. peak and hole (e.Å <sup>-3</sup> )	0.198 and -0.300	0.369 and -0.185

A análise de difração de raios-X mostrou a presença de duas moléculas do triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol na unidade assimétrica, provavelmente ligadas através de interações por ligação de hidrogênio intermolecular com uma molécula de água (Fig. 47). Desta forma, a fórmula molecular contém 0,5 H<sub>2</sub>O. Este fato também foi observado para o ácido acetil aleurítico (AAA) (SAN GIL et al., 2008), onde a duplicidade de alguns sinais no espectro de RMN de <sup>13</sup>C sugeriram a presença de duas moléculas de AAA na célula unitária para o triterpeno. Estudos de modelagem molecular confirmaram esta hipótese, mostrando que no mínimo duas formas diméricas de AAA são possíveis, ambas com arranjo cíclico com duas ligações de hidrogênio moderadas.

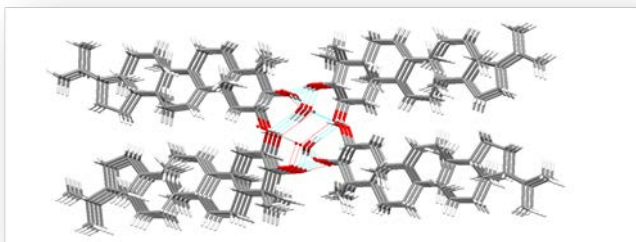


Figura 47: Estrutura de raio-X para o composto **10**. Duas moléculas do triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol na unidade assimétrica, unidas através de interações por ligação de hidrogênio intermolecular com uma molécula de água.

Desta forma, o composto **10** foi inequivocamente identificado como o triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (fernenodiol), e reforça a proposta estrutural do triterpeno **7**. O triterpeno fernenodiol foi isolado anteriormente dos botões de *Rhododendron macrocephalum*, uma azalea selvagem japonesa (AGETA; AGETA, 1984).

O composto **11**, Fig. 27, pág. 119, foi obtido inicialmente na forma de um fino sólido verde e isolado após sucessivas lavagens em AcOEt resultando em 1,6100 g do composto puro na forma de um fino



sólido branco com HRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z 481,3651 ( calculado para C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 481,3652), anexos, MS14, p.f. de 243,6-244,4° C e R<sub>f</sub> de 0,26 (40:60 hexano-AcOEt). Sua estrutura foi elucidada através do estudo conjunto dos espectros de infravermelho (Fig. 48), RMN de <sup>1</sup>H (Fig. 49), <sup>13</sup>C (Fig. 50) e <sup>13</sup>C DEPT (Fig. 51, pág. 140), Tabela 03, pág. 122 e confirmada por cristalografia de raios-X (Tabela 07, pág. 146).

O espectro de infravermelho apresentou uma intensa absorção na região de  $\nu$  2972-2857 cm<sup>-1</sup> atribuída à estiramentos C-H, uma intensa absorção na região de  $\nu$  3461-3323 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento da ligação O-H e uma pequena banda de absorção em  $\nu$  1644 cm<sup>-1</sup> sugerindo a presença de uma ligação dupla C=C.

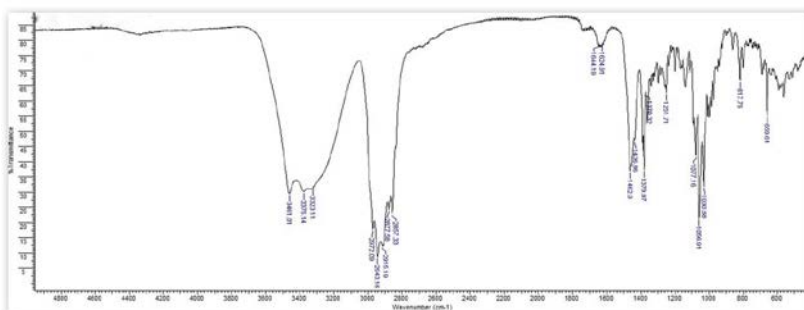


Figura 48: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto **11**.

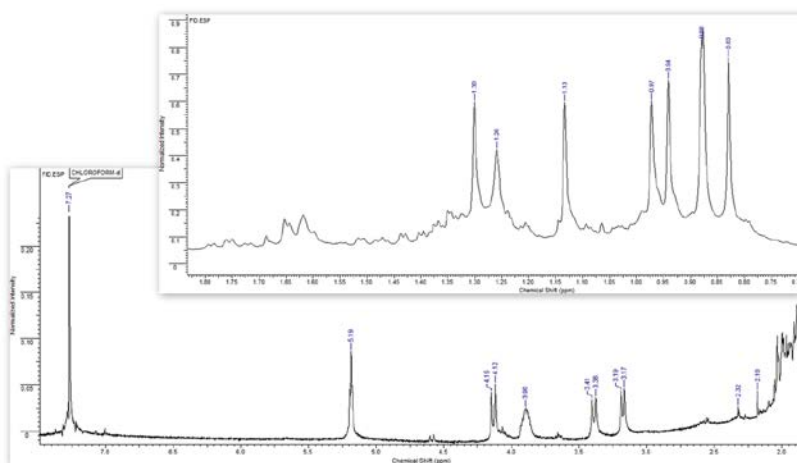


Figura 49: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **11**.

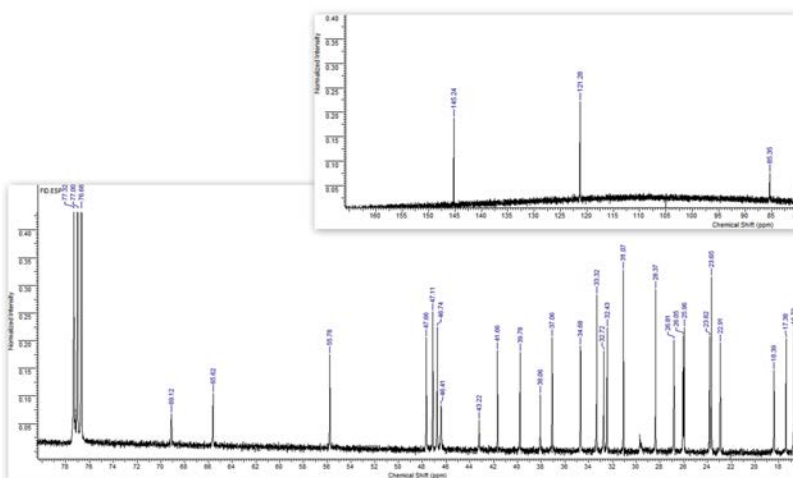


Figura 50: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão do composto **11**.

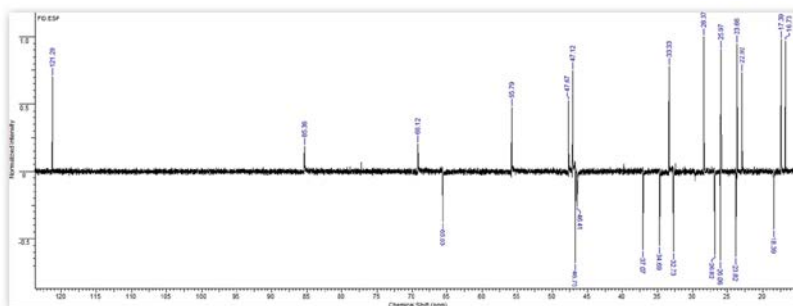


Figura 51: Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **11**.

Os sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram similares àqueles observados para o composto **10**, com um carbono oxigenado adicional. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou a presença de três carbonos oxigenados com deslocamentos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  85,4 (CH),  $\delta_{\text{C}}$  69,1 (CH) e  $\delta_{\text{C}}$  65,6 ( $\text{CH}_2$ ) os quais foram atribuídos aos carbonos 3, 2 e 23, respectivamente. Estas atribuições foram realizadas pela observação de acoplamento entre os sinais de hidrogênio centrados em  $\delta_{\text{H}}$  3,20 (d,  $J = 8,99$  Hz) ligado ao C3, com o sinal do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (m)

ligado ao C2, e deste último com os sinais dos hidrogênios CH<sub>2</sub> em  $\delta_{\text{H}}$  2,05 (m) e 0,94 (m), ligados ao C1, no mapa de correlação COSY (anexos, MS 15). O sistema de spin CH (3)/CH (2)/CH<sub>2</sub>(1) apresentado pelo mapa de correlação <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY confirmou esta atribuição. Estes dados estão de acordo com a presença do diol nos carbonos 2 e 3, observado também para o composto **10**. A atribuição completa dos sinais de RMN foi realizada com auxílio do mapa de correlação HMQC, anexos, MS 16, e pode ser observada na Tabela 03, pág. 122.

A ligação dupla trissubstituída foi aferida pela correlação entre os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  145,2 (C) C13 e  $\delta_{\text{C}}$  121,3 (CH) C12, e o sinal centrado em  $\delta_{\text{H}}$  5,19 (dd,  $J = 3,95$  e  $3,13$  Hz) referente ao H12 no mapa de correlação HMBC (anexos, MS 17), e também pelo sistema de spin CH (11)/CH<sub>2</sub> (12) no mapa de correlação COSY (anexos, MS 15).

A localização do terceiro carbono oxigenado foi possível através da análise dos mapas de correlação COSY e HMBC. As correlações apresentadas na Figura 32, pág. 123, mostraram claramente que o terceiro grupo funcional hidroxila está ligado ao carbono 23 (CH<sub>2</sub>), o que origina um sistema de spin isolado para dois átomos de hidrogênio geminados, também confirmada pelos valores de deslocamentos apresentados nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>13</sup>C DEPT. Algumas diferenças no anel E do triterpeno também foram observadas com relação aos compostos **7** e **10**. Estes dados revelaram que o triterpeno tem um esqueleto do tipo oleanano.

Os procedimentos de recristalização em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> resultaram em cristais apropriados para análise de cristalografia de raios-X (Tabela 06, pág. 137), confirmando, desta forma, a estrutura da molécula, Fig. 52.

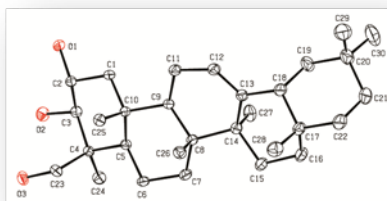


Figura 52: Estrutura de raio-X em perspectiva para o composto **11**. Elipsoides foram desenhadas com um nível de 50% de probabilidade. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

Assim, o composto **11** foi inequivocamente identificado como sendo o triterpeno  $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroiolean-12-eno, isolado anteriormente das raízes de *Actinidia macrosperma* (DING; WANG; WANG, 2007) e das raízes de *Commiphora merkeri* (FOURIE; SNYCKERS, 1989). Este triterpeno também apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica (FOURIE; SNYCKERS, 1989).

### 5.1.2.2 Fração acetato dos caules (CHCA)

A fração acetato de etila dos caules de *Croton heterodoxus* foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel e eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila e etanol, conforme descrição experimental, resultando em 200 frações. A análise por CCD permitiu reunir as frações em dois grupos distintos, sendo detectada a presença de dois compostos fenólicos (Fig. 53).

As frações 55-61 foram reunidas e forneceram 0,6022 g do flavonoide metoxilado pachypodol (**12**). O composto foi isolado na forma de um pó amarelo claro e apresentou ponto de fusão de 198,8-202,1° C.

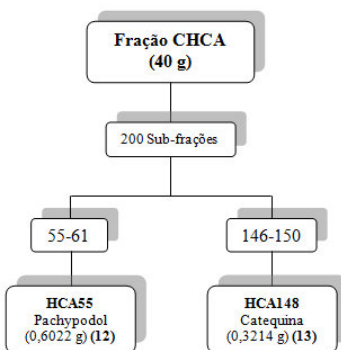


Figura 53: Fracionamento cromatográfico da fração CHCA.

O composto **12** foi analisado por espectroscopia de infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , apresentando perfil semelhante ao observado para o flavonoide quercetina (**6**). O espectro de infravermelho, Fig. 54, mostrou sinais característicos de flavonoides, com bandas de absorção em  $3559$  e  $3420\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento dos grupos OH livre e em ligação de hidrogênio. Observou-se ainda uma banda em  $1646\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de ligações C=O, uma banda em  $1636\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de ligações C=C, uma

banda em  $1383\text{ cm}^{-1}$ , do estiramento da ligação C-O e, finalmente, uma banda em  $2950\text{ cm}^{-1}$ , estiramento característico de ligações C-H.

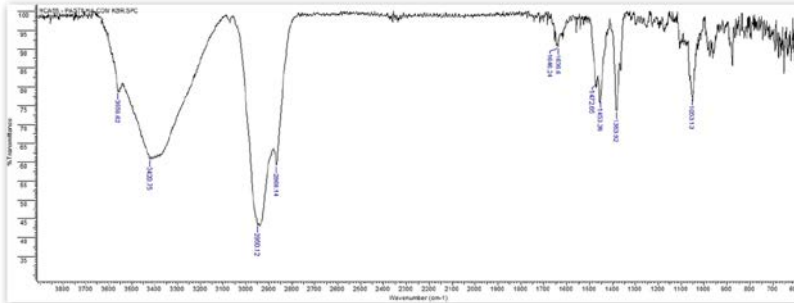


Figura 54: Espectro de IV (em pastilha de KBr) do composto **12**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Fig. 55, mostrou um par de dupletos centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6,38 e 6,46, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C6 e C8 do anel A dos flavonoides, respectivamente, com constante de acoplamento de 2,21 Hz, indicando um acoplamento *meta*. Dois dupletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  7,07 com constante de acoplamento de 8,60 Hz (*orto*) e outro em  $\delta_{\text{H}}$  7,71, com  $J=1,95$  Hz (*meta*), atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C5' e C2' do anel B, respectivamente, bem como um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,67, com constantes de acoplamento de 8,60 e 1,95 Hz (sistema *orto-meta*), atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C6' do anel B, podem também ser observados.

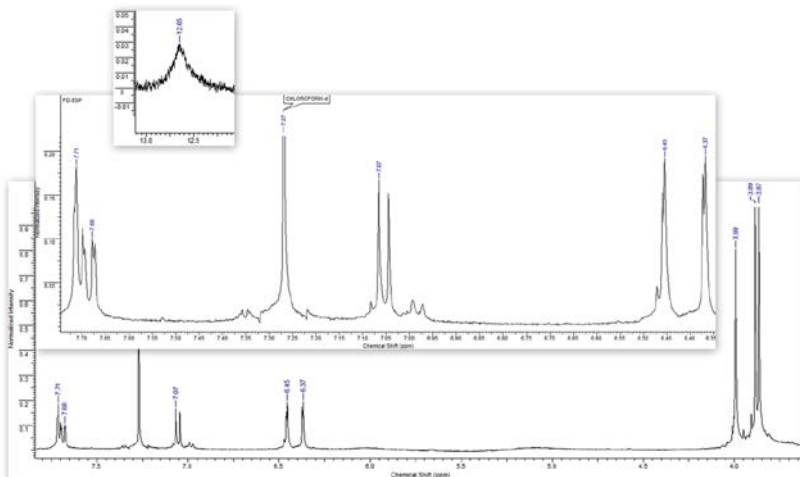


Figura 55: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) para o composto **12**.

O espectro também indicou a presença de um grupo OH quelado em 12,65 ppm, referente à interação dos grupos ligados aos carbonos C4 e C5. Por fim, podem ser detectados no espectro três sinais intensos referentes à grupos metoxila: em 3,99, 3,89 e 3,86 ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , Fig. 56, foram contabilizados 15 sinais referentes ao núcleo quercetina, e três sinais adicionais: em 60,2; 56,1 e 55,8 ppm, referentes aos grupos metoxilas.

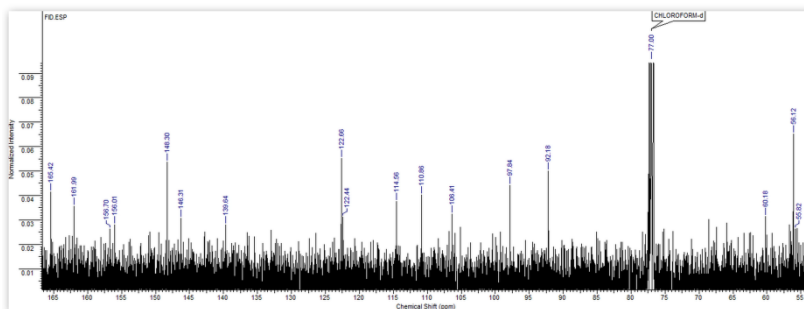


Figura 56: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) para o composto **12**.

A Tabela 07 apresenta os deslocamentos químicos observados para o composto **12**, em comparação com aqueles obtidos para a quercetina (**6**). A atribuição dos sinais foi realizada através da análise do mapa de correlação HMQC (anexos, MS 18).

A localização dos grupos metoxila na estrutura pôde ser realizada através das correlações a longa distância observadas no mapa de correlação HMBC (anexos, MS 19), principalmente pelas correlações entre o hidrogênio H8 em  $\delta_{\text{H}}$  6,46 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  97,8 (C6), 165,4 (C7), 156,7 (C9) e 106,4 (C10), o hidrogênio H6 em  $\delta_{\text{H}}$  6,38 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  162,0 (C5), 165,4 (C7), 92,2 (C8) e 106,4 (C10), e os hidrogênios da metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,89 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  165,4 (C7) no anel A do flavonoide, confirmando a posição do primeiro grupo metoxila no carbono C7. Também foram observadas correlações entre o hidrogênio H2' em  $\delta_{\text{H}}$  7,71 e os carbonos em 156,0 (C2), 122,4 (C1'), 122,7 (C6'), 148,3 (C4') e 146,3 (C3'), e entre o hidrogênio H5' em  $\delta_{\text{H}}$  7,07 e os carbonos em 122,4 (C1'), 122,7 (C6'), 148,3 (C4') e 146,3 (C3'). Ainda, a correlação observada entre os hidrogênios da metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,99 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  146,3 (C3'), confirmam a posição da segunda metoxila no carbono C3', no anel B do flavonoide. Por fim, a

última metoxila foi localizada pela correlação observada entre os hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,86 e o carbono em  $\delta_C$  139,6 (C3), confirmando assim a posição da terceira metoxila no carbono C3.

Estes dados estão de acordo com a literatura (SILVA et al., 2006), confirmando assim a estrutura da 5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetóxilavona (pachypodol), Fig. 57, para o composto **12**.

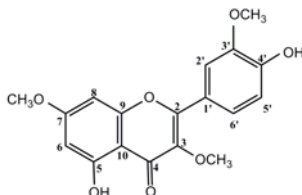


Figura 57: Estrutura do composto **12** (5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetóxilavona).

Tabela 07: Dados espectroscópicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  para o composto **12**, isolado da fração CHCA ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz).

Posição	Composto <b>12</b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$
2	156,0	
3	139,6	
4	-**	
5	162,0	12,65 (s)
6	97,8	6,38 (d) $J=2,21$
7	165,4	
8	92,2	6,46 (d) $J=2,21$
9	156,7	
10	106,4	
1'	122,4	
2'	110,9	7,71 (d) $J=1,95$
3'	146,3	
4'	148,3	
5'	114,6	7,07 (d) $J=8,60$
6'	122,7	7,67 (dd) $J=8,60$ e 1,95
O-CH <sub>3</sub> *	56,1	3,99 (s)
O-CH <sub>3</sub> *	55,8	3,89 (s)
O-CH <sub>3</sub> *	60,2	3,86 (s)

\*Confirmadas por RMN DEPT 135.

\*\*Não observado devido ao tempo insuficiente de análise.

O composto **13** (0,3214) foi isolado na forma de um pó amarelo escuro com faixa de fusão de 166,5-173,8° C (174-176° C (SETO et al., 1997)) e identificado por análise dos espectros de infravermelho (Fig. 58) e RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 59) e  $^{13}\text{C}$  (Fig.60, pág. 148), e através de comparação com dados da literatura.

O espectro de infravermelho apresentou uma banda intensa em  $3332\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento das ligações O-H, uma banda intensa em  $1621\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento das ligações C=C, e bandas de absorção na região de  $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento das ligações C-O. O espectro também apresentou um conjunto de bandas de absorção na região de  $\nu$   $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  correspondente a estiramentos C-H alifáticos.

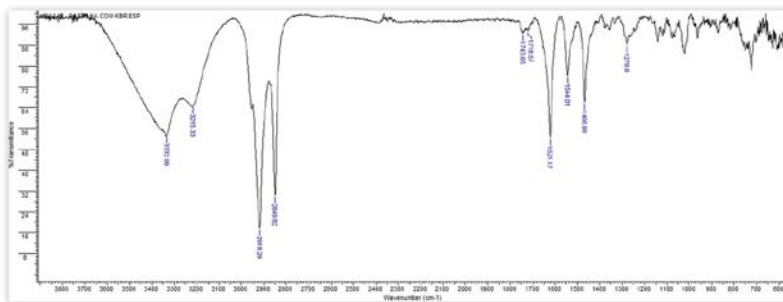


Figura 58: Espectro de IV (em pastilha de KBr) do composto **13**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Fig. 59, mostrou sinais semelhantes aos encontrados na estrutura da quercetina, com padrão de substituição em 5 e 7 do a nel A, e 3' e 4' do a nel B dos flavonoides. Porém, a presença dos sinais em 2,58 ppm (dd,  $J=16,00$  e  $8,49$ ), e em 2,85, aproximadamente, correspondente aos hidrogênios axial H4 e equatorial H4, sugere um esqueleto do tipo flavan-3-ol, sem a presença da carbonila no carbono 4, característico para o grupo das catequinas. O sinal intenso em 2,85 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  refere-se à água no solvente (GOTTLIEB; KOTLYAR; NUDELMAN, 1997). Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  bem como dados da literatura podem ser observados na Tabela 08.





O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , Fig. 60, também foi analisado e, através de comparação com dados da literatura (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008; AYRES et al., 2009), confirmou-se a estrutura da catequina para o composto isolado, Fig. 61.

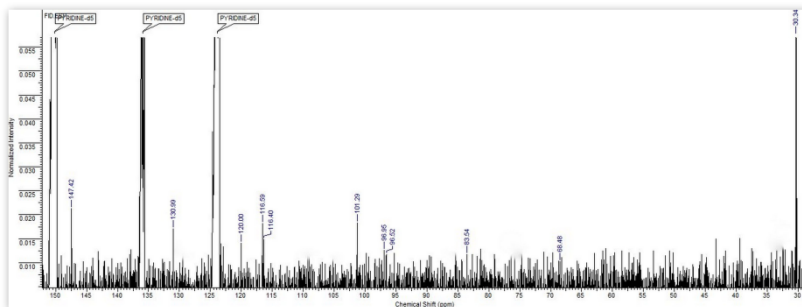


Figura 60: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em Pir) para o composto **13**.

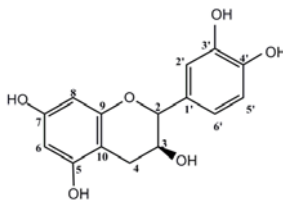


Figura 61: Estrutura do composto **13** (catequina).

### 5.1.2.3 Fração aquosa dos caules (CHCW)

A fração aquosa dos caules de *Croton heterodoxus* foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel desativada, conforme descrição experimental, resultando em 96 frações. As frações 14-18 foram reunidas após avaliação de seu perfil cromatográfico em CCD, Fig. 62. Após sucessivas lavagens em AcOEt, obteve-se 0,5052 g de um fino sólido amarelo com faixa de fusão de 221,5 - 228,5° C.

O composto foi identificado através das análises de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e através de comparação com dados da literatura, indicando a estrutura de um canferol glicosilado.

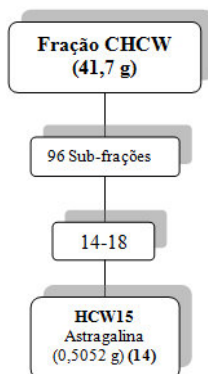


Figura 62: Fracionamento cromatográfico da fração CHCW.

Pode-se observar no espectro de infravermelho, Fig. 63, um a banda de absorção intensa e larga em  $3402\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação O-H, duas bandas de baixa intensidade em  $2917\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento da ligação C-H, uma banda intensa em  $1661\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C=O, deslocada devido a uma possível ligação de hidrogênio, e uma banda intensa em  $1180\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C-O. Estes sinais reforçam nosso argumento de tratar-se da estrutura do canferol glicosilado.

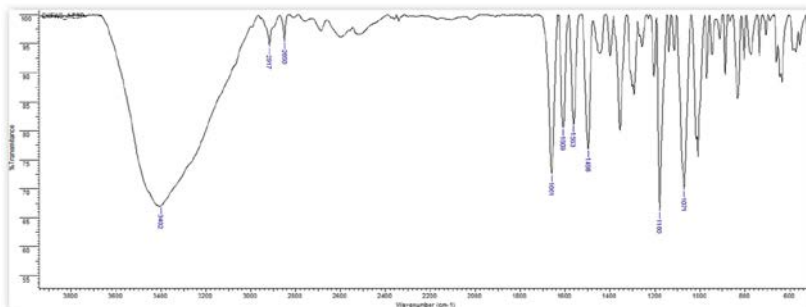


Figura 63: Espectro de IV (em pastilha de KBr) do canferol glicosilado.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Fig. 64, apresentou um perfil típico de flavanoide. Todavia, o sinal referente à hidroxila quelatogênica não foi observado no espectro devido à análise ter sido realizada em metanol, trocando desta forma o hidrogênio pelo deutério e omitindo este sinal no espectro. Para o anel A da aglicona pode-se observar dois dupletos pelos sinais centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6,05 (C6) com  $J = 2,35\text{ Hz}$  e  $\delta_{\text{H}}$

6,25 (C8) com  $J= 2,35$  Hz, ambos com integração para um hidrogênio cada. Os valores das constantes de acoplamento sugerem que estes hidrogênios estão em posição *meta* um em relação ao outro. Para o anel B observam-se dois dupletos com integração para dois hidrogênios cada, indicando um anel simétrico com hidrogênios equivalentes. Os sinais centrados em  $\delta_{\text{H}}$  6,74 (C5' e C3') com um valor de  $J=8,99$  Hz e em  $\delta_{\text{H}}$  7,91 (C6' e C2') com um valor de  $J=8,99$  Hz, sugerem que estes hidrogênios encontram-se *orto*-relacionados.

Os sinais correspondentes aos hidrogênios do anel glicosídico podem ser observados abaixo de 5,0 ppm. O duplete centrado em  $\delta_{\text{H}}$  4,99 com um valor de  $J=6,65$  Hz foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico (C1''), indicando a presença de ligação  $\beta$ -glicosídica. Foram observados ainda no espectro os sinais do hidrogênio ligado ao C2'' em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 como um duplo duplete com valores de  $J=8,20$  e 6,65 Hz com integração para um hidrogênio, e o sinal do hidrogênio ligado ao C3'' em  $\delta_{\text{H}}$  3,49 como um duplo duplete com valores de  $J=8,20$  e 3,91 Hz com integração para um hidrogênio. O hidrogênio ligado ao C4'' apresenta-se como um duplo duplete centrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,64 com valores de  $J=13,68$  e 3,91 Hz, com integração para um hidrogênio. O sinal para o hidrogênio ligado ao C6'' aparece em  $\delta_{\text{H}}$  3,26 como um duplo duplete com valores de  $J=13,68$  e 3,91 Hz com integração para dois hidrogênios, e por fim um multipletto centrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,65 com integração para um hidrogênio pode ser observado, atribuído ao hidrogênio ligado ao C5''.

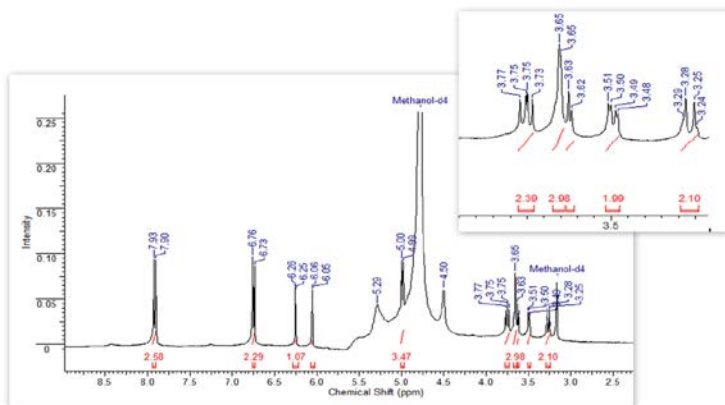


Figura 64: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em MeOD) do canferol glicosilado.

A atribuição completa dos sinais de carbono no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , Fig. 65, pode ser observada na Tabela 09. O sinal em campo baixo no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  referente ao carbono da carbonila (C4) foi observado como um sinal de pequena intensidade no espectro devido ao tempo insuficiente de análise. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  116,4 referem-se aos carbonos C3' e C5', e em  $\delta_{\text{C}}$  132,4 referem-se aos carbonos C2' e C6', apresentando desta forma uma intensidade maior que os demais sinais apresentados no espectro.

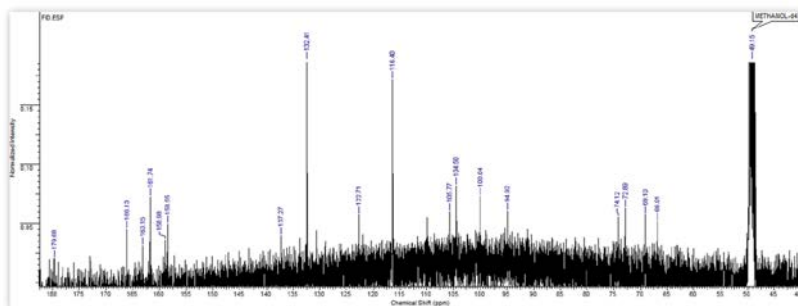


Figura 65: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em MeOD) do canferol glicosilado.

A análise dos espectros de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  juntamente com dados encontrados na literatura (KAOUADJI, 1990) levaram à identificação do canferol glicosilado como sendo o 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil (14), comumente conhecido como astragalina, Fig. 66. O flavonoide astragalina tem sido também isolado em diversas espécies do gênero *Solanum* (SILVA et al., 2003).

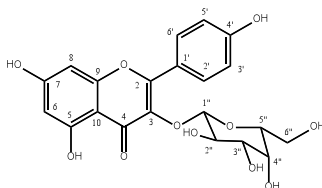


Figura 66: Estrutura da astragalina (14).

Tabela 09: Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a astragalina (**14**).

Posição		Deslocamento químico (ppm)	
C	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	159,7	158,6	-
3	135,4	137,3	-
4	179,2	179,7	-
5	162,9	163,2	-
7	166,3	166,1	-
9	158,7	159,0	-
10	105,0	105,8	-
1'	122,8	122,7	-
4'	161,6	161,7	-
<b>CH</b>			
6	100,7	100,0	6,05 (d); $J=2,35$ Hz
8	95,3	94,9	6,25 (d); $J=2,35$ Hz
2''	132,2	132,4	7,91 (d); $J=8,99$ Hz
3''	116,1	116,4	6,74 (d); $J=8,99$ Hz
5''	116,1	116,4	6,74 (d); $J=8,99$ Hz
6''	132,2	132,4	7,91 (d); $J=8,99$ Hz
1'''	104,5	104,5	4,99 (d); $J=6,65$ Hz
2'''	75,7	72,8	3,75 (dd); $J=8,20$ e $6,65$ Hz
3'''	78,4	74,1	3,49 (dd); $J=8,20$ e $3,91$ Hz
4'''	71,4	69,1	3,64 (dd); $J=13,68$ e $3,91$ Hz
5'''	78,1	72,9	3,65(m)
<b>CH<sub>2</sub></b>			
6'''	62,7	66,9	3,26 (dd); $J=13,68$ e $3,91$ Hz

\* Em MeOD (KAOUADJI, 1990).

#### 5.1.2.4 Fração hexano das folhas (CHF<sub>H</sub>)

Nesta fração o esteroide  $\beta$ -sitosterol (**9**) e o triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**10**) descritos anteriormente para a fração CHCH também foram encontrados e isolados como compostos majoritários para a fração, Fig. 67.

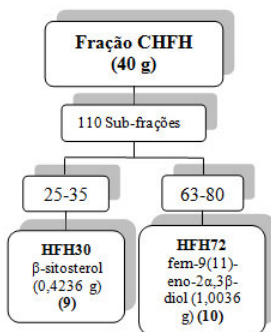


Figura 67: Fracionamento cromatográfico da fração CHFH.

### 5.1.2.5 Fração acetato das folhas (CHFA)

Durante o particionamento líquido-líquido do extrato bruto de *C. heterodoxus*, Fig. 68, observou-se a formação de um precipitado amarelo ao adicionar acetato de etila. O sólido foi então removido do extrato e lavado em AcOEt, fornecendo 2,0856 g de uma mistura de flavonoides. O sólido obtido foi submetido às análises de RMN de  $^1\text{H}$  e eletroforese capilar.

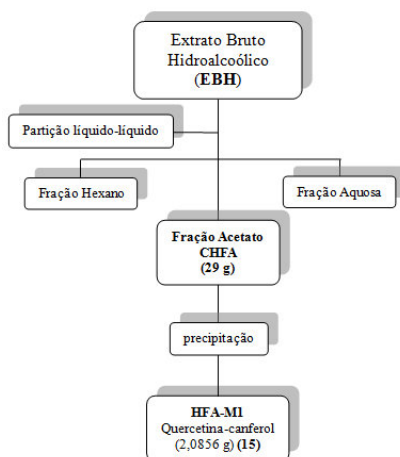


Figura 68: Fracionamento cromatográfico da fração CHFA.

O precipitado apresentou uma faixa de fusão de 185,0-194,0° C. O espectro de IV, Fig. 69, apresentou duas bandas largas, intensas e sobrepostas em 3289 e 3379  $\text{cm}^{-1}$  característica de estiramentos de

ligações O-H, uma banda em  $1673\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramentos de ligação C=O, uma banda em  $1616\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramentos de ligação C=C, uma banda em  $1364\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramentos de ligação C-O e uma banda de pequena intensidade em  $2961\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramentos de ligações C-H.

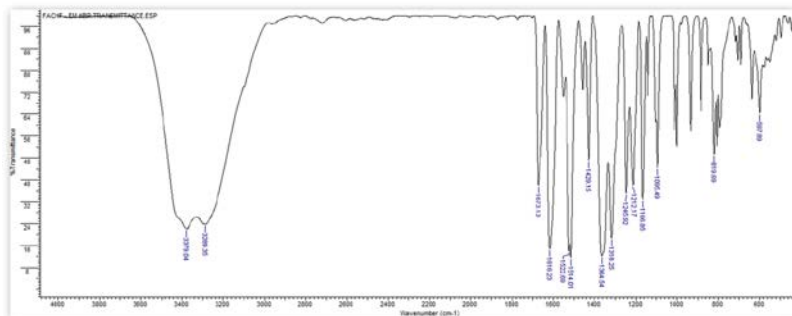


Figura 69: Espectro de IV (em pastilha de KBr) da mistura de flavonoides quercetina e canferol (15).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Fig. 70, revelou um perfil de sinais característicos dos flavonoides quercetina e canferol. Analisando os sinais de maior proporção observa-se a presença de dois dupletos centrados em 6,72 e 6,97 ppm, com constantes de acoplamento de 2,00 Hz, indicando acoplamento *meta* entre eles, e integral correspondente a um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C6 e C8 do anel A dos flavonoides, respectivamente. Pode-se observar também dois dupletos centrados em 7,46 e 8,28 ppm, com constantes de acoplamento de 8,60 Hz (acoplamento *orto*) e 2,3 Hz (acoplamento *meta*), respectivamente, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C5' e C2' do anel B, e um duplo duplete em 8,17 ppm com constantes de acoplamento de 8,60 e 2,30 Hz, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C6' do anel B, todos com integração para um hidrogênio. Estes dados estão de acordo com a estrutura da quercetina, flavonoide majoritário na mistura.



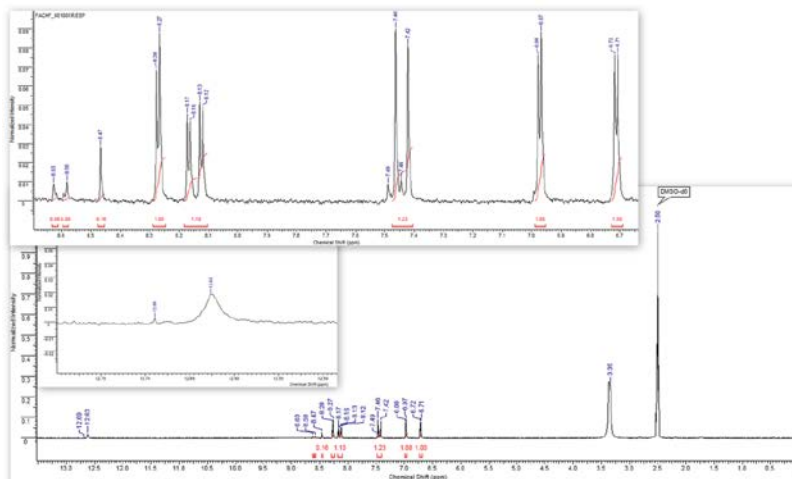


Figura 70: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) com expansão da mistura de flavonoides quercetina-canferol (**15**).

Analisando o conjunto de sinais de menor proporção observa-se dois dupletos centrados em 8,58 e 8,63 ppm, atribuídos respectivamente aos hidrogênios ligados aos carbonos C6 e C8 do anel A, com constante de acoplamento de 2,10 Hz, indicando acoplamento *meta*, e integral correspondente a um hidrogênio. Observam-se ainda dois dupletos centrados em 7,49 e 8,47 ppm com integração para dois hidrogênios e constante de acoplamento de 9,00 Hz, indicando acoplamento *orto*, atribuídos respectivamente aos pares de hidrogênios 2'/6' e 3'/5' do anel B. Estes dados correspondem à estrutura do canferol. Estes dados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  para a mistura de flavonoides (**15**).

Posição	Quercetina	Canferol
6	6,72 (d; 2,00)	8,58 (d; 2,10)
8	6,97 (d; 2,00)	8,63 (d; 2,10)
2'	8,28 (d; 2,30)	7,49 (d; 9,00)
3'	-	8,47 (sl)
5'	7,46 (d; 8,60)	8,47 (sl)
6'	8,17 (dd; 8,60; 2,30)	7,49 (d; 9,00)

Solvente DMSO. Dados: deslocamento químico / ppm (multiplicidade – d=dupletto, dd=duplo dupletto, sl=simpleto largo; acoplamento ( $J$ ) / Hz).

A análise qualitativa da mistura de flavonoides por eletroforese capilar conforme descrito na seção experimental, pág. 79, confirmou tratar-se de uma mistura dos flavonoides quercetina e canferol. Observa-se o aumento dos picos referentes à quercetina e ao canferol com padrão co-injetado sem a formação de ombros confirmando a composição da mistura, Fig. 71. Pode-se observar no eletroferograma a sobreposição dos espectros de UV-VIS dos flavonoides presentes na amostra com seus respectivos padrões, Fig. 72.

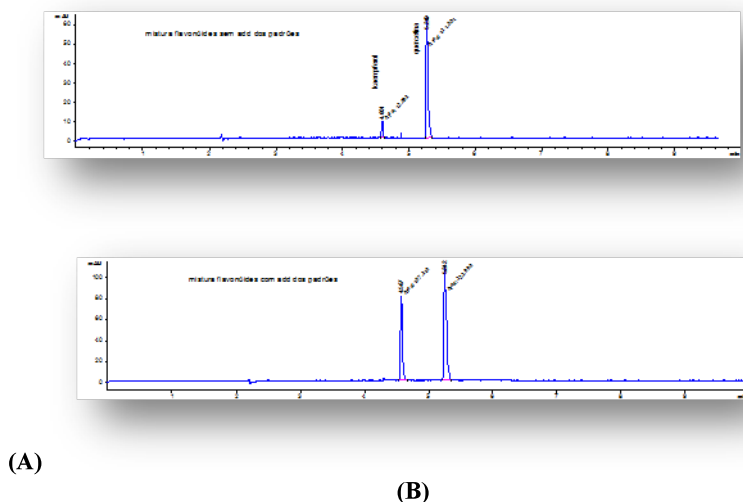


Figura 71: Eletroferograma da mistura de flavonoides quercetina-canferol (15). Análise qualitativa (A) sem adição dos padrões e (B) com adição dos padrões .

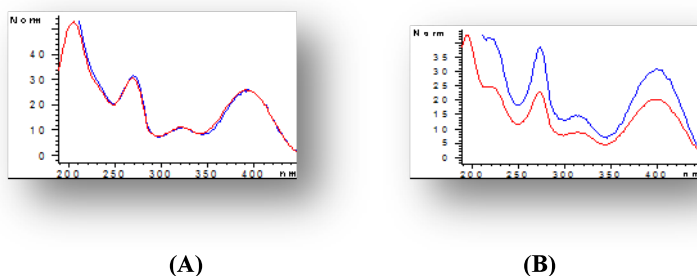


Figura 72: Sobreposição dos espectros de UV dos flavonoides detectados por eletroforese capilar. Linha azul = amostra HFA-M1, linha vermelha = flavonoide padrão (A) quercetina e (B) canferol.

O precipitado foi submetido à hidrólise ácida e analisado por eletroforese capilar com co-injeção dos padrões de quercetina e canferol. Os mesmos picos foram observados após a hidrólise, confirmando tratar-se de uma mistura de flavonoides não-glicosilados.

A análise quantitativa por EC levou à determinação da proporção de cada flavonoide na mistura. Uma massa de 3,10 mg da mistura foi dissolvida em 10 mL de MeOH, resultando em uma solução na concentração de 310 mg L<sup>-1</sup>. A análise revelou a presença de 257,26 mg L<sup>-1</sup> de quercetina (~83%) para 41,94 mg L<sup>-1</sup> de canferol (~13,5%) na mistura, Fig. 73.

Desta forma, o sólido obtido a partir da fração acetato de etila das folhas de *Croton heterodoxus* foi identificado como sendo a mistura dos flavonoides quercetina ou 3, 5, 7, 3',4' penta-hidroxiflavona e canferol ou 3, 5, 7, 4' tetra-hidroxiflavona (**15**), Fig 74.

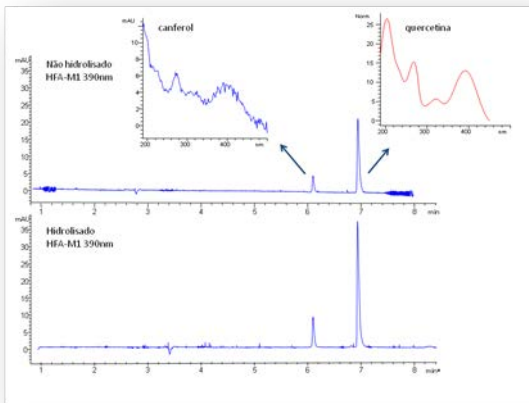


Figura 73: Eletroferograma da mistura de flavonoides antes e após a hidrólise ácida. Condições analíticas: Mistura diluída 3 vezes em solução MeOH:H<sub>2</sub>O 50% (v/v). Eletrólito de corrida tetraborato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> e metanol 10%, pH 9,0. Tensão aplicada 25 kV. Injeção por pressão 50 mbar durante 3 s. Temperatura do capilar 25° C. Detecção direta em 390 nm.

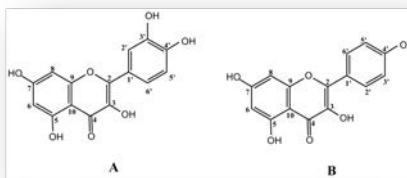


Figura 74: Estruturas químicas dos flavonoides presentes na mistura isolada de CHFA: quercetina (A) e canferol (B).

### 5.1.2.6 Fração aquosa das folhas (CHFV)

A fração aquosa das folhas de *Croton heterodoxus* apresentou características visualmente semelhantes à fração CHCW da mesma espécie vegetal. O fracionamento cromatográfico seguiu o mesmo perfil de separação e ao final do processo o flavonoide astragalina, Fig. 75, discutido anteriormente para a fração CHCW, foi também identificado como principal componente da fração analisada.

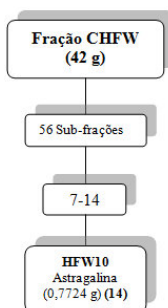


Figura 75: Fracionamento cromatográfico da fração CHFV.

Todos os compostos isolados de *Croton heterodoxus* descritos neste trabalho foram isolados pela primeira vez para esta espécie vegetal, consistindo em material de pesquisa inédito e de grande importância para o gênero *Croton*.

## 5.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 5.2.1 Ensaios antioxidantes

#### 5.2.1.1 Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O método de determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais consiste na utilização do reagente de Folin-Ciocalteu (mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico), no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação  $6^+$ . Estes são reduzidos ao entrar em contato com agentes redutores como os compostos fenólicos, formando os complexos azul de molibdênio e azul de tungstênio, cuja intensidade de coloração permite a determinação da concentração de compostos fenólicos (WATERMAN; MOLE, 1994), utilizando uma curva de calibração feita com ácido gálico, de onde obteve-se a equação da reta  $y = 5,46x + 6,48$ ;  $R^2 = 0,999$ .

De acordo com os resultados obtidos, Tabela 11, pág. 169, pode-se verificar que as frações acetato de etila foram as que apresentaram o maior conteúdo de compostos fenólicos para as duas espécies, exceto para os caules, onde os extratos brutos apresentaram o maior conteúdo fenólico. A espécie *Croton heterodoxus* apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos no extrato bruto dos caules, enquanto a espécie *Croton antisiphiliticus* apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos na fração acetato de etila da planta inteira. Ainda para a espécie *C. antisiphiliticus* o conteúdo de compostos fenólicos no extrato bruto e na fração acetato de etila das folhas não difere significativamente, mostrando-se frações ricas em compostos fenólicos. Vale lembrar que apesar do resultado ser expresso em equivalentes de ácido gálico, um composto fenólico simples, a metodologia utilizada não apresenta seletividade para subtipos de compostos fenólicos vegetais, e além de compostos fenólicos simples, podem ser detectados no teste seus polímeros, como taninos hidrolisáveis, flavonoides e catequinas.

#### 5.2.1.2 Avaliação do conteúdo de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides nos extratos e frações foi realizada através da complexação com o reagente  $AlCl_3$  (WOISKY; SALATINO, 1998; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 2011). Este agente complexante forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo carbonila nos flavonoides (Figura 76), proporcionando um

deslocamento batocrômico das bandas de absorção do espectro de UV/Vis para uma região característica (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). A concentração de flavonoides, Tabela 11, pág 169, foi obtida da curva de calibração da quercetina, de onde obteve-se a equação da reta  $y = 10,47x + 7,00$ ;  $R^2 = 0,998$ .

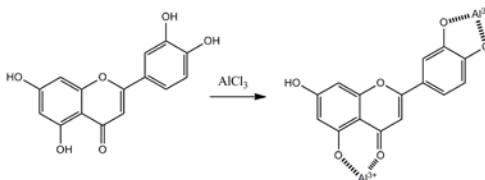


Figura 76: Complexo formado entre um flavonoide e o reagente AlCl<sub>3</sub>.

Pode-se verificar que as frações acetato de etila apresentaram os maiores teores de flavonoides, exceto para as folhas de *Croton antisiphiliticus*, onde o extrato bruto apresentou o maior teor de flavonoides. Ainda, para a espécie *C. antisiphiliticus*, a fração acetato do caule bem como o extrato bruto do caule não diferem significativamente, apresentando baixos conteúdos de flavonoides. Pode-se observar ainda que os teores de flavonoides foram maiores nas folhas, em relação às frações obtidas com o extrato dos caules. O maior teor de flavonoides nas folhas, em relação ao caule, vem de encontro a uma das funções dos flavonoides nas plantas que é de proteger contra a ação da radiação ultravioleta. As folhas constituem as partes aéreas dos vegetais, logo, constituem alvo mais acessível deste tipo de radiação, quando comparadas ao caule (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Compostos fenólicos que apresentam grupo catecol conferem reação positiva com AlCl<sub>3</sub>, tornando-se um interferente e fornecendo um falso positivo na determinação do teor de flavonoides. Este fato pode ter ocorrido com a fração acetato das folhas de *Croton heterodoxus* e com a fração hexano das folhas de *Croton antisiphiliticus*, uma vez que o teor de flavonoides apresentado foi maior que o conteúdo fenólico total da respectiva fração.

### 5.2.1.3 Avaliação da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Para a interpretação dos resultados do ensaio de DPPH, considera-se que a diminuição da absorbância em 517 nm e o aumento do aparecimento da coloração amarela em solução corresponde a um

maior potencial antioxidante por parte da solução teste. Os resultados obtidos são expressos em  $CI_{50}$ , que significa a concentração de extrato ou fração necessária para reduzir em 50 % a concentração de DPPH em solução, e pode ser obtida através do gráfico de concentração do DPPH em solução *versus* concentração da solução teste com o extrato ou a fração analisada. Quanto menor a concentração necessária para alcançar a  $CI_{50}$ , melhor a capacidade sequestrante do radical livre por parte da amostra.

Observa-se que as frações hexano das duas espécies apresentaram a menor capacidade de sequestro de radicais DPPH, Tabela 11, pág. 169, o que está de acordo com os baixos conteúdos de compostos fenólicos e de flavonoides apresentados por estas frações. Para a espécie *Croton heterodoxus*, a fração que apresentou melhor capacidade de sequestro de radicais DPPH foi o extrato bruto do caule, com  $CI_{50}$  de  $32,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Já para *Croton antisiphiliticus*, a fração mais ativa foi a fração acetato da planta inteira, com  $CI_{50}$  de  $19,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para os compostos isolados, o flavonoide (6), quercetina - ATW2, e a mistura de flavonoides (15), quercetina/canferol - HFA-M1 apresentaram a melhor capacidade de sequestro de radicais DPPH, com  $CI_{50}$  de 2,74 e  $3,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, Tabela 12, pág. 170. Sabe-se que os flavonoides apresentam propriedades antioxidantes e ingeridos na alimentação ajudam a prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas com os radicais livres, como doenças coronarianas, câncer e envelhecimento. Hirano et al. (2001) verificaram a capacidade de sequestro de radicais DPPH de dez flavonoides: catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina galato, epigallocatequina galato, miricetina, quercetina, apigenina, canferol, e luteolina. Com exceção da luteolina, que apresentou uma  $CI_{50}$  de  $16,0 \mu\text{M}$ , todos os demais flavonoides apresentaram excelentes resultados de atividade antioxidante, variando de  $CI_{50}$   $1,06 \mu\text{M}$  para epigallocatequina galato a  $CI_{50}$   $5,93 \mu\text{M}$  para canferol. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados neste trabalho para os flavonoides isolados.

#### 5.2.1.4 Determinação do potencial redutor

Para a atribuição de valores de potencial redutor, utilizou-se uma curva de calibração com diversas concentrações de ácido ascórbico de onde se obteve a equação de reta  $y=2,43x + 1,94$ ;  $R^2 = 0,999$ .

Analisando os resultados, Tabela 11, pág. 169, verifica-se que para a espécie *Croton heterodoxus* as frações que apresentaram maiores

capacidades redutoras foram o extrato bruto do caule, com 187,47 mg de ácido ascórbico/ g de extrato, seguido da fração acetato do caule com 136,03 mg de ácido ascórbico/ g de extrato.

Já para a espécie *Croton antisiphiliticus*, as frações mais ativas foram a fração acetato da planta inteira, com 333,77 mg de ácido ascórbico/ g de extrato, seguido do extrato bruto das folhas, com 181,30 mg de ácido ascórbico/ g de extrato.

Para os compostos isolados, o flavonoide (6), quercetina - ATW2, e a mistura de flavonoides (15), quercetina/canferol - HFA-M1, apresentaram as maiores capacidades redutoras, com 3015,14 e 1295,25 mg de ácido ascórbico/ g de composto, respectivamente, Tabela 12, pág. 170. Este mesmo comportamento foi observado para o ensaio do DPPH, revelando que estes compostos são promissores na ação antioxidante. Com capacidade redutora inferior, porém ainda assim expressiva, observa-se o composto (5), ácido quínico - ATW45, com 415,41 mg de ácido ascórbico/ g de composto.

#### 5.2.1.5 Inibição da peroxidação lipídica

O ensaio de inibição da peroxidação lipídica consiste em um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo (ácido linoléico). A determinação é efetuada a 470 nm, na presença e na ausência de um antioxidante. É um método simples, sensível, mas não específico (substâncias oxidantes ou redutoras podem interferir no ensaio). Apesar disto, o método é amplamente usado, pois como não recorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termo-sensíveis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A Tabela 11, pág. 169, apresenta a porcentagem de inibição do processo de peroxidação lipídica dos extratos e frações estudados, em relação à solução sem a presença de antioxidantes. Os resultados foram calculados a partir dos dados de absorvância. Maiores valores significam maior potencial inibidor da reação de peroxidação lipídica e conseqüentemente inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno.

De maneira geral, pode-se observar que as substâncias antioxidantes dos extratos brutos estão localizadas em maiores quantidades no extrato bruto total (folhas e caules), seguido do extrato bruto das folhas e por fim pelo extrato bruto dos caules para as duas espécies vegetais. Para *C. heterodoxus* os extratos brutos e as frações



acetato de etila apresentaram a maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica, sendo o extrato bruto total a fração com a maior atividade antioxidante (47,15 %). Já para *C. antisiphiliticus* valores ainda mais elevados de atividade antioxidante foram observados, sendo as frações acetato de etila da planta inteira (110,75 %), extrato bruto total (77,72 %), extrato bruto das folhas (66,45 %) e fração hexano das folhas (62,15 %) as frações que apresentaram maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica. Para esta espécie verificou-se que as melhores atividades antioxidantes não se limitaram apenas às frações de maior polaridade, mas distribuí-se inclusive nas frações mais apolares. A espécie *C. heterodoxus* foi novamente a menos ativa nos ensaios antioxidantes, mostrando resultados concordantes com os outros ensaios realizados.

As Figuras 77 e 78 apresentam o perfil de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos e frações testados de *C. heterodoxus* e *C. antisiphiliticus*, respectivamente, em função do tempo, observados através da descoloração do  $\beta$ -caroteno nas soluções. Pode-se observar que as soluções do controle negativo, ou seja, sem a presença dos antioxidantes, apresentaram clara descoloração, o que pode ser verificado através do decaimento das absorvâncias. Já as soluções contendo BHT como agente antioxidante (controle positivo) mostram a permanência da coloração ao longo do tempo, pois seus valores de absorvância permanecem mais estáveis ou até aumentaram. Quanto mais semelhantes ao perfil apresentado pelo BHT forem as soluções teste, melhores os resultados de inibição da peroxidação lipídica pelas frações analisadas. De um modo geral, nota-se que os resultados apresentados pelos extratos e frações de *C. antisiphiliticus* foram melhores do que aqueles apresentados por *C. heterodoxus*, sendo que nos dois casos a fração acetato de etila da planta inteira demonstrou proteger mais a solução da descoloração.

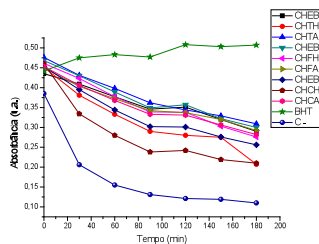


Figura 77. Ação protetora contra peroxidação lipídica dos extratos e frações de *C. heterodoxus*.

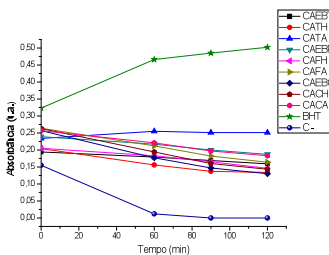


Figura 78. Ação protetora contra peroxidação lipídica dos extratos e frações de *C. antisyphiliticus*.

Tabela 11: Teor de compostos fenólicos totais<sup>\*</sup> e flavonoides<sup>\*\*</sup>, capacidade sequestrante do radical livre DPPH (CI<sub>50</sub><sup>\*\*\*</sup> - µg/mL), potencial redutor<sup>\*\*\*\*</sup> e inibição da peroxidação lipídica<sup>\*\*\*\*\*</sup> dos extratos e frações das espécies estudadas (letras diferentes diferem estatisticamente).

FRAÇÕES	FENÓLICOS	FLAVONOIDES	DPPH	POTENCIAL REDUTOR	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
<i>Croton heterodoxus</i>					
CHEBT	74,64 <sup>f</sup> ± 0,55	27,08 <sup>f</sup> ± 0,43	75,39	86,03 <sup>f</sup> ± 2,06	47,15 <sup>cj</sup> ± 3,45
CHTH	12,37 <sup>d</sup> ± 1,10	3,30 <sup>d,e</sup> ± 0,05	>200	2,90 <sup>d</sup> ± 0,00	11,27 <sup>a</sup> ± 5,46
CHTA	82,33 <sup>b</sup> ± 1,28	62,42 <sup>b</sup> ± 3,58	47,03	114,43 <sup>b</sup> ± 1,23	39,27 <sup>bj</sup> ± 3,64
CHEBF	59,71 <sup>g</sup> ± 0,27	38,73 <sup>g</sup> ± 0,62	101,33	75,95 <sup>g</sup> ± 6,38	39,03 <sup>bj</sup> ± 4,55
CHFH	14,66 <sup>d</sup> ± 0,82	4,97 <sup>e</sup> ± 0,86	>200	1,88 <sup>d</sup> ± 1,03	32,84 <sup>b,ej</sup> ± 3,46
CHFA	68,41 <sup>a</sup> ± 0,37	77,27 <sup>a</sup> ± 2,29	89,27	100,44 <sup>a</sup> ± 4,12	42,54 <sup>b,cj</sup> ± 6,54
CHEBC	129,58 <sup>e</sup> ± 0,00	4,30 <sup>e</sup> ± 0,57	32,55	187,47 <sup>e</sup> ± 1,44	28,48 <sup>ab</sup> ± 1,28
CHCH	14,66 <sup>d</sup> ± 1,01	2,24 <sup>d</sup> ± 0,14	>200	ND <sup>*****</sup>	8,97 <sup>a</sup> ± 4,55
CHCA	102,20 <sup>f</sup> ± 1,01	14,95 <sup>c</sup> ± 0,05	35,57	136,03 <sup>c</sup> ± 1,44	37,82 <sup>bj</sup> ± 5,45
<i>Croton antisyphiliticus</i>					
CAEBT	91,03 <sup>c</sup> ± 0,82	3,15 <sup>b</sup> ± 0,09	48,84	112,78 <sup>c</sup> ± 6,58	77,72 <sup>h</sup> ± 10,13
CATH	32,97 <sup>b</sup> ± 0,46	8,50 <sup>d</sup> ± 0,76	153,22	22,04 <sup>b</sup> ± 1,85	54,84 <sup>b,c,f</sup> ± 5,80
CATA	183,89 <sup>f</sup> ± 2,11	102,10 <sup>f</sup> ± 1,24	19,81	333,77 <sup>f</sup> ± 1,65	110,75 <sup>g</sup> ± 0,98
CAEBF	127,29 <sup>e</sup> ± 3,02	90,88 <sup>c</sup> ± 1,19	28,33	181,30 <sup>c</sup> ± 3,09	66,45 <sup>d</sup> ± 9,03
CAFH	26,65 <sup>g</sup> ± 0,00	26,79 <sup>g</sup> ± 0,81	>200	32,12 <sup>b</sup> ± 0,41	62,15 <sup>fc</sup> ± 2,91
CAFA	127,93 <sup>a</sup> ± 1,28	66,09 <sup>a</sup> ± 0,76	42,81	169,57 <sup>a</sup> ± 10,70	35,27 <sup>b,e</sup> ± 7,42
CAEBC	75,55 <sup>d</sup> ± 0,18	2,15 <sup>b,c</sup> ± 0,24	84,44	97,14 <sup>d</sup> ± 3,70	18,06 <sup>a</sup> ± 12,90
CACH	15,66 <sup>e</sup> ± 1,28	1,19 <sup>c</sup> ± 0,14	>200	ND <sup>*****</sup>	22,58 <sup>ca</sup> ± 9,03
CACA	34,62 <sup>b</sup> ± 0,82	2,58 <sup>b,c</sup> ± 0,67	116,42	26,36 <sup>b</sup> ± 1,23	52,26 <sup>cf</sup> ± 1,94

\* Expresso em mg de ácido gálico/ g de extrato (mg AG/g).

\*\* Expresso em mg de quercetina/ g de extrato (mg QUE/g).

\*\*\* CI<sub>50</sub> = Concentração de extrato ou fração necessária, em µg mL<sup>-1</sup>, para diminuir a concentração do radical livre DPPH em 50 %.

\*\*\*\* Expresso em mg de ácido ascórbico/ g de extrato (mg AA/g).

\*\*\*\*\* Atividade não detectada através do método utilizado.

\*\*\*\*\* A medida da inibição da peroxidação lipídica em porcentagem refere-se à inibição da descoloração do β-caroteno, na ausência de um antioxidante. BHT (controle positivo) para *C. heterodoxus* = 123,64% ± 1,93 e para *C. antisyphiliticus* = 215,48% ± 6,06 de inibição.

Tabela 12: Capacidade sequestrante do radical livre DPPH (CI<sub>50</sub>\* - µg/mL) e potencial redutor\*\* dos compostos isolados das espécies estudadas (letras diferentes diferem estatisticamente).

COMPOSTOS	DPPH	POTENCIAL REDUTOR
ATH12 (9)	>100	31,60 <sup>a</sup> ± 0,24
ATW2 (6)	2,74	3015,14 <sup>c</sup> ± 12,92
ATW12 (3)	>100	161,92 <sup>d</sup> ± 2,65
ATW45 (5)	34,76	415,41 <sup>e</sup> ± 3,43
HCA55*** (12)	-	-
HCH18 (7)	>100	50,80 <sup>b</sup> ± 2,07
HCH25 (8)	>100	30,23 <sup>a</sup> ± 0,86
HCH40 (9)	>100	49,43 <sup>b</sup> ± 0,41
HCH70 (10)	>100	6,63 <sup>f</sup> ± 0,41
HCH115 (11)	>100	24,74 <sup>a</sup> ± 0,41
HFA-M1 (15)	3,86	1295,25 <sup>g</sup> ± 1,44

\* CI<sub>50</sub> = Concentração de composto necessário, em µg mL<sup>-1</sup>, para diminuir a concentração do radical livre DPPH em 50 %.

\*\* Expresso em mg de ácido ascórbico/ g de extrato (mg AA/g).

\*\*\* Amostra insuficiente para realização dos ensaios.

Ao relacionar os resultados dos ensaios de atividade antioxidante de sequestro de radicais DPPH e poder redutor e o ensaio de inibição da peroxidação lipídica com os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos e frações percebe-se uma elevada correlação entre os ensaios antioxidantes e o conteúdo fenólico das amostras, conforme apresentado na Tabela 13.

Observa-se que para a espécie *Croton heterodoxus* existe uma maior correlação entre os ensaios antioxidantes DPPH e o conteúdo fenólico, e poder redutor com o conteúdo fenólico e entre os próprios ensaios antioxidantes,  $R^2 = 0,99461$ ;  $0,98399$  e  $0,96021$ , respectivamente, para as folhas. Para os caules e a planta inteira o mesmo comportamento foi observado, com elevadas correlações entre os ensaios antioxidantes DPPH e poder redutor com o conteúdo fenólico e entre os próprios ensaios antioxidantes, com  $R^2 = 0,90952$ ;  $0,99701$  e  $0,87470$  para os caules e  $0,98884$ ;  $0,95702$  e  $0,98954$  para a planta inteira.

Tabela 13: Correlação entre as atividades antioxidantes de sequestro de radicais DPPH, potencial redutor e peroxidação lipídica com os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides. Os valores apresentados referem-se ao coeficiente de correlação  $R^2$ .

ENSAIOS RELACIONADOS	FOLHAS	CAULES	TOTAL
<i>Croton heterodoxus</i>			
DPPH/Fenólicos	0,99461	0,90952	0,98884
DPPH/Flavonoides	0,60211	-0,24932	0,60444
DPPH/Pot. Redutor	0,96021	0,87470	0,98954
Pot. Red./Fenólicos	0,98399	0,99701	0,95702
Pot. Red./Flav.	0,80113	-0,68744	0,71302
Per. Lip./Fenólicos	0,70801	0,43740	0,80967
Per. Lip./Flav.	0,93048	0,42363	-0,12732
Per. Lip./DPPH	0,85275	0,77161	0,71321
Per. Lip./ Pot. Red.	0,96469	0,36663	0,60465
<i>Croton antisiphiliticus</i>			
DPPH/Fenólicos	0,98671	0,60420	0,62542
DPPH/Flavonoides	0,80506	0,40262	-0,20162
DPPH/Pot. Redutor	0,99994	0,52264	0,45016
Pot. Red./Fenólicos	0,98839	0,99512	0,97830
Pot. Red./Flav.	0,79867	-0,56997	0,78385
Per. Lip./Fenólicos	0,26505	-0,78918	0,99920
Per. Lip./Flav.	-0,99995	-0,15306	0,60689
Per. Lip./DPPH	-0,81120	-0,96621	0,65610
Per. Lip./ Pot. Red.	-0,80490	-0,72474	0,96923

Com relação ao conteúdo de flavonoides, as correlações encontradas não foram significativas para os três ensaios antioxidantes, sugerindo que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante apresentada pelas amostras são compostos fenólicos pertencentes a uma classe diferente de flavonoides. Com relação ao ensaio da peroxidação lipídica, observou-se que para as folhas de *C. heterodoxus* há uma elevada correlação com o conteúdo de flavonoides e com o ensaio do poder redutor, com  $R^2 = 0,93048$  e  $0,96469$ , respectivamente. Para os caules e a planta inteira correlações significativas não foram observadas com relação ao ensaio da peroxidação lipídica.

Para a espécie *Croton antisiphiliticus* um comportamento diferente é observado. Enquanto para as folhas uma alta correlação é observada entre os ensaios antioxidantes DPPH e poder redutor e o conteúdo fenólico e entre os próprios ensaios antioxidantes,  $R^2 = 0,98671$ ;  $0,98839$  e  $0,99994$ , respectivamente, para os caules e para a

planta inteira apenas o ensaio antioxidante do poder redutor apresentou correlação com o conteúdo de compostos fenólicos,  $R^2 = 0,99512$  e  $0,97830$ , respectivamente, enquanto para o ensaio do DPPH não houve correlação significativa com o conteúdo fenólico apresentado. Ainda, pode-se notar que não houve correlação significativa entre os ensaios antioxidantes DPPH e poder redutor para os caules e planta inteira. Assim como o ensaio do poder redutor, o ensaio de peroxidação lipídica também apresentou elevada correlação com o conteúdo de compostos fenólicos, com  $R^2 = 0,99920$  e também com o ensaio do poder redutor,  $R^2 = 0,96923$ , indicando que os compostos fenólicos de *C. antisiphiliticus* exercem forte influência nos ensaios antioxidantes. Com relação ao teor de flavonoides, o mesmo comportamento foi observado para as duas espécies vegetais, não havendo correlação significativa entre estes ensaios. A alta correlação apresentada entre o ensaio do poder redutor e o conteúdo fenólico,  $R^2 = 0,99512$  e  $0,97830$ , e a baixa correlação entre o ensaio do DPPH e o conteúdo fenólico,  $R^2 = 0,60420$  e  $0,62542$ , para os caules e planta inteira de *C. antisiphiliticus*, respectivamente, sugerem que os principais compostos antioxidantes dos sistemas analisados podem ser não-fenólicos, visto que a doação de radicais hidrogênio à molécula oxidante do DPPH não foi expressiva. De acordo com Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008), estes compostos podem ser ácido ascórbico, ácido fítico, tocoferóis, esteróis, carotenoides e saponinas.

Estes resultados estão de acordo com a tendência observada na literatura, onde, de maneira geral, existe uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante, todavia, esta correlação algumas vezes é contraditória, sendo necessário uma análise cautelosa dos resultados obtidos a partir de diferentes métodos.

### 5.2.2 Toxicidade frente à *Artemia salina*

São considerados ativos para o bioensaio os extratos ou frações que apresentarem valores de  $DL_{50}$  até  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A Tabela 14 apresenta os resultados do ensaio de letalidade utilizando larvas de *A. salina* para os extratos e frações das duas espécies de *Croton*. Verifica-se que a espécie *Croton heterodoxus* apresentou maior toxicidade sobre as larvas de *A. salina*, com quatro frações fornecendo resultados inferiores à dose de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que a fração mais ativa foi a fração hexano das folhas, com  $DL_{50}$  de  $182,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguida das frações hexano da planta inteira, com  $DL_{50}$  de  $321,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , extrato bruto da folha, com  $DL_{50}$  de  $439,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  e fração hexano do caule,

com  $DL_{50}$  de  $475,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para *Croton antisiphiliticus*, a fração mais ativa foi a hexano do caule, com  $DL_{50}$  de  $612,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Contudo, as toxicidades apresentadas são baixas quando comparadas ao controle positivo dicromato de potássio ( $20-40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Esta espécie apresentou ainda uma fração inativa, com  $DL_{50} >1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o extrato bruto da planta inteira.

Tabela 14: Atividade tóxica frente à *Artemia salina*.

FRAÇÕES	$DL_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$ (IC <sub>95%</sub> )
<i>Croton heterodoxus</i>	
CHEBT	568,8 (438,8 – 737,4)
CHTH	321,4 (260,8 – 396,0)
CHTA	861,0 (705,9 – 1050,1)
CHEBF	439,5 (344,4 – 561,0)
CHFH	182,8 (133,2 – 250,8)
CHFA	787,0 (644,1 – 961,7)
CHEBC	829,8 (689,7 – 998,5)
CHCH	475,3 (330,2 – 684,2)
CHCA	803,5 (666,2 – 969,2)
<i>Croton antisiphiliticus</i>	
CAEBT	> 1000
CATH	691,8 (546,6 – 975,6)
CATA	696,6 (559,4 – 867,5)
CAEBF	714,5 (577,2 – 884,4)
CAFH	922,6 (823,6 – 1033,4)
CAFA	879,0 (719,3 – 1074,2)
CAEBC	726,1 (599,8 – 879,0)
CACH	612,4 (485,9 – 771,8)
CACA	666,8 (519,9 – 855,2)
$K_2Cr_2O_7$	20-40

Ramos et al. (2009) verificaram a citotoxicidade de diferentes espécies vegetais, entre elas as espécies *C. sellowii*, *C. rhamnifolius*, *C. jacobinensis* e *C. micans*, utilizando *A. salina*. Para a espécie *C. Sellowii*, o extrato hexânico do caule apresentou a maior toxicidade, com  $DL_{50}$  de  $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que os extratos etanólicos das folhas e caules apresentaram resultados semelhantes. Já para as espécies *C. rhamnifolius*, *C. jacobinensis*, os extratos etanólicos do caule se destacam, com valores de  $DL_{50}$  de  $0,15$  e  $6,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A espécie *C. micans* apresentou a menor toxicidade frente à *A. salina* dentre as estudadas, todavia com valores de  $DL_{50}$  menores que aqueles obtidos em nosso grupo de estudo para a espécie *C. antisiphiliticus*.

Medina et al. (2009) avaliaram a letalidade dos extratos metanólico das cascas, etanólico e hexânico das folhas de *Croton fluribundus*, e do diterpeno ácido caurenóico frente à larvas de *Artemia salina*. Os extratos apresentaram DL<sub>50</sub> menores que o diterpeno isolado, sendo o extrato etanólico das folhas o que apresentou maior toxicidade no bioensaio, com DL<sub>50</sub> de 230,7 µg mL<sup>-1</sup>. Este resultado assemelha-se ao obtido em nosso grupo de estudo para a espécie *C. heterodoxus*, que apresentou uma DL<sub>50</sub> de 439,5 µg mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico bruto das folhas e uma DL<sub>50</sub> de 182,8 µg mL<sup>-1</sup> para a fração hexano das folhas.

### 5.2.3 Inibição da enzima acetilcolinesterase

A exemplo da galantamina, um fármaco de origem natural empregado na inibição da enzima acetilcolinesterase, produtos naturais desempenham um importante papel na busca de novos compostos bioativos. A estrutura única e complexa de produtos naturais não pode ser obtida facilmente pela química sintética, sendo assim a natureza representa uma rica fonte na pesquisa por novos agentes terapêuticos, com baixa toxicidade e de menor custo (VIEGAS JUNIOR et al., 2004; BARBOSA FILHO et al., 2006).

Neste contexto, os extratos e frações das espécies *Croton heterodoxus* e *Croton antisiphiliticus* foram avaliados com relação ao potencial inibidor frente à AChE. Inicialmente avaliou-se a porcentagem de inibição apresentada pelas diferentes frações, sendo que, aquelas que apresentaram porcentagem de inibição acima de 50%, foram submetidas ao cálculo de CI<sub>50</sub>. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para as amostras testadas.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que, exceto para as poucas frações que não apresentaram atividade pelo método empregado, os resultados foram bastante promissores. Várias frações apresentaram porcentagem de inibição maior que 50% em uma triagem inicial, sendo, portanto, submetidas à determinação da CI<sub>50</sub>. Para a espécie *C. heterodoxus*, a fração mais ativa frente à AChE foi a hexano da planta inteira, com CI<sub>50</sub> de 21,54 µg mL<sup>-1</sup> para inibição da enzima. Já para a espécie *C. antisiphiliticus* a fração mais ativa foi a acetato do caule, com CI<sub>50</sub> de 23,14 µg mL<sup>-1</sup>. Esta espécie apresentou mais frações ativas com potencial inibição da AChE, mostrando que a investigação de tais frações é interessante e pode revelar novos candidatos à fármacos.

Tabela 15: Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

FRAÇÕES	% inibição (100 ppm)	CI <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )***
<i>Croton heterodoxus</i>		
CHEBT	ND*	-
CHTH	100,00 <sup>c</sup> ± 2,37	21,54
CHTA	ND	-
CHEBF	100,00 <sup>c</sup> ± 0,56	29,68
CHFHH	ND*	-
CHFA	ND*	-
CHEBC	72,63 <sup>b</sup> ± 0,22	66,79
CHCH	8,82 <sup>a</sup> ± 2,07	-
CHCA	ND*	-
<i>Croton antisiphiliticus</i>		
CAEBT	ND*	-
CATH	62,75 <sup>e</sup> ± 0,66	24,04
CATA	48,53 <sup>f</sup> ± 0,31	-
CAEBF	58,73 <sup>d</sup> ± 0,28	86,70
CAFH	49,03 <sup>f</sup> ± 0,28	-
CAFA	62,32 <sup>e</sup> ± 1,38	51,86
CAEBC	23,78 <sup>d</sup> ± 0,16	-
CACH	100,00 <sup>c</sup> ± 3,16	28,41
CACA	100,00 <sup>b</sup> ± 0,67	23,14
Reminyl**		9,30

\*Atividade não detectada pelo método utilizado.

\*\*Comprimido do fármaco Reminyl contendo 8mg do princípio ativo galantamina.

\*\*\* Amostras que apresentaram porcentagem de inibição acima de 50% foram submetidas à determinação da CI<sub>50</sub>.

Ainda, os compostos isolados de cada fração foram avaliados quanto à sua ação inibitória frente à acetilcolinesterase. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para os compostos isolados das duas espécies vegetais.

Entretanto, observa-se que para os compostos isolados, apenas o composto (6), quercetina - ATW2, isolado de *Croton antisiphiliticus*, apresentou porcentagem de inibição maior que 50%, com CI<sub>50</sub> de 47,17 µg mL<sup>-1</sup>, mostrando que o sinergismo dos componentes de cada fração é um fator importante para inibição da enzima, no ensaio realizado.



Tabela 16: Atividade inibitória dos compostos frente à enzima acetilcolinesterase.

COMPOSTOS	% inibição (100 ppm)	CI <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )**
ATH12 (9)	19,06 <sup>a</sup> ± 0,33	-
ATW2 (6)	61,61 <sup>b</sup> ± 0,31	47,17
ATW12 (3)	3,88 <sup>c</sup> ± 0,33	-
ATW45 (5)	20,58 <sup>d</sup> ± 0,71	-
HCH18 (7)	1,36 <sup>e</sup> ± 0,20	-
HCH25 (8)	35,04 <sup>f</sup> ± 0,13	-
HCH40 (9)	16,73 <sup>g</sup> ± 0,33	-
HCH70 (10)	38,88 <sup>h</sup> ± 0,33	-
HCH115 (11)	16,96 <sup>g</sup> ± 0,13	-
HFA-M1 (15)	15,13 <sup>i</sup> ± 2,33	-
Reminyl*		9,30

\*Comprimido do fármaco Reminyl contendo 8mg do princípio ativo galantamina.

\*\*Amostras que apresentaram percentagem de inibição acima de 50% foram submetidas à determinação da CI<sub>50</sub>.

### 5.2.4 Atividade antibacteriana

Neste trabalho, os extratos brutos e frações das duas espécies vegetais *C. heterodoxus* e *C. antisiphiliticus* foram submetidos à avaliação da atividade antibacteriana através do método de microdiluição a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Bacillus cereus*. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para a atividade antibacteriana dos extratos e frações testados.

Para a classificação da atividade antibacteriana foi utilizado o critério proposto por Machado et al. (2005). Para extratos brutos e frações uma CIM abaixo de 10 µg mL<sup>-1</sup> é considerada um efeito excelente, entre 10 e 100 µg mL<sup>-1</sup> bom, de 100 a 500 µg mL<sup>-1</sup> moderado, de 500 a 1000 µg mL<sup>-1</sup> fraco e acima de 1000 µg mL<sup>-1</sup> inativo (MACHADO et al., 2005).

Tabela 17: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da atividade antibacteriana\* dos extratos e frações das duas espécies de *Croton*.

FRAÇÕES	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
<i>Croton heterodoxus</i>				
CHEBT	250	250	125	125
CHTH	250	250	250	125
CHTA	250	250	125	62,5
CHEBF	500	500	250	250
CHFH	500	500	250	62,5
CHFA	250	500	125	62,5
CHEBC	500	500	500	125
CHCH	500	500	125	62,5
CHCA	250	250	125	62,5
<i>Croton antisiphiliticus</i>				
CAEBT	250	250	125	250
CATH	500	250	125	125
CATA	1000	500	250	62,5
CAEBF	500	500	250	250
CAFH	250	250	125	125
CAFA	500	500	125	31
CAEBC	125	500	250	125
CACH	7,8	125	125	3,9
CACA	7,8	125	125	3,9
Gentamicina	1,0	6,0	6,0	0,2

\*Resultados expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os extratos e frações testados apresentaram atividade antibacteriana em diversos níveis. De acordo com a classificação proposta por Machado et al. (2005), nota-se que a espécie *Croton antisiphiliticus* apresentou resultados que podem ser classificados como excelentes diante dos microrganismos *S. aureus* e *B. cereus*, com CIM de 7,8 e 3,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, para as frações hexano e acetato do caule. Este resultado é bastante interessante, uma vez que *Staphylococcus aureus* representa um dos microrganismos de maior incidência nas infecções hospitalares (HOEFEL; LAUTERT, 2006). Outros resultados representativos foram obtidos pelas frações acetato das folhas e acetato da planta inteira, com CIM de 31,0 e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, considerado um bom resultado de atividade antibacteriana frente à *B. cereus*. Para as demais frações os resultados podem ser considerados moderados, exceto para a fração acetato da

planta inteira, que curiosamente, apresentou resultado considerado fraco frente à *S. aureus*, com CIM de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , apesar de apresentar resultado bom frente à *B. cereus*. Já para a espécie *Croton heterodoxus* resultados excelentes não foram observados, todavia, diversas frações apresentaram resultados considerados bons, com CIM de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente à *B. cereus* para as frações acetato da planta inteira, folhas e caules, e para as frações hexano das folhas e caules. Todos os demais resultados podem ser classificados como moderados, revelando que a atividade antibacteriana frente a diversos microrganismos é bastante promissora.

Para as duas espécies vegetais observa-se que as bactérias que apresentaram maior sensibilidade aos extratos e frações foram as do tipo Gram-positivas, o que é coerente com as diferenças morfológicas destas em relação às Gram-negativas. A resistência apresentada por bactérias Gram-negativas pode ser explicada pela presença de uma membrana externa, que representa uma barreira para a entrada de inúmeras moléculas de antibióticos, e um espaço periplasmático, que contém enzimas capazes de destruir moléculas estranhas; ambos ausentes em bactérias Gram-positivas (DUFFY; POWER, 2001).

Para compostos isolados, uma CIM abaixo de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  é considerada um efeito excelente, de  $10$  a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  é considerado bom, e acima de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  é considerado inativo (RÍOS; RECIO, 2005). Com relação aos compostos isolados, Tabela 18, pode-se observar que nenhum deles apresentou atividade significativa frente às bactérias estudadas, indicando que estes compostos não são recomendáveis para investigação de fármacos para doenças de origem bacteriana, e que os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada pelas frações podem não terem sido isolados neste trabalho.

A atividade antibacteriana já foi relatada para outras espécies do gênero *Croton*. Abo, Ogunleye e Ashidi (1999) avaliaram a atividade antibacteriana das folhas e cascas dos caules de *C. zambesicus* utilizando o método de difusão em disco de ágar. Os extratos apresentaram atividade antibacteriana frente a diversos microrganismos, entre eles *S. aureus* e *E. coli*, com resultados comparáveis ao obtido pela ampicilina. Utilizando o mesmo método, Martins et al. (2000) verificaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton stellulifer* contra diversos microrganismos, apresentando atividade moderada frente à *S. aureus* e *E. coli* (MARTINS et al., 2000). Já os extratos hexânico e etanólico das folhas e caules das espécies *Croton sellowii*, *C. rhamnifolius*, *C. jacobinensis* e *C. micans* não apresentaram

atividade antibacteriana contra os microrganismos testados, entre eles *S. aureus* e *E. coli* (RAMOS et al., 2009).

Tabela 18: Atividade antibacteriana\* dos compostos das duas espécies de *Croton*.

COMPOSTOS	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
ATH12 (9)	> 1000	1000	> 1000	500
ATW2 (6)	> 1000	1000	> 1000	500
ATW12 (3)	> 1000	1000	> 1000	500
ATW45 (5)	> 1000	1000	> 1000	500
HCA55 (12)	500	500	>1000	250
HCH18 (7)	> 1000	1000	> 1000	500
HCH25 (8)	> 1000	1000	> 1000	500
HCH40 (9)	> 1000	1000	> 1000	500
HCH70 (10)	> 1000	1000	> 1000	500
HCH115 (11)	> 1000	1000	> 1000	500
HFA-MI (15)	> 1000	1000	> 1000	500
Gentamicina	2,5	1,25	1,25	0,25

\*Resultados expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados encontrados na literatura com relação à atividade antibacteriana do gênero *Croton* são diversos, todavia, dados para as espécies em estudo não foram encontrados.

### 5.2.5 Atividade antifúngica

Os extratos e frações das espécies *C. heterodoxus* e *C. antisiphiliticus* foram avaliados quanto ao seu potencial antifúngico diante dos microrganismos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos para as frações testadas.

Deste estudo prévio pode se observar que várias frações das duas espécies vegetais mostraram-se ativas. Com relação à *C. heterodoxus*, nota-se que o fungo mais sensível foi *C. gattii*, com inibição de até 87,3% pela fração hexano da planta inteira, enquanto o menos sensível foi *C. parapsilosis*, que não apresentou qualquer

inibição significativa. Outra fração interessante de *C. heterodoxus* é a hexano dos caules, que apresentou 79,8%, 77,7% e 96,3% de inibição frente aos fungos *C. neoformans*, *C. gattii* e *P. brasiliensis*, respectivamente. Já para *C. antisiphiliticus*, a maior sensibilidade foi verificada frente à *P. brasiliensis*, com inibições de 79,4%; 78,7% e 75,3% para as frações hexano da planta inteira, extrato bruto da planta inteira e extrato bruto da folha, respectivamente. Outro microrganismo que se mostrou bastante sensível foi *C. tropicalis*, com inibição de até 70,5% pelo extrato bruto do caule, e várias frações com porcentagem de inibição maior que 50%, enquanto *C. albicans* apresentou a menor sensibilidade diante das diferentes frações, sendo o valor mais representativo de inibição aquele alcançado pela fração hexano da planta inteira, 50,6%.

Tabela 19: Porcentagem de inibição dos extratos e frações contra leveduras patogênicas.

FRAÇÕES*	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. brasiliensis</i>
<i>Croton heterodoxus</i>						
CHEBT	0,0	45,2	0,0	56,8	0,0	69,6
CHTH	31,3	58,8	46,7	87,3	5,5	0,0
CHTA	12,4	16,1	0,0	41,2	0,0	57,4
CHEBF	22,0	61,6	54,0	62,5	0,0	47,9
CHFH	57,0	60,0	51,8	57,3	23,7	0,0
CHFA	38,1	63,9	0,0	0,0	0,0	28,4
CHEBC	0,0	46,6	0,6	18,0	0,0	21,0
CHCH	44,3	55,4	79,8	77,7	3,4	96,3
CHCA	0,0	43,4	0,0	17,6	0,0	0,0
<i>Croton antisiphiliticus</i>						
CAEBT	44,6	64,5	6,0	21,1	62,6	78,7
CATH	50,6	54,4	25,8	31,1	61,8	79,4
CATA	0,0	48,2	1,9	0,0	74,7	3,0
CAEBF	31,8	49,2	59,2	83,1	0,0	75,3
CAFH	0,0	54,1	46,9	36,6	0,0	0,0
CAFA	4,9	53,4	0,0	0,0	0,0	26,8
CAEBC	46,5	70,5	38,4	6,9	24,9	0,0
CACH	41,9	19,4	87,6	84,7	0,0	0,0
CACA	44,3	61,4	64,0	49,7	0,0	0,0
Itraconazol**	65,1	80,0	89,2	72,0	70,0	94,2
DMSO	0,0	13,0	13,6	13,0	0	0

\*As amostras foram testadas na concentração de 500 µg/ml.

\*\*Utilizado na concentração de 0,5 µg/ml.

De maneira similar ao que ocorre com *C. heterodoxus*, a fração hexano do caule de *C. antisiphiliticus* também mostrou-se bastante interessante, apresentando 87,6% de inibição para *C. neoformans* e 84,7% para *C. gattii*. Ainda frente à *C. gattii*, o extrato bruto das folhas apresentou 83,1% de inibição. Outra fração interessante foi a acetato da planta inteira, que apresentou 74,7% de inibição frente à *C. parapsilosis*.

Para todas as amostras com porcentagem de inibição  $\geq 70\%$  foi realizado o CIM a fim de encontrar a menor concentração ativa e avaliar o efeito de diferentes concentrações de extratos, frações e compostos isolados na atividade antifúngica.

De acordo com a Tabela 20, verifica-se que para a espécie *C. heterodoxus* apenas o fungo *P. brasiliensis* foi menos resistente, com CIM de  $125 \mu\text{g ml}^{-1}$  para a fração hexano do caule e  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o extrato bruto total. Para a espécie *C. antisiphiliticus*, os fungos *C. gattii* e *C. parapsilosis* foram os menos resistentes, com CIM de  $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  para a fração hexano do caule e  $125 \mu\text{g ml}^{-1}$  para o extrato bruto da folha frente à *C. gattii* e  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  para a fração acetato da planta inteira frente à *C. parapsilosis*. Os demais fungos apresentaram-se mais resistentes às frações testadas, com valores de CIM igual ou maior que  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Tabela 20: Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g ml}^{-1}$  dos extratos e frações estudados.

FRAÇÕES	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. brasiliensis</i>
<i>Croton heterodoxus</i>					
CHEBT	-	-	-	-	250
CHTH	-	-	$\geq 500$	-	-
CHCH	-	$\geq 500$	$\geq 500$	-	125
<i>Croton antisiphiliticus</i>					
CAEBT	-	-	-	-	500
CATH	-	-	-	-	500
CATA	-	-	-	250	-
CAEBF	-	-	125	-	$\geq 500$
CAEBC	500	-	-	-	-
CACH	-	-	62,5	-	-
Itraconazol	0,062*	0,031	0,031	0,031	0,031

\* efeito trailing.

Já para os compostos isolados, a grande maioria dos compostos foi ativa frente ao fungo *P. brasiliensis*, além *C. gattii* e *C. krusei*. Os compostos ATW45 (**5**) e HCH115 (**11**) apresentaram até 100% de inibição frente à *P. brasiliensis*, conforme dados da Tabela 21. Todavia, apenas os compostos HCH18 (**7**) e HFA-M1 (**15**) mostraram-se mais ativos frente à *P. brasiliensis*, com CIM de 62,5 e 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 22). Os demais fungos apresentaram-se mais resistentes aos compostos testados, com valores de CIM igual ou maior que 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Tabela 21: Porcentagem de inibição dos compostos contra leveduras patogênicas.

COMPOSTOS*	C.		C.	C.	C.	P.	C.
	<i>albicans</i>	<i>tropicalis</i>	<i>neoformans</i>	<i>gattii</i>	<i>parapsilosis</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>krusei</i>
ATH12 ( <b>9</b> )	57,4	0	48,1	52,7	39,4	70,2	17,7
ATW2 ( <b>6</b> )	0	0	0	0	0	0	0
ATW12 ( <b>3</b> )	0	39,5	0	0	0	91,8	30,9
ATW45 ( <b>5</b> )	0	29,8	0	0	0	100	70
HCA55 ( <b>12</b> )	0	46,8	53,3	0	53,5	100	8,2
HCH18 ( <b>7</b> )	8,1	55,3	46	51,6	24,1	98,8	3,3
HCH25 ( <b>8</b> )	43	29,5	34	77,4	30	90,1	24,2
HCH40 ( <b>9</b> )	21	47,4	0	38,9	28,1	32,4	49,2
HCH70 ( <b>10</b> )	20,6	46,8	10	42,6	18,7	22,7	38,8
HCH115 ( <b>11</b> )	46,8	55,8	18,8	52	7,9	100	28,9
HFA-M1 ( <b>15</b> )	27,1	56,2	66,2	76,9	52,6	81,3	49,4
Itraconazol	80	98,2	80,6	90,3	90,2	100	98,9

\*As amostras foram testadas na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ .

Tabela 22: Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g m l}^{-1}$  dos compostos estudados.

COMPOSTOS	<i>C. gattii</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>C. krusei</i>
ATH12 ( <b>9</b> )	-	>500	-
ATW12 ( <b>3</b> )	-	>500	-
ATW45 ( <b>5</b> )	-	>500	500
HCA55 ( <b>12</b> )	-	>500	-
HCH18 ( <b>7</b> )	-	62,5	-
HCH25 ( <b>8</b> )	>500	-	-
HCH115 ( <b>11</b> )	-	>500	-
HFA-M1 ( <b>15</b> )	500	250	-
Itraconazol	0,031	0,031	0,125

A atividade antifúngica já foi relatada para outras espécies do gênero *Croton*. Abo, Ogunleye e Ashidi (1999) avaliaram a atividade antifúngica das cascas dos caules de *C. zambesicus* utilizando o método

de difusão em disco. Os extratos apresentaram atividade antifúngica frente à diversos microrganismos, entre eles *C. albicans*, com resultados comparáveis ao obtido pelo tioconazol. Com o mesmo método, Martins et al. (2000) verificaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Croton stellulifer* contra diversos microrganismos, apresentando atividade moderada frente à *C. albicans* e *C. neoformans*.

Em estudo de Fenner et al. (2006) foi detectada a utilização das folhas frescas da espécie vegetal *Croton antisiphiliticus* como sendo medicinal com potencial atividade antifúngica em feridas e úlceras. Todavia, ensaios para comprovar tal atividade não foram relatados até o presente momento.

Em síntese, pode-se destacar que diversas frações apresentaram resultados interessantes diante dos ensaios biológicos a que foram submetidas. Este fato é interessante visto que a maior parte das amostras não apresentou toxicidade relevante frente à *Artemia salina*, porém, vale lembrar que estudos de toxicidade *in vivo* devem ser realizados para o propósito do desenvolvimento de novos fármacos.

### 5.2.6 Citotoxicidade

As estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para os próximos anos são alarmantes. Apenas para o ano de 2012-2013, estima-se cerca de 518.510 casos novos de câncer no Brasil. Estes dados aliados às dificuldades encontradas no tratamento das diferentes neoplasias malignas que incluem, resistência aos fármacos utilizados, toxicidade e baixa especificidade, faz com que a pesquisa por novos agentes antitumorais torne-se imprescindível. Diante deste contexto, a atividade antitumoral *in vitro* dos extratos, frações e compostos isolados das duas espécies vegetais foram avaliados frente à duas linhagens de células cancerígenas humanas, MCF-7 (câncer de mama) e TK-10 (câncer renal). Os resultados obtidos para extratos e frações podem ser observados na Tabela 23, e na Tabela 24 para os compostos isolados. Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de triagem frente às células tumorais nas concentrações entre 20-100 µg/mL.

Os resultados apresentados nas Tabelas 23 e 24 são definidos de acordo com a porcentagem de inibição apresentada pelas amostras, sendo considerado citostático aqueles compostos que evitam a multiplicação e o crescimento das células e citotóxicos aqueles compostos que levam à morte celular. De acordo com a Tabela 23, o extrato bruto total de *C. antisiphiliticus* e a fração hexano das folhas da mesma espécie, atuam levando as células de câncer renal à morte, e todas as



demais amostras atuam impedindo a multiplicação celular, exceto o extrato bruto do caule de *C. heterodoxus*, que estimula o crescimento das células tumorais renais. As demais frações e compostos apresentam-se como citostáticos diante das duas linhagens celulares.

Tabela 23: Porcentagem de inibição dos extratos e frações contra células tumorais.

FRAÇÕES	MCF-7		TK-10	
	% de inibição	Resultado	% de inibição	Resultado
<i>Croton heterodoxus</i>				
CHEBT	47	Citostático	38	Citostático
CHTH	47	Citostático	26	Citostático
CHTA	59	Citostático	5	Citostático
CHEBF	48	Citostático	*	
CHFH	39	Citostático	*	
CHFA	70	Citostático	*	
CHEBC	44	Citostático	0	Estimula
CHCH	54	Citostático	15	Citostático
CHCA	50	Citostático	*	
<i>Croton antispyhiliticus</i>				
CAEBT	56	Citostático	102	Citocida
CATH	66	Citostático	37	Citostático
CATA	45	Citostático	*	
CAEBF	34	Citostático	*	
CAFH	54	Citostático	101	Citocida
CAFA	36	Citostático	57	Citostático
CAEBC	48	Citostático	69	Citostático
CACH	65	Citostático	11	Citostático
CACA	53	Citostático	*	
Etoposídeo	99	Citocida	182	Citocida
DMSO 1%	0	Citostático	0	Citostático

\* ensaio não realizado para estas amostras.

Com relação aos compostos isolados, Tabela 24, todos os compostos testados apresentaram-se como citostáticos frente às células tumorais MCF-7.

O extrato bruto total (CAEBT) e a fração hexano das folhas (CAFH) de *Croton antispyhiliticus*, que mostraram-se citocidas frente às células tumorais TK-10, apresentaram também baixa toxicidade frente à *A. salina*, com  $DL_{50} > 1000$  e  $922,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes resultados são interessantes do ponto de vista terapêutico, uma vez que representam frações seguras e de baixa toxicidade para o tratamento de

tipos específicos de células cancerígenas, pois atuam em células doentes e não em células saudáveis.

Tabela 24: Porcentagem de inibição dos compostos contra células tumorais MCF-7.

COMPOSTOS	MCF-7	
	% de inibição	Resultado
ATH12 <b>(9)</b>	21	Citostático
ATW2 <b>(6)</b>	89	Citostático
ATW12 <b>(3)</b>	10	Citostático
ATW45 <b>(5)</b>	11	Citostático
HCA55 <b>(12)</b>	*	-
HCH18 <b>(7)</b>	22	Citostático
HCH25 <b>(8)</b>	10	Citostático
HCH40 <b>(9)</b>	16	Citostático
HCH70 <b>(10)</b>	*	-
HCH115 <b>(11)</b>	29	Citostático
HFA-M1 <b>(15)</b>	75	Citostático
Etoposídeo	96	Citocida
DMSO 1%	0	Citostático

\* ensaio não realizado para estas amostras.

### 5.2.7 Atividade anti-inflamatória

Para avaliação da atividade anti-inflamatória o modelo experimental utilizado foi o da pleurisia, caracterizado pelo influxo de neutrófilos na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória deflagrada pelo agente flogístico (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Este estudo avaliou apenas a primeira fase da resposta inflamatória, na qual ocorre o recrutamento de neutrófilos nas vias aéreas, para o estudo da ação da planta.

O EBH, frações e os compostos isolados de *Croton antisypiliticus* inibiram de forma efetiva a migração leucocitária na cavidade pleural inflamada pela carragenina, como pode ser observado na Tabela 25.

Entre todas as frações estudadas, a fração aquosa demonstrou o melhor resultado em inibir esse parâmetro, uma vez que a dose efetiva desta fração foi de 25 mg kg<sup>-1</sup> (55,7 ± 3,8%), enquanto para as frações Hex, AcOEt e EBH as doses efetivas foram de 50, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os flavonoides isolados da fração aquosa, quercetina – ATW2 **(6)** e vitexina – ATW12 **(3)**, demonstraram resultados similares, em doses ainda mais baixas (10 mg kg<sup>-1</sup> para ambos) que esta fração. A

quercetina a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  reduziu a quantidade de leucócitos em  $41,7 \pm 5,7\%$  enquanto a vitexina a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  inibiu a migração de leucócitos em  $35,8 \pm 7,2\%$ . O material vegetal demonstrou ser tão eficaz na inibição do influxo de células inflamatórias quanto os fármacos de referência utilizados.

Tabela 25: Efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico obtido das partes aéreas da espécie *Croton antisiphiliticus*, suas frações e compostos isolados, sob a migração de leucócitos e exsudação, no modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Grupos/Doses (mg Kg <sup>-1</sup> )	Leucócitos (x10 <sup>6</sup> ) (% de inibição)	Exsudação (µg mL <sup>-1</sup> ) (% de inibição)
Sal <sup>a</sup>	0,61 ± 0,08	1,89 ± 0,22
Cg <sup>a</sup>	5,84 ± 0,23	13,68 ± 0,82
EBH 25 <sup>b</sup>	5,35 ± 0,56	13,18 ± 1,28
EBH 50 <sup>b</sup>	5,11 ± 0,28	7,90 ± 0,90** (42,3 ± 6,6%)
EBH 100 <sup>b</sup>	2,48 ± 0,16** (57,6 ± 2,8%)	8,50 ± 0,49** (37,9 ± 3,6%)
EBH 200 <sup>b</sup>	2,94 ± 0,23** (49,6 ± 3,8%)	8,16 ± 0,34** (40,4 ± 2,4%)
Hex 10 <sup>b</sup>	5,62 ± 0,25	12,09 ± 0,83
Hex 25 <sup>b</sup>	5,32 ± 0,43	13,71 ± 0,96
Hex 50 <sup>b</sup>	4,18 ± 0,40** (28,6 ± 6,8%)	10,07 ± 0,69** (26,4 ± 5,0%)
AcOEt 10 <sup>b</sup>	5,68 ± 0,32	12,02 ± 0,51
AcOEt 25 <sup>b</sup>	6,20 ± 0,68	13,32 ± 0,92
AcOEt 50 <sup>b</sup>	3,90 ± 0,37** (33,3 ± 6,3%)	10,56 ± 0,78* (22,8 ± 5,7%)
Aq 10 <sup>b</sup>	5,70 ± 0,32	10,45 ± 0,58* (19,6 ± 5,0%)
Aq 25 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,22** (55,7 ± 3,8%)	7,32 ± 0,84** (44,2 ± 6,4%)
Aq 50 <sup>b</sup>	2,42 ± 0,22** (58,6 ± 3,8%)	5,94 ± 0,59** (54,7 ± 4,5%)
ATW2 5 <sup>b</sup>	5,25 ± 0,50	11,35 ± 1,13
ATW2 10 <sup>b</sup>	3,40 ± 0,33** (41,7 ± 5,7%)	9,31 ± 0,86** (29,0 ± 6,5%)
ATW2 25 <sup>b</sup>	3,07 ± 0,42** (47,4 ± 7,2%)	10,23 ± 0,28* (22,0 ± 2,2%)
ATW12 5 <sup>b</sup>	5,40 ± 0,35	11,69 ± 1,03
ATW12 10 <sup>b</sup>	3,75 ± 0,42** (35,8 ± 7,2%)	10,55 ± 1,16* (22,9 ± 8,5%)
ATW12 25 <sup>b</sup>	4,10 ± 0,32** (29,8 ± 5,4%)	10,67 ± 1,15* (22,0 ± 8,4%)
ATW45 5 <sup>b</sup>	4,86 ± 0,51	5,31 ± 0,41** (59,5 ± 3,1%)
ATW45 10 <sup>b</sup>	4,48 ± 0,70	4,55 ± 0,42** (65,2 ± 3,2%)
ATW45 25 <sup>b</sup>	3,40 ± 0,67** (41,7 ± 1,5%)	5,06 ± 0,85** (61,3 ± 6,5%)
Dexa 0,5 <sup>b</sup>	1,90 ± 0,20** (67,5 ± 2,6%)	6,80 ± 0,50** (50,0 ± 6,4%)
Indo 5 <sup>b</sup>	2,26 ± 0,32** (61,2 ± 2,1%)	7,93 ± 0,56** (42,4 ± 5,2%)

Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBH: 25 - 200 mg kg<sup>-1</sup>) de *Croton antisiphiliticus* Mart., Fração Hexano (Hex: 10 - 50 mg kg<sup>-1</sup>), Fração Acetato de Etila (AcOEt: 10 - 50 mg kg<sup>-1</sup>), Fração Aquosa (Aq: 10 - 50 mg kg<sup>-1</sup>), quercetina (ATW2: 5 - 25 mg kg<sup>-1</sup>), vitexina (ATW12: 5 - 25 mg kg<sup>-1</sup>) e ácido quínico (ATW45: 5 - 25 mg kg<sup>-1</sup>) administrados 0,5 h antes da carragenina (1%). Sal = animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl 0,9%); Cg = animais tratados somente com carragenina (1%); Dexa = animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>). Indo = animais pré-tratados com indometacina (5,0 mg kg<sup>-1</sup>); a = administração por

via intrapleural (i.pl.); b= administração por via intraperitoneal (i.p.). Cada grupo representa a Média  $\pm$  E.P.M de 6 animais. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.

Com relação à exsudação, tanto o EBH como as frações estudadas foram capazes de reduzir a concentração de exsudato na cavidade pleural inflamada pela carragenina. Os resultados alcançados com o material vegetal foram similares aos resultados obtidos com o tratamento com os anti-inflamatórios de referência, Tabela 25.

Novamente a fração aquosa demonstrou ser mais efetiva que as demais frações em diminuir o extravasamento vascular, uma vez que ela foi efetiva em doses inferiores, 10 e 25 mg kg<sup>-1</sup> (10 mg kg<sup>-1</sup>: 19,5  $\pm$  5,0%; 25 mg kg<sup>-1</sup>: 44,1  $\pm$  6,4%) quando comparada com as demais frações estudadas, 50 mg g kg<sup>-1</sup> para Hex, AcOEt e E BH. O efeito anti edematoso promovido pela fração aquosa pode estar relacionado com a ação dos compostos isolados. Dentre os compostos isolados estudados, o ácido quínico apresentou o melhor resultado em inibir esse parâmetro, tendo em vista que todas as doses estudadas diminuíram a exsudação (5 mg kg<sup>-1</sup>: 59,5  $\pm$  3,1%; 10 mg kg<sup>-1</sup>: 65,2  $\pm$  3,2% e 25 mg kg<sup>-1</sup>: 61,3  $\pm$  6,5%), se comparado com as doses efetivas dos demais compostos, quercetina (10 mg kg<sup>-1</sup>) e vitexina (10 mg kg<sup>-1</sup>).

### 5.2.8 Atividade anti-hiperglicêmica

Todos os triterpenos testados apresentaram significativa ação antihiperglicêmica nas doses testadas, como pode ser observado na Figura 79, que mostra o efeito dos triterpenos nos níveis séricos de glicose.

Os triterpenos HCH18 (7) e HCH70 (10) apresentaram um perfil semelhante de redução da glicemia de animais hiperglicêmicos nas doses de 10, 1 e 0,1 mg kg<sup>-1</sup>. Com a dose de 1 mg kg<sup>-1</sup>, o HCH18 (7) reduziu em 25% os níveis séricos de glicose 30 minutos após a indução da hiperglicemia enquanto o HCH70 (10), na mesma dose, inibiu em 26 e 21 % a hiperglicemia em 15 e 30 minutos após sua indução, respectivamente. Em animais tratados com o HCH25 (8) verificou-se um efeito normoglicêmico com as doses de 10 e 1 mg kg<sup>-1</sup>, com redução da glicemia em 23 e 34%, respectivamente, 15 minutos após indução da hiperglicemia, levando a níveis próximos ao normoglicêmico em 180 minutos.

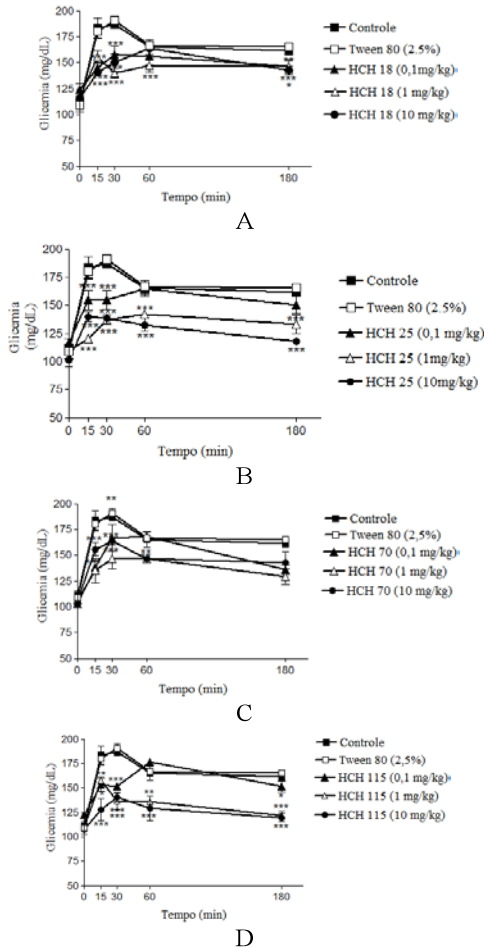


Figura 79: Efeito dos triterpenos HCH18 (7) (A), HCH25 (8) (B), HCH70 (10) (C) e HCH115 (11) (D) testados nas doses de 0,1; 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup> nos níveis séricos de glicose.

O triterpeno HCH115 (11) apresentou uma ação antihiper-glicêmica mais significativa na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>, reduzindo a

glicemia em 30, 24, 21 e 25% nos tempos de 15, 30, 60 e 180 minutos após a indução da hiperglicemia em relação ao controle hiperglicêmico.

Com relação ao conteúdo de glicogênio hepático, todos os triterpenos testados permitiram um aumento significativo, como pode ser observado na Figura 80. HCH18 (7) e HCH70 (10) apresentaram significativa ação com as doses de 0,1 e 10 mg kg<sup>-1</sup>. Com a dose de 0,1 mg kg<sup>-1</sup> observou-se um aumento no conteúdo de glicogênio de aproximadamente 3 e 4 vezes em relação ao controle, respectivamente. HCH25 (8) e HCH115 (11) também permitiram um aumento no conteúdo de glicogênio hepático com as três doses testadas quando comparado com o controle hiperglicêmico não tratado. Não foi observado efeito de dose-dependência entre as doses testadas em cada triterpeno.

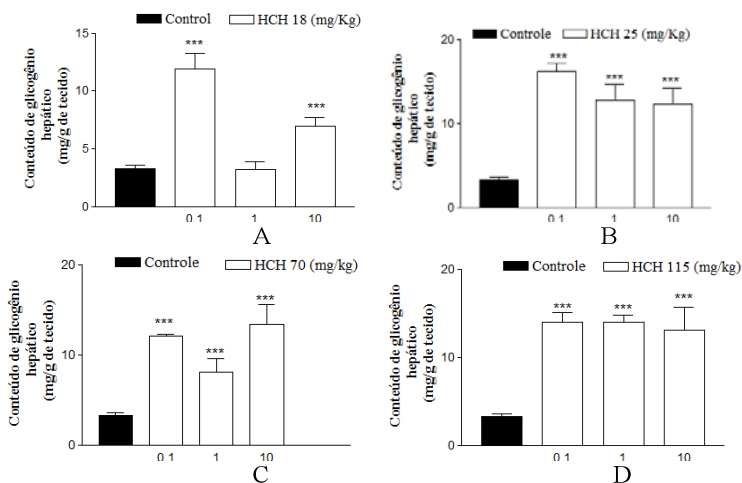
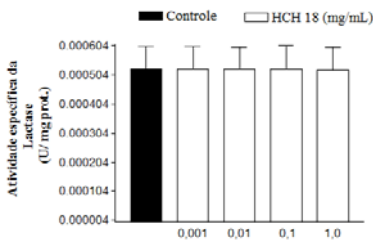


Figura 80: Efeito dos triterpenos HCH18 (7) (A), HCH25 (8) (B), HCH70 (10) (C) e HCH115 (11) (D) no conteúdo de glicogênio hepático. Triterpenos testados nas doses de 0,1; 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup>.

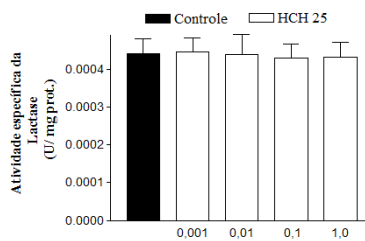
A influência dos triterpenos nas dissacaridasas intestinais maltase, sacarase e lactase foi avaliada a fim de verificar a redução nos níveis glicêmicos de animais hiperglicêmicos, Figura 81. Pode-se observar que os triterpenos HCH18 (7) e HCH115 (11) aumentaram a atividade da maltase na menor concentração testada. Para a lactase observou-se que somente o HCH115 (11) reduziu sua atividade, enquanto que os outros triterpenos testados não apresentaram efeito

algum na inibição da atividade das dissacaridases maltase, lactase e sacarase.

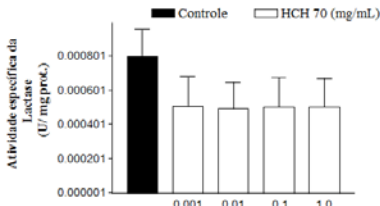
Contudo, é descrito que alguns triterpenos apresentam ação inibitória da atividade das  $\alpha$ -glicosidases, como o Ácido Corosólico mas, em geral, a atividade inibitória dos triterpenos sobre estas enzimas é fraca (HOU et al, 2009), como observado neste trabalho. Os triterpenos analisados não apresentaram influência sobre a disponibilidade de glicose para absorção intestinal, o que é confirmado com a observação de um aumento no conteúdo de glicogênio hepático observado para todos os triterpenos.



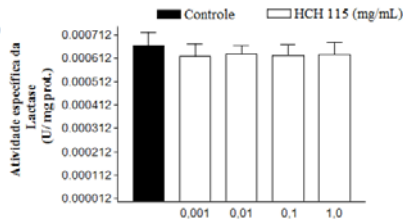
A1



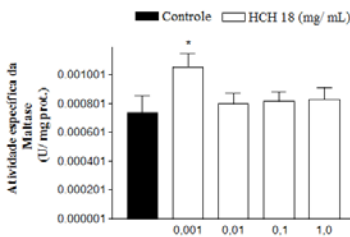
B1



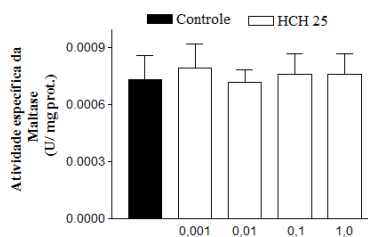
C1



D1



A2



B2

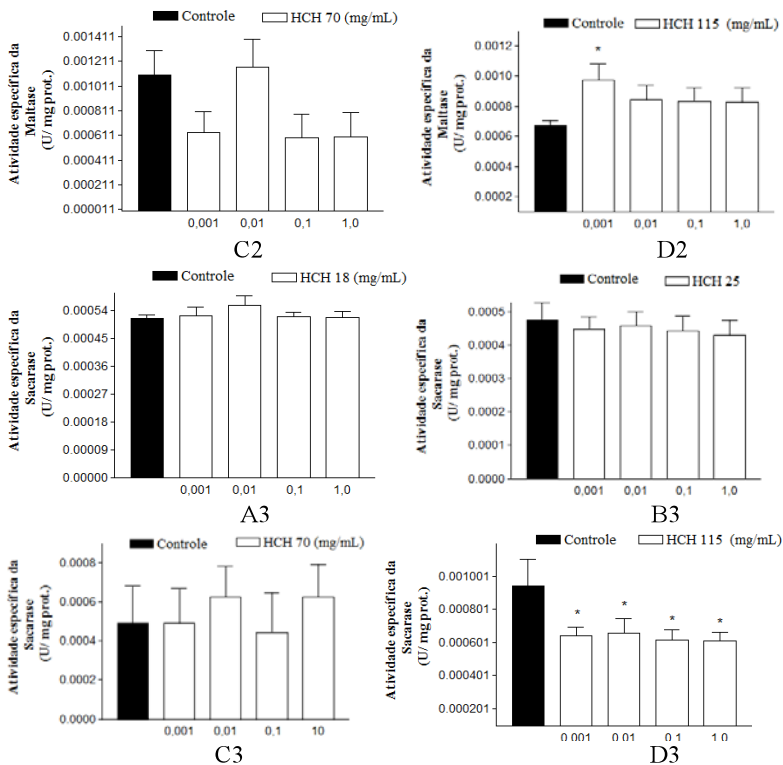


Figura 81: Efeito dos triterpenos HCH18 (7) (A), HCH25 (8) (B), HCH70 (10) (C) e HCH115 (11) (D) nas dissacaridasas intestinais lactase (1), maltase (2) e sacarase (3). Triterpenos testados nas doses de 0,001; 0,01; 0,1 e 10 mg mL<sup>-1</sup>.

A ação modulatória de vários triterpenos na glicemia de animais diabéticos é descrita na literatura (ALARCON-AGUILAR et al, 2005), como o Ácido Ursólico e Oleanólico (PEREZ et al, 1998) Ácido Moroico (RAMÍREZ-ESPINOSA et al, 2011) e o Dimetiletilsigmasteno (ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005). Os mecanismos pelos quais estes compostos regulam os níveis glicêmicos ainda é pouco descrito, contudo, acredita-se que eles podem estar agindo por um mecanismo insulínomimético (GHOSH; MAITY; SINGH, 2011), secretagogo de insulina (SUGIHARA et al, 2000) ou ainda por meio da inibição da atividade de dissacaridasas intestinais, que diminuem a disponibilidade de glicose para ser absorvida.



Neste trabalho verificou-se uma ação antihiperlicemiante aguda com todos os triterpenos testados. Estes efeitos denotam uma ação destes triterpenos na homeostase da glicose e uma potencial ação farmacológica no tratamento de patologias relacionadas com o metabolismo da glicose.

### 5.2.9 Atividade antinociceptiva

Os resultados apresentados nas Figuras 82 e 83, pág. 196, demonstram o efeito dos triterpenos HCH70 (**10**) e HCH115 (**11**) na nocicepção induzida pela administração intraplantar de formalina em camundongos. Pode-se observar que o triterpeno HCH70 (**10**) foi capaz de inibir significativamente e de forma dose-dependente a nocicepção de origem neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase) induzida pela formalina quando comparados ao grupo controle. As inibições observadas para a primeira fase foram de  $44 \pm 7\%$  e  $54 \pm 9\%$  e para a segunda fase  $54 \pm 15\%$  e  $56 \pm 7\%$  nas doses de 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 82 A e B). Comparativamente, o triterpeno HCH115 (**11**) foi menos potente e eficaz, contudo, foi capaz de inibir  $40 \pm 13\%$  a primeira fase na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> e na segunda fase  $55 \pm 14\%$  e  $50 \pm 10\%$  da dor induzida pela formalina nas doses de 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 83 A e B). O triterpeno HCH70 (**10**) nas doses de 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> também foi capaz de reduzir o edema de pata causado pela injeção intraplantar de formalina, com inibições de  $54 \pm 11\%$ ,  $48 \pm 14\%$  e  $71 \pm 10\%$  em relação ao grupo controle, respectivamente (Figura 82 C). Já o triterpeno HCH115 (**11**) nas doses de 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup> reduziu o edema em relação ao grupo controle, com inibições de  $62 \pm 14\%$  e  $51 \pm 4\%$ , respectivamente (Figura 83 C). Os triterpenos não foram capazes de reduzir o aumento da temperatura da pata promovida pela formalina, comparado com o grupo salina (Figuras 82 D e 83 D) e também não promoveram alteração da temperatura corporal, ou seja, efeito hipotérmico inespecífico quando comparado com o grupo controle (Figuras 82 E e 83 E).

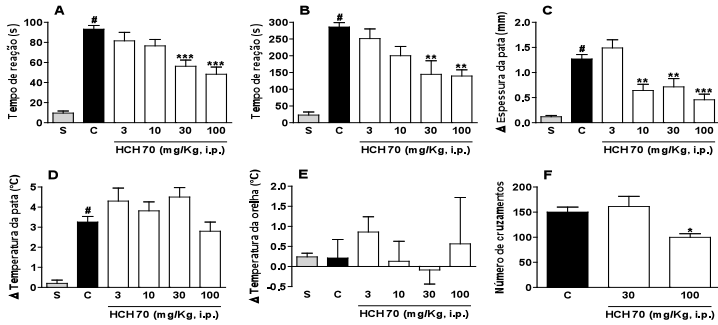


Figura 82: Efeito do triterpeno HCH70 (**10**) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos. A barra cinza-claro do gráfico representa o grupo que recebeu apenas salina na pata (S). Os animais foram tratados com o triterpeno (barras abertas) ou veículo (controle: C, barra fechada), 30 min antes por via intraperitoneal, nas doses indicadas e após este período receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5% e a nocicepção foi avaliada na primeira (A) e segunda fase (B), dor de origem neurogênica e inflamatória, respectivamente. O edema foi avaliado através da mensuração da espessura da pata (C). A hiperemia foi avaliada através da mensuração da temperatura da pata (D). A temperatura corpórea dos animais foi avaliada através da mensuração da temperatura da orelha (E). Efeito do triterpeno HCH70 (**10**) sobre atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto – *Open field* (F). Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os “asteriscos” denotam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) e o “jogo da velha” ( $^{\#}p < 0,001$ ) mostra a diferença estatística do grupo controle em relação ao grupo salina (S) (one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls).

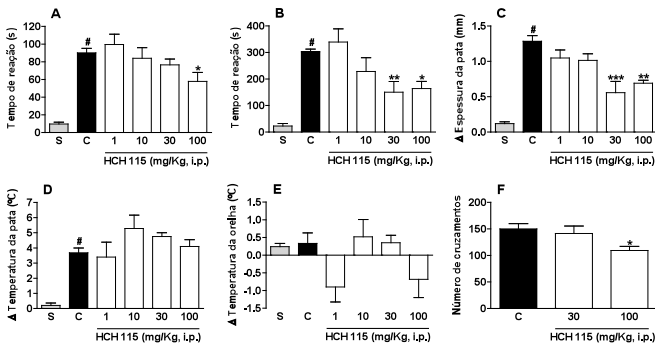


Figura 83: Efeito do triterpeno HCH115 (**11**) na nocicepção induzida pela formalina em camundongos. A barra cinza-claro do gráfico representa o grupo que recebeu apenas salina na pata (S). Os animais foram tratados com o triterpeno (barras abertas) ou veículo (controle: C, barra fechada), 30 min antes por via intraperitoneal, nas doses indicadas e após este período receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5% e a nocicepção foi avaliada na primeira (A) e segunda fase (B), dor de origem neurogênica e inflamatória, respectivamente. O edema foi avaliado através da mensuração da espessura da pata (C). A hiperemia foi avaliada através da mensuração da temperatura da pata (D). A temperatura corpórea dos animais foi avaliada através da mensuração da temperatura da orelha (E). Efeito do triterpeno HCH115 (**11**) sobre atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto – *Open field* (F). Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os “asteriscos” denotam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) e o “jogo da velha” ( $^{\#}p < 0,001$ ) mostra a diferença estatística do grupo controle em relação ao grupo salina (S) (one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls).

No modelo da formalina, a dose responsável por apresentar efeito antinociceptivo e anti-inflamatório para os triterpenos HCH70 (10) e HCH115 (11) foi de 30 mg kg<sup>-1</sup>. Nesta dose, os triterpenos não causaram alteração da atividade locomotora no teste de campo aberto, quando comparado com o grupo controle (Figuras 82 F e 83 F). No entanto, pode-se observar que na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>, os triterpenos HCH70 (10) e HCH115 (11) reduziram de forma significativa a atividade locomotora dos animais em 33 ± 5% e 27 ± 5% quando comparado com o grupo controle, respectivamente (Figuras 82 F e 83 F).

As Figuras 84 e 85 demonstram que o tratamento com os triterpenos HCH70 (10) e HCH115 (11) promoveu a redução do processo inflamatório agudo após a injeção de carragenina. Os resultados mostram que os triterpenos HCH70 (10) e HCH115 (11) reduziram a contagem total de leucócitos, com inibições de 47 ± 10% e 57 ± 7% para a dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 84 A e 85 A) e diferencial de neutrófilos, no exsudato pleural, com inibições de 48 ± 8% e 53 ± 7% (Fig. 84 B e 85 B). Na mesma dose, o tratamento com ambos os triterpenos, não alterou a contagem diferencial de mononucleares, Fig. 84 C e 85 C, porém o triterpeno HCH115 (11), na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> aumentou o número de células mononucleares (Fig. 85 C).

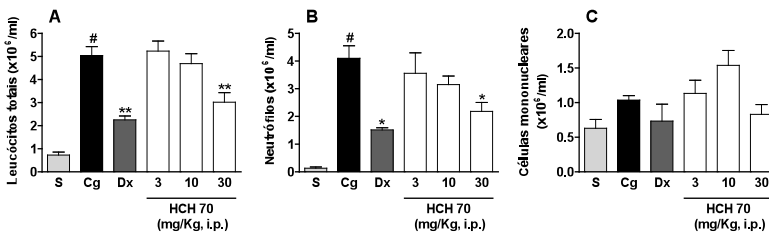


Figura 84: Efeito do triterpeno HCH70 (10) na contagem total de leucócitos (A), contagem diferencial de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. S: representa os animais que receberam uma injeção intrapleural de 0,1 ml de salina (NaCl 0,9%) (barra cinza-claro); Cg: representa o grupo que recebeu injeção intrapleural de carragenina (1%) e que foi tratado com veículo (tween, 5%) usado para diluir o triterpeno HCH70 (10) (barra preta); Dx: representa o grupo que recebeu a injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1%) e que foi tratado com dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) (barra cinza-escuro); as doses de 3 - 30 mg kg<sup>-1</sup>, correspondem aos grupos que receberam a injeção intrapleural de carragenina (1%) e que foram tratados com o triterpeno HCH70 (10) (barras abertas). Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os "asteriscos" denotam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle (\*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001) e o "jogo da velha" (p<0,001) mostra a diferença estatística do grupo controle em relação ao grupo salina (S) (one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls).

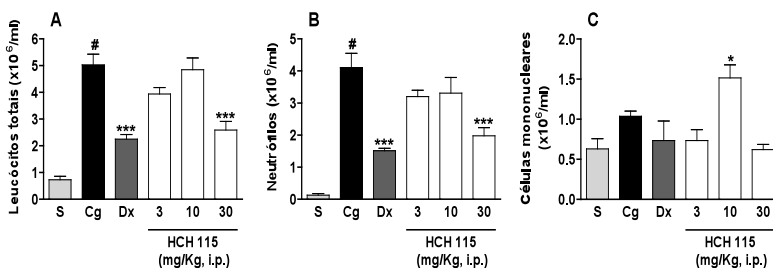


Figura 85: Efeito do triterpeno HCH115 (**11**) na contagem total de leucócitos (A), contagem diferencial de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. S: representa os animais que receberam uma injeção intrapleurial de 0,1 ml de salina (NaCl 0,9%) (barra cinza-claro); Cg: representa o grupo que recebeu uma injeção intrapleurial de carragenina (1 %) e que foi tratado com veículo (tween, 5 %) usado para diluir o triterpeno HCH115 (**11**) (barra preta); Dx: representa o grupo que recebeu a injeção intrapleurial de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foi tratado com dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) (barra cinza-escuro); as doses de 3 - 30 mg kg<sup>-1</sup>, correspondem aos grupos que receberam a injeção intrapleurial de carragenina (1 %) e que foram tratados com o triterpeno HCH115 (**11**) (barras abertas). Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os “asteriscos” denotam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle (\*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001) e o “jogo da velha” (<sup>#</sup>p<0,001) mostra a diferença estatística do grupo controle em relação ao grupo salina (S) (one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls).

As Figuras 86 e 87 apresentam os efeitos dos triterpenos sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 no exsudato pleural de camundongos. Os resultados mostram que os triterpenos HCH70 (**10**) e HCH115 (**11**) reduziram significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumentaram os níveis de IL-10, apresentando o mesmo perfil que a dexametasona, utilizada como controle positivo do experimento (Figs. 86 e 87).

O tratamento com os triterpenos HCH70 (**10**) e HCH115 (**11**) reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  em 95  $\pm$  5% e 89  $\pm$  10% respectivamente, na dose de 3 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; 68  $\pm$  19% e 74  $\pm$  12% respectivamente, na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; 84  $\pm$  8% e 100  $\pm$  0% respectivamente, na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.p., em relação ao grupo controle (Fig. 86 A e 87 A). Os níveis de IL-1 $\beta$  também foram reduzidos no tratamento com HCH70 (**10**) e HCH115 (**11**) em 54  $\pm$  20% e 52  $\pm$  6% respectivamente, na dose de 3 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; 67  $\pm$  8% e 33  $\pm$  3% respectivamente, na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; 81  $\pm$  4% e 98  $\pm$  7% respectivamente, na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.p., em relação ao grupo controle (Fig. 86 B e 87 B). Por fim, os níveis de IL-10 aumentaram no tratamento com os triterpenos HCH70 (**10**) e HCH115 (**11**) em até 5 e 3 vezes na dose de 3 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; 3 vezes e dobrou na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; 3 e 2 vezes, respectivamente, na dose

de 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.p., quando comparados ao grupo controle (Fig. 86 C e 87 C).

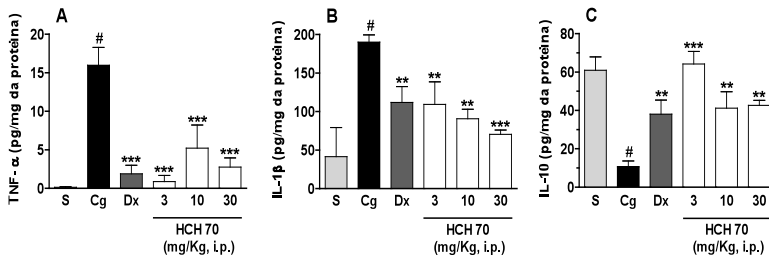


Figura 86: Níveis de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-10 (C) em exsudato pleural de camundongos tratados com o triterpeno HCH70 (**10**) (3, 10 e 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). S: representa os animais que receberam uma injeção intrapleural de 0,1 ml de salina (NaCl 0,9%) (barra cinza-claro); Cg: representa o grupo que recebeu uma injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foi tratado com veículo (tween, 5 %) usado para diluir o triterpeno HCH70 (**10**) (barra preta); Dx: representa o grupo que recebeu a injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foi tratado com dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) (barra cinza-escuro); as doses de 3 - 30 mg kg<sup>-1</sup>, correspondem aos grupos que receberam a injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foram tratados com o triterpeno HCH70 (**10**) (barras abertas). Cada coluna representa a média de 4 - 6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os "asteriscos" denotam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) e o "jogo da velha" ( $\#p < 0,001$ ) mostra a diferença estatística do grupo controle em relação ao grupo salina (S) (one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls).

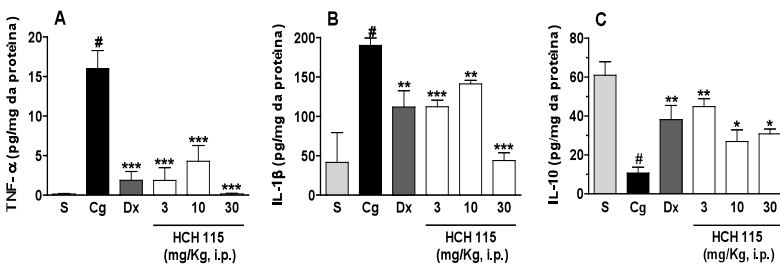


Figura 87: Níveis de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-10 (C) em exsudato pleural de camundongos tratados com o triterpeno HCH115 (**11**) (3, 10 e 30 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). S: representa os animais que receberam uma injeção intrapleural de 0,1 ml de salina (NaCl 0,9%) (barra cinza-claro); Cg: representa o grupo que recebeu uma injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foi tratado com veículo (tween, 5 %) usado para diluir o triterpeno HCH115 (**11**) (barra preta); Dx: representa o grupo que recebeu a injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foi tratado com dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) (barra cinza-escuro); as doses de 3 - 30 mg kg<sup>-1</sup>, correspondem aos grupos que receberam a injeção intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %) e que foram tratados com o triterpeno HCH115 (**11**) (barras abertas). Cada coluna representa a média de 4 - 6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os "asteriscos" denotam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) e o "jogo da velha" ( $\#p < 0,001$ ) mostra a diferença estatística do grupo controle em relação ao grupo salina (S) (one-way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls).

Dos resultados apresentados pode-se assegurar que os triterpenos HCH70 (10) e HCH115 (11) apresentaram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sobre a nocicepção induzida pela formalina em camundongos. A dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> dos triterpenos testados afetou de forma significativa a atividade locomotora dos animais, sugerindo que a dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> é a mais segura para ser utilizada em futuras investigações.

Na inflamação pleural aguda, os triterpenos reduziram a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o local da inflamação, a liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumentaram os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, ambos os triterpenos apresentaram um perfil semelhante ao da dexametasona, utilizada como controle positivo nos experimentos de pleurisia, sugerindo um efeito semelhante aos glicocorticoides.

Em conjunto, estes dados sugerem o papel dos triterpenos analisados sobre o processo inflamatório agudo, para que futuramente possam ser utilizados no tratamento de condições patológicas de origem inflamatória.



## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho realizou-se o estudo fitoquímico das espécies vegetais *Croton antisiphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon, e a avaliação das atividades biológicas dos extratos, frações e compostos isolados. As principais conclusões foram:

### **Em relação ao estudo fitoquímico de *Croton antisiphiliticus* Martius:**

✓ Os flavonoides *O*-glicosilados rutina (1), isoquercitrina (2) e quercitrina (4) e o flavonoide *C*-glicosilado vitexina (3) foram identificados por eletroforese capilar no extrato bruto total (CAEBT) e extrato bruto total aquoso (CATW) de *C. antisiphiliticus*.

✓ O fracionamento cromatográfico de CATW levou ao isolamento de vitexina (3) e ácido quínico (5) como compostos majoritários da fração, e quercetina (6) como um artefato de isolamento devido à hidrólise sofrida durante o processamento do CAEBT e CATW.

### **Em relação ao estudo fitoquímico de *Croton heterodoxus* Baillon:**

✓ Os triterpenos fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7), 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno (8), fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10) e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11) e o esterol  $\beta$ -sitosterol (9) foram isolados da fração hexano dos caules de *C. heterodoxus* (CHCH) através de métodos cromatográficos e identificados através de métodos espectroscópicos.

✓ O triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7) foi relatado pela primeira vez na literatura. Os demais compostos isolados foram relatados pela primeira vez para esta espécie vegetal.

✓ Os triterpenos fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10) e 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11) foram analisados por difração de raios-X, confirmando de maneira inequívoca as estruturas dos compostos. A análise também revelou a presença de duas moléculas do triterpeno fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol na unidade assimétrica, provavelmente ligadas através de interações por ligação de hidrogênio intermolecular com uma molécula de água.

✓ O flavonoide metoxilado pachypodol (12) e a catequina (13), e o flavonoide astragalina (14) foram isolados das frações acetato de etila dos caules (CHCA) e aquosa dos caules (CHCW) de *C. heterodoxus*, respectivamente, por métodos cromatográficos e identificados por métodos espectroscópicos e comparação com a literatura.



✓ A mistura de flavonoides quercetina-canferol (**15**) foi isolada da fração acetato de etila das folhas de *C. heterodoxus* (CHFA) por precipitação e identificados por métodos espectroscópicos e comparação com a literatura. A análise por eletroforese capilar revelou a presença de 257,26 mg L<sup>-1</sup> de quercetina (~83%) para 41,94 mg L<sup>-1</sup> de canferol (~13,5%) na mistura.

### **Em relação ao estudo das atividades biológicas:**

✓ O extrato bruto dos caules de *C. heterodoxus* (CHEBC) e a fração acetato de etila da planta inteira de *C. antisiphiliticus* (CATA) apresentaram o maior conteúdo de compostos fenólicos, sendo os maiores teores de flavonoides observados nas frações acetato de etila de *C. heterodoxus* e no extrato bruto das folhas de *C. antisiphiliticus* (CAEBF).

✓ O extrato bruto total de *C. heterodoxus* (CHEBT) apresentou a maior inibição da peroxidação lipídica (47,27 %). Para *C. antisiphiliticus* as frações acetato de etila da planta inteira (CATA), extrato bruto total (CAEBT), extrato bruto das folhas (CAEBF) e fração hexano das folhas (CAFH) apresentaram 110,77, 66, e 61%, respectivamente, de inibição.

✓ No ensaio do DPPH o extrato bruto do caule de *C. heterodoxus* (CHEBC) e a fração acetato da planta inteira de *C. antisiphiliticus* (CATA) apresentaram os melhores resultados, com CI<sub>50</sub> de 32,55 e 19,81 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

✓ As maiores capacidades redutoras foram apresentadas pelo extrato bruto do caule de *C. heterodoxus* (CHEBC), com 187,47 mg de ácido ascórbico/g de extrato e, fração acetato da planta inteira (CATA) e extrato bruto das folhas de *C. antisiphiliticus* (CAEBF) com 333,77 e 181,30 mg de ácido ascórbico/g de extrato, respectivamente.

✓ A espécie *C. antisiphiliticus* foi a mais ativa nos ensaios antioxidantes.

✓ O flavonoide quercetina (**6**) e a mistura de flavonoides quercetina/canferol (**15**) apresentaram as melhores capacidade de sequestro de radicais DPPH, com CI<sub>50</sub> de 2,74 e 3,86 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes compostos também apresentaram as maiores capacidades redutoras, com 3015,14 e 1295,25 mg de ácido ascórbico/g de composto, respectivamente.

✓ No ensaio de toxicidade sobre *A. salina* a fração hexano das folhas de *C. heterodoxus* (CHFH) foi a mais ativa, com DL<sub>50</sub> de 182,8 µg mL<sup>-1</sup>. Para *C. antisiphiliticus*, a fração hexano do caule (CACH) apresentou DL<sub>50</sub> de 612,4 µg mL<sup>-1</sup>.

✓ Para a espécie *C. heterodoxus*, a fração mais ativa na inibição da AChE foi hexano da planta inteira (CHTH), com  $CI_{50}$  de  $21,54 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para *C. antisiphiliticus* a fração acetato do caule (CACA), com  $CI_{50}$  de  $23,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dos compostos isolados, apenas a quercetina (**6**) apresentou porcentagem de inibição maior que 50%, com  $CI_{50}$  de  $47,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

✓ Os extratos e frações apresentaram atividade antibacteriana em diversos níveis. As frações hexano (CACH) e acetato (CACA) do caule de *C. antisiphiliticus* apresentaram resultados excelentes com CIM de 7,8 e  $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  diante dos microrganismos *S. aureus* e *B. cereus*, respectivamente. As frações hexano das folhas (CHFH) e dos caules (CHCH) de *C. heterodoxus* apresentaram resultados bons, com CIM de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente à *B. cereus*. Os compostos isolados não apresentaram atividade antibacteriana significativa.

✓ Na atividade antifúngica, a fração hexano dos caules de *C. heterodoxus* (CHCH) apresentou 79,8; 77,7 e 96,3% de inibição frente aos fungos *C. neoformans*, *C. gattii* e *P. brasiliensis*, respectivamente. As frações hexano da planta inteira (CATH) e extrato bruto da planta inteira (CAEBT) de *C. antisiphiliticus* apresentaram inibições de 79,4 e 78,7%, respectivamente, frente à *P. brasiliensis*. A fração acetato da planta inteira (CATA) apresentou 74,7% de inibição frente à *C. parapsilosis*. Os compostos HCH18 (**7**) e HFA-M1 (**15**) mostraram-se ativos frente à *P. brasiliensis*, com CIM de 62,5 e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

✓ O extrato bruto total de *C. antisiphiliticus* e a fração hexano das folhas causaram a morte das células de câncer renal TK-10. As demais frações e compostos das duas espécies vegetais apresentaram-se como citostáticos para as linhagens celulares MCF-7 e TK-10.

✓ O EBH, frações e os compostos isolados de *C. antisiphiliticus* inibiram de forma efetiva a migração leucocitária na cavidade pleural inflamada pela carragenina. A fração aquosa, quercetina (**6**) e vitexina (**3**) apresentaram o melhor resultado em inibir esse parâmetro. O ácido quínico (**5**) foi um dos responsáveis pelo efeito antiedematogênico apresentado pela fração aquosa.

✓ Os triterpenos HCH18 (**7**), HCH25 (**8**), HCH70 (**10**) e HCH115(**11**) apresentaram ação antihiperlipemizante aguda, o que denota a ação destes triterpenos na homeostase da glicose e uma potencial ação farmacológica no tratamento de patologias relacionadas com o metabolismo da glicose.

✓ Os triterpenos HCH70 (**10**) e HCH115 (**11**) apresentaram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sobre a nocicepção induzida pela

formalina em camundongos, sendo a dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> a mais segura para ser utilizada em futuras investigações por não afetar de forma significativa a atividade locomotora dos animais. Na inflamação pleural aguda, os triterpenos reduziram a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o local da inflamação, a liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumentaram os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Ambos os triterpenos apresentaram um perfil semelhante a dexametasona, sugerindo um efeito semelhante aos glicocorticoides.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDON, A. P. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. **Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 1215, 2002.**

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. ***Phytotherapy Research***, v. 13, p. 494–497, 1999.

ABOU-DOUH, A. M.; ITO, C.; TOSCANO, R. A.; EL-BAGA, N. Y.; EL-KHRISY, E. E. A.; FURUKAWA, H. Prenylated flavonoids from the root of Egyptian *Tephrosia apollinea* - crystal structure analysis. ***Chemical Sciences***, Egito, v. 4, n. 60, p. 458-470, 2005.

ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/revistaic>>. v. 1, p. 1, 2001.

ADELEKAN, A. M.; PROZESKY, E. A.; HUSSEIN, A. A.; URENA, L. D.; ROOYEN, P. H.; LILES, D. C.; MEYER, J. J. M.; RODRIGUEZ, B. Bioactive diterpenes and other constituents of *Croton steenkampianus*. ***Journal of Natural Products***, v. 71, p. 1919–1922, 2008.

AGETA, H.; AGETA, T. Ericaceous constituents - 17 triterpenoids isolated from the buds of *Rhododendron macrocephalum*. ***Chemical & Pharmaceutical Bulletin***, v. 32, n. 1, p. 369, 1984.

ALARCON-AGUILAR, F. J.; CALZADA-BERMEJO, F.; HERNANDEZ-GALICIA, E.; RUIZ-ANGELES, C.; ROMAN-RAMOS, R. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonorae* root extracts-II. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 97, p. 447–452, 2005.

ALTOMARE, A., BURLA, M. C., CAMALLI, M., CASCARANO, G. L., GIACOVAZZO, C., GUAGLIARDI, A., MOLITERNI, A. G. G., POLIDORI, G.; SPAGNA, R. *SIR97*: a new tool for crystal structure

determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 115, 1999.

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

ANAGNOSTOPOULOU, M.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet Orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n.1, p. 19-25, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 325–348, 2005.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 205-209, 2010.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA JUNIOR, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.

BARBOSA, P. R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; ROQUE, N. F. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 307, 2003.

BARBOSA, P. S.; ABREU, A. S.; BATISTA, E. F.; GUILHON, G. M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; SECCO, R. S. Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 887, 2007.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 633-636, 1999.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 185-191, 2005.

BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822-828, 2007.

BESSON J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BESSON J. M., CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v. 67, p. 67-186, 1987.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 93-99, 2003.

BIGHETTI, E. J. B.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BRITO, A. R. M. S.; J. Anti-inflammatory and Antinociceptive Effects in Rodents of the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 1447, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOTREL, R. T.; RODRIGUES, L. A.; GOMES, L. J.; CARVALHO, D. A.; FONTES, M. A. L. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 143-156, 2006.

BRASIL, 2013. Ministério da saúde. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/doencas-e-tratamentos>>. Acesso em 14 de junho de 2013.

BRASIL, D. S. B.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; 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 Croton palanostigma Klotzsch*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 4, p. 731-739, 2010.

BREITMAIER, E. **Terpenes flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Wiley, 2006. 223 pág.

BRUMMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 89-117, 1993.

CAREY, F. A. **Organic chemistry**, 4 ed. McGraw-Hill, 2000. 1108 p.

CARUZO, M. B. R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no estado de São Paulo, Brasil. *Hoeheia*, v. 34, n. 4, p. 571-585, 2007.

CATALÁN, C. A.; HELUANI, C. S.; KOTOWICZ, C.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry*, v. 64, p. 625, 2003.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica*, v. 64, p. 393-396, 1998.

CLSI. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard**. Second edition, document M27- A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, Pa, USA, 2002.

CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, v. 18, n. 5, p. 460-467, 1995.

COSTA, D. A.; MATIAS, W. N.; LIMA, I. O.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. B. M.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F.; BATISTA, L. M.; SOUZA, M. F. V.; SILVA, D. A. First secondary metabolites from *Herissantia crispa* L(Brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 48-50, 2009.

COUTINHO, L. M.; 2000. Aspectos do Cerrado. Disponível em: < <http://eco.ib.usp.br/cerrado/index.htm> >. Acesso em 26 de setembro de 2011.

CRAGG, G. M. Paclitaxel (Taxol®): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, n. 5, p. 315-331, 1998.

DALAZOANA, K.; SILVA, M. A.; MORO, R. S. Comparação de três fisionomias de campo natural no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, PR. **Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre**, v. 5, supl. 1, p. 675-677, jul. 2007.

DALBÓ, S.; JÜRGENSEN, S.; HORST, H.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 317-323, 2006.

DALBÓ, S.; MOREIRA, E. G.; BRANDÃO, F. C.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; MICKE, G. A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 106, p. 234-241, 2008.

DE PAULA, J. E.; I MAÑA-ENCINAS, J.; SANTANA, O. A.; RIBEIRO, G. S.; IMAÑA, C. R. Levantamento florístico e sua distribuição diamétrica da vegetação de um cerrado *sensu stricto* e de um fragmento de floresta de galeria no ribeirão Dois Irmãos na APA de Cafuringa, DF, Brasil. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 35-46, setembro de 2009.



DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. 2 ed., John Wiley, 2002. 507 p.

DING, L.; WANG, S.; WANG, Z. Studies on chemical constituents from root of *Actinidia macrosperma*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 32, n. 18, p.1893, 2007.

DRAY A. Peripheral Mediators of Pain. In: DICKENSON, A., BESSON, J., -M. **The Pharmacology of Pain**, v. 130/I., Springer: Verlag, Berlin, p. 21-41, 1997.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 527-529, 2001.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, 2006.

FERNANDES, V. C.; PEREIRA, S. I. V.; COPPEDE, J.; MARTINS, J. S.; RIZO, W. F.; BELEBONI, R. O.; MARINS, M.; PEREIRA, P. S.; PEREIRA, A. M. S.; FACHIN, A. L. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1005-1011, 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FOURIE, T. G.; SNYCKERS, F. O. A pentacyclic triterpene with anti-inflammatory and analgesic activity from the roots of *Commiphora merkeri*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 5, p. 1129, 1989.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, 2001.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of ‘açai’ (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1427-1430, 2008.

GAMBOA-ÂNGULO, M. M.; CRISTÓBAL-ALEJO, J.; MEDINA-BAIZABAL, I. L.; CHÍ-ROMERO, F.; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, R.; SIMÁ-POLANCO, P.; MAY-PAT, F. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, México. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p.1955–1959, 2008.

[GHOSH, T.](#); [MAITY, T. K.](#); [SINGH, J.](#) Antihyperglycemic activity of bacosine, a triterpene from *Bacopa monnieri*, in alloxan-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 77, p. 804-808, 2011.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.

GINER, J. L.; DJERASSI, C. A reinvestigation of the biosynthesis of lanosterol in *Euphorbia lathyris*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 333 - 335, 1995.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p.7512-7515,1997.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.4, p. 561-584, 2003.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 58, p. 966-968, 1981.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1997-2000, 2000.

HENRIQUES, M. G. M. O.; ERA, G. A; CORDEIRO, R. S. B.; WILLIAMS, T. J. Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw oedema and

pleurisy in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, n. 3, p. 579-582, 1992.

HIRANO, R.; SASAMOTO, W.; MATSUMOTO, A.; ITAKURA, H.; IGARASHI, O.; KONDO, K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 47, p. 357-362, 2001.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; RODRÍGUEZ, J. A.; HAUN, M.; NUNES, D. S.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 229-234, 2000.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 65, p. 325-330, 1999.

HOEFEL, H. H. K.; LAUTERT, L. Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: responsabilidade da enfermagem. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 08, n. 03, p. 441 - 449, 2006. Disponível em [http://www.fen.ufg.br/revista/revista8\\_3/v8n3a15.htm](http://www.fen.ufg.br/revista/revista8_3/v8n3a15.htm).

HOU, W.; LI, Y.; ZHANG, Q.; WEI, X.; PENG, A.; CHEN, L.; WEI, Y. Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 614-618, 2009.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 28, p. 343-355, 1987.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em 20 de julho de 2013.

JANTZ, M. A.; ANTONY, V. B. Pathophysiology of the pleura. **Respiration**, v. 75, n. 2, p. 121-133, 2008.

JOHANN, S.; CISALPINO, P.S.; WATANABE, G.A.; COTA, B.B.; SIQUEIRA, E.P.; PIZZOLATTI, M.G.; ZANI, C.L.; RESENDE, M.A. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 388-396, 2010.

JOHNSON, T. L.; FORBES, B. A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; McCLATCHEY, K. D. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 83, n. 3, p. 374-378, 1985.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, sep. 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2003.

KAOUADJI, M. Acylated and nonacylated kaempferol monoglycosides from *Platanus acerifolia* buds. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2295, 1990.

KOOPS, A. J.; BAAS, W. J.; GROENEVELD, H. W. The composition of phytosterols, latex triterpenols and wax triterpenoids in the seedling of *Euphorbia lathyris* L. **Plant Science**, v. 74, p. 185-191, 1991.

KOVGANKO, N. V.; KASHKAN, N. Z.; BORISOV, E. V. <sup>13</sup>C NMR Spectra of functionally substituted 3-chloroderivatives of cholesterol and -sitosterol. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 36, n. 6, 2000.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 17-23, 1962.

LAWRENCE T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LENCINA, C.; PIRES, V. S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* Baill. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 89-93, 2001.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez., 2001.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOUSA, D. I. M.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. **Inflammation Research**, v. 56, p. 487, 2007.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 401-416, 2009.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, Seattle, v. 353, p. 1607-1609, may, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, apr. 2008.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 178-184, 2010.

LORTHOLARY, O., DENNING, D. W., DUPONT, B. Endemic mycoses: a treatment update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 321-331, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W. SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199–206, 2005.

MAACK, R. **Geografia física do Paraná**. Curitiba: Secretaria de Cultura e Esporte do Governo do Estado do Paraná, 1968, 450 p.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33–39, 2008.

MACHADO, K. E.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, M. L.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MACHADO, R. B., RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. 2004. **Estimativas de perda da área do cerrado brasileiro**. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 41, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823, 1998.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 205-212, set./dez., 1999.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**. Sabouraudia, v. 117, p. 147-154, 1980.

MARCON, R.; LUIZ, A. P.; WERNER, M. F. P.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; NASCIMENTO, F. P.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyirin octanoate. **Brain Research**, v. 76, p. 1295, 2009.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. Disponível em: < <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm> > Acesso em: 14 de setembro de 2011.

MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L. R.; GONÇALVES, M. J.; VILA, R.; TOMI, F.; ADZET, T.; CUNHA, A. P.; CAÑIGUERAL, S.; CASANOVA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S. Tomé e Príncipe. **Planta Medica**, v. 66, p. 647-650, 2000.

MARTINS, D. F.; ROSA, A. O.; GADOTTI, V. M.; MAZZARDO-MARTINS, L.; NASCIMENTO, F. P.; EGEA, J.; LÓPEZ, M. G.; SANTOS, A. R. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3beta, in mice. **The Journal of Pain**, v. 12, p. 315–322, 2011.

MARTINSEN, A.; BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; ABAD, A.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOREL, N. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. **Vascular Pharmacology**, v. 52, p. 63–69, 2010.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, p. 778-786, 2007.

MATOS, L. M. M. **Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae)**. Mestrado em Ciências (Dissertação). Departamento de Botânica, USP, São Paulo, 2011. 123 p.

MATSUNAGA, S.; MORITA, R. Hopenol-B, a triterpene alcohol from *Euphorbia supina*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 605-606, 1983.

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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19 (1B), p. 207-211, Jan./Mar. 2009.

MELO, M. S.; MATIAS, L. F. 2003. Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná. Projeto financiado pela Fundação Araucária e CNPq. Ponta Grossa: UEPG (relatório final). Disponível em: <<http://www.uepg.br/natural/>>. Acesso em 26 de setembro de 2011.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p.31-34, 1982.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-164, jan. 1999.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 10, p. 2091-2099, 2003.

MOKBEL, M.S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 529-534, 2006.



MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757, 1991.

MOORE, A. R. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 123-8, 2003.

MOORE, A. R.; AYOUB, S. S.; SEED, M. P. Cyclooxygenase enzymes and their products in the carrageenan-induced pleurisy in rats. **Methods in Molecular Biology**, v. 644, p. 201-5, 2010.

MORONEY M. A.; ALCARAZ, M. J.; FORDER, R. A.; CAREY, F.; HOULT, J. R. S. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 11, p. 787-792, 1988.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55, 1983.

MOTA, K. S. L.; PITA, J. C. L. R.; ESTEVAM, E. C.; MEDEIROS, V. M.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F.; DINIZ, M. F. F. M.; SILVA, M. S.; BATISTA, L. M. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 441-446, 2008.

MOTTA, L. B.; FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.;CORDEIRO, I.; SALATINO, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobotryis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, 2011. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-95X2011005000174&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-95X2011005000174&lng=en&nrm=iso) Acesso em 08 de outubro de 2011.

NARDI, G. M.; DALBÓ, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 73–78, 2006.

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

NARDI, G. M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 115–122, 2007.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, p. 1-20, 2012.

NG, L.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of Cigarette Tobacco by Direct Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry (ESI-ITMS) Analysis of the Aqueous Extracts A Novel and Simple Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7251-7257, 2004.

NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds. **Food Chemistry**, v. 106, p. 760-766, 2008.

NUCCI, C.; MAZZARDO-MARTINS, L.; STRAMOSK, J.; BRETHANHA, L. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; MARTINS, D. F. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and

chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 170 –178, 2012.

OLIVEIRA FILHO, E. C.; LIMA, J. E. F. W. **Potencial de impacto da agricultura sobre os recursos hídricos na região do cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. n. 56, 50 p.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. **Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice**. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1471, 2001.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008. Disponível em: <<http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>>.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em 10 de julho de 2013.

OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Sciences**, v. 69, p. 2225, 2001.

PANIAGO, A. M, AGUIAR, J. I, AGUIAR, E. S, DA CUNHA, R. V, PEREIRA, G. R, LONDERO, A. T, WANKE, B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 455-9, 2003.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. FERREIRA; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. An ent-Kaurane-Type

Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, p. 8851-8858, 2012.

PEREIRA, Z. V.; GOMES, C. F.; LOBTCHENKO, G.; GOMES, M. E. S.; SIMÕES, P. D. A.; SARUWATARI, R. P. S.; RIGO, V. F.; CORDEIRO, W. P. Levantamento das plantas medicinais do cerrado *sensu stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. **Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre**, v. 5, supl. 1, p. 249-251, jul. 2007.

PERES, M. T. L. P., PIZZOLATTI, M. G., YUNES, R. A.; MONACHE, F. D. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 171-174, 1998b.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 223-226, 1997.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 209–211, 1998a.

[PEREZ, G. R. M.](#); PEREZ, G. C.; PEREZ, G. S.; ZAVALA, S. M. A. Effect of triterpenoids of *Bouvardia terniflora* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. [Phytomedicine](#), v. 5, p. 475-8, 1998.

PETERSON, D. M. Oat antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p. 115-129, 2001.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, v. 17, p. 1381 – 1390, 2011.

PIETERS, L.; BRUYNE, T.; CLAEYS, A.; VLIETINCK, A.; CALOMME, M.; BERGHE, D. V. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 6, p. 899-906, June 1993.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R.S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90, 2006.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803 – 815, 2007.

RAHMAN, M.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MOLBY, R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

RAMÍREZ-ESPINOSA, J. J.; RIOS, M. Y.; LÓPEZ-MARTINEZ, S.; LÓPEZ-VALLEJO, F.; MEDINA-FRANCO, J. L.; PAOLI, P.; CAMICI, G.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; ORTIZ-ANDRADE, R.; ESTRADA-SOTO, S. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP1B: In vitro, in silico, and in vivo approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2243 -2251, 2011.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; C ÂMARA, C. A. G.; 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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19 (2A), p. 376-381, Abr./Jun. 2009.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RITTER, L. M. O.; MORO, R. S. Similaridade florística entre as disjunções de cerrado na bacia do alto Tibagi, Paraná. **Terra Plural, Ponta Grossa**, v. 1, n. 2, p. 85-98, 2007.

ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj.

(Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 344, 2008.

RODRIGUES, L. A.; CARVALHO, D. A.; GOMES, L. J.; BOTREL, R. T. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias, MG. **Boletim Agropecuário Universidade Federal de Lavras-MG**, n.52, p. 1-34, novembro/2002.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande –Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v.25, n.1, p.102-123, jan./fev., 2001.

ROENGSUMRAN, S.; PATA, P.; RUENGRAWEEWAT, N.; TUMMATORN, J.; PORNPAAKAKUL, S.; SANGVANICH, P.; PUTHONG, S.; PETSOM, A. New cleistanthane diterpenoids and 3,4-*seco*-cleistanthane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2009.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53 -60, 2007.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895–1901, June 2003.

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.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of heophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 811-819, 1996.

SAN GIL, R. A. S.; ALBUQUERQUE, M. G.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C.; GOMES, F. E. S.; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A. M. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR and molecular modeling studies of acetyl

aleuritolic acid obtained from *Croton cajucara* Benth. **Journal of Molecular Structure**, v. 885, p. 82, 2008.

SANTOS, H. S.; BARROS, F. W. A.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; BANDEIRA, P. N.; PESSOA, C.; BRAZ-FILHO, R.; MONTE, F. J. Q.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LEMOS, T. L. G. Cytotoxic diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1884–1887, 2009.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 403-434.

SANTOS, S. A. O.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, M. R. M.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9386–9393, 2011.

SERRA, C. P.; CÔRTEZ, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, p. 424–432, 2005.

SETO, R.; NAKAMURA, H.; NANJO, F.; HARA, Y. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 9, p. 1434-1439, 1997.

SHELDRIK, G. M. A short history of *SHELX*. **Acta Crystallographica A**, v. 64, p. 112, 2008.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 762 – 774, 2011.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 813, 2006.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química nova**, v. 22, n. 1, p. 94, 1999.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, p. 517, 2003.

SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 35-38, 2007.

SLOMP, L.; PEREIRA, P. S.; FRANCA, S. D.; ZINGARETTI, S.; BELEBONI, R. O. *In vitro* nematocidal effects of medicinal plants from Sao Paulo state, Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 3, p. 230 - 235, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr., 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em 15 de julho de 2013.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; M IOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the a- and b-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3377, 2008.



SUÁREZ, A. I.; COMPAGNONE, R. S.; SALAZAR-BOOKAMAN, M. M.; TILLET, S.; DELLE MONACHE, F.; DI GIULIO, C.; BRUGES, G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 11, 2003.

SUGIHARA, Y.; NOJIMA, H.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.; YOSHIKAWA, M.; KIMURA, I. Antihyperglycemic effects of gymnemic acid IV, a compound derived from *Gymnema sylvestre* leaves in streptozotocin-diabetic mice. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 2, n. 4, p. 321-327, 2000.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99-102, 2006.

TAKEDA, A. K.; TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V. Unidades de conservação da região dos Campos Gerais, Paraná. **Publicatio UEPG – Biological and Health Science**, v. 7; n. 1; p. 57-78, 2001.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

THUONG, P. T.; DAO, T. T.; PHAM, T. H. M.; NGUYEN, P. H.; LE, T. V. T.; LEE, K. Y.; OH, W. K. *Croton kinensins* A and B, diterpenoids from the vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 2040-2042, 2009.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test - an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5, 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: DICKENSON A., BESSON J. M. **The Pharmacology of Pain**, v.130/I., Springer-Verlag, Berlin, p. 1-20, 1997.

TRAVASSOS, L. R., TABORDA, C. P., COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, p. 251-62, 2008.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Tropicos.org. <<http://www.tropicos.org/Name/12800955>>. Acesso em 19 de agosto de 2013.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

WALL, P. D. Introduction to the fourth edition. In: WALL P. D., MELZACK R. **Textbook of Pain**, Churchill Livingstone: London. p. 1-8, 1999.

WATERMAN, P.G., MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994, 238p.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, p. 793-823, november, 1993.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WENDT, K. U. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: new pieces of the puzzle. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 3966–3971, 2005.

WENDT, K. U.; SCHULZ, G. E.; COREY, E. J.; LIU, D. R. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, p. 2812-2833, 2000.

WHO. World Health Organization. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. Geneva, World Health Organization, 2000.

WHO. World Health Organization. **National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey.** Geneva, World Health Organization, 2005.

WHO. World Health Organization. **WHO traditional medicine strategy 2002–2005.** Geneva, World Health Organization, 2002.

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

XI, J.; SHOUQIN, Z. Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by high hydrostatic pressure extraction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1350-1356, 2007.

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

YEN, G. C., CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 27-32, 1995.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176-186, 2001.

YUN-CHOI, H.; JIN, J.; HONG, S.; LEE, Y.; LEE, J. Constituents of *Euphorbia milii*. **Natural Product Sciences**, Coréia, v. 4, n. 9, p. 270-272, 2003.

ZARDO, D. M.; DANTAS, A. P.; VANZ, R.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e cap acidade antioxidativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 148-154, 2009.

ZHOU, X.; ZHANG, Y.; LIANG, H.; HUANG, S.; WANG, C.; A, PING, A. Chemical constituents of *Rhododendron lepidotum*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 37, n. 4, p. 483-489, 2012.

ZIMMERNANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, jun. 1983.

ZOU, G. A.; SU, Z. H.; ZHANG, H. W.; WANG, Y.; YANG, J. S.; ZOU, Z. M. Flavonoids from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. **Molecules**, v. 15, p. 1097-1102, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 576-614.

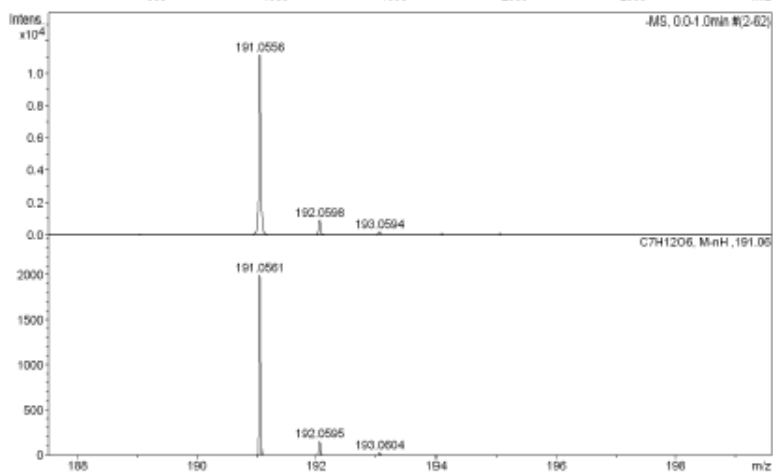
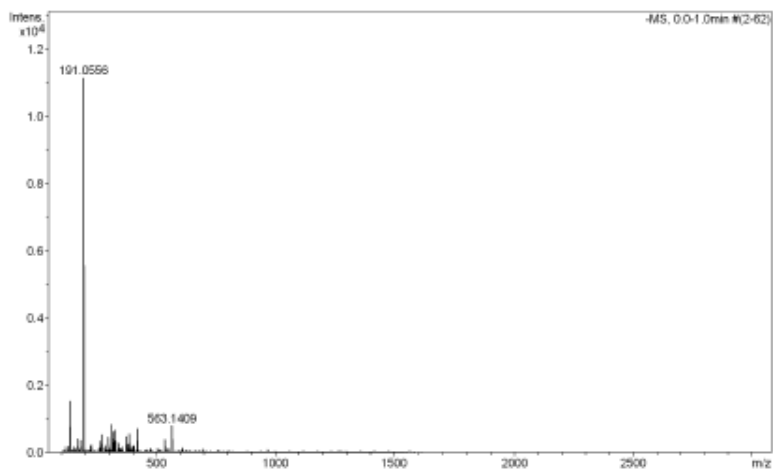


## ANEXOS

- MS01: Mapa de correlação de RMN HMBC da vitexina (3).
- MS02: HRMS do ácido quínico (5).
- MS03: Mapa de correlação RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).
- MS04: Mapa de correlação de RMN HMQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).
- MS05: Mapa de correlação de RMN HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).
- MS06: HRMS do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).
- MS07: Mapa de correlação de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY do 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno (8).
- MS08: Mapa de correlação de RMN HMQC do 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno (8).
- MS09: Mapa de correlação de RMN HMBC do 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)eno (8).
- MS10: Mapa de correlação de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10).
- MS11: Mapa de correlação de RMN HMQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10).
- MS12: Mapa de correlação de RMN HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10).
- MS13: HRMS do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (10).
- MS14: HRMS do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11).
- MS15: Mapa de correlação de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11).
- MS16: Mapa de correlação de RMN HMQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11).
- MS17: Mapa de correlação de RMN HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (11).
- MS18: Mapa de correlação de RMN HMQC do pachypodol (12).
- MS19: Mapa de correlação de RMN HMBC do pachypodol (12).

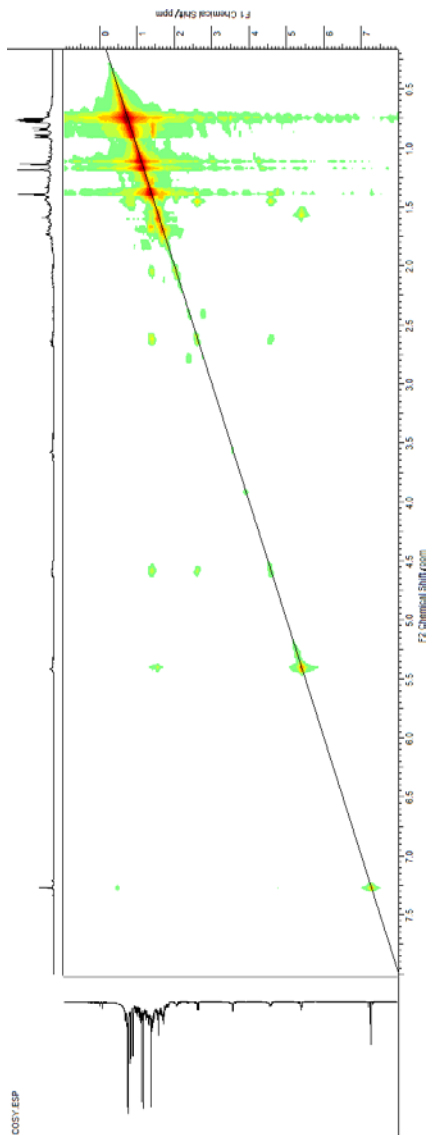


## Generic Display Report (all)

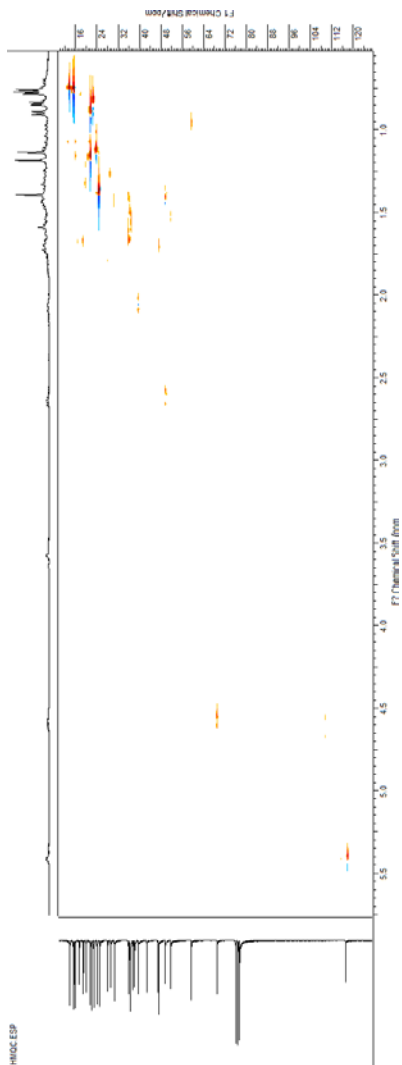


MS02: HRMS do ácido quínico (5).

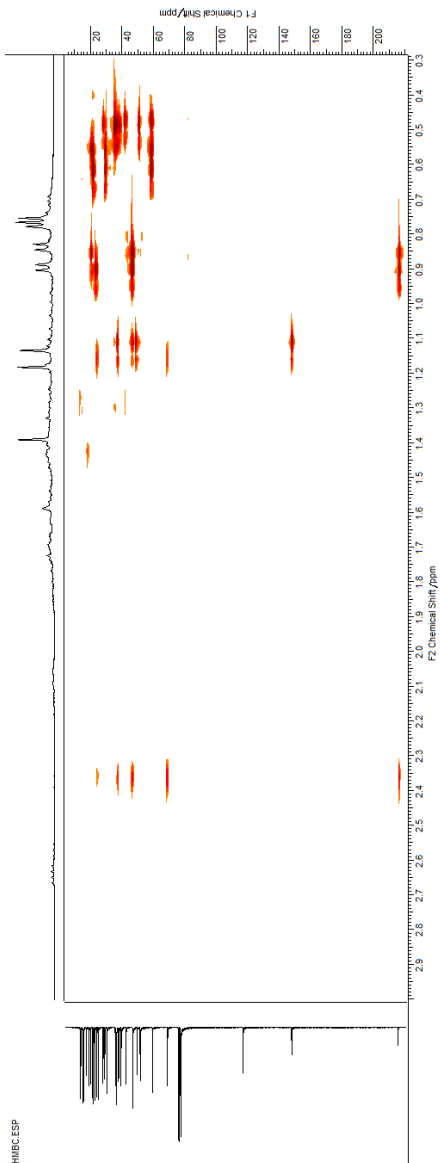




MS03: Mapa de correlação de RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).

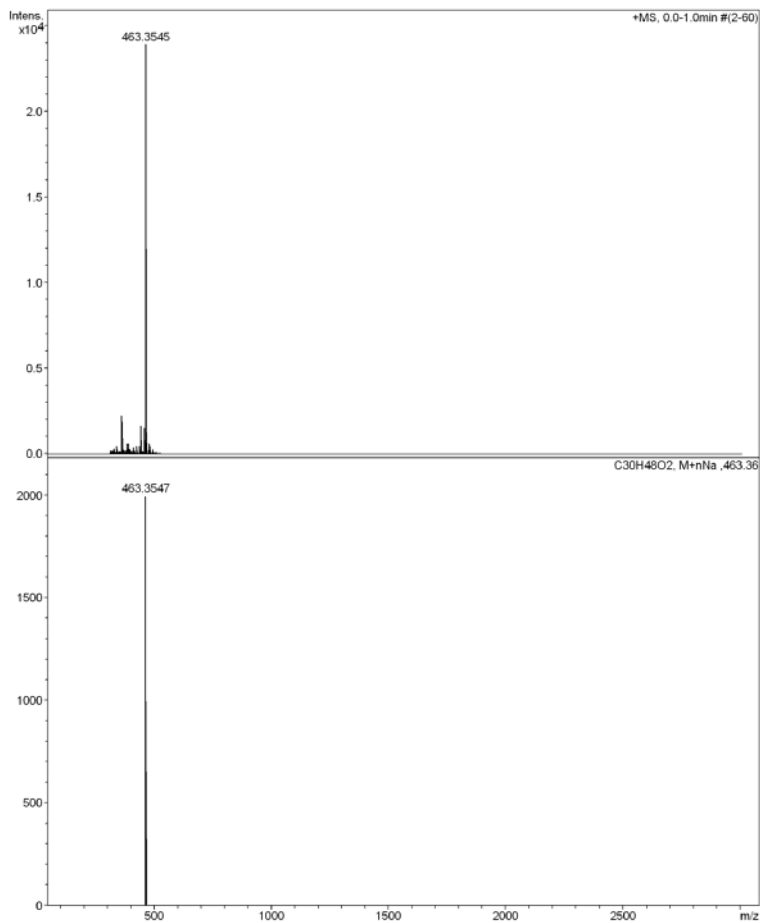


MS04: Mapa de correlação de RMN HMQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).

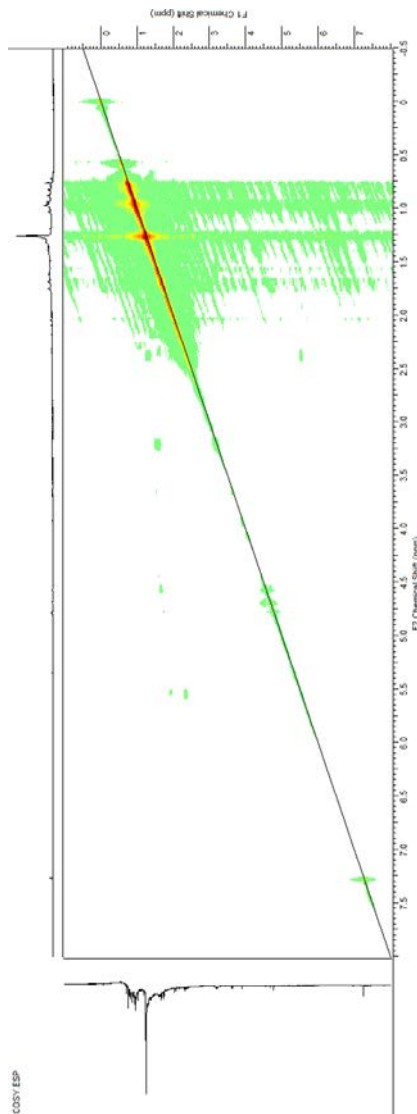


MS05: Mapa de correlação de RMN HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).

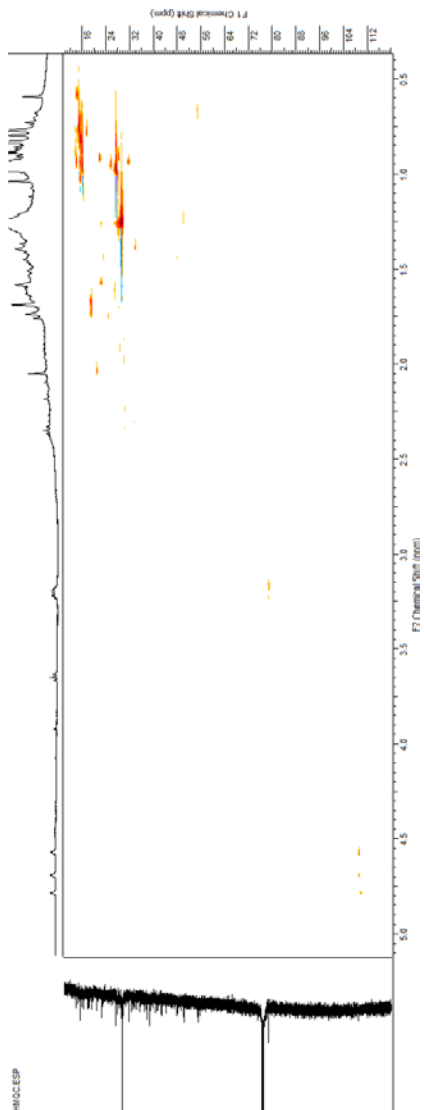
## Generic Display Report (all)



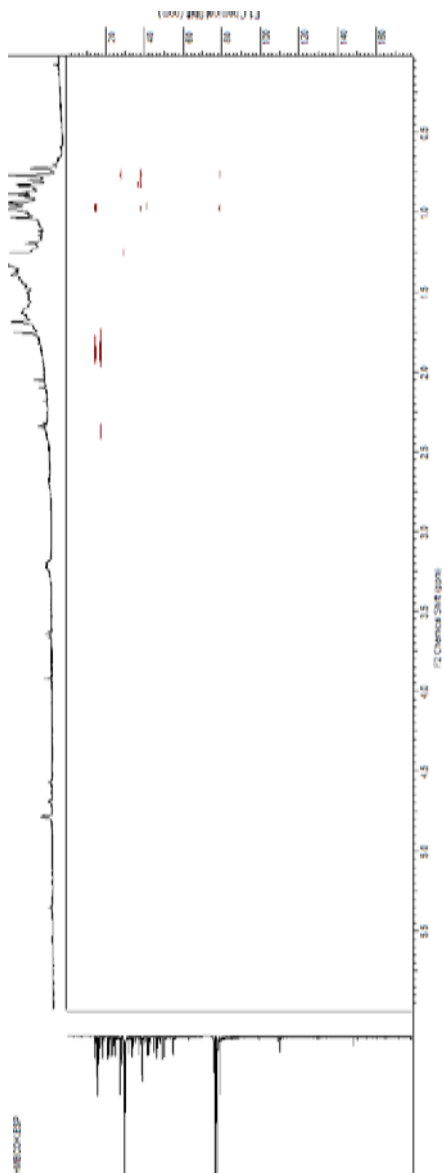
MS06: HRMS do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ -ol-3-oxo (7).



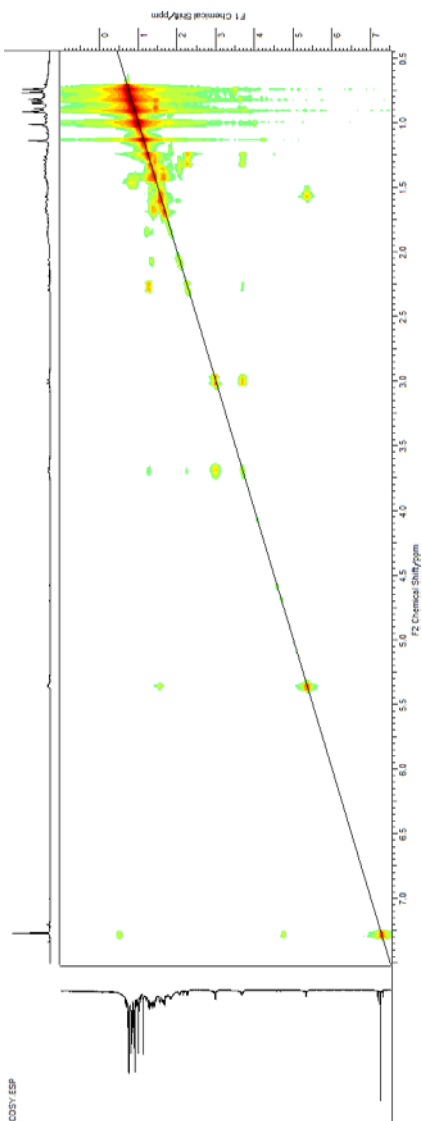
MS07: Mapa de correlação de RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY do 3β-hidroxi-hop-22(29)eno (**8**).



MS08: Mapa de correlação de RMN HMQC do 3 $\beta$ -hidroxihip-22(29)eno (**8**).

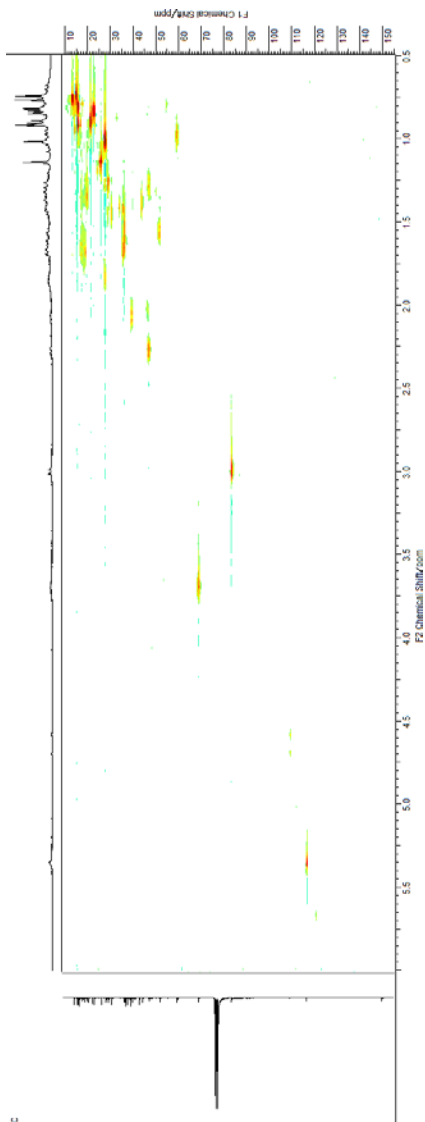


MS09: Mapa de correlação de RMN HMBC do 3β-hidroxi-hop-22(29)eno (**8**).

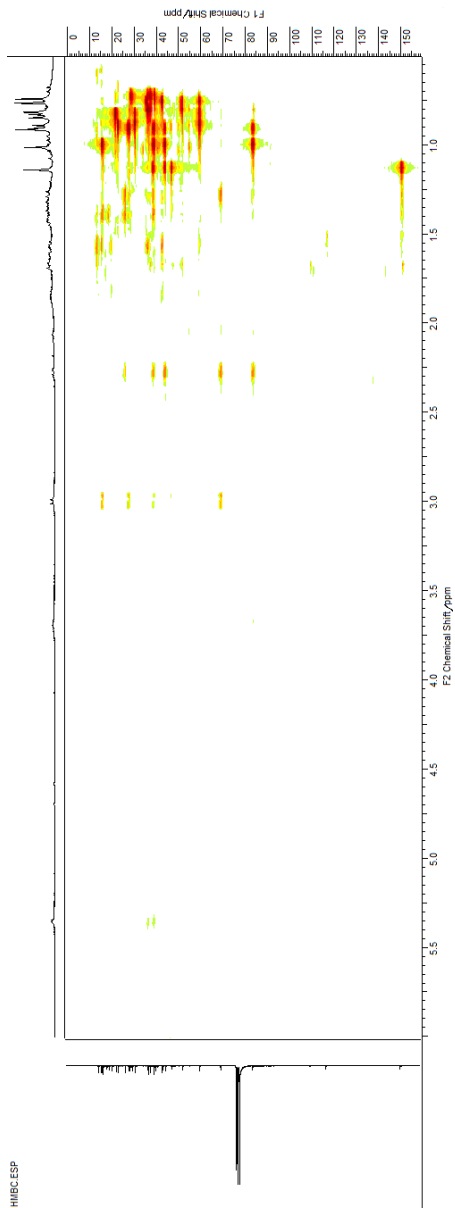


MS10: Mapa de correlação de RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**10**).



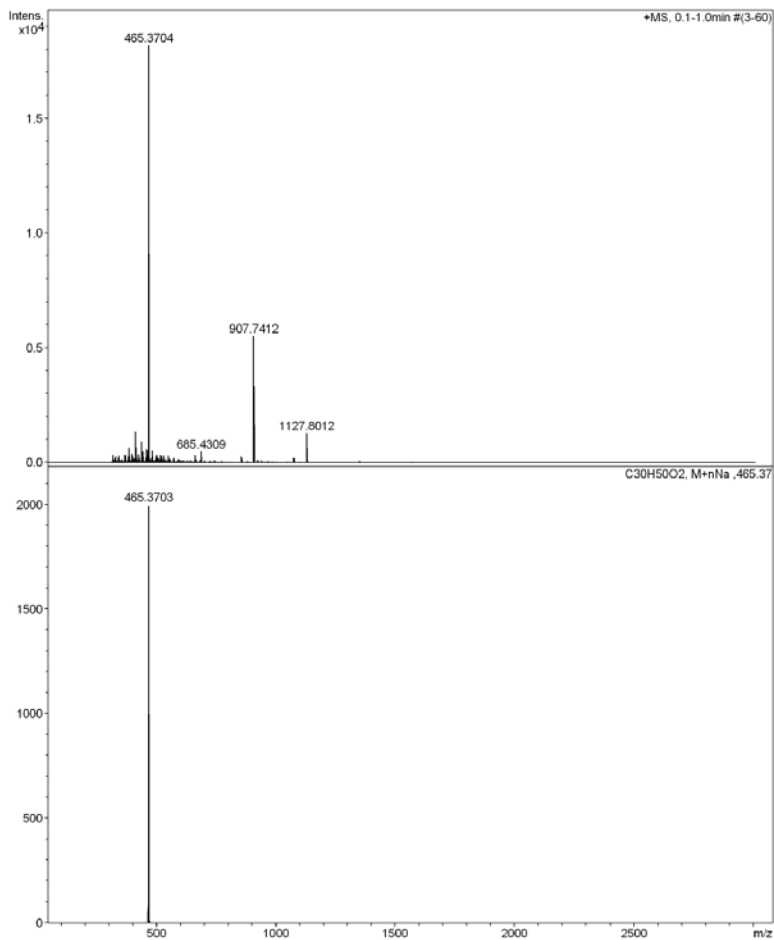


MS11: Mapa de correlação de RMN HMQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**10**).



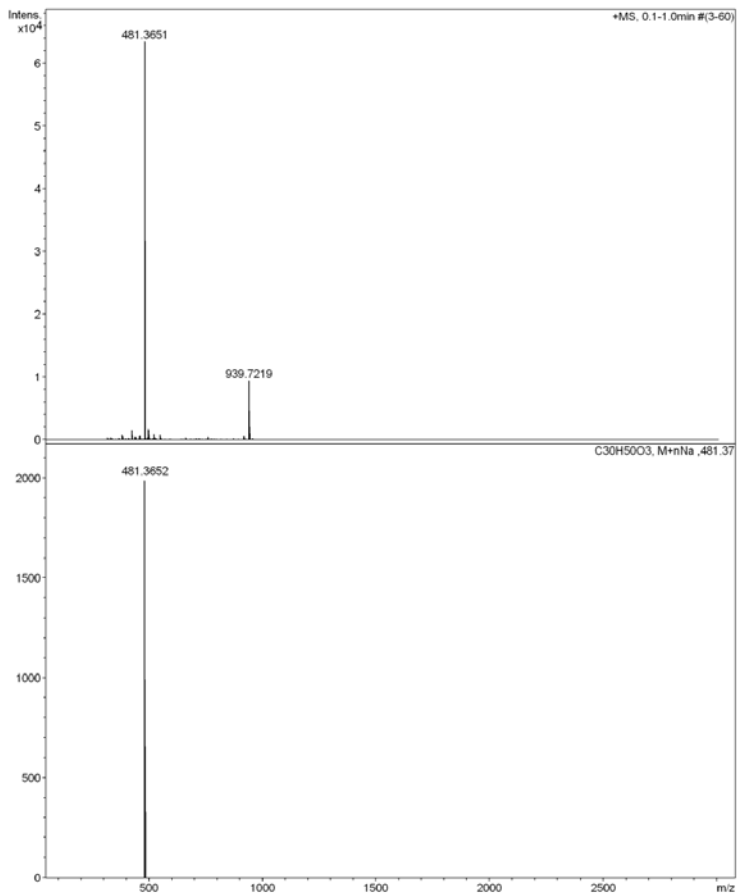
MS12: Mapa de correlação de RMN HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**10**).

## Generic Display Report (all)

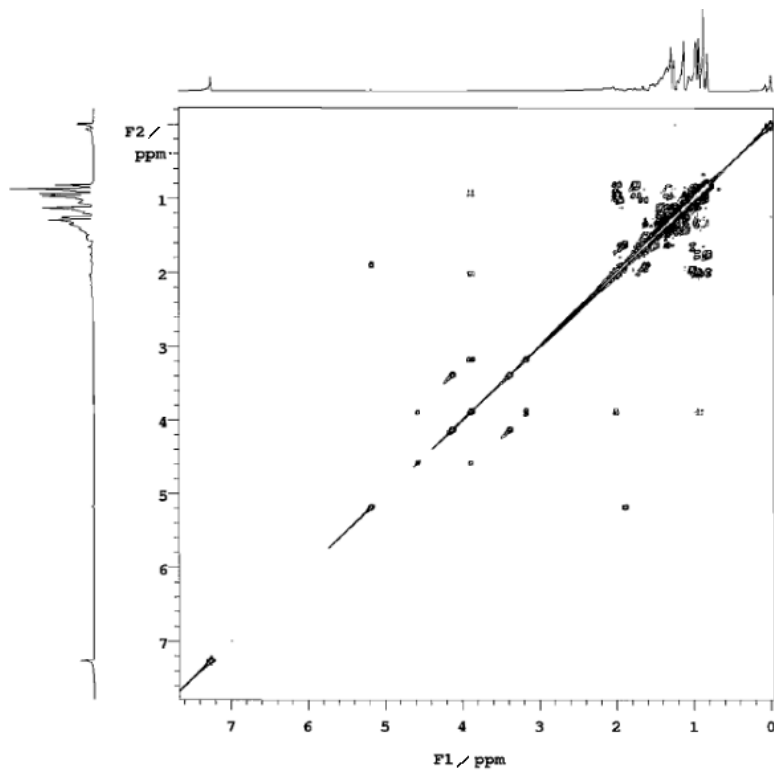


MS13: HRMS do fern-9(11)-eno-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (**10**).

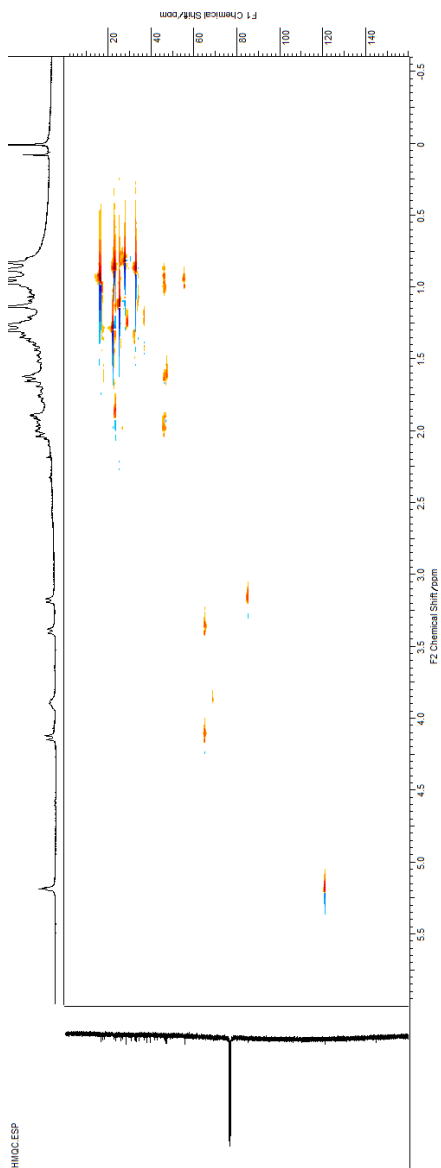
## Generic Display Report (all)



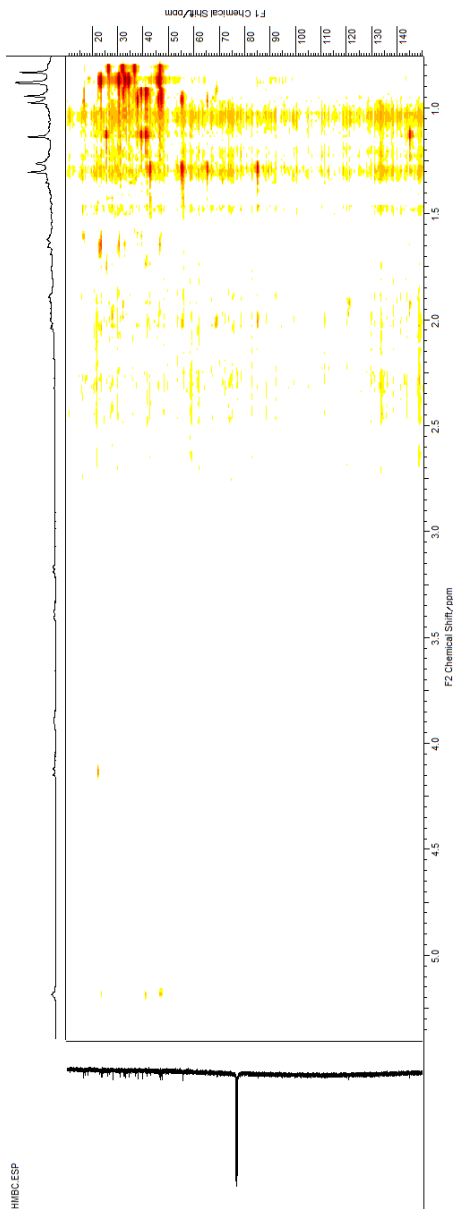
MS14: HRMS do  $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroiolean-12-eno (**11**).



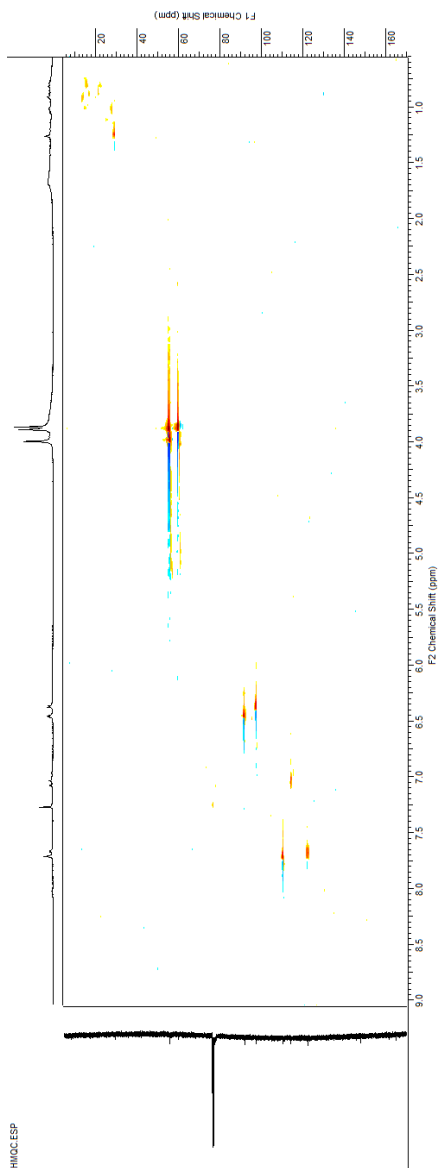
MS15: Mapa de correlação de RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroiolean-12-eno (**11**).



MS16: Mapa de correlação de RMN HMQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroxiolean-12-eno (**11**).

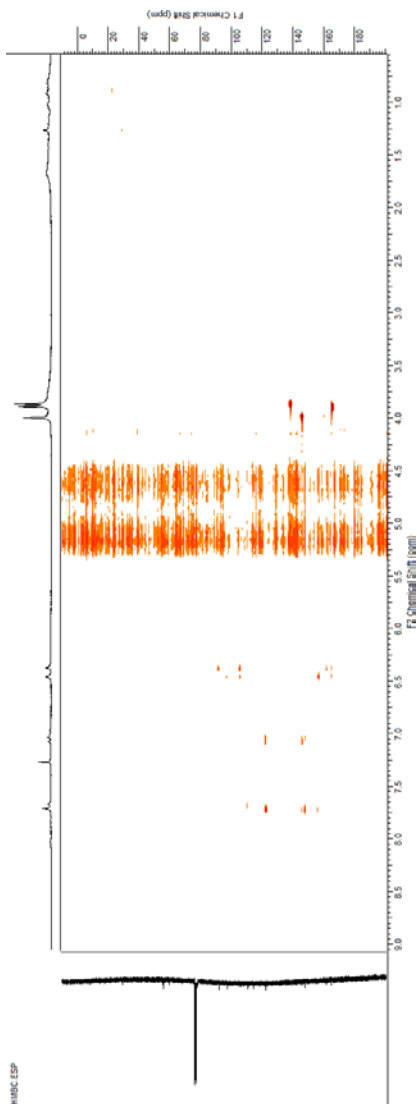


MS17: Mapa de correlação de RMN HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihidroiolean-12-eno (**11**).



MS18: Mapa de correlação de RMN HMQC do pachypodol (12).





MS19: Mapa de correlação de RMN HMBC do pachypodol (12).