

HEROS HORST

ANÁLISE QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS CONSTITUINTES
FENÓLICOS DE *Croton celtidifolius* baill

UFSC
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HEROS HORST

ANÁLISE QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS CONSTITUINTES
FENÓLICOS DE *Croton celtidifolius* baill

Florianópolis – SC

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANÁLISE QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS CONSTITUINTES
FENÓLICOS DE *Croton celtidifolius* baill

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis – SC
2008

Heros Horst

ANÁLISE QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS CONSTITUINTES
FENÓLICOS DE *Croton celtidifolius* baill

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Ademir Neves

(Coordenador de Curso de Pós-Graduação em Química)

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
(Orientador)

Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Dedico este trabalho a minha
esposa Marlete e minha filha
Bárbara, razões de minha
existência

AGRADECIMENTOS

Em meio às várias pessoas e instituições que me ajudaram no decorrer destes dois anos gostaria de agradecer, em especial:

Ao meu orientador, o Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, a dedicação, apoio e por acreditar, desde o início.

A professora Dra. Inês Brighente, a sua participação em nosso grupo de pesquisa, e especialmente as suas sugestões no trabalho.

Aos professores, Dr. Antônio Carlos Joussef, Dr. Gustavo Amadeu Micke e Dr. Miguel Soriano Balparda Caro, membros da banca examinadora, pelas contribuições sugeridas no trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química, por todo aprendizado adquirido durante o mestrado.

Aos funcionários da Central de Análises pela realização das análises.

A professora Dr. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e a aluna de doutorado Silvia Dal Bó pela execução de alguns dos experimentos.

Ao professor Dr. Gustavo Amadeu Micke pelas análises de eletroforese.

Aos meus irmãos Henri e Heron a compreensão e força que me deram nos momentos mais difíceis.

A minha esposa Marlete pela paciência, carinho e amor dedicados nestes anos.

Finalmente, a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao suporte financeiro.

Aos colegas do laboratório pela paciência, ajuda e compreensão no decorrer destes dois anos.

Heros

A vida nos reserva grandes surpresas

RESUMO

ANÁLISE QUÍMICA E BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Croton celtidifolius* baill

O *Croton celtidifolius* é conhecido popularmente como sangue-de-ádvave e usado na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias, úlcera, cicatrizante e reumatismo. Os principais metabólitos secundários encontrados na espécie *Croton celtidifolius* são compostos fenólicos, os quais são responsáveis por várias atividades biológicas, como a atividade antioxidante e antinociceptiva. Este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química, fracionar e isolar compostos com atividade antioxidante, antinociceptiva e vasorelaxante. O extrato etanólico de *Croton celtidifolius* foi primeiramente fracionado pela técnica de extração líquido-sólido, originando as frações clorofórmio (Fr.-CHCl₃), acetato de etila (Fr.-AcOEt), acetona (Fr.-acet) e resíduo (Res.). As frações Fr.-AcOEt, Fr.-acet e Res. apresentaram alto rendimento, sendo, então, submetidos ao procedimento específico para isolamento de compostos fenólicos, originando as Fr. AcOEt tratada e Fr. Acetona tratada. A fração Fr. AcOEt tratada resultante do procedimento foi rotulada como fração rica em proantocianidinas (FRP) foi cromatografada em coluna flash, gerando 41 frações, das quais se isolou 3 compostos (A-C) e uma mistura de polímeros (D). As frações foram avaliadas quanto sua composição química, foram analisadas por cromatografia em camada delgada e foram reunidas conforme semelhança do perfil cromatográfico. A FRP foi analisada qualitativamente em eletroforese capilar e ficou evidente a composição de dois compostos majoritários e compostos de característica polimérica. Os compostos isolados foram identificados por técnicas espectroscópicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, tendo sido identificados 3 compostos: catequina (A), galocatequina (B) e catequina-(4 α -8)-epicatequina (C). Não foi possível identificar a fração D, utilizando as técnicas usuais, embora tenha sido possível verificar que este é uma mistura de proantocianidinas poliméricas. Os teores de compostos fenólicos totais, de proantocianidinas totais e de flavonóides, testados para as frações, variaram de 257,75 a 473,82 mg /g, 3,45 a 75,65 % e de 2,06 a 7,79 mg/g, respectivamente. Com relação ao potencial antioxidante, a maior atividade de seqüestro de radical livre DPPH foi encontrada para catequina isolada por cromatografia flash da FRP. Além disso, a FRP apresentou excelente atividade antinociceptiva em animais, causando inibição de 83% e 99,5%, na primeira e da segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, respectivamente. A FRP (100 e 300 mg/kg, i.p.) também aumentou de maneira significativa a latência dos animais quando avaliados no teste da placa quente, idêntico aos animais tratados com morfina (10 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes, causou marcado efeito antinociceptivo neste teste. O resultado adquirido no teste do efeito vaso relaxante demonstra que a FRP promove efeito interessante de modo dose dependente para o endotélio no modelo de aorta isolada de ratos. Os resultados obtidos demonstram que a espécie *Croton celtidifolius* é uma boa fonte de compostos bioativos, dentre os quais se encontram flavan-3-ol, que possuem atividade antioxidante.

Palavras-chave: Flavonóides, Atividade antioxidante, Proantocianidinas

ABSTRACT

BIOLOGICAL AND CHEMICAL ANALYSIS OF COMPOUND IN FENÓLICOS *Croton celtidifolius* baill

The *Croton celtidifolius* is popularly known as “sangre-de-ádvave” and used in popular medicine in the treatment of inflammatory diseases, ulcers, rheumatism and healing. The main secondary metabolites found in the *Croton celtidifolius* species are phenolic compounds, which are responsible for various biological activities, such as antioxidant activity and antinociceptive. This study aimed to evaluate the chemical composition, fractionation and isolate compounds with antioxidant activity, antinociceptive and vasorelaxant. The ethanolic extract of *Croton celtidifolius* was first fractionated by the technique of solid-liquid extraction, causing the fractions chloroform (Fr.-CHCl₃), ethyl acetate (Fr.-AcOEt), acetone (Fr.-acet) and residue (Res). The fractions Fr.-AcOEt, Fr.-acet and Res had high incomes, and then submitted to the procedure for isolation of phenolic compounds, causing the treated Fr. AcOEt and treated Fr. Acetone. The fraction Fr. AcOEt treated resulting from the procedure was labeled fraction rich in proanthocyanidins (FRP) and chromatographed in flash column, generating 41 fractions, of which 3 were isolated compounds (AC) in a mixture of polymers (D). The fractions were evaluated regarding their chemical composition, were analyzed by thin layer chromatography, and were met as similarity of the chromatographic profile. The FRP was analyzed qualitatively in capillary electrophoresis was evident in the composition of two major compounds and compounds with behavior of polymers. The isolated compounds were identified by technical spectroscopies of infrared and nuclear magnetic resonance of ¹H and ¹³C, and was identified compounds 3: catechin (A), gallocatechin (B) and catechin-(4 α -8) - epicatechin (C). Unable to identify the sample D, using the usual techniques, but has been unable to verify that this is a mixture of proanthocyanidins polymer. The levels of total phenolic compounds, total proanthocyanidins and flavonoids, tested for the fractions, ranged from 257.75 to 473.82 mg / g, 3.45% to 75.65% and 2.06 to 7.79 mg / g, respectively. The study radical scavenging on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), increased activity of scavenging of DPPH free radical was found to catechin isolated by flash chromatography of FRP. Moreover, the FRP showed excellent antinociceptive activity in animals, causing inhibition of 83% and 99.5%, the first and second phase of nociception induced by formalin, respectively. The FRP (100 and 300 mg / kg, ip) also increased in a meaningful way the latency of the animals when evaluated in the test of the hot plate, similar to animals treated with morphine (10 mg / kg, ip), 30 minutes before, caused marked antinociceptive effect this test. The result acquired in the test of the effect vase vasorelaxant shows that the FRP promotes interesting effect on endothelium-dependent concentration in the model of isolated aorta of rats. The results show that the species *Croton celtidifolius* is a good source of bioactive compounds, of which there are flavan-3-ol, which have antioxidant activity.

Keywords: Flavanols, Antioxidant Activity, Proanthocyanidins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cardiotônicos de <i>Digitalis</i>	10
Figura 2: Substâncias de origem natural.....	11
Figura 3: Compostos isolados de <i>Croton celtidifolius</i>	18
Figura 4: Reação do teste antioxidante pelo método ABTS (Marc et al., 2004).....	21
Figura 5: Biossíntese dos fenóis (UNL, 2007).....	23
Figura 6: Variedades de flavonóides;.....	24
Figura 7: Cromatografia em camada delgada dos compostos isolados da coluna flash.....	31
Figura 8: Método de obtenção de proantocianidinas.....	32
Figura 9: Curva de calibração com ácido gálico para o teste de avaliação de fenólicos totais.....	33
Figura 10: Curva padrão em quercetina.....	34
Figura 11: Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.....	34
Figura 12: Degradação de proantocianidinas em hidrólise ácida (Santos, 2003).....	35
Figura 13: Curva de calibração (padrão) para quantificar proantocianidinas em comprimento de onda $\lambda = 551 \text{ nm}$	36
Figura 14: Obtenção da IC_{50} para FRP de <i>C. celtidifolius</i>	37
Figura 15: Espectro de IV, em pastilha de KBr, da catequina (A).	44
Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C (acetona d_6) da catequina.	46
Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (acetona d_6) da catequina.....	46
Figura 18: Estrutura do flavan-3-ol catequina.....	47
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (acetona d_6) da galocatequina.....	49
Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C (acetona d_6) da galocatequina.	49
Figura 21: Estrutura do flavan-3-ol galocatequina.....	50
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD) da procianidina B_4 catequina-(4α -8)-epicatequina.....	52
Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OH)da procianidina B_4 (catequina-(4α -8)-epicatequina).....	52
Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C /DEPT (CD_3OD) da catequina-(4α -8)- epicatequina.....	53
Figura 25: Estrutura da procianidina B-4 catequina-(4α -8)-epicatequina.....	53
Figura 26: Eletroferograma da FRP.	55

Figura 27: Espectro de absorção na região UV-Vis da Fr. AcOEt.....	57
Figura 28: Decomposição catalisada por ácido de uma procianidina B-4.	58
Figura 29: Reação do radical livre representado pelo DPPH com fenol (ROH).	60
Figura 30: Efeito antinociceptivo causado pela FRP induzida pela injeção de formalina 2,5% em camundongos.....	62
Figura 31: Efeito antinociceptivo da FRP e morfina, pelo teste da placa quente em camundongos.....	62
Figura 32: Curva concentração-resposta de FRP induzida vasodilatação em aorta isolada.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa dos compostos isolados por cromatografia flash;	31
Tabela 2: Dados para o preparo das curvas de calibração para hidrólise de proantocianidina.....	36
Tabela 3: Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para catequina.....	47
Tabela 4: Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para galocatequina.....	50
Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para procianidina B-4.	54
Tabela 6: Teor de proantocianidinas totais nas frações de <i>C. celtidifolius</i>	57
Tabela 7: Teor de fenólico totais e flavonóides das frações de <i>C. celtidifolius</i>	59
Tabela 8: Avaliação da captura de radicais livres DPPH	61

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
PF	Ponto de fusão
IV	Espectrometria no Infravermelho
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
DMSO	Dimetilsulfóxido
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
MHz	Mega Hertz
Hz	Hertz
ppm	partes por milhão
AcOEt	Acetato de etila
n-BuOH	n-butanol
Fr.	fração
CCD	Cromatografia em camada delgada
EL	Eletroforese
R _f	índice de retenção
FRP	fração rica em proantocianidinas
E.P.M.	erro padrão da média
i.p.	intraplantar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. ASPECTOS GERAIS.....	10
1.2. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE NOVOS COMPOSTOS	16
1.3. <i>Croton celtidifolius</i> BAIL.....	16
1.4. TESTES BIOLÓGICOS	18
1.4.1. DOR.....	19
1.4.2. PRESSÃO ARTERIAL	20
1.4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	20
1.5. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. EQUIPAMENTOS.....	28
3.1.1. PONTO DE FUSÃO	28
3.1.2. ELETROFORESE CAPILAR.....	28
3.1.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	28
3.1.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	28
3.1.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA.....	28
3.2. MATERIAL VEGETAL	29
3.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E FRACIONAMENTOS.....	29
3.4. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS A, B, C e FRAÇÃO D A PARTIR DAS CASCAS DE <i>C. celtidifolius</i>	30
3.5. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO ETANÓLICO E NAS FRAÇÕES DE <i>C. celtidifolius</i>	33
3.6. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS.....	33
3.7. ANÁLISE DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO DA SOLVÓLISE	34
3.8. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQÜESTRO DO RADICAL LIVRE 2,2'-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH)	36
3.9. ENSAIOS BIOLÓGICOS	38
3.9.1. ANIMAIS	38
3.9.2. DROGAS E REAGENTES	38

3.9.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	39
3.9.3.1. TESTE DA FORMALINA	39
3.9.3.2. TESTE DA PLACA QUENTE	40
3.9.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO VASO RELAXANTE	41
3.9.4.1. ANIMAIS.....	41
3.9.4.2. AORTA ISOLADA DE RATOS.....	41
4. Resultados e discussão	42
4.1. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Croton celtidifolius</i>	43
4.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FRAÇÕES POR COLUNA FLASH E CCD.....	43
4.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	44
4.3.1 COMPOSTO A.....	44
4.3.2. COMPOSTO B	48
4.3.3. COMPOSTO C.....	51
4.3.4. FRAÇÃO D.....	54
4.3.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR.....	55
4.3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS POR ANÁLISE COLORIMÉTRICA PELO MÉTODO DA BUTANÓLISE	56
4.3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH	60
4.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS	61
4.4.1. TESTE DA FORMALINA.....	61
4.4.2. TESTE DA PLACA QUENTE	62
4.4.3. EFEITO VASORELAXANTE	63
5. CONCLUSÕES	64
6. bibliografia	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapêuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos como, por exemplo, os cardiotônicos obtidos da *Digitalis* (figura 1) usados para insuficiência cardíaca. Como emprego medicinal poder-se-ia citar centenas de exemplos, porém alguns são clássicos como é o caso da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), vulgarmente conhecida por papoula, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina (figura 2) - isolada por Setürner - princípio ativo empregado para combater a dor desde 1803. Passado mais de um século isolou-se desta mesma planta a codeína (figura 2) e mais tarde a papaverina (figura 2). Índícios arqueológicos indicam seu uso há 4000 anos a.C. Estas plantas também têm uma longa história, pois egípcios e romanos já faziam uso delas pelas propriedades diuréticas e tóxicas. Foi durante a antiguidade Egípcia, Grega e Romana que se acumularam conhecimentos empíricos transmitidos, principalmente pelos árabes, aos herdeiros destas civilizações. Isto prova que, desde as mais antigas civilizações, as plantas são utilizadas como fitoterápicos (Foglio et al 2006).

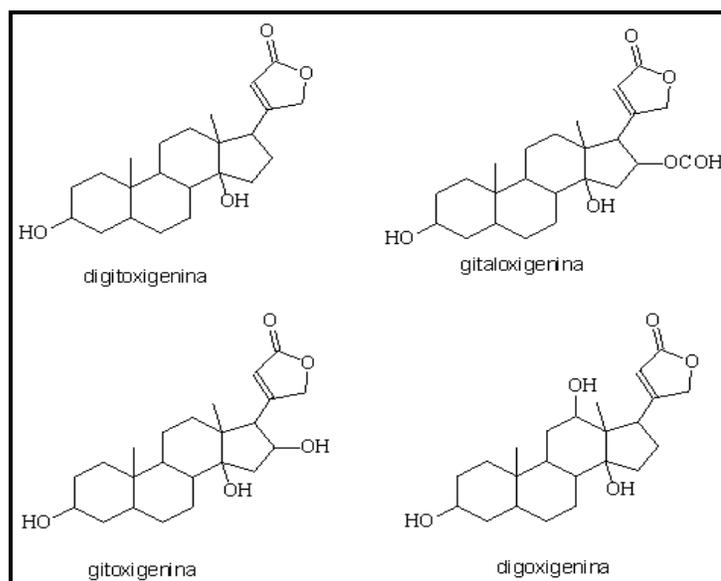


Figura 1: Cardiostimulantes de *Digitalis*

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação

farmacológica. As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese. Tradicionalmente as plantas têm sido usadas no tratamento de várias doenças. Sua aplicação abrange desde o combate ao câncer até os microrganismos patogênicos (Calixto, 2000). Além disso, as plantas têm contribuído para a obtenção de vários fármacos, utilizados até hoje em clínicas, como a vincristina e a rutina (figura 2) (Cechinel e Yunes 1998).

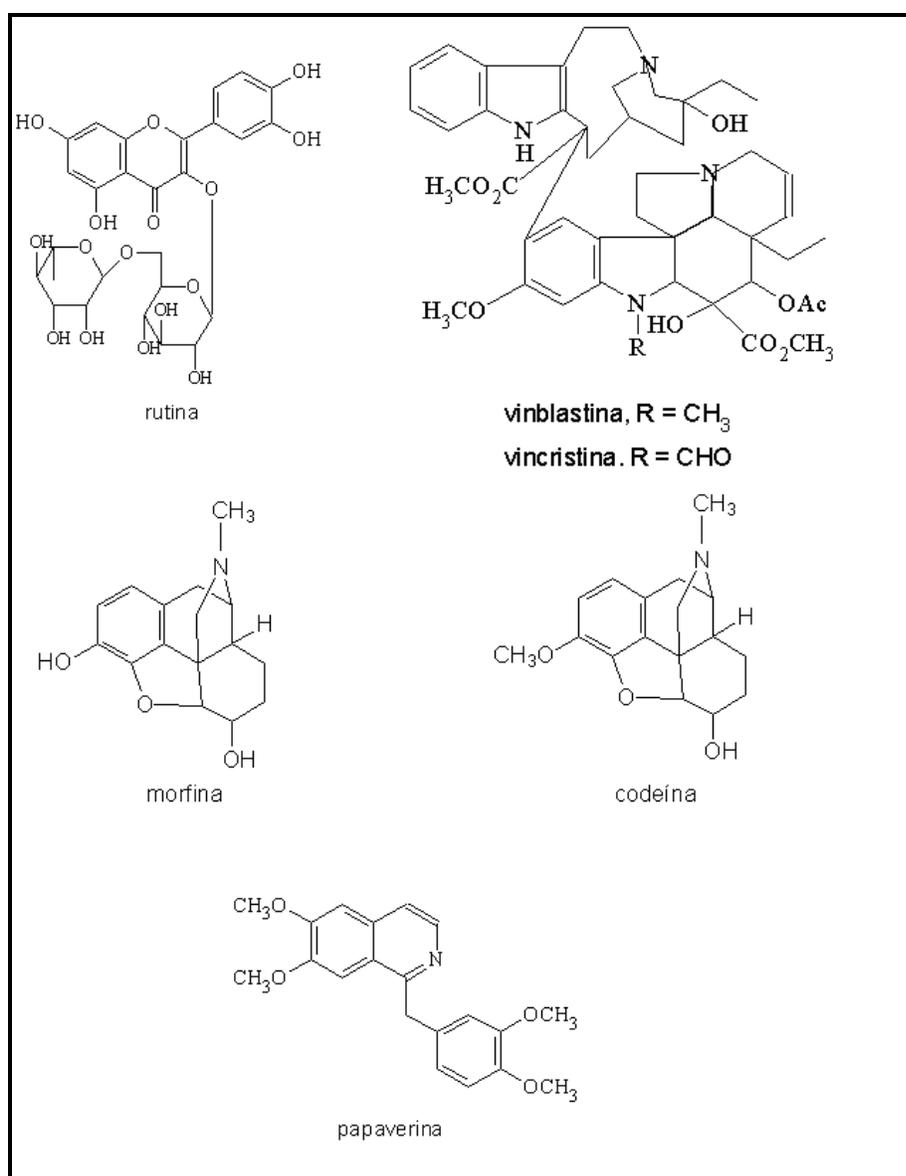


Figura 2: Substâncias de origem natural.

Silva et al. (2001) mencionam que, a utilização popular das plantas medicinais no Brasil, com fins terapêuticos e rituais religiosos, provém de diferentes origens e culturas tradicionais, principalmente de índios brasileiros, seitas afro-brasileiras, e da cultura e tradição africana e européia. O uso e o comércio destes recursos, como em outros países, foram estimulados pelas necessidades de uma crescente população que demanda cada vez mais por plantas medicinais para o cuidado de sua saúde e para seus cultos e tradições religiosas; pela facilidade de acesso devido aos custos elevados da medicina ocidental, aos efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, além do crescente interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico além do econômico que representam a demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica.

A busca pela cura ou tratamento de doenças, tem levado pesquisadores a se interessarem, cada vez mais, na investigação de espécies vegetais com substâncias ativas de potencial terapêutico. Evidencia-se este fato pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (Calixto, 2000). A vantagem destas substâncias está na eficácia no tratamento de enfermidades como, por exemplo: substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcalóides (vincristina e vinblastina) extraídos da espécie vegetal *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae), originário do Madagascar, descobertos no final dos anos 60, ainda considerados indispensáveis para o tratamento de leucemia assim como os taxóides extraídos das espécies *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (teixo do Pacífico) e *T. baccata* L. para cânceres ginecológicos (Schepartz et al., 1993). Outro fator que incentiva o estudo com plantas é a complexidade na descoberta de novas drogas; atualmente são necessários de sete a dez anos para o desenvolvimento completo. O volume de recursos envolvidos nesses estudos explica a concentração da pesquisa e desenvolvimento destes novos fármacos nos países ditos do primeiro mundo, detentores de tecnologia e recursos (Montanari, 1995). Além disto, estudos recentes demonstram que a chamada megabiodiversidade, representada por Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, Malásia, México, Peru e Zaire, está seriamente ameaçada, o que justificaria a utilização das plantas de forma sustentável, para conservação e reparação das áreas degradadas (Nodari e Guerra, 2003).

No Brasil 20% da população consomem 63% dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação. O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha e atualmente isto tem prioridade na maioria delas. Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas está a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais como os alcalóides da vinca (figura 2), com atividade antileucêmica, ou do jaborandi, com atividade antiglaucoma, ambos ainda considerados indispensáveis para o tratamento e por muitas plantas serem matéria-prima para síntese de fármacos (Foglio et al., 2006).

Hoje em dia existem várias metodologias para a obtenção de fármacos, dentre elas a abordagem biotecnológica e as correspondentes técnicas genéticas, que possibilitaram identificar e preparar diversas proteínas. A química combinatória, que permitiu o desenvolvimento de técnicas de triagem em larga escala como o *HTS* (*High-throughput screening*) que permitem que até 100 mil compostos sejam testados num único dia em relação a sua atividade biológica e a química computacional que correlaciona a estrutura molecular com a atividade biológica (Yunes, 2001). A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundário relevante da mesma. Caso o interesse seja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (Elisabetsky e Souza, 2003).

Dentro deste aspecto, cabe ressaltar a necessidade de uma atuação multidisciplinar que o estudo com as plantas exige, incluindo desde o ponto de vista fitoquímico, até estudos abordando os aspectos agrotecnológico, microbiológico, farmacológico e biotecnológico, de tal forma que esta integração possa propiciar uma ampliação na busca de novas moléculas ativas. Apesar de contar com uma enorme biodiversidade, o Brasil dispõe de uma infra-estrutura que deve ser melhorada para adequar a produção e a extração racional das espécies. Para o

fitoquímico, todas estas especialidades têm papel importante na pesquisa com plantas medicinais. Qualquer profissional ou instituição que deseja trabalhar com plantas medicinais esbarra na dificuldade em produzi-las ou adquiri-las com confiabilidade na identificação botânica ou mesmo em obter informações sobre em quais condições a espécie foi cultivada. A área agrotecnológica, por sua vez, pode auxiliar o pesquisador através das técnicas de micropropagação vegetativa, cultivo em larga escala e estudos de aclimação, visando a disseminação da espécie e sua sustentabilidade e aliando a produção com a otimização do teor do(s) princípio(s) ativo(s), possibilitando a adequação da espécie às condições climáticas locais. Nas áreas microbiológicas e farmacológicas encontra-se o apoio necessário à caracterização da atividade *in vitro* e *in vivo* das plantas em estudo, na busca da determinação da atividade antimicrobiana destes produtos e o controle de qualidade fitopatológico das espécies e seus produtos acabados. As plantas não são unicamente uma fonte potencial de princípios ativos quimicamente definidos. O uso de extratos é também possível e, para isto, a atividade farmacológica deve estar definida, assim como os compostos responsáveis por esta atividade. Do ponto de vista farmacológico é imprescindível a avaliação da atividade em diversos modelos como o antiulcerogênico, antiinflamatório, anticâncer em cultura de células tumorais humanas e em modelos experimentais utilizando animais de laboratório, anticolvulsivante, analgésico e outros, bem como avaliação toxicológica (citotoxicidade, toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas (toxicidade crônica), irritação dérmica primária e cumulativa, irritação ocular, sensibilidade cutânea e fototoxicidade). O delineamento destes estudos permite o fechamento do ciclo multidisciplinar no estudo com plantas medicinais (UNICAMP, 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80% das pessoas dos países em desenvolvimento no mundo dependem da medicina tradicional para as suas necessidades básicas de saúde e cerca de 85% da medicina tradicional envolve o uso de extratos de plantas. Isso significa que 3,5 a 4,0 bilhões de pessoas dependem de plantas como fontes de tratamentos (Azevedo e Silva, 2006).

O Brasil é um dos países de maior diversidade genética vegetal, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (Nodari e Guerra, 2003). Neste contexto, a Mata Atlântica ocupa posição de destaque no que se refere ao patrimônio genético

nacional. Sua ocupação deu-se ao longo dos 500 anos de história por diferentes formas de exploração, o que levou a degradação e extinção de muitos recursos.

Devem-se distinguir dois aspectos relevantes no que concerne a obtenção de novos fármacos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços, ainda é limitada (Nodari e Guerra, 2003).

Estima-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal seja de US\$12,4 bilhões, onde 50% do consumo neste tipo de mercado esta concentrado na Europa. Fitoterápicos e fitofármacos são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (Cragg et al.,1997).

O crescimento do mercado nacional de medicamentos preparados a base de plantas medicinais (fitoterápicos) é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4%.

A demanda na utilização de plantas medicinais na prevenção ou cura de doenças e cultivo ou extrativismo dessas plantas torna-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional. Por outro lado, a qualidade das plantas medicinais e dos produtos fitoterápicos comercializados vem sendo afetada negativamente pelo aumento da demanda dos mesmos. Estudos têm demonstrado que cerca de 50% dos produtos a base de plantas medicinais disponíveis no comércio, no Brasil, apresenta alguma irregularidade devido a presença de matéria orgânica estranha, contaminações e insetos, problemas de identificação botânica, teores de compostos abaixo do especificado e adulteração. Os preços pagos pelo comércio atacadista são extremamente baixos, fato que contribui para o aumento da pressão sobre a biodiversidade e para manutenção de baixa qualidade da matéria-prima, criando um círculo vicioso (Reis et al., 2003).

A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta nos ecossistemas tropicais (extrativismo) tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Assim a

domesticação e cultivo, práticas razoáveis para espécies medicinais exóticas, aparecem como opções para obtenção da matéria-prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações florestais (Reis et al., 2003).

1.2. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE NOVOS COMPOSTOS

É importante ressaltar o fantástico desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, nas últimas três décadas e mais recentemente de instrumentos analíticos hifenados, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas, muitos desses ainda sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese (Montanari, 2001).

A complexidade na determinação estrutural de uma nova molécula é evidenciada pelas técnicas utilizadas como: infravermelho, ultravioleta, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono incluindo experimentos de correlação homo e heteronuclear, não deixando de mencionar as técnicas químicas e físicas preliminares tais como cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, rotação ótica e ponto de fusão. Os procedimentos para determinação e elucidação de uma estrutura química, que muitas vezes é um enorme desafio mesmo para os especialistas no assunto, sendo fundamental, portanto a participação do químico nas pesquisas voltadas à obtenção de novas moléculas com atividade farmacológica. (Ferri, 1995)

1.3. *Croton celtidifolius* BAIL

Planta da família *Euphorbiaceae*, que compreende 290 gêneros e aproximadamente 7500 espécies, distribuídas em todo o mundo principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África. (Joly, 1993).

Ao gênero *Croton* são atribuídos vários estudos biológicos. As plantas deste gênero são ricas em metabólitos secundários responsáveis pelas atividades biológicas, dentre esses constituintes ativos encontram-se as proantocianidinas, terpenos, alcalóides, flavonas e outros compostos fenólicos (DalBó, 2004). Entre as atividades conferidas ao gênero *Croton* encontra-se a anti-helmíntica e efeito cardiovascular de *Croton zehntneri* (Camurça-Vasconcelos et al., 2007, De Siqueira et al., 2006), antinociceptiva de *Croton urucurana* (Rao et al., 2007), moluscicida de *Croton campestris* (Babili et al., 2006), antiinflamatória de *Croton cuneatus* (Suárez et al., 2006), anticancerígeno de *Croton flavens* (Sylvestre et al., 2006), mutagênica e antioxidante de *Croton lechleri* (Lopes e Lopes et al., 2004).

Croton celtidifolius Baill, é uma árvore encontrada nas regiões de Mata Atlântica, comumente mediana de seis a dez metros de altura e dez a vinte e cinco centímetros de diâmetro. Geralmente encontrada desde o estado de Rio de Janeiro a Goiás, em São Paulo e na região Sul do Brasil, e conhecida popularmente por Pau-Sangue, Sangue de Dragão e Sangue de Adáve (Smith, 1998).

Na medicina folclórica, a planta é recomendada para o tratamento de leucemia, úlcera, reumatismo e doenças inflamatórias, tanto pela mastigação da casca como a preparação de infusão destas (DalBó et al., 2005) e como cicatrizante, segundo Axt 1976. Entretanto, existem poucos estudos da atividade biológica de *C. celtidifolius*. As divulgações existentes na literatura encontram-se os estudos das cascas em relação a atividade antinociceptiva, antiinflamatória, antiedermatogênica e antioxidante (Nardi, 2002; Nardi et al., 2003; DalBó et al., 2005; Nardi et al., 2006; Nardi et al., 2007; DalBó et al., 2006).

Axt e Mukherjee (1984) citam o isolamento e determinação estrutural de compostos da família dos ciclitolis, o 1L-1-O-metil-mio-inositol, neo-inositol e sitosterol (figura 3) em *Croton celtidifolius*. Além disso, há publicações demonstrando a presença de alcalóides e saponinas nesta espécie (Amaral e Barnes, 1997).

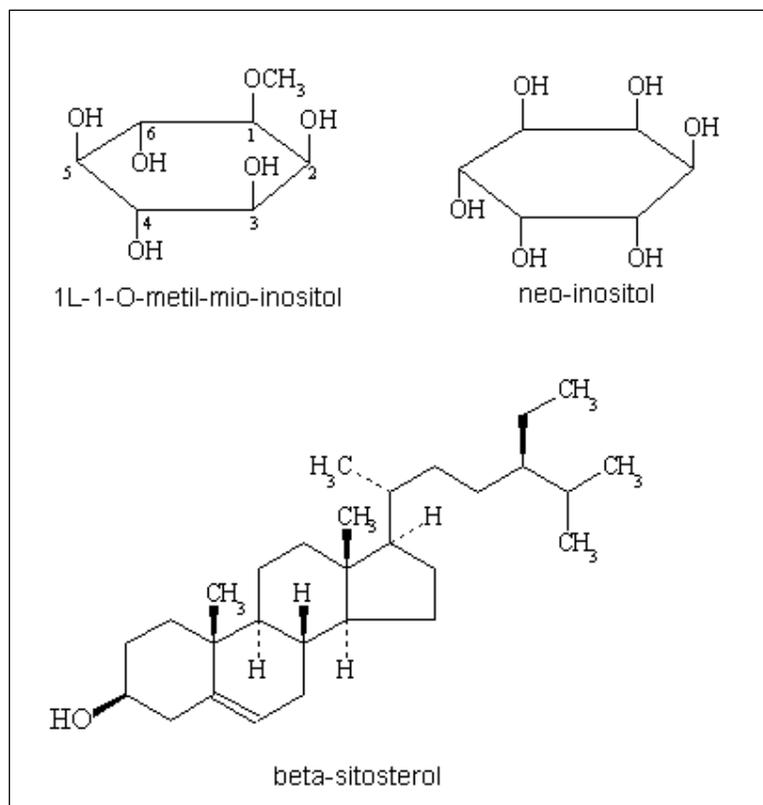


Figura 3: Compostos isolados de *Croton celtidifolius*.

1.4. TESTES BIOLÓGICOS

As propriedades biológicas (antimicrobiana, antinociceptiva, antiinflamatória) estão diretamente relacionadas com o potencial antioxidante desempenhado pelos fenóis. Por outro lado a atividade antioxidante depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor, pela sua capacidade de captura de radicais livres, reatividades com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais. Há estudos demonstrando que o potencial antioxidante *in vitro* de flavonóides é superior aos das vitaminas E e C (Rice-Evans et al., 1997; Rice-Evans et al., 1995).

Logo, a interação entre os laboratórios de química e farmacologia é de fundamental importância no que concerne ao monitoramento farmacológico do fracionamento químico com o objetivo de identificar os compostos ativos presentes nas plantas (Elisabetsky e De Souza 2003).

1.4.1. DOR

A dor é uma linguagem: células nervosas especializadas no sentido da dor (nociceptores), que existem aos milhares em cada milímetro de nossa pele, transmitem estes impulsos ao nosso sistema nervoso central (SNC) que responde tentando afastar a parte do corpo afetada do estímulo doloroso.

Os gregos antigos acreditavam que a dor fosse uma emoção. Hoje, embora ainda possamos “chorar de dor ou morrer de felicidade quando ela se vai”, a ciência classifica a dor como uma sensação. Assim como outros sentidos - olfato ou paladar - a dor necessita de órgãos especiais para a detecção e informação ao SNC. Estes receptores para a dor foram chamados de nociceptores.

Os mecanismos associados ao início e propagação dos impulsos da dor são os nociceptores que são ativados por, basicamente, 4 tipos de estímulo: mecânico, elétrico, térmico ou químico (Loeser e Melzack, 1999). A ativação dos nociceptores está, em geral, associada a uma série de reflexos, tais como o aumento do fluxo sanguíneo local, a contração de músculos da vizinhança, mudanças na pressão sanguínea e dilatação da pupila. Uma das primeiras descobertas foi a da ação das prostaglandinas sobre os nociceptores. Quando um tecido é injuriado, tal como por uma infecção ou queimadura solar, as suas células liberam prostaglandinas e leucotrienos, que aumentam a sensibilidade dos nociceptores. Hipersensibilizados, os nociceptores são capazes de transformar em dor qualquer impulso, mesmo que mínimo: lembra-se de como é doloroso um simples toque sobre a pele queimada? Este fenômeno é um mecanismo de defesa do organismo e é conhecido como hiperalgesia.

Vários fármacos interferem com o ciclo de produção das prostaglandinas, tal como a aspirina, e reduzem a sensibilização destes tecidos. O bloqueio da síntese ou ação dos leucotrienos também é um alvo dos analgésicos farmacêuticos.

Os nociceptores estão ligados ao SNC por intermédio de fibras nervosas de três tipos. Fibras A α , A δ e C. Estas fibras apresentam características anatômicas e funcionais distintas, porém são componentes importantes para o início da transmissão do impulso nociceptivo. Todas as fibras levam os impulsos até a corda

espinhal; esta conduz a informação até o tálamo. Então, é neste momento que a dor é detectada: quando a informação atinge o tálamo.

1.4.2. PRESSÃO ARTERIAL

O coração é uma bomba eficiente que bate 60 a 80 vezes por minuto durante toda nossa vida e impulsiona de 5 a 6 litros de sangue por minuto para todo o corpo. Pressão arterial é a força com a qual o coração bombeia o sangue através dos vasos. É determinada pelo volume de sangue que sai do coração e a resistência que ela encontra para circular no corpo. Ela pode sofrer variação pelo volume de sangue, viscosidade do sangue, da frequência cardíaca e da elasticidade dos vasos. Elevações ocasionais da pressão podem ocorrer com o nervosismo, preocupações, drogas, alimentos, fumo, álcool e café (Busato, 2001).

Quando a pressão alta não for descoberta e tratada ela pode causar (Fontes, 2005):

- Aumento do coração, o qual pode ocasionar a falha deste.
- Aneurismas nos vasos sangüíneos, mais comumente na aorta e artérias no cérebro, pernas e intestinos.
- Estreitamento dos vasos sangüíneos nos rins, o que pode causar a falha destes.
- "Endurecimento" precoce de artérias pelo corpo, especialmente aquelas no coração, cérebro, rins e pernas. Isso pode causar ataque cardíaco, infarto, falha nos rins ou amputação de parte da perna.
- Sangramento ou ruptura de vasos sangüíneos nos olhos, o que causa alterações na visão e pode resultar em cegueira.

1.4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos comumente usados para determinar a capacidade antioxidante por serem fáceis, rápidos e sensíveis são aqueles envolvendo compostos cromogênicos de um radical natural que simula as espécies reativas do oxigênio (ERO). A presença de antioxidante leva ao desaparecimento desses radicais

cromogênicos. Dois radicais muito utilizados para medir a atividade antioxidante são o $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinóbis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido)) (figura 4) e o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).

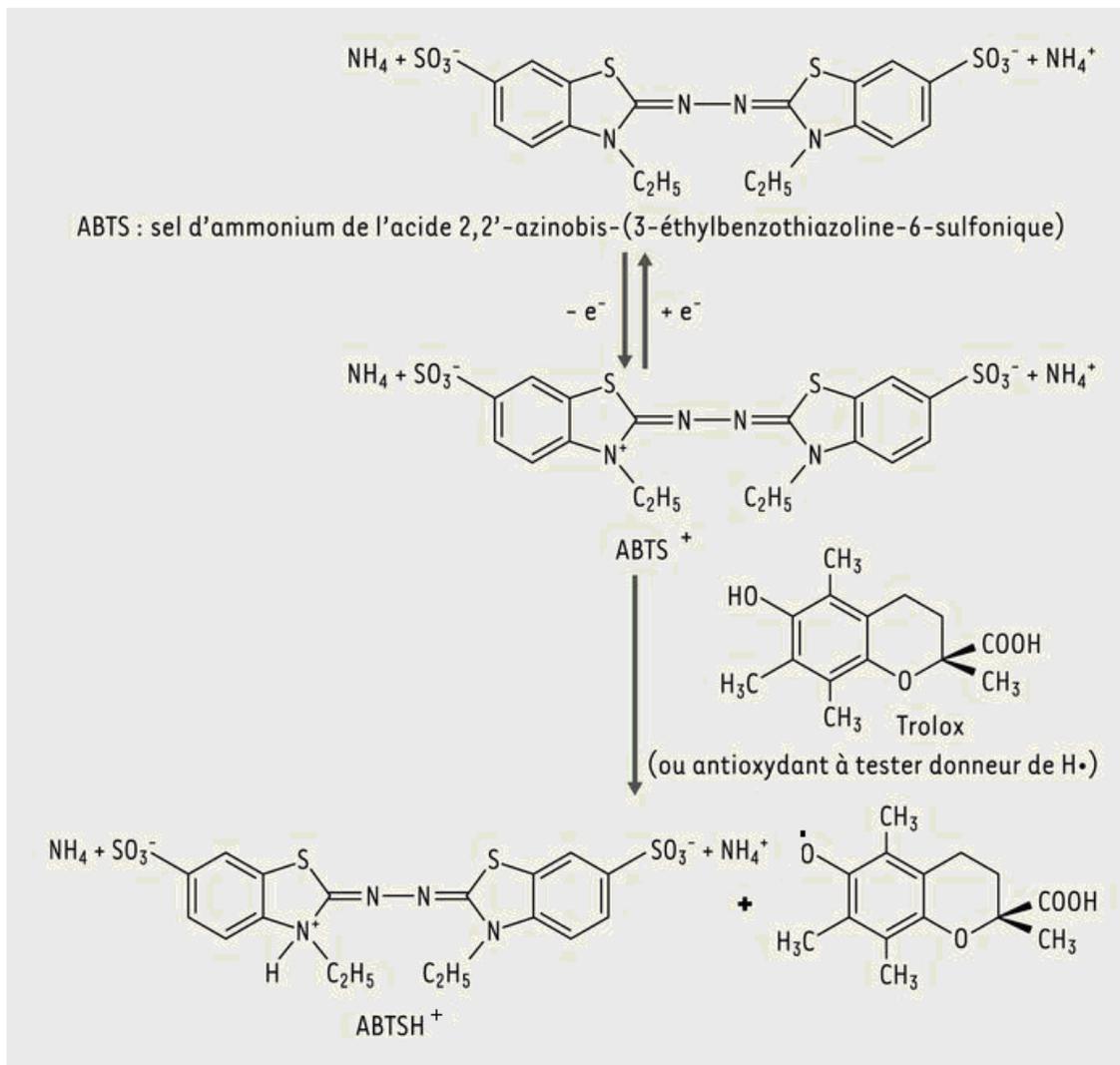


Figura 4: Reação do teste antioxidante pelo método ABTS (Marc et al., 2004).

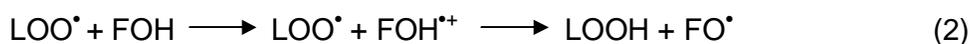
Os radicais livres são compostos cuja estrutura química possui um ou mais elétrons desemparelhados, sendo por isso, muito instáveis, altamente reativos, e tempo de meia vida curto. Os principais compostos são os originados por reações do oxigênio molecular, denominadas de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), sendo este termo usado para qualquer espécie de radical formado (Soares, 2000).

1.5. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos (figura 5) podem ser formados por meio de duas rotas biogénéticas: via do ácido chiquímico ou via do acetato de polimalato que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogénética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquimico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição orto, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em meta (Carvalho et al.,2003).

Os compostos fenólicos são formados por um ou mais anéis aromáticos hidroxilados, sendo capazes de quelar metais e capturar radicais livres. A existência de elétrons π em sua estrutura, que auxiliam na estabilização do radical formado pela oxidação do fenol ao perder um átomo de hidrogênio, ajuda a compreender a atividade antioxidante destes compostos.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos pode se manifestar de duas formas: pelo mecanismo de transferência de hidrogênio (1) ou pelo mecanismo de transferência de próton combinado (concertado) por transferência eletrônica (2) (Zhang et al., 2002).



Nas reações 1 e 2 indicadas, estão representadas por F os compostos fenólicos e L um lipídeo, composto que é alvo da ação dos radicais livres.

A maior parte dos vegetais possui em suas estruturas compostos fenólicos, da classe dos flavonóides e dos não flavonóides. Destacam-se entre os não flavonóides os compostos derivados do ácido cafêico e do ácido p-cumárico ($\text{C}_6\text{-C}_3$). E os derivados da estrutura $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$, pertencentes ao grupo do resveratrol (Rice-Evans et al., 1997) e xantonas.

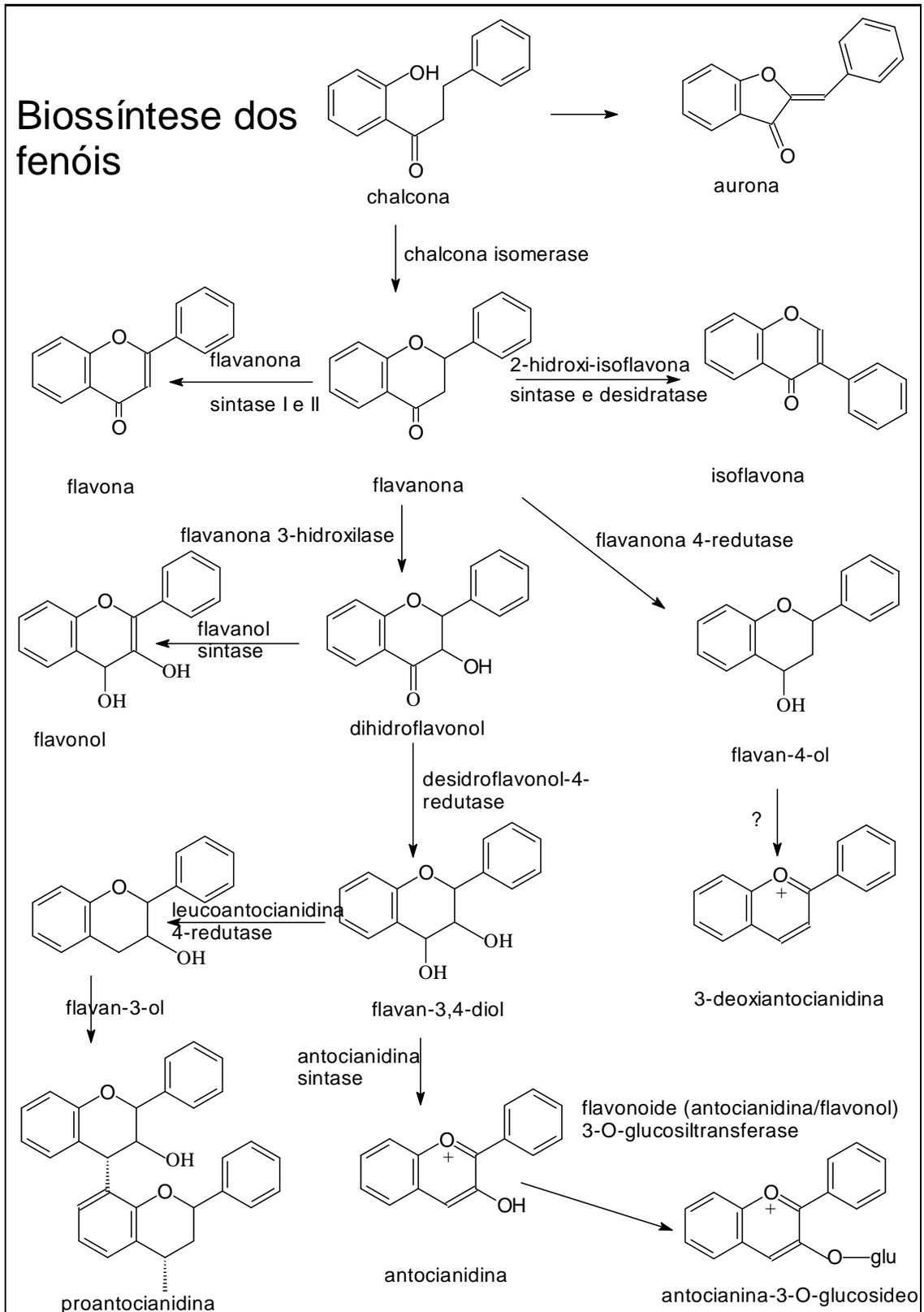


Figura 5: Biossíntese dos fenóis (UNL, 2007).

Por outro lado os flavonóides, que constituem a maioria dos antioxidantes são encontrados principalmente nas frutas e verduras. A estrutura básica destes compostos, representada por C₆-C₃-C₆ (figura 6), está baseada em um núcleo que consiste de dois anéis fenólicos, A e B, ligados por uma cadeia de três átomos de carbono. Esta cadeia, por sua vez, fecha-se como um terceiro anel, C, heterociclo do tipo pirano com um átomo de oxigênio (Zuanazzi e Montanha, 2003).

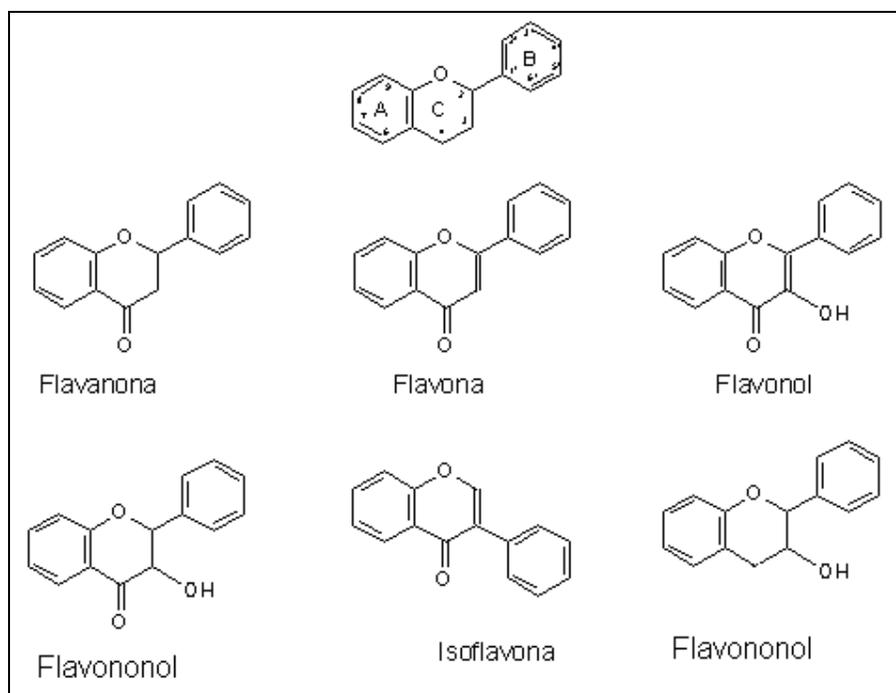


Figura 6: Variedades de flavonóides;

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a espécie *C. celtidifolius* com respeito de sua composição em proantocianidinas e o quanto estes compostos influenciam nas atividades biológicas e farmacológicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar os extratos vegetais e as frações enriquecidas de proantocianidinas.

Isolar por métodos cromatográficos em escala preparativa as proantocianidinas da espécie *Croton celtidifolius*.

Caracterizar e identificar os compostos isolados, através de testes específicos e aplicar as técnicas de espectroscopia.

Realizar ensaios *in vitro* e *in vivo* para a avaliação das atividades antioxidante, antinociceptiva e o efeito vaso relaxante dos extratos e das frações ricas em proantocianidinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os solventes e reagentes empregados no desenvolvimento desse trabalho foram de grau p.a. e procedência Nuclear e Vetec.

3.1. EQUIPAMENTOS

3.1.1. PONTO DE FUSÃO

Foi utilizado aparelho de ponto de fusão manual da microquímica. Este equipamento é composto por uma lupa para o acompanhamento da fusão da amostra, através do bloco metálico aquecido, sobre o qual é colocada a amostra entre lâmina e lamínula.

3.1.2. ELETROFORESE CAPILAR

A análise em eletroforese foi utilizado um aparelho da Agilent Technologies HP^{3D}CE aparato (Palo Alto, CA, U.S.A.) equipado com um detector com arranjo de diodos em 207 nm. Procedeu-se a separação a 25°C em um capilar de sílica fundida (60 cm x 375 µm diâmetro externo x 50 µm diâmetro interno) da Polymicro Technologies. As amostras e os padrões foram injetados hidrodinamicamente a 0,5 psi em 2 s. A voltagem aplicada foi de 20 kV de polaridade positiva. As identificações dos picos foram feitas por comparação de tempo de migração e os dados dos espectros foram comparados com padrões.

3.1.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm⁻¹ em um espectrômetro Perkin Elmer FT 16PC, na Central de Análises do Departamento de Química-UFSC.

3.1.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono para as substâncias foram realizados em temperatura ambiente dissolvidas em metanol e ou acetona deuterados, empregando tetrametilsilano (TMS) como referência. Empregou-se aparelho Varian em campo de 400 MHz (RMN ¹H) e 100 MHz (RMN ¹³C).

3.1.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

Utilizou-se aparelho espectrofotômetro da Perkim Elmer UV-VIS, com varredura entre 300 e 700 nm com amostra dissolvida em metanol em cubetas de 1 cm.

3.2. MATERIAL VEGETAL

A espécie vegetal *Croton celtidifolius* (Euphorbiaceae) foi coletada no período matutino em março de 2000, no município de Orleans – SC. Este espécime foi identificado no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina pelo Prof. Dr. Daniel Falkenberg de Barcelos e depositada uma exsicata sob o número de voucher, FLOR 31.272 no Herbário de mesma instituição.

3.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E FRACIONAMENTOS

Após a coleta e identificação, as cascas (568g) do *Croton celtidifolius* foram secas sob ventilação, moídas e submetidas à extração por maceração em etanol 90% (3x) a temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator removido em rotaevaporador com condensador acoplado sob vácuo, resultando em 100,0 g de extrato bruto hidroalcoólico (EB) que foi conservado sob congelamento em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O extrato bruto seco deste material vegetal foi submetido à extração líquido-sólido (particionamento) em ordem de solventes: clorofórmio, acetato de etila, acetona e restando o resíduo (figura 8).

Depois de ter sido realizado este particionamento, foi aplicado um método desenvolvido no laboratório para a separação de proantocianidinas que consta do seguinte procedimento.

Uma determinada quantidade de extrato ou fração (no presente caso refere-se a 5g de cada uma das frações: Acetona, Acetato de etila e Resíduo Aquoso) é dissolvida numa quantidade mínima de acetona seguindo-se a adição de um grande excesso de água destilada. O material é deixado em repouso para a precipitação e finalmente filtrado em papel filtro analítico. O resíduo do papel filtro após devidamente seco é pesado e reservado à parte. A acetona presente no filtrado é removida com auxílio de um rotaevaporador e em seguida procede-se uma extração líquido-líquido com acetato de etila. O extrato acetato de etila assim obtido é

submetido a um fracionamento por cromatografia em coluna flash conforme Still 1978 (figura 8).

3.4. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS A, B, C e FRAÇÃO D A PARTIR DAS CASCAS DE *C. celtidifolius*

Os métodos cromatográficos utilizados para separação e isolamento das frações e dos compostos foi a cromatografia em coluna flash e para fins de identificação e análise de misturas por comparações com padrões usou-se a cromatografia em camada delgada (CCD), nesse caso chama-se cromatografia analítica, enquanto a cromatografia que visa ao isolamento de compostos é dita cromatografia preparativa. A fase estacionária pode encontrar-se empacotada em coluna (aberta ou fechada) ou constituir uma superfície plana, como a cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada. Em geral, as técnicas cromatográficas envolvidas neste trabalho foram desenvolvidas conforme as seguintes etapas:

- montagem da coluna: disposição adequada da fase estacionária (sílica gel SiO_2) ou suporte da fase móvel;
- aplicação da amostra (extrato + sílica);
- desenvolvimento: passagem de um solvente (ordem crescente de polaridade – coluna aberta ou de forma isocrática - flash) escolhido – fase móvel – através da fase estacionária;
- revelação (vapor de iodo, solução de cloreto férrico, solução ácida de anisaldeído e solução de sulfato cérico) e visualização (luz ultravioleta comprimentos de onda de 254 e 365nm) das cromatoplacas para localização das diferentes zonas de separação dos compostos;

A cromatografia em camada delgada (CCD) teve por objetivo específico o monitoramento das frações eluídas em coluna. A metodologia da CCD consiste em uma folha de alumínio como suporte com uma fina camada de sílica, aplicando as amostras a um centímetro de uma das extremidades e eluindo o sistema com uma mistura adequada de solvente. As cromatoplacas eluídas com amostras aplicadas

com perfis semelhantes ($R_f \rightarrow$ índice de retenção = $d_{amostra}/d_{solvente}$) de visualização foram reunidas.

A fração acetato de etila tratada (FRP = 100 mg), rica em proantocinidinas, foi submetida a este procedimento em uma coluna de diâmetro 15 mm, preenchida com 18 cm de sílica gel (40-230 mesh) com fluxo de $1,5 \text{ mLmin}^{-1}$. O eluente utilizado foi preparado segundo a literatura para CCD de proantocianidinas (Tits et al., 1992), que foi o mesmo para a cromatografia flash AcOEt:H₂O:HCOOH:AcOOH (70:20:3:2, v/v/v/v) este sistema forma duas fases e se usa a fase superior.

Foram coletadas 41 frações (tabela 1) com volume de 4 mL cada. As amostras eluidas foram convenientemente analisadas por CCD (figura 7) e reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico, detectando a pureza das substâncias isoladas. Os valores dos R_f foram os seguintes: A (0,89), B (0,87), C (0,65) e D (0,00). A razão de as CCD terem resolução ruim reside no grau de hidroxilação destes compostos. Quanto mais hidroxilas o composto tiver maior são as interações com a fase estacionária, sílica, originando perfis cromatográficos imperfeitos de acordo com a figura 7.

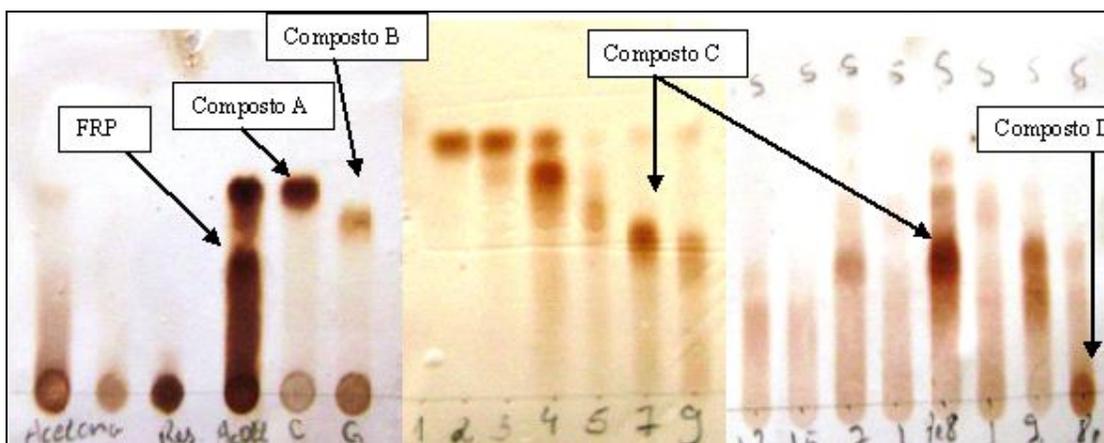


Figura 7: Cromatografia em camada delgada dos compostos isolados da coluna flash.

Tabela 1: Massa dos compostos isolados por cromatografia flash;

Fr. Coletada	m (mg)	
1, 2 e 3		
4, 5 e 6	25,2	composto A
7 e 8	7,3	composto B
9 – 18	12,5	composto C
19 – 30	5,9	
31 – 41	21,4	composto D

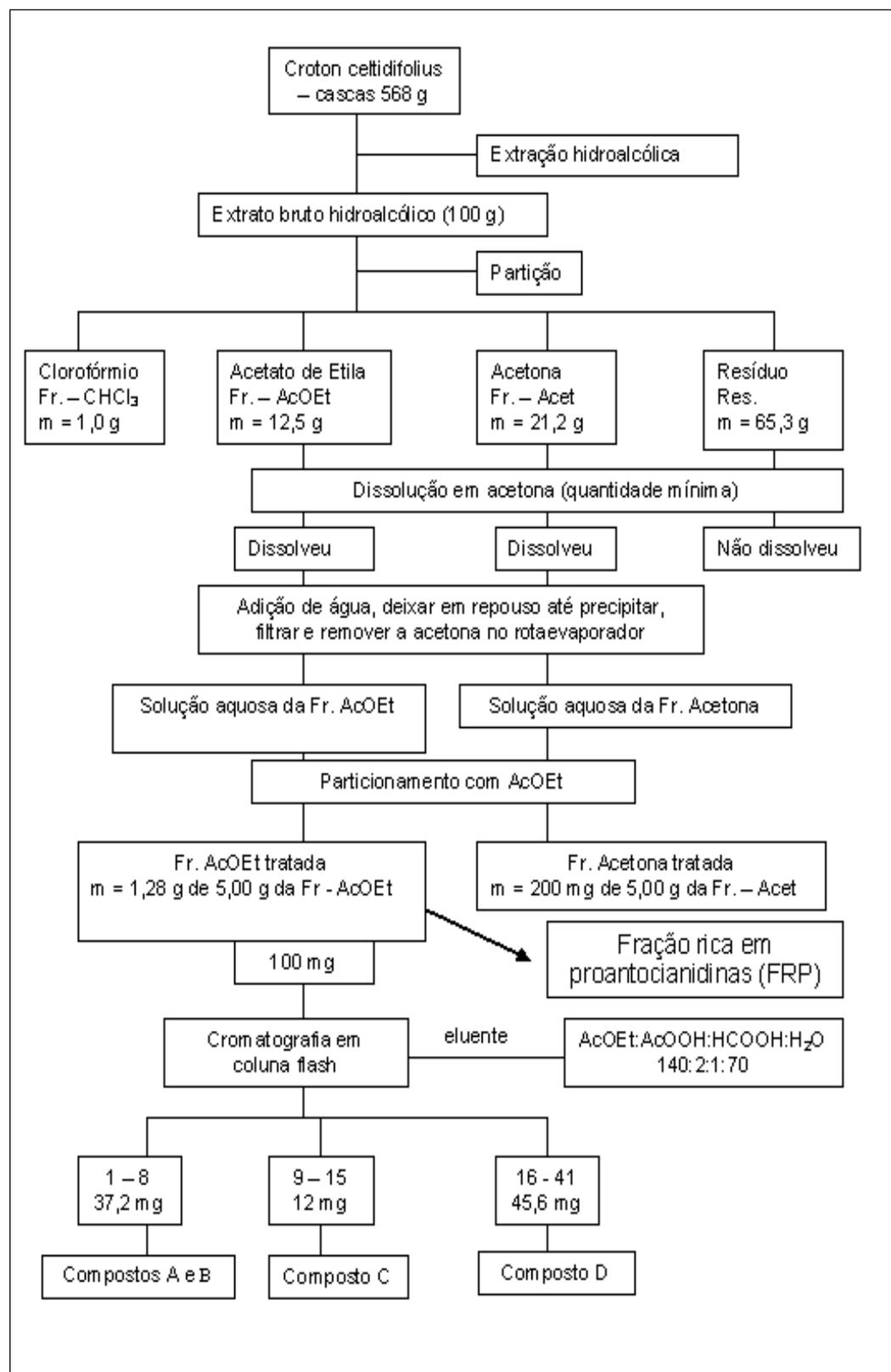


Figura 8: Método de obtenção de proantocianidinas

3.5. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO ETANÓLICO E NAS FRAÇÕES DE *C. celtidifolius*

Os compostos fenólicos totais foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Gutfinger, 1981), utilizando o ácido gálico como padrão de referência (figura 9). A 0,5 mL de cada amostra, adicionou-se 0,5 mL do reagente Folin- Ciocalteu diluído 1/10 e 1 mL de Na₂CO₃ saturado e a mistura foi armazenada ao abrigo da luz por uma hora. O tubo controle continha 0,5 mL de etanol a 80%. A absorbância foi medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de peso seco da amostra (mg EAG/g). 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).

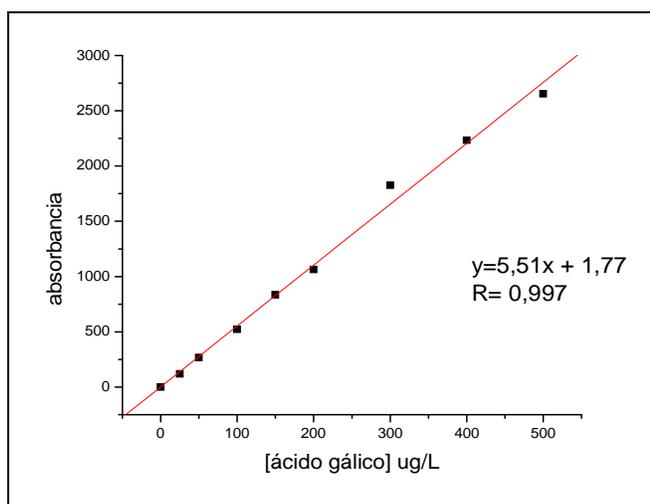


Figura 9: Curva de calibração com ácido gálico para o teste de avaliação de fenólicos totais.

3.6. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A dosagem de flavonóides foi feita de acordo com Quettier-Deleu 2000, onde se utilizou quercetina como padrão, em solução de cloreto de alumínio. O método consiste na mistura de 0,5 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) 2%, 0,5 mL de extrato e 2,5 mL de etanol. Após repouso de 60 minutos, fez-se leitura a 415 nm em espectrofotômetro UV/visível Perkin Elmer para se obter a concentração de

flavonóides expresso em equivalentes de quercetina/g de extrato ou fração. Os dados de absorvância das amostras foram comparados com uma curva padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de quercetina.(figura 10).

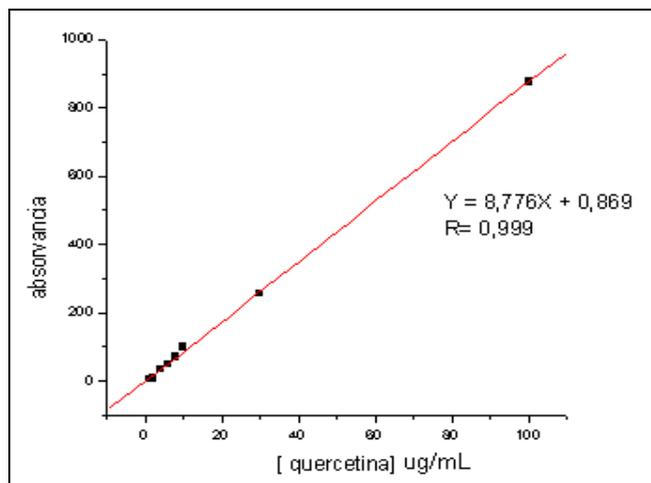


Figura 10: Curva padrão em quercetina.

O cátion alumínio forma complexos (figura 11) estáveis com os flavonóides em metanol, ocasionando um deslocamento batocrômico no espectro eletromagnético na região do UV-VIS juntamente com uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorvância (Salatino, 2007).

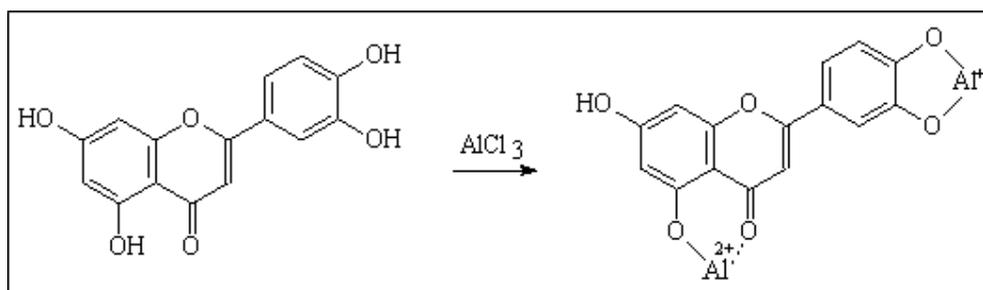


Figura 11: Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio

3.7. ANÁLISE DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO DA SOLVÓLISE

Antes da análise do perfil químico por cromatografia líquida, foi realizada a solvólise das proantocianidinas, forma predominante encontrada nessa espécie.

Segundo Porter 1986, este método baseia-se na depolimerização oxidativa de proantocianidinas com aquecimento em meio ácido mineral com a formação de cátions antocianidinas que absorvem intensamente em 550 nm (cor vermelha). O método usado foi a butanolise em ácido clorídrico (figura 12).

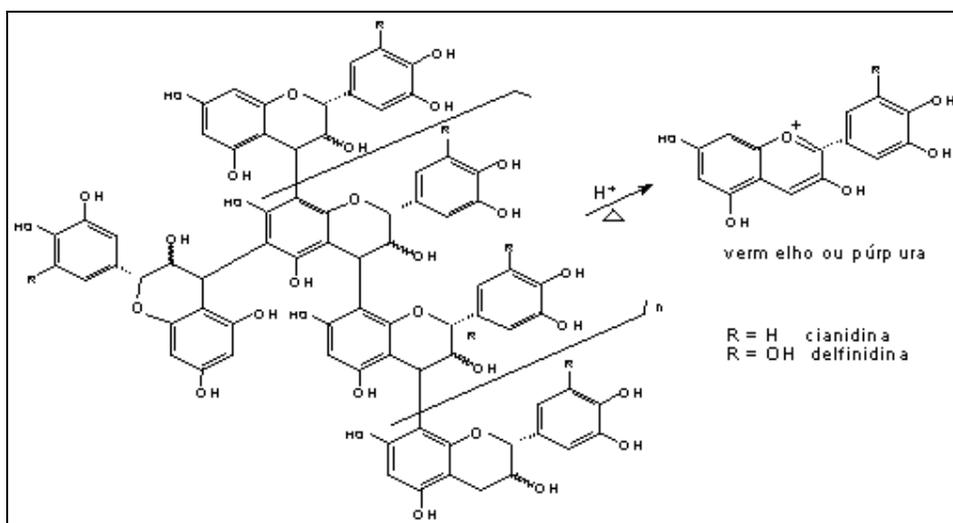


Figura 12: Degradação de proantocianidinas em hidrólise ácida (Santos, 2003)

Transferiu-se 10 mg de cada uma das frações do particionamento líquido sólido e da cromatografia em coluna para um tubo de reação e adicionou-se 2 mL de solução n-Bu-OH e HCl 80:20 v/v. Fechou-se o tubo de reação e este foi mantido em banho “Maria” a $95 \pm 2^\circ\text{C}$, durante duas horas. Após o término da reação, tomou-se uma alíquota de 0,5 ml que foi diluída em 8,5 ml de n-butanol e a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro entre 350 e 700 nm.

A curva de calibração (figura 13) foi feita a partir de uma solução estoque padrão (SEP) pela dissolução de 10,5 mg de amostra padrão de proantocianidinas em 5 mL de n-BuOH. Alíquotas crescentes da SEP (Tabela 2) com concentrações crescentes de proantocianidinas foram submetidas à reação de hidrólise com n-butanol (n-Bu-OH) e ácido clorídrico 37% (HCl) na proporção 90:10 v/v com volume de 2 mL por duas horas.

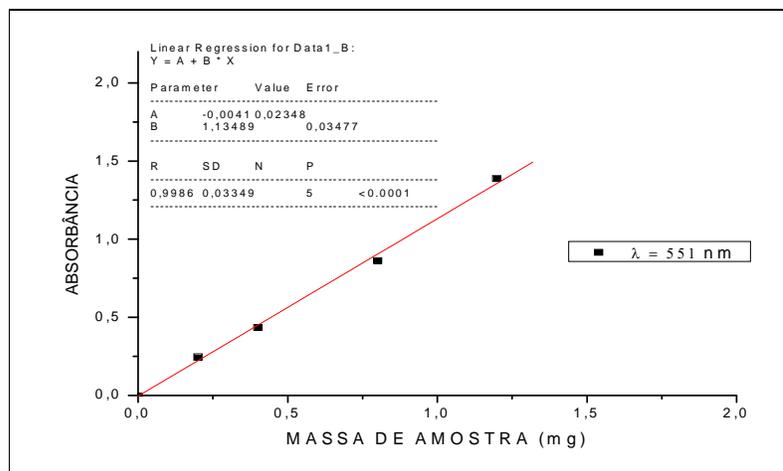


Figura 13: Curva de calibração (padrão) para quantificar proantocianidinas em comprimento de onda $\lambda = 551$ nm.

As soluções após o término da reação e em temperatura ambiente foram diluídas para formar soluções equivalentes em volume e as respectivas densidades óticas foram medidas em espectrofotômetro 550nm (Tabela 2), tendo como branco n-BuOH. A curva de calibração foi construída com os dados obtidos e foram manipulados no programa origin 7.0.

Tabela 2: Dados para o preparo das curvas de calibração para hidrólise de proantocianidina.

Amostras	Volume (SEP) mL	Equivalente em mg	V (mL) n-BuOH/HCl 10%	n-BuOH qsp 9 mL	Absorbância
					$\lambda = 550$ nm
01	0,1	0,2	2,0	6,9	0,2268
02	0,2	0,4	2,0	6,8	0,4345
03	0,4	0,8	2,0	6,6	0,8624
04	0,6	1,2	2,0	6,4	1,3865
05	1,0	2,0	2,0	6,0	2,1696

3.8. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQÜESTRO DO RADICAL LIVRE 2,2'-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o cromóforo DPPH, técnica esta que se baseia no método de CAVIN et al. (1998) e BOUCHET et al. (1998). Para realização do ensaio, preparou-se uma solução de DPPH (1,1-

difenil-2-picrilhidrazil) 0,004 % momentos antes do uso. As amostras do extrato bruto e frações foram preparadas nas concentrações 1 - 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A leitura foi feita no espectrofotômetro UV-VIS, em 517 nm. Primeiro determinou-se a absorbância do controle (A_C) medindo-se a absorbância da mistura de 2mL de DPPH 0,004 % (que é violeta) e 1mL de metanol, logo após, da absorbância do branco que consiste de 1 mL do extrato e 2 mL de metanol. Analogamente, a cada uma das soluções dos extratos em análise (1 mL), foram adicionados 2 mL de DPPH. Após 30 minutos iniciaram-se as medidas de absorbância. O teste é feito em duplicata. A IC_{50} , concentração necessária para se alcançar 50 % de decréscimo na absorbância do DPPH, é obtida a partir do gráfico de percentagem de DPPH em função da concentração do extrato (Figura 14). A atividade antioxidante foi determinada em termos percentagem de reação segundo a fórmula $\% \text{inibição} = [(A_A - A_B)/A_C] \times 100$, onde A_A é a absorbância da amostra e A_C é a absorbância do controle negativo no momento do preparo da solução.

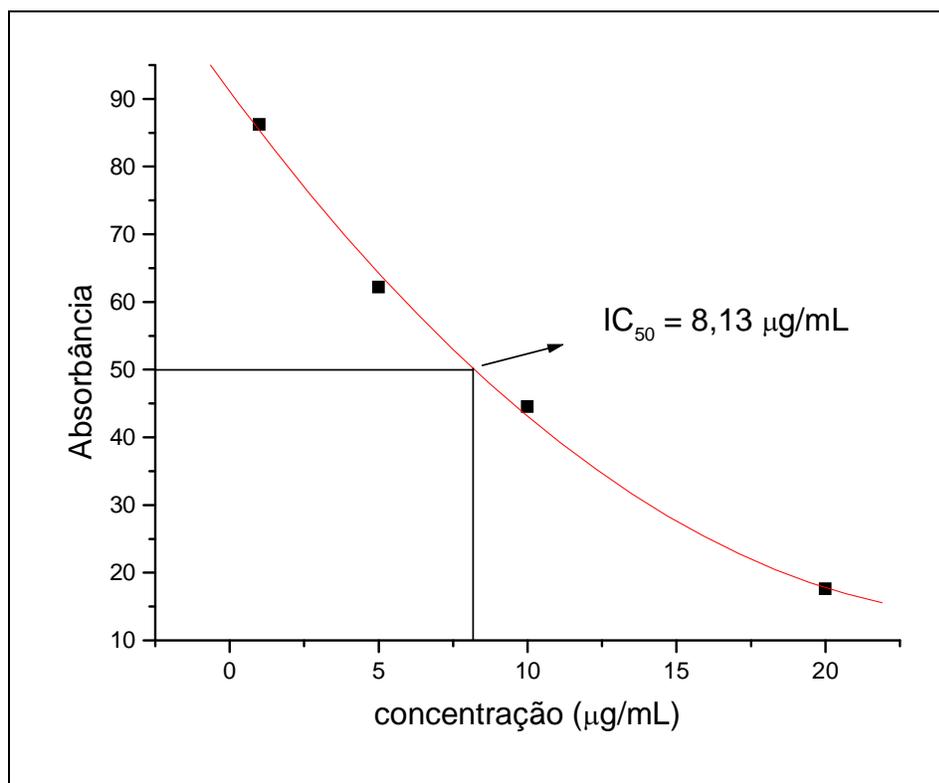


Figura 14: Obtenção da IC_{50} para FRP de *C. celtidifolius*

3.9. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.9.1. ANIMAIS

Nos ensaios com animais foram utilizados camundongos suíços machos, pesando entre 25 e 35 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB – UFSC, em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de pelo menos 24 horas antes da realização dos ensaios.

Os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas de cuidados com animais de laboratório e de uso para estudos sobre dor (Zimmermann, 1983). Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e está cadastrado sob o n° 157.

3.9.2. DROGAS E REAGENTES

- Ácido Ascórbico (Merck, AG Darmstadt, Alemanha)
- Capsaicina (Calbiochen, San Diego, USA)
- Cloridrato de Fenilefrina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)
- Cloridrato de L-Arginina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)
- Cloridrato de Morfina (Merck, AG Darmstadt, Alemanha)
- Dimetilsulfóxido (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)
- Formaldeído (Nuclear, SP, Brasil)
- PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM and phosphate buffer 10 mM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)
- Reserpina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)

As drogas e a fração rica em proantocianidians (FRP) injetadas por via parenteral foram preparadas imediatamente antes do uso em solução salina tamponada (PBS), com exceção da capsaicina, que foi preparada em 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO); o prazosin, que foi dissolvido em 0,2% de dimetilformamida e a reserpina, que foi dissolvida em uma solução contendo 2% de ácido ascórbico. As drogas administradas por via oral foram dissolvidas em água destilada. As soluções foram preparadas em concentrações adequadas para administração de volumes constantes de 10 mLkg⁻¹ (via oral e parenteral). Os animais dos grupos controle receberam os respectivos veículos aos quais as drogas foram dissolvidas.

3.9.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.9.3.1. TESTE DA FORMALINA

O teste de nocicepção induzida pela formalina consiste na injeção intraplantar (i.pl.) de formaldeído 0,92% (formalina 2,5%) na pata posterior direita do animal. Este modelo nos permite avaliar dois tipos de nocicepção: a primeira fase, causada pela ativação direta de nociceptores periféricos (ativando fibras aferentes primárias), e que compreende os 5 minutos imediatamente após a injeção de formalina e a segunda fase, que é uma resposta inflamatória crônica e ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina (Hunskar et al., 1985; Hunskar e Hole, 1987).

O ensaio foi realizado como descrito anteriormente (Shibata et al., 1989), com pequenas modificações (Vaz et al., 1996). Os animais receberam 2,0 mL de formalina 2,5% na superfície plantar da pata posterior direita. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico e observados por 30 minutos. O tempo que os animais despenderam lambendo ou mordendo a pata injetada foi registrado com o auxílio de um cronômetro, e considerado como indicativo de nocicepção.

Com o objetivo de determinar a dose capaz de reduzir a reatividade dos animais em ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina, grupos de animais receberam diferentes doses da fração rica em proantocianidinas (1 – 100 mg kg⁻¹) ou veículo por via i.p., 30 minutos antes da indução da nocicepção.

Para analisar a duração do efeito antinociceptivo no modelo da formalina, grupos de animais receberam a dose que conseguiu inibir 50% da reatividade dos animais (DI50) na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, em diferentes tempos de pré-tratamento (15 – 120 min) por via i.p.

Para investigar um possível efeito antinociceptivo terapêutico da fração rica em proantocianidinas, os animais foram tratados (DI50 para a segunda fase), por via i.p., 5 min após a injeção de formalina, ou seja, ao fim da primeira fase da nocicepção e foram avaliados em relação à segunda fase da nocicepção induzida pela formalina.

3.9.3.2. TESTE DA PLACA QUENTE

O teste da placa quente, descrito por Eddy e Leimback (1953), foi utilizado também com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva da fração rica em proantocianidinas frente a estímulos térmicos. Este modelo consiste na colocação do animal sob uma superfície metálica aquecida a uma temperatura constante. Isto pode evocar dois tipos de comportamento, que consiste em o animal lambar as patas ou pular, que podem ser mensurados em seus tempos de reação. Ambas as reações são consideradas como respostas integradas supra-espinhais (Le Bars, et al., 2001).

Neste ensaio, os animais foram colocados sob uma superfície aquecida a $56 \pm 1^\circ\text{C}$. A medida do lapso de tempo decorrido entre a aplicação do estímulo e a reação de lambar as patas ou pular foi registrada, fornecendo um índice nociceptivo (Michael-Titus et al., 1990). Os animais foram tratados com a fração rica em proantocianidinas nas doses de 100 e 300 mg kg⁻¹, ou morfina, na dose de 10 mg kg⁻¹ por via i.p. e 30 minutos após foram novamente expostos ao estímulo doloroso. Foi adotado tempo máximo de 30 segundos para evitar possíveis danos teciduais. Todos os animais foram testados 24 horas antes do experimento quanto as suas reatividades.

A porcentagem do efeito máximo (P.E.M.) foi calculada da seguinte forma:

$$P.E.M. = \frac{(\text{latência pós - droga}) - (\text{latência pré - droga})}{30 - (\text{latência pré - droga})} \times 100$$

3.9.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO VASO RELAXANTE

3.9.4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, pesando entre 180 e 350 g. Todos os animais permaneceram alojados em gaiolas plásticas, mantidos em temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água.

3.9.4.2. AORTA ISOLADA DE RATO

Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 seguido de exsanguinação feita pela secção da artéria carótida. Após a abertura da cavidade torácica, a aorta foi cuidadosamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica específica para este tipo de preparação, retirando-se os tecidos adiposos e conectivos adjacentes (Andriambelason et al., 1997).

O vaso foi seccionado na forma de anéis de 3 - 4 mm de comprimento, (são necessários 8 a 12 anéis por protocolo experimental). Os anéis foram transferidos para cubas de vidro com volume total de 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,2; KH_2PO_4 0,9; NaHCO_3 25; glicose 11. A solução nutriente foi mantida à 37°C , pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2 . Duas hastes metálicas foram inseridas na luz dos mesmos, sendo uma delas adaptada a um transdutor de tensão isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados SOFT AND SOLUTIONS (KitCad 8). A tensão de repouso das preparações corresponde a 1,0 g e a solução nutriente foi substituída a cada 15 minutos.

Após o período de equilíbrio (60 a 90 minutos) as preparações foram contraídas com fenilefrina (1nM - $3\mu\text{M}$) para verificar a capacidade contrátil dos anéis aórticos. A presença do endotélio funcional foi avaliada pela capacidade de indução acetilcolina (ACh, $1\mu\text{M}$) ao relaxamento das preparações contraídas previamente com fenilefrina. Somente as preparações que apresentaram relaxamento igual ou superior a 80% foram consideradas com endotélio íntegro.

Nos experimentos onde se investigou a relevância do endotélio vascular na capacidade vasorelaxante de extratos, frações e compostos isolados, foi realizada a remoção da camada de células endoteliais (Corrêa et al., 1991). Para este procedimento, uma das hastes utilizadas na montagem dos vasos ao sistema, foi levemente friccionada contra a superfície interna das preparações. A lesão do endotélio vascular foi considerada após a verificação da ausência total de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh $1\mu\text{M}$), em vasos contraídos previamente com fenilefrina. Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução fisiológica e mantidas em repouso por 30 minutos. Em seguida realizou-se a curva concentração resposta à fração e compostos isolados

4. Resultados e discussão

4.1. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE *Croton celtidifolius*

O extrato bruto foi fracionado por partição sólido-líquido com clorofórmio, acetona e acetato de etila, originando as frações solúveis em clorofórmio, acetona, acetato de etila e resíduo aquoso. (Fr - CHCl_3 , Fr – Acet, Fr – AcOEt e Resíduo). As Fr–Acet e Fr–AcOEt. foram submetidas ao procedimento de extração de proantocianidinas desenvolvido em laboratório que consiste na máxima dissolução da fração num volume mínimo de acetona, seguida da adição de água para precipitar as substâncias menos polares. A solução resultante foi filtrada e o resíduo retido no filtro foi descartado. O filtrado foi evaporado para remoção da acetona e logo após foi submetida à técnica de extração líquido-líquido com acetato de etila, resultando nas Fr. AcOEt tratada e Fr. Acetona tratada. A fração, Fr. AcOEt tratada, resultante do procedimento foi rotulada como fração rica em proantocianidinas (FRP). A Fr. AcOEt tratada foi cromatografada em coluna flash, gerando 41 frações, das quais se isolaram 3 compostos e uma mistura de polímeros.

Massa da fração Acetona tratada = 200 mg

Massa da fração Acetato tratada (FRP) = 1,2769 g

4.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FRAÇÕES POR COLUNA FLASH E CCD.

A partir da fração acetato de etila tratada, foram pesadas 100 mg de amostra que foram submetidas a cromatografia em coluna flash com eluente AcOEt 140 : ac. acético 2 : ac. fórmico 1: água 70 utilizando a fase superior. Com isso, obtiveram-se 41 frações e estas foram reunidas, conforme perfil cromatográfico da seguinte maneira: 1 a 8, 9 a 15 e de 16 a 41. O resultado obtido a partir desta união foi o isolamento de compostos sendo eles: composto A, composto B, composto C e fração D.

4.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.3.1 COMPOSTO A

Este composto foi isolado na forma de um sólido branco, amorfo solúvel em acetona. Após sucessivas recristalizações com acetona apresentou uma faixa de fusão de 140 - 144°C. O espectro na região do infravermelho IV (figura 15) mostra absorção forte em 3401 cm^{-1} referente à vibração de O—H, uma banda com absorção representativa em 1628 cm^{-1} relativo à vibração C=C aromático e absorções de menor intensidade na região de 1142 cm^{-1} correspondentes a vibração das ligações C-O. A característica mais relevante, quanto a este espectro é a ausência de uma banda de absorção para carbonila presumindo ser um flavan-3-ol.(figura 15). Os espectros referentes ao composto A são indicativos de uma estrutura flavonoídica

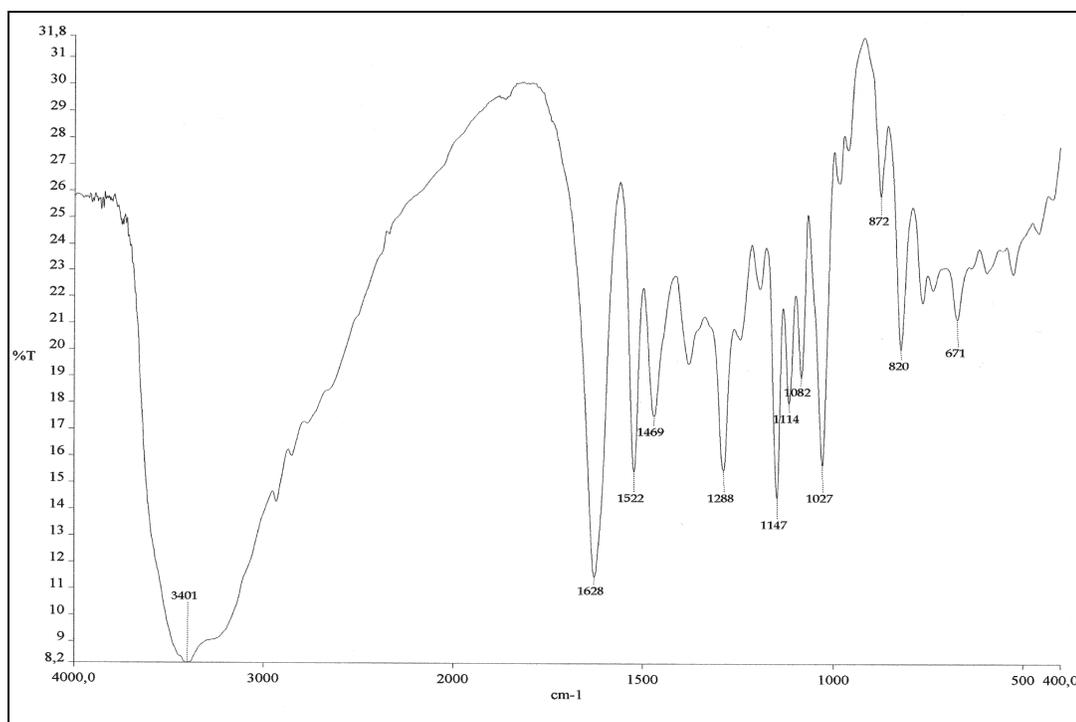


Figura 15: Espectro de IV, em pastilha de KBr, da catequina (A).

No espectro de ressonância nuclear de carbono (RMN ^{13}C) do composto A (figura 16) observa-se quinze sinais que correspondem aos de quinze átomos carbono da estrutura flavonoidica. A ausência de carbono sp^2 de carbonila na região de campo baixo, a presença do sinal em campo alto (27.0 ppm) de carbono

metilênico, e os sinais em 68.82 ppm atribuído a carbono sp^3 ligado a hidroxila e o sinal 82.85 ppm para carbono ligado a um heteroátomo do anel pirano e a um grupo fenil são típicos do anel C de um flavanol. Com isso atribui-se ao anel C uma conformação meia cadeira com o anel B na posição quase exclusivamente equatorial e que o grupo 3-hidroxil esta na posição axial. A elucidação estrutural deste composto fica completa pela existência dos sinais em 147.2 e 147.4 ppm típico de sistema catecol. Portanto, os demais deslocamentos químicos mostrados no espectro de ^{13}C estão apresentados na tabela 3 e permitem definir a estrutura do composto A, sendo a catequina (figura 18).

A catequina (figura 18) possui em sua estrutura 9 hidrogênios carbônicos e 5 hidrogênios hidroxílicos. Dentre os 9 hidrogênios carbônicos 5 são metínicos aromáticos, 2 metínicos carbinólicos e 2 hidrogênios metilênicos. No espectro de RMN 1H (figura 17) observa-se os sinais característicos de hidrogênios aromáticos entre 5.85 e 6.90 ppm. Os dois dupletos com constantes de acoplamentos meta $J = 2.3$ Hz em 5.87 e 6.02 ppm são atribuídos aos hidrogênios dos C-6 e C-8 do anel A de flavonóides. Em seguida encontra-se sinais típicos de sistema catecol constituído de um duplete em 6.89 ppm com $J = 2.3$ Hz do H-2' meta ao H-6', outro duplete em 6.79 ppm com $J = 8.2$ correspondente ao acoplamento orto do H-5' com o H-6', em 6.75 ppm percebe-se um duplo duplete $J = 8.2$ e 2.3 Hz correspondendo ao H 6' acoplando orto com os H-5' e meta com o H-2', respectivamente. Localizado em 4.75 ppm encontra-se um duplete referente ao hidrogênio do C-2 com $J = 7.5$ Hz acoplando com o H-3 o qual aparece como multiplete em 4.00 ppm atribuído aos acoplamentos com os H-4 pseudo-axial e H-4 pseudo-equatorial do C-4. Os hidrogênios metilênicos do C-4 encontram-se em campo alto com maior blindagem sobre seu núcleo em relação aos outros. Os dois duplos dupletos em 2,52 e 2,91 ppm referem-se ao H-4 pseudo-equatorial $J = 8.3$ Hz acoplando com o H-3 e 16.0 Hz acoplando com o H-4 pseudo-axial e este acoplando com o H-3, $J = 5,4$ Hz e também acoplando com o H-4 pseudo equatorial com $J = 16.0$ Hz. Todos os sinais estão representados na tabela 3 comparados com dados da literatura.

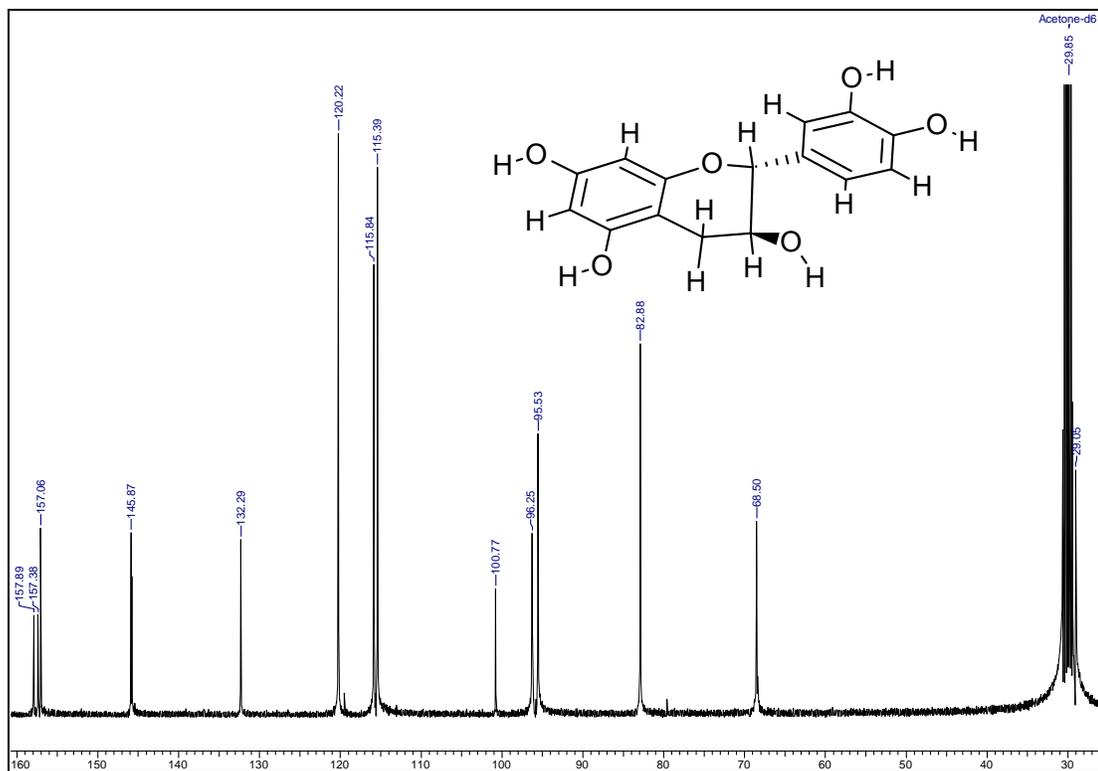


Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C (acetona d_6) da catequina.

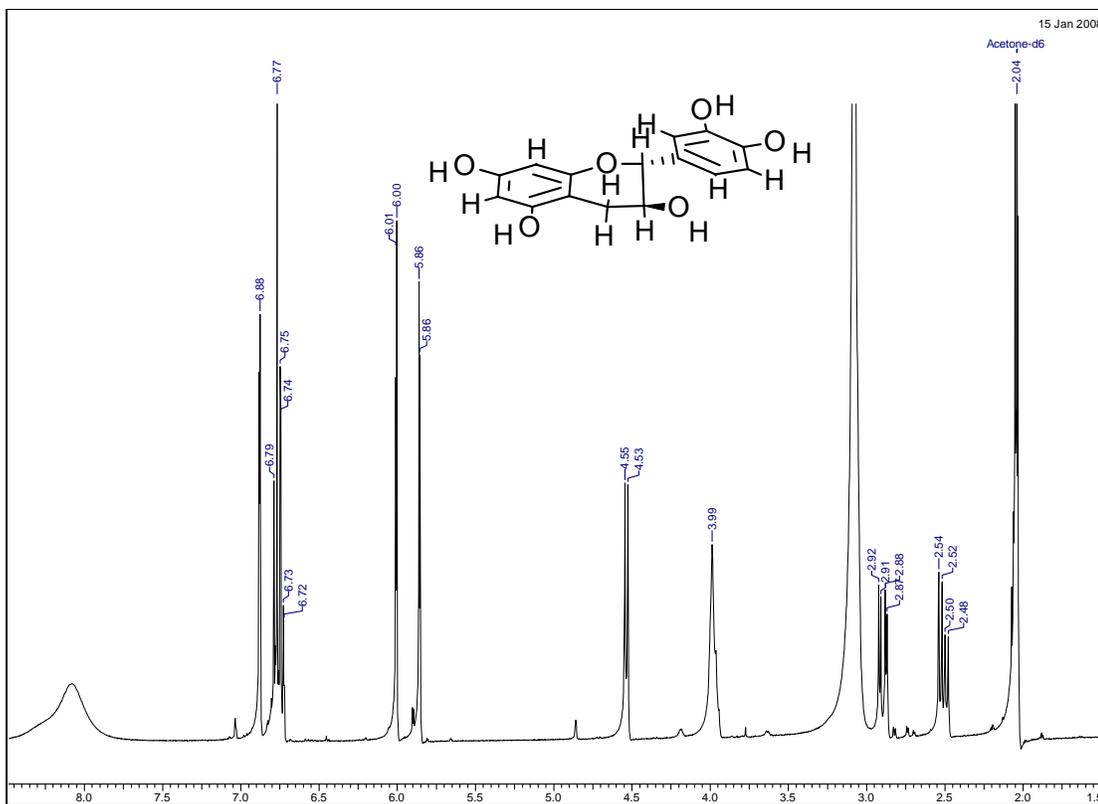


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H (acetona d_6) da catequina

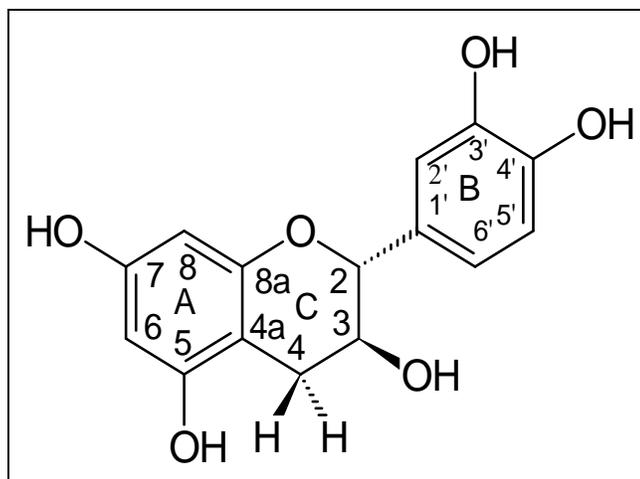


Figura 18: Estrutura do flavan-3-ol catequina.

Tabela 3: Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para catequina

	Composto A		Literatura catequina (CD_3OD) [*]	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C				
2	4.55 (1H, d, $J = 7.4$ Hz)	82.88	4.66 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	83.1
3	4.00 (1H, m)	68.50	4.07 (1H, m)	69.1
4ax	2.90 (1H, dd, $J = 5.4$ Hz, $J = 16.3$ Hz)	29.05	2.94 (1H, dd, $J = 5.4$ Hz, $J = 16.1$ Hz)	28.7
4eq	2.52 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 16.3$ Hz)		2.60 (1H, dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 16.1$ Hz)	
4a		100.77		101.1
5		157.38		158.1
6	6.02 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)	96.25	6.03 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)	96.6
7		157.85		157.8
8	5.87 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)	95.53	5.96 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)	95.8
8a		157.10		157.2
1'		132.29		132.5
2'	6.90 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	115.39	6.93 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	115.5
3'		145.60		146.5
4'		145.87		
5'	6.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	115.84	6.80±6.88 (2H, m)	116.4
6'	6.75 (1H, dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 8.0$ Hz)	120.22		120.3

* Goetz, et al 1999

4.3.2. COMOSTO B

O composto B foi isolado na forma de um sólido marrom, amorfo e solúvel em acetona. A faixa de fusão encontrada foi de 160 - 167°C, após recristalização em acetona. O espectro na região do infravermelho IV assemelha-se ao do composto A de acordo com a figura 15. A ausência de uma banda de absorção atribuída a carbonila é também outro aspecto importante de um flavan-3-ol.(figura 15).

No espectro de RMN ^{13}C (figura 20) do composto B apresenta 13 sinais com seus deslocamentos típicos de estruturas flavan-3-ol. Além do mais, a semelhança de alguns sinais em 28.74, 68.55 e 83.03 ppm dos C-4, C-3 e C-2 do anel C, 95.62 ppm (C-8), 96.30 ppm (C-6), 100.80 ppm (C-4a), 157.11 ppm (C-8a), 157.50 ppm (C-5) e 157.95 ppm (C-7) do anel A e o sinal em 131.9 ppm referente ao C-1' do anel B, sugere uma estrutura algo semelhante a da catequina no entanto, os sinais em 107.44 e 146.50 ppm definem um sistema pirogalol monosubstituído e simétrico, ou seja, aos carbonos C-2' e C-6' (107.44 ppm) e C-3' e C-5' (146.50 ppm), confirmado pelo espectro de ^1H (figura 19), cujo sinal em 6.40 ppm sob a forma de singlete referente a dois hidrogênios comprovando assim se tratar de um flavan-3-ol , galocatequina (figura 21).

O espectro de ^1H (figura 19) confirma estas deduções estruturais, visto que os sinais encontrados são muito similares ao da catequina. Entretanto os sinais em campo baixo são distintos, um singlete em 6.45 ppm distingue este composto da catequina, e é indicativo de um flavan-3-ol constituído de um sistema pirogalol no anel B, denominado galocatequina (figura 21). O singlete refere-se aos H-2' e 6' que são quimicamente e magneticamente equivalentes, ou seja, devido as interações eletronegativas semelhantes exercida pelas hidroxilas do anel pirogalol nos carbonos vizinhos.

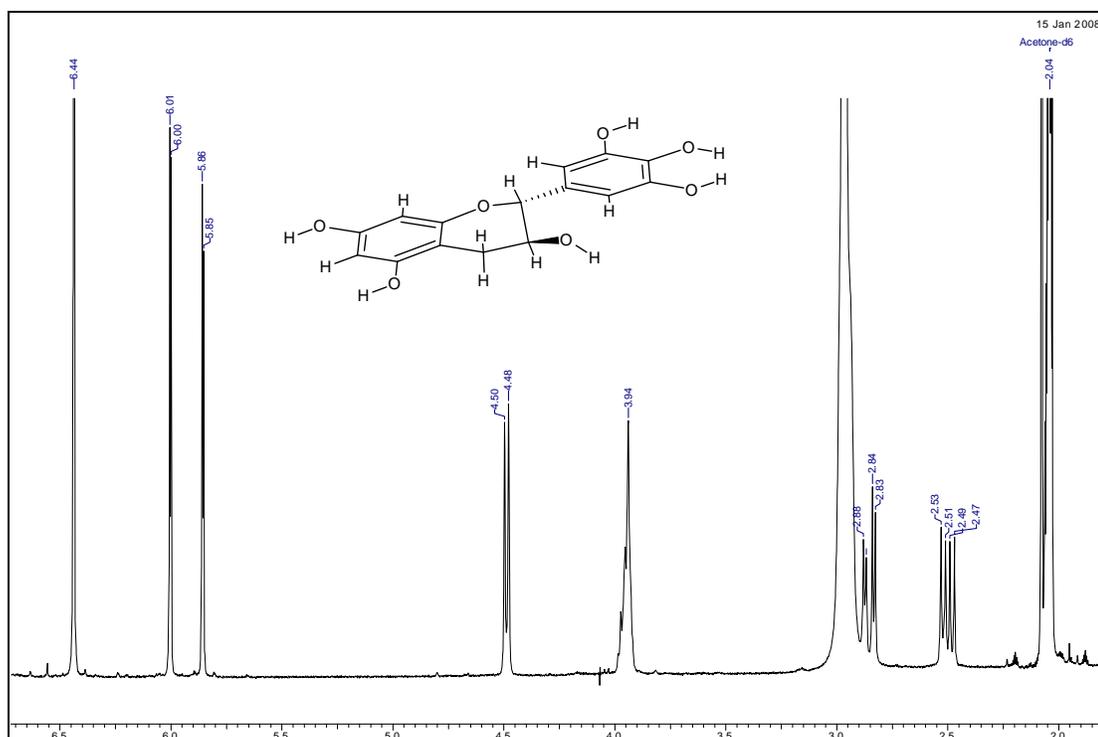


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (acetona d_6) da galocatequina.

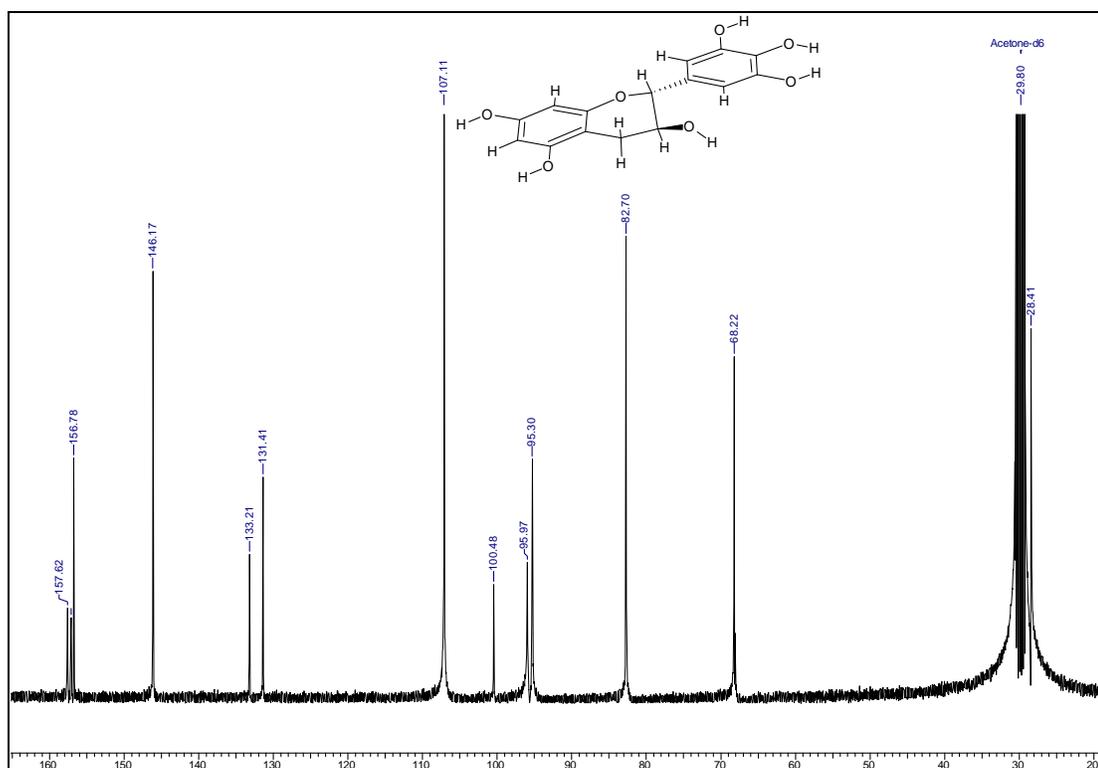


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C (acetona d_6) da galocatequina.

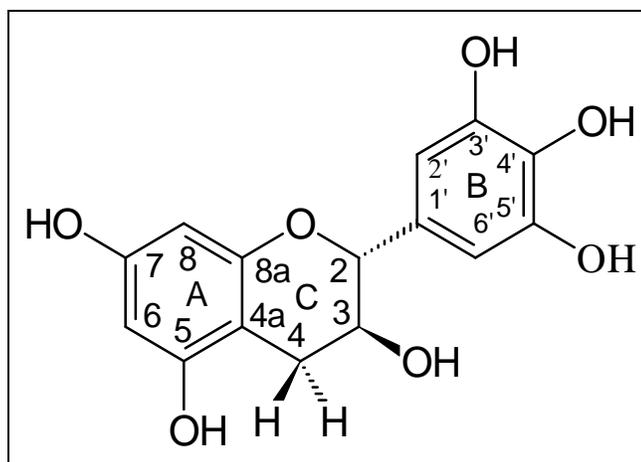


Figura 21: Estrutura do flavan-3-ol galocatequina.

Tabela 4: Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para galocatequina.

C	Composto B		Literatura galocatequina*	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	4.50 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	83.03	4.53 (1H, d, $J = 7.1$ Hz)	83.1
3	3.97 (1H, m)	68.55	3.87 (1H, m)	69.0
4ax	2,86 (1H, dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 16.6$ Hz)	28.74	2,82 (1H, dd, $J = 5.3$ Hz, $J = 16$ Hz)	28.3
4eq	2.52 (1H, dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 16.6$ Hz)		2.52 (1H, dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 16$ Hz)	
10		100.80		101
5		157.47		157.9
6	5.87 (1H, d, $J = 2.6$ Hz)	96.30	5.72 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	96.6
7		157.95		158.1
8	6.02 (1H, d, $J = 2.6$ Hz)	95.62	5.86 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	95.8
8a		157.11		157.1
1'		131.74		131.9
2'	6.46 (1H, s)	107.44	6.39 (2H, s)	107.5
3'		146.50		147
4'		133.54		134.3
5'		146.50		147
6'	6.46 (1H, s)	107.44	6.39 (2H, s)	107.5

* Fan, 2007.

4.3.3. COMPOSTO C

O composto C possui características de uma substância complexa. Os sinais mostrados espectros de RMN de ^{13}C e ^1H (figuras 22 e 23) são indicativos de estruturas diméricas da classe das proantocianidinas já que compreende muitos sinais nas regiões características de aromáticos. Fundamentado no espectro da figura 22 (^{13}C), percebe-se um sinal em 27.58 ppm que pode ser atribuído ao C-4 metilênico da unidade terminal do dímero, além disso pode-se observar no espectro RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (figura 24) o sinal referente a este carbono.

O sinal 37.37 ppm é característico do C-4 metínico, cuja ligação inter flavanóide está presente. Em 67.72 e 72.52 ppm encontram-se os carbonos hidroxilados das duas unidades. É interessante observar a diferença de 5 ppm entre os dois carbonos proporcionada pelo efeito de desproteção anisotrópica do anel aromático da unidade terminal, portanto o sinal 67.72 é da unidade terminal e 72.52 ppm da unidade superior.

Na região correspondente a carbonos oxigenados (81.25-82,91 ppm), percebe-se dois sinais de mesma intensidade atribuídos aos C-2 dos dois fragmentos superior e inferior do dímero. Os sinais entre 114.0 e 120.0 ppm são atribuídos aos carbono metínicos aromáticos e os sinais em 144.2 e 145.2 ppm são os carbonos orto hidroxilados, ou seja, sistema catecol nos anéis B e E de uma procianidina B_4 . A existência de dois sinais bem definidos em 130.65 ppm e 131.43 ppm confirmam a presença das duas unidades do dímero em questão, os quais representam os C-1' dos anéis B e E. Os carbonos com deslocamento químico em campo baixo (153.68 – 156.45 ppm) descrevem a substituição dos anéis A e D. Logo, os C-5 e C-6 estão ligados a oxigênios de hidroxila e o C-8a está ligado ao oxigênio do anel pirano.

Por serem de baixa resolução pode-se observar que o composto C compreende uma mistura composta do dímero catequina-(4 α -8)-epicatequina como constituinte majoritário e do monômero catequina.

A interpretação do espectro de ^1H (figura 23) torna-se difícil e complexa em razão da sobreposição de sinais. Este efeito é ampliado, devido ao isomerismo rotacional (rotâmeros) das várias ligações sigma de que o composto é formado.

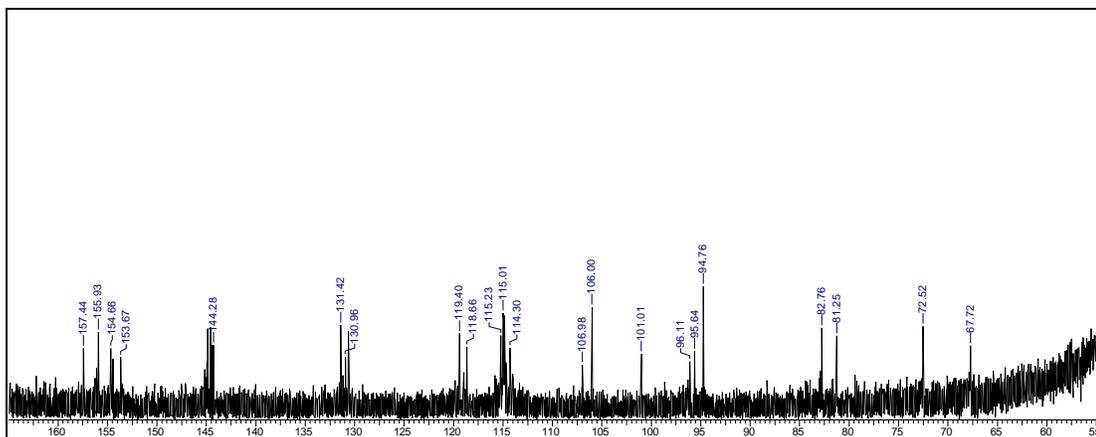


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD) da procianidina B₄ catequina-(4 α -8)-epicatequina.

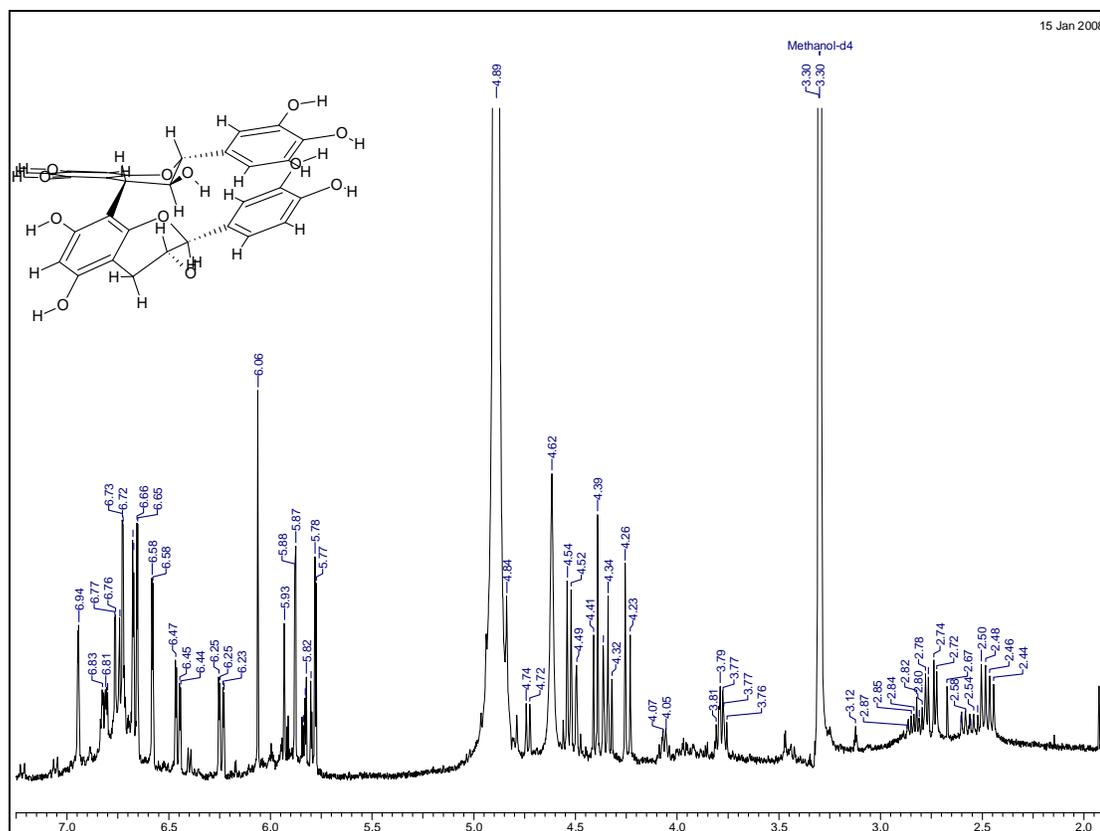


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OH) da procianidina B₄ (catequina-(4 α -8)-epicatequina).

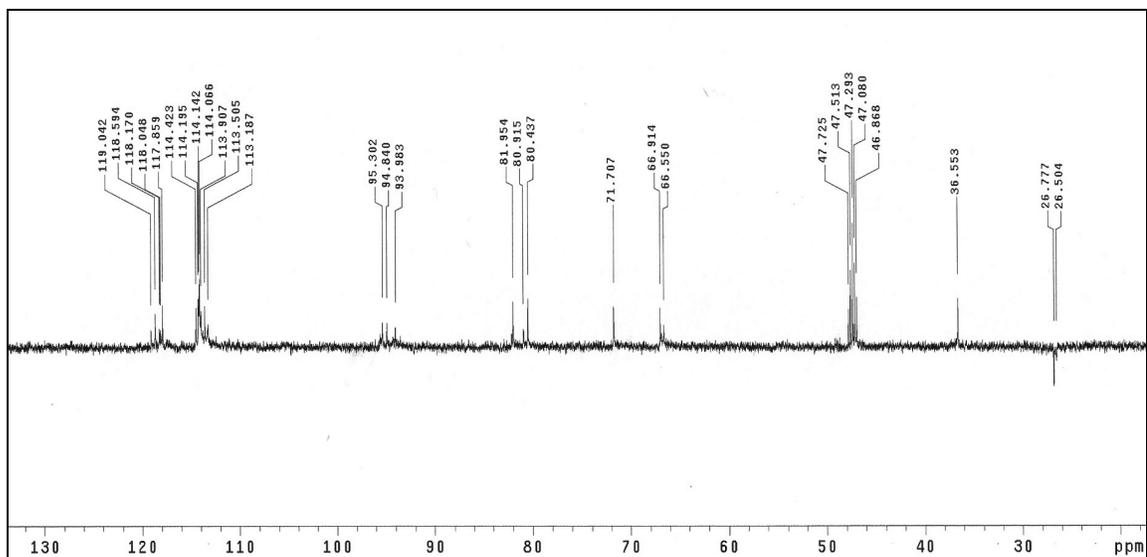


Figura 24: Espectro de RMN¹³C/DEPT (CD₃OD) da catequina-(4α-8)-epicatequina

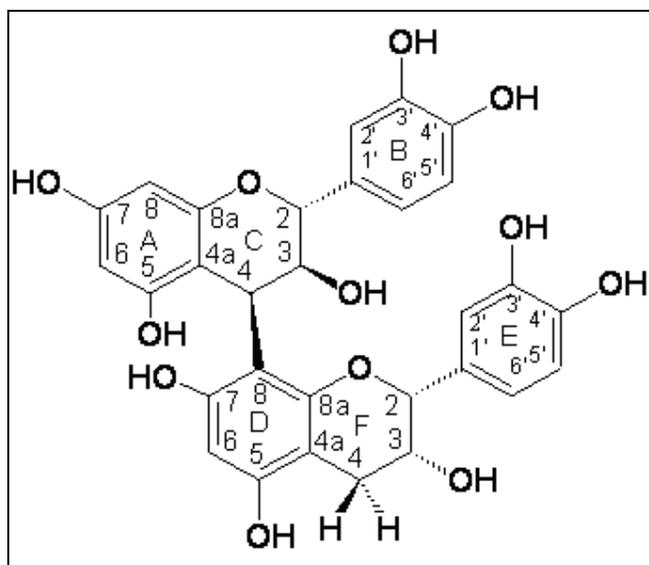


Figura 25: Estrutura da procianidina B-4 catequina-(4α-8)-epicatequina

Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para procianidina B-4.

	C	^a PA epicatequina- (4 β →8)-catequina	^b PA galocatequina- (4 α →8)-catequina	Composto C
superior	2	76.74	83.9	81.25
	3	72.58	73.6	72.52
	4	36.76	38.3	37.37
	4 ^a	100.95	107.4	101.01
	5	155.63	154-158	155.94
	6	96.11	96.3-97.6	95.65
	7	157.40	154-158	157.45
	8	95.54	96.3-97.6	94.80
	8 ^a	155.11		154.67
	1'	132.37	131.7	131.42
	2'	116.06	109	115.22
	3'	145.07	145-146.	144.30-145.20
	4'	145.30		144.30-145.20
	5'	115.77	145-146.	115.00
6'	119.38	109	119.40	
inferior	2	81.77	81.3	82.76
	3	67.76	68.5	67.72
	4	28.40	28.3	27.58
	4 ^a	100.95	101.8	101.01
	5	155.63		155.94
	6	96.93	96.3-97.6	96.12
	7	157.40	154-158	157.45
	8	107.49	109	106.99
	8 ^a	155.11		154.67
	1'	131.95	131.7	130.65
	2'	115.38	115.4-116.7	114.94
	3'	145.07	145-146.	144.30-145.20
	4'	145.30		144.30-145.20
	5'	114.93	115.4-116.7	114.87
6'	119.38	119.9	118.67	
		Acetona d ₆		Metanol d ₄

a – Lu e Foo, 1999.

b – Brandon, 1982.

4.3.4. FRAÇÃO D

Não foi possível identificar a amostra D, pelas condições normais do laboratório e do departamento, por se tratar de uma fração complexa. Esta fração possui características de polímeros entre os quais pode ser destacado: a baixa solubilidade, índice de retenção zero e baixa resolução nos espectros de RMN ^{13}C e ^1H . Além disso, no eletroferograma da fração FRP (figura 26) percebe-se um sinal de

baixa intensidade com uma base larga com tempo de migração 8.80 min é de uma mistura de polímeros. Portanto, técnicas mais sofisticadas como as de submeter a fração D a reações químicas como metilação das hidroxilas ou hidrólise seguida da análise em equipamentos hifenados possam resolver os problemas ocasionados por substâncias polares de alto peso molecular pelas quais seria capaz de identificar, quantificar e sobretudo obter o grau de polimerização destes compostos.

4.3.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR

O procedimento utilizado foi o descrito por Herrero-Martinez (2003) em que utilizava a técnica da derivatização das amostras com cisteína em meio ácido para caracterizar misturas de proantocianidinas, investigar o grau de polimerização e o tamanho molecular destes compostos por cromatografia eletrocínética micelar.

Contudo, a amostra FRP submetida a análise não foi possível obter resultados quantitativos com segurança, como era o esperado, devido à alta complexidade da matriz. O eletroferograma (figura 26) apresentado dá uma visão qualitativa da composição da fração rica em proantocianidinas. O eletroferograma apresenta duas substâncias majoritárias, catequina e galocatequina bem como a identificação de dois dímeros, um deles a catequina-(4 α -8)-epicatequina e a presença de proantocianidinas poliméricas.

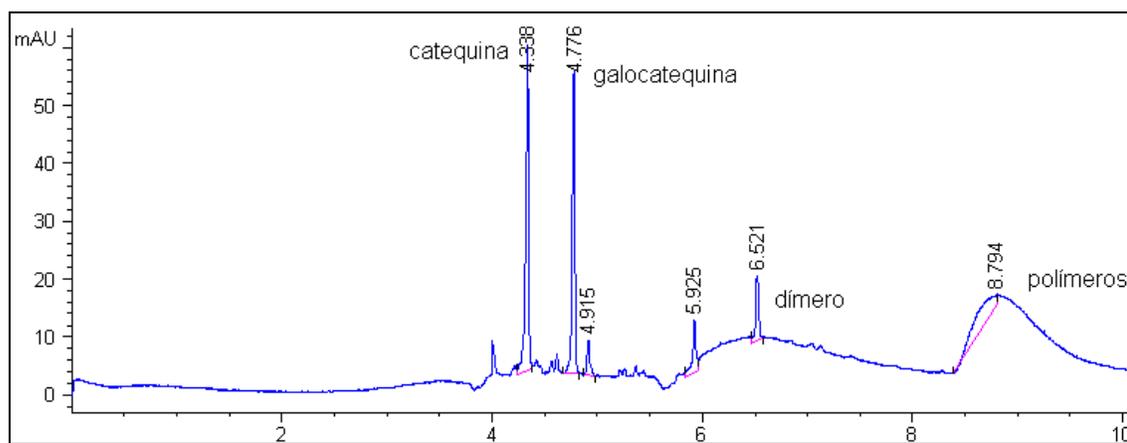


Figura 26: Eletroferograma da FRP.

4.3.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS POR ANÁLISE COLORIMÉTRICA PELO MÉTODO DA BUTANÓLISE

Este método fundamenta-se numa reação colorimétrica com intensa absorção em 550 nm, após tratamento com ácido. A clivagem ou a depolimerização oxidativa de taninos condensados formam antocianidinas evidenciando a labilidade da ligação C₄—C₈ (Schofield et al., 2001). A reação é mostrada na figura 28.

Detalhando esta reação é possível verificar que a decomposição de proantocianidinas catalisada por ácido produz cianidinas da parte superior do dímero e um flavan-3-ol da unidade terminal. Esta reação acontece pela protonação do anel D da unidade terminal do dímero, estabelecendo uma ressonância para estabilizar o carbocátion. Posteriormente há a ruptura da ligação entre flavan para estabilizar o íon, por conseguinte o dímero fragmentado forma um monômero (unidade terminal) e a cianidina (unidade superior). A unidade superior em forma de carbocátion perde próton gerando flavan-3-ene, este sofre oxidação fornecendo antocianidina de cor vermelha (figura 28) (Haslam, 1975).

Em meio ácido, alcoólico e a quente, as proantocianidinas caracterizam-se pela liberação de antocianidinas, devido à ruptura das ligações estabelecidas entre as unidades monoméricas. As antocianidinas liberadas para o meio poderão ser a pelargonidina, a cianidina ou a delphinidina, conforme for o grau de hidroxilação do anel "B".

O produto da reação é a formação quantitativa de antocianidinas, resultado da quebra das ligações interflavona pelo ácido (ligações 4 → 6 (C—C) e 4 → 8 (C—C), sendo a primeira mais resistente). Estes compostos possuem uma coloração vermelha cuja densidade ótica é proporcional a quantidade de proantocianidinas nas amostras, obedecendo a Lei de Lambert-Beer. Procedeu-se a leitura de uma amostra (Fr. AcOEt) na região UV-Vis para confirmação da absorção em 550 nm. Portanto as densidades óticas das amostras foram lidas no comprimento de onda 550 nm (figura 27).

Os resultados da análise de proantocianidinas na tabela 6 demonstram sua grande concentração nos extratos desta espécie de *Croton*, principalmente nas

frações AcOEt 74,43% e Acetona 69,67% submetidas ao tratamento alternativo desenvolvido no laboratório.

Tabela 6: Teor de proantocianidinas totais nas frações de *C. celtidifolius*.

Frações	%PA $\lambda = 551 \text{ nm}$
Aquoso	3,45
Fr. AcOEt	23,30
Fr. Acetona	29,46
Fr. AcOEt tratada	74,43
Fr. Acetona tratada	69,67
Dímero	47,75
Polímero	75,65

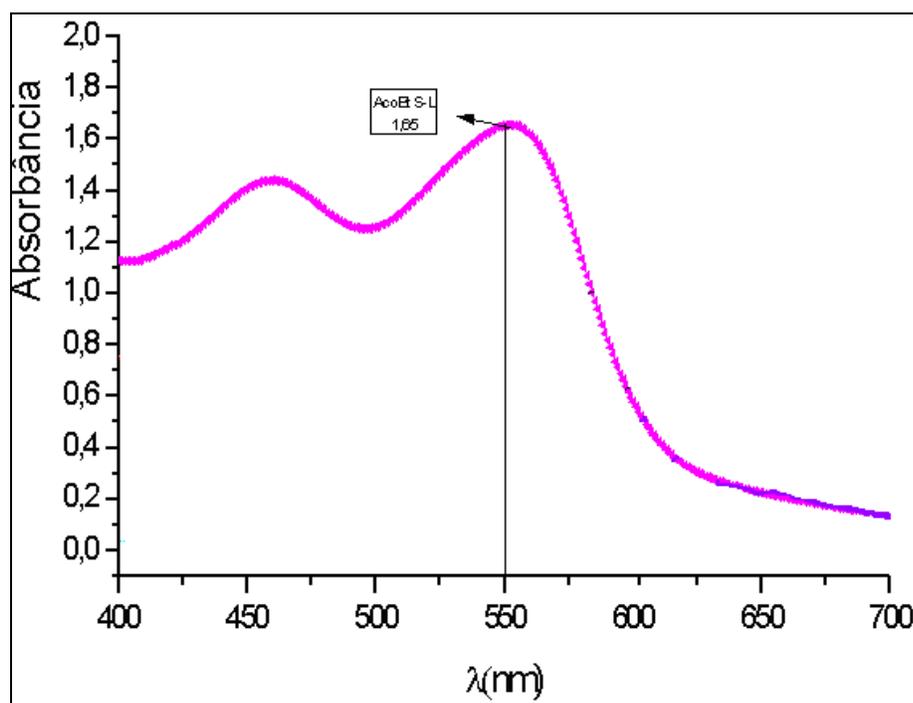


Figura 27: Espectro de absorção na região UV-Vis da Fr. AcOEt.

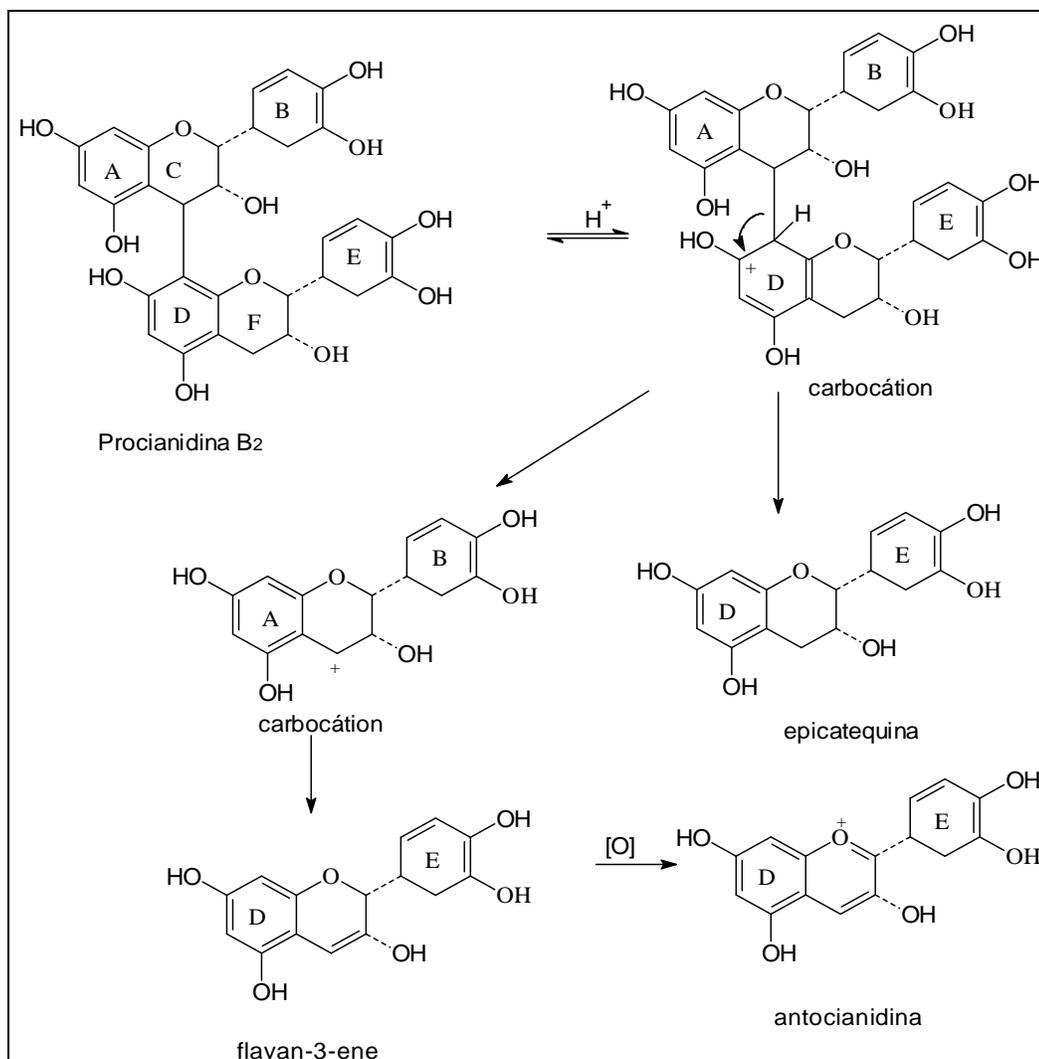


Figura 28: Decomposição catalisada por ácido de uma procianidina B-4.

4.3.7. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS.

O teste de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação de oxidação-redução em que os íons fenolatos são oxidados, enquanto os reagentes fosfotungístico-fosfomolibídico são reduzidos. A produção de um cromóforo de cor azul é atribuída ao complexo fosfotungístico-fosfomolibídico de estrutura indefinida e o mecanismo químico desta reação não é bem compreendido (Shofield et al., 2001). A concentração dos compostos fenólicos nas frações é proporcional a intensidade da cor azul.

O ensaio para flavonóides totais com $AlCl_3$ é determinado pela formação de complexos estáveis que absorvem em 415 nm. A formação do complexo deixa a

solução verde-escura. Quanto maior a concentração de flavonóides no extrato ou fração maior será a intensidade da coloração, podendo desta forma ser quantificado pela intensidade de absorção no UV-VIS.

A tabela 8 apresenta os resultados dos teores de fenólicos e flavonóides totais nas frações do particionamento de *C. celtidifolius*. A quantidade de compostos fenólicos totais na fração acetona tratada mostrou ser a mais intensa em relação as demais frações, equivalendo a 473,82 mg em termos de ácido gálico / g de fração, porém constatou-se que o resíduo tem quantidades inferiores, 257,75 mg em termos de ácido gálico / g de fração, em comparação com as outras frações.

Tabela 7: Teor de fenólico totais e flavonóides das frações de *C. celtidifolius*

	Fenólicos totais (mg /g) ^{a,b}	Flavonóides (mg /g) ^{a,c}
Fração acetona	462,21±3,07	4,34±0,02
Fração acetato de etila	452,50±2,59	2,06±0,01
Resíduo Aquoso	257,75 ±1,43	7,79±0,03
Fração Acetona tratada	473,82±0,20	6,19±0,05
Fração AcOEt tratada	438,38±5,88	4,25±0,02

^aValor é a média ± o desvio padrão

^bEquivalente de ácido gálico

^cEquivalente de quercetina

Por outro lado a avaliação de flavonóides totais foi observado maior quantidade no resíduo aquoso, compreendendo 7,79 mg em termos de quercetina/ g de fração. Entretanto, podê-se observar que esta espécie do *Croton* não é tão rica em flavonóides, para o teste de complexação com AlCl₃, pois, variaram de 2,06 - 7,79 mg em equivalente de quercetina/ g de fração no resíduo motivo, pelo qual esta planta tem maior teor de flavan-3-ol que não são capazes de formar complexos tão estáveis quanto os flavonóis. Apesar do método colorimétrico para determinação de flavonóides totais, através do AlCl₃, ser rápido e prático, não é um método preciso, pois o efeito batocrômico da absorção causado pelo complexo com Al³⁺ não é uniforme para todos os flavonóides. Isto porque a formação de quelatos entre o Al³⁺

e os flavonóides ocorre de forma diferente, dependendo da estrutura do flavonóide (Jurd e Geissman, 1956).

Dois sítios de complexação de íons metálicos nos flavonóides podem ser observados: estruturas com grupos *o*-difenólicos 3',4'-dihidroxi no anel B (grupo catecol), estruturas em que há carbonila, ou seja, grupos 4-ceto, 3-hidroxi ou 4-ceto e 5-hidroxi (quercetina) no anel C (Rice-Evans et al., 1995). O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, as bandas deslocam-se no sentido de maiores comprimentos de onda (Jurd e Geissman, 1956). Desta forma, dependendo da composição de flavonóides os resultados podem ser sub ou super estimados.

4.3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

Estudos de flavonóides quanto sua capacidade de captura de radicais livres (figura 29) permitem caracterizar os principais componentes fenólicos que ocorrem naturalmente como antioxidantes. Trabalhos recentes têm evidenciado o nível do potencial fotoquímico destes compostos, incluindo os fenil propanóides e ácidos fenólicos. Os polifenóis, entre eles proantocianidinas, possuem uma estrutura química ideal para combater radicais livres e tem se mostrado mais efetivos que os antioxidantes usuais. As propriedades químicas dos polifenóis como agentes redutores na forma de doar hidrogênio ou doar elétrons prediz seu potencial de ação como seqüestrador de radicais livres (Rice-Evans et al., 1995).

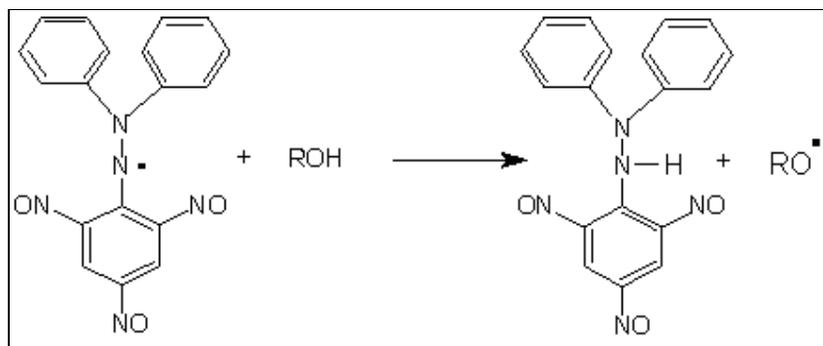


Figura 29: Reação do radical livre representado pelo DPPH com fenol (ROH).

Os resultados obtidos para o seqüestro do radical livre DPPH para as frações e compostos isolados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Avaliação da captura de radicais livres DPPH

Frações <i>Croton celtidifolius</i>	DPPH mg de fração/ mg AA
AcOEt	19
Acetona	20
FAq	3,38
FAcetona tratada	8,43
FAcOEt tratada	8,13
Catequina	3,2
Galocatequina	
Dímero	
Polímero	3,80
Ácido gálico	2,10

Conforme demonstrado na tabela 8, o composto isolado catequina $IC_{50} = 3,2$ $\mu\text{g/mL}$ do procedimento cromatográfico se mostrou com maior atividade antioxidante valor semelhante a substância referência ácido gálico $2,10$ $\mu\text{g/mL}$, conhecida pela sua atividade antioxidante.

As frações acetona e AcOEt tratadas apresentaram atividade antioxidante semelhante $8,43$ e $8,13$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Este ensaio confirma os resultados mostrados com relação aos fenóis totais, já que proantocianidinas são compostos fenólicos de ampla atividade antioxidante.

4.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1. TESTE DA FORMALINA

A injeção intraplantar de 20 μL de formalina $2,5\%$ (formaldeído $0,92\%$) na pata posterior direita de camundongos induziu um quadro nociceptivo intenso com duas fases bem definidas.

O tratamento de camundongos com FRP por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de formalina, reduziu de maneira dependente da dose o tempo de reação dos animais tanto na primeira (Figura 30 A), quanto na segunda fase (Figura 30 B) da nocicepção causada pela formalina. Entretanto a FRP mostrou-se mais potente na segunda fase, uma vez que a DI_{50} na primeira fase foi de $36,0$ ($24,4 - 53,0$) mg/kg , enquanto que na segunda fase foi de $11,2$ ($8,8 - 14,3$) mg/kg . Além disso, a FRP causou inibição de 83% e $99,5\%$, da primeira e da segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, respectivamente.

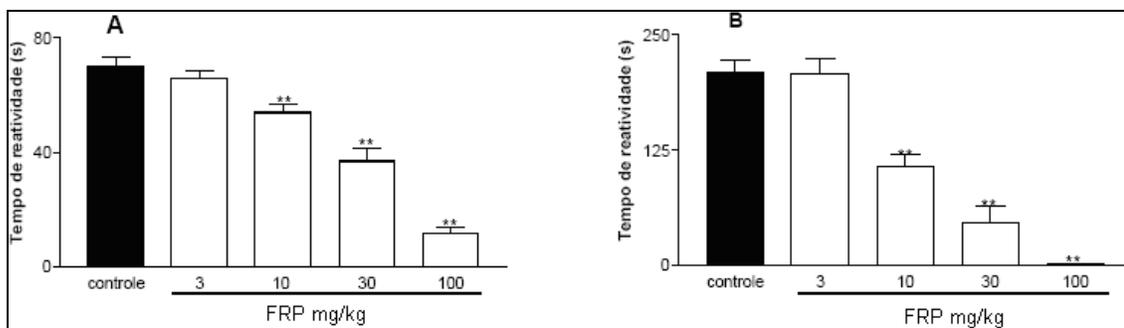


Figura 30: Efeito antinociceptivo causado pela FRP (0,3 – 100 mg.kg⁻¹, i.p.), administrada 30 minutos antes, em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 2,5% em camundongos. O grupo controle recebeu apenas veículo. Cada barra representa a média do tempo de reatividade (s) de 6-10 animais e as linhas verticais os E.P.M. ***p* < 0,01 representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparado com o grupo controle.

4.4.2. TESTE DA PLACA QUENTE

A Figura 31 demonstra que o tratamento dos animais com FRP (100 e 300 mg.kg⁻¹, i.p.) também aumentou de maneira significativa a latência dos animais quando avaliados no teste da placa quente. Da mesma forma, os animais tratados com morfina (10 mg.kg⁻¹, i.p.), 30 minutos antes, causou marcado efeito antinociceptivo neste teste.

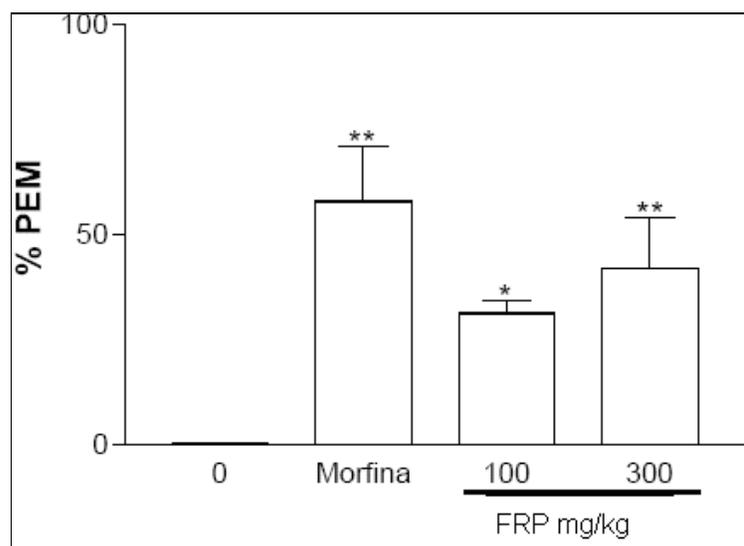


Figura 31: Efeito antinociceptivo da FRP (100 e 300 mg.kg⁻¹, i.p.) ou morfina (10 mg.kg⁻¹, i.p.), administrada 30 minutos antes do teste da placa quente em camundongos. Cada barra representa a média de 6-10 animais e as linhas verticais os E.P.M. **p* < 0,05; ***p* < 0,01 representa as diferenças estatisticamente significativas entre as medidas antes e depois do tratamento com FRP e morfina. %PEM representa a Porcentagem do Efeito Máximo da atividade antinociceptiva produzida pelas drogas.

4.4.3. EFEITO VASORELAXANTE

Substâncias com atividade vasorelaxante podem reduzir a pressão arterial por promover um aumento no calibre dos vasos. Atualmente tem sido muito discutido a ação de substâncias que promovem dilatação por ativar o relaxamento de forma dependente do endotélio. O que é caso da FRP, já que a mesma promove efeito vasorelaxante, concentração dependente no modelo de aorta isolada de ratos (vasos de grande calibre). Neste modelo, observamos o relaxamento com auxílio de um aparelho que permite medir a tensão do vaso, que representa diretamente se o vaso está mais contraído ou mais relaxado,

A fração apresenta efeito vasorelaxante, dependente do endotélio funcional, já que com a retirada do endotélio praticamente desaparece o efeito relaxante (figura 32).

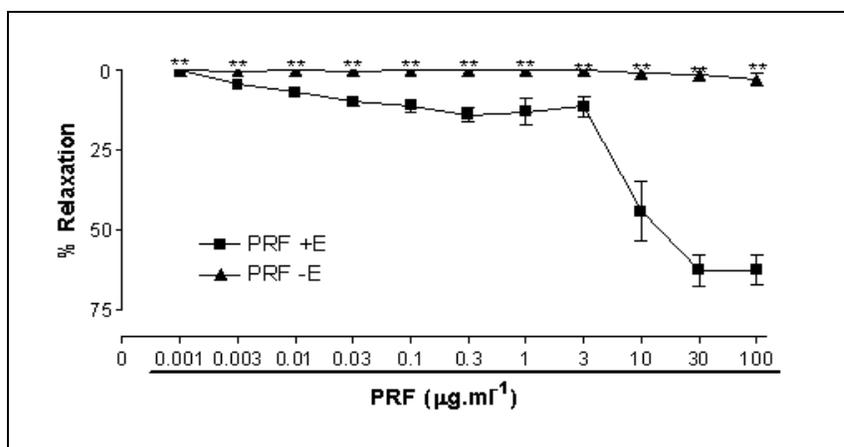


Figura 32: Curva concentração-resposta de PRF induzida vasodilatação (0,01 – 100 µg.mL⁻¹) em aorta isolada pré-concentrada com Phe (1 µM) em preparações com endotélio intacto (+E) e endotélio (-E). Valores representando a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de pelo menos seis experimentos. *p<0.05, **p,0.01 são diferenças significativas dos grupos, quando comparado com o grupo controle.

Foram testadas também substâncias isoladas neste mesmo modelo. As concentrações utilizadas foram equivalentes às concentrações de cada composto na FRP. Foi observado que nenhum dos compostos apresenta efeito equivalente ao da fração rica em proantocianidinas, apresentando efeito apenas nas concentrações mais altas (dímero). Os monômeros e polímeros não apresentaram efeito. Isso sugere que a atividade da fração deve ser um somatório dos efeitos dos compostos isolados, ou seja, efeito sinérgico e ou aditivo entre os monômeros, dímeros e polímeros.

5. CONCLUSÕES

- A espécie vegetal *Croton celtidifolius* se apresenta como uma importante fonte de compostos que possuem atividades biológicas, visto que as frações apresentaram atividades antioxidante, antinociceptiva e vasorelaxante, objeto deste estudo.
- A espécie *Croton celtidifolius* assume uma posição quimiotaxonomica baseada no grande acúmulo de catequina, galocatequina, proantocianidinas diméricas e poliméricas
- As cascas de *Croton celtidifolius* possuem elevado teor de compostos fenólicos totais, proantocinidinas totais e um baixo teor de flavonóides.
- O composto isolado catequina $IC_{50} = 3,2 \mu\text{g/mL}$ do procedimento cromatográfico se mostrou com maior atividade antioxidante cujo valor se revela semelhante a substância referência ácido gálico $2,10 \mu\text{g/mL}$, conhecida pela sua atividade antioxidante.
- O fracionamento líquido-sólido, seguido do procedimento elaborado para isolamento de compostos fenólicos possibilitou a obtenção de frações ricas em proatocianidinas (FRP).
- A análise por eletroforese capilar demonstrou qualitativamente a presença de duas substâncias majoritárias, catequina e galocatequina bem como a identificação do dímero catequina-(4 α -8)-epicatequina e a presença de polímeros.
- Foram isolados catequina, galocatequina e catequina-(4 α -8)-epicatequina obtidos da FRP a partir das cascas de *Croton celtidifolius*, os quais tiveram suas estruturas confirmadas através do uso de métodos espectroscópicos e cromatográficos.
- Não foi possível identificar a amostra D, utilizando as técnicas disponíveis, embora tenha sido possível verificar que este é uma mistura de proantocianidinas poliméricas.
- A FRP apresentou excelente atividade antinociceptiva pelo teste da formalina e também aumentou de maneira significativa a latência dos animais quando avaliados no teste da placa quente, resultado idêntico aos animais tratados com morfina.

- No teste do efeito vasorelaxante observou-se que a FRP promove um aumento no calibre dos vasos. Estas substâncias responsáveis pela atividade vasorelaxante podem reduzir a pressão arterial. A atividade da FRP deve ser um somatório dos efeitos dos compostos isolados, ou seja, efeito sinérgico e ou aditivo entre os monômeros, dímeros e polímeros, já que os ensaios dos compostos individuais não apresentaram atividade frente a este modelo.

6. bibli iografia

- AMARAL, A.C.F.; BARNES, R.A. Alkaloids of *Croton celtidifolius*. *Planta Medica*. v.63, p.485 1997.
- AXT, E.M. MUKHERJEE, R. Ciclitols from *Croton celtidifolius*. *Phytochemistry*. v.23, p.2682-2684. 1984.
- AZEVEDO, S.K.S. E SILVA I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, *Acta bot. Brás;* v. 20, n. 1, p. 185-194. 2006.
- BABILI, F.EL.; FABRE, N.; MOULIS, C., et al. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fitoterapia*, v.77, 2006, p.384-387.
- BOUCHET,N; BARRIE, R,L; FAUCONNEAU, B, Radical scavenging activity and antioxidant proprieties of tannins from *Guiera senegalensis*,(Combretacea) *Phytotherapy research*, v. 12, 1998, p. 159.
- BRANDON, M.J.; FOO, L.Y.; PORTER, L.J.; et al.Proanthocyanidins of barley and sorghum; composition as a function of maturity of barley ears. *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, 1982, p. 2953-2957.
- BUSATO, O. *Hipertensão Arterial*. 2001 Disponível em: < www.abcdasaude.com.br/artigo.php?244 > Acesso em: 29 jan. 2008.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M., et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, v.148, n. 3-4, 2007, p.288-294.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos, In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.
- CAVIN, A., POTTERAT, O., WOLFENDER, J.L., HOSTETTMANN, K., LC-UV-MS and LC-NMR of an anti-oxidant fraction from *Orophea enneandra* and the isolation of a polyacetylene, lignans and a tocopherol derivative, *Journal of Natural Products*,v. 61, 1998, p.1497.
- CECHINEL, V. FILHO e YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, *Química Nova*; v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CRAGG, G.C.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*., v. 60, 1997, p. 52-60,.
- DALBÓ, S. *Avaliação da atividade antinociceptiva da subfração 63 (SF63) obtida a partir das cascas da Croton celtidifolius (EUPHORBIACEAE) – estudo do*

mecanismo de ação. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. 88f 2004.

DALBÓ, S.; JÜRGENSEN, S.; HORST, H., et al. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 57, 2005, p. 765-771.

DALBÓ, S.; PIZZOLATTI, M.G.; HORST H., et al. 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, n. 2, 2006, p. 317-323.

DE SIQUEIRA, R.J.B.; MAGALHÃES, P.J.C.; LEAL-CARDOSO, J.H., et al. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. *Life Sciences*, v.78, n.20, 2006, p.2365-2372.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Syntetic analgesics II. Dithienil-butenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 107, 1953, p. 385-393.

ELISABATSKY, E.; DE SOUZA, G.C.. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.

FAN, J., DING, X., GU, W. Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, v. 102, 2007, p.168–177

FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: Editora UNESP, 1995.

FOGLIO, M.A.; Queiroga, C.L.; Oliveira Sousa, I.M.; Ferreira Rodrigues, R.A. *Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar*. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf> Acesso em: 09 nov. 2007.

FONTES, H. A. F. *National Heart, Lung, and Blood Institute*. Pressão Alta ou hipertensão arterial. 2005. Disponível em: < www.copacabanarunners.net/pressao-alta.html> Acesso em: 29 jan. 2008.

GOETZ, G., FKYERAT, A., MÉTAIS, N., KUNZ, M., et al. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase *Phytochemistry*, v. 52, 1999 p. 759–767

GUTFINGER, T; *Polyphenols in olive oils*. *J. Am Oil Chem Soc* v.58, 1981 p. 966-968.
HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, 1987, p. 103-14.

HASLAM E. Natural Proanthocyanidins, In; HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. *The Flavonoids*. Part 1 New York/San Francisco. Academic Press, 1975.

- HERRERO-MARTINEZ, J.M.; RÀFOLS, C.; ROSÉS, M., et al. Micellar electrokinetic chromatography estimation of size and composition of procyanidins after thiolysis with cysteine. *Electrophoresis*, v. 24, 2003, p. 1404-1410.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods*, v.14, 1985, p. 69-73.
- JOLY, A.B. Botânica Introdução à taxonomia vegetal. v. 4, 11ed. São Paulo: *Companhia Editora Nacional*, 1993.
- JURD, L.; GEISSMAN, T.A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *Journal of Organic Chemistry*, v. 21, 1956, p. 1395-1401.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Prarmacol. Rev.* v..53, 2001, p. 597-652.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, v. 353(9164), 1999, p. 1607-9.
- LOPES E LOPES, M.I.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S., et al. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, n.2-3, 2004, p.437-445.
- MARC, F.; DAVIN, A.; DEGLÈNE-BENBRAHIM, L., et al. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medicine/Sciences*, v. 20, 2004, p. 458-463.
- MICHAEL-TITUS, A.; BOUSSELMAME, R.; COSTENTIN, J. Stimulation of D2 receptors induces an analgesia involving an opioidergic but non enkefalinergic link. *Eur. J. Pharmacol.* v. 187, 1990, p. 201-207.
- MONTANARI, C.A. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva No Desenvolvimento da Farmacoterapia. *Química Nova*, Brasil, v. 18, p. 56-64, 1995.
- MONTANARI, C.A. Química Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, Brasil, v. 24, p. 105-111, 2001.
- NARDI, G.M. *Avaliação da atividade antioxidante, antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto, frações, sub-frações e compostos isolados da Croton celtidifolius. Florianópolis.* Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. 150f. 2002.
- NARDI, G.M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S., et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*. v.10, 2003, p.176-184.
- NARDI, G.M.; DALBÓ S.; DELLE MONACHE, F., et al. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 1, 2006, p. 73-78.
- NARDI, G.M.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.G., et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine*. v.14, 2007, p.115-122.

- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.
- PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. *Phytochemistry*, v. 25, 1986, p. 223.
- QUETIER-DELEU, Gressier, B; VASSEUR, J. DINE, T; BRUNET, C; LUYCKX, MC; CAZIN, JC; BAILLEUL, F; TROTIN, F; *Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculent Moench) Hull and flour. J.ethnopharmacol* v.72, 2000, p. 35-42.
- RAO, V S.; GURGEL, L.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P., et al. Dragon's blood from Croton urucurana (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.113, n.2, 2007, p.357-360.
- REIS, M.S. dos; MARIOT, A.; STEENBOOK, W. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.J.; BOLWELL, G.P., et al. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic. *Free Radical Research*, v. 22, 1995, p. 375-383.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolics compounds. *Trends in plants science*, v. 2, n. 4, 1997, p. 152-160.
- SALATINO, A.; WOISKY, R.G.; MARCUCCI, M.C. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Disponível em: < <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm> > Acesso em: 11. dez. 2007.
- SANTOS, S.daC.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, 2001, p. 21-40.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J.; KLEIN, R.M. Euforbiáceas in: *Flora Ilustrada Catarinense*. 408p. 1998.
- SILVA, S.R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L.H. DE.; MARTINS, M.V.M. Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos Gerais Sobre Legislação e Comércio. 2001. Disponível em: <<http://www.traffic.org/content/439.pdf>> Acesso em: 11 nov. 2007.
- SINGLETON, V. L. ET AL. Colometry of total phenolic with phosphomoliddic – phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, 1965, p. 144-149.
- SCHEPARTZ, S.A.; CRAGG, G.M.; SUFFNEZ, M.; GREVER.M.R. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the lager- scale production of novel natural

- product anticancer and anti – HIV agents. *Journal of Natural Product*, v. 56, 1993, p. 1657-1668.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. v.38, 1989, p. 347-52.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, 2002, p. 71-81.
- STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, v. 43, n. 14, 1978, p. 2923-2925.
- SUÁREZ, A.I.; BLANCO, Z.; COMPAGNONE, R.S., et al. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105, n.1-2 2006, p.99-101.
- TITS, M.; POUKENS, P.; ANGENOT, L.; et al. Thin layer chromatographic analysis of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves. *Journal of Pharmaceutical e Biomedical Analysis*, v. 10, nos. 10-12, 1992, p. 1097-1100.
- UNICAMP. Disponível em <<http://www.cpqba.unicamp.br>> Acesso em 11 nov. 2007.
- UNL-Universidade Nova de Lisboa. Disponível em <<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qpn1/molweb/2004/proantocianidinas/Biosintese.htm>> Acesso em 11 dez. 2007.
- VAZ, Z.R. FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.278, 1996, p. 304-12.
- YUNES, R.A.; CECHINEL, V. FILHO. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B., *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó-SC, Editora Argus, 2001.
- ZHANG, H.; SUN, Y.; WANG, X. Electronic effects on O-H próton dissociation energies of phenolic cation radical: A DFT study. *Journal Organic Chemistry*, v. 67, 2002, p. 2709-2712.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, 1983, p. 109-110.
- ZUANAZZI, J.A.S; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003