

CAMILA GRAÇA PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE *Croton urucurana* BAILLON**

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2018

CAMILA GRAÇA PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* DE *Croton urucurana* BAILLON**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2018

T

P654c  
2018 Pinheiro, Camila Graça, 1989-  
Caracterização fitoquímica e atividade antioxidante *in vitro*  
e *in vivo* de *Croton urucurana* Baillon / Camila Graça Pinheiro.  
– Viçosa, MG, 2018.  
xi, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Croton urucurana*. 2. Plantas - Análise. 3. Extratos vegetais. 4. Enzimas. 5. Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

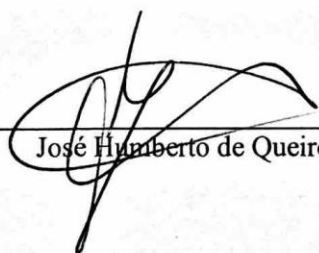
CDD 22 ed. 583.69

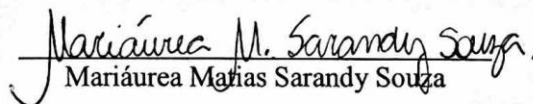
CAMILA GRAÇA PINHEIRO

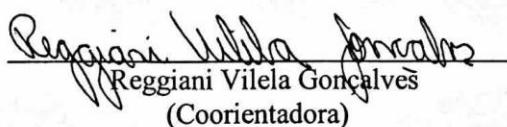
**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*  
E *in vivo* DE *Croton urucurana* BAILLON**

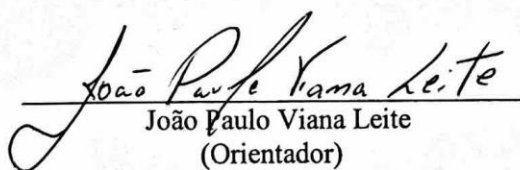
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de março de 2018.

  
José Humberto de Queiroz

  
Mariáurea M. Sarandy Souza  
Mariáurea Marias Sarandy Souza

  
Reggiani Vilela Gonçalves  
(Coorientadora)

  
João Paulo Viana Leite  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todos os caminhos que me fez trilhar, mesmo que alguns, à primeira vista, não parecessem promissores, mas sempre foram fontes de grandes ensinamentos e de constatação de sua presença em minha vida.

À minha família representada nas figuras de meus pais, Marcus e Neide, e nas figuras de minha avó Brígida e minha madrinha Idalina. Agradeço por todo amor e confiança depositados em mim. Certamente não estaria onde estou se não fosse pela educação, princípios e compreensão vindos deles. A eles e a meu irmão Bruno, todo o meu amor.

A Maurício, por estar comigo nos melhores e piores momentos de minha vida. Seu apoio e amor me deram forças nos momentos que mais precisei e sua companhia me faz verdadeiramente feliz. Agradeço pela sua compreensão, afeto e conselhos, especialmente durante essa jornada.

Ao professor João Paulo, pela orientação e ensinamentos que levarei sempre comigo.

Ao grupo BIOPROS pela convivência e pelos aprendizados compartilhados.

À Janaína, Isabella, Iorrana, Laís, Ana Paula, Jéssica, Fernanda e Gislaine cuja amizade e companhia fizeram essa caminhada mais leve, feliz e animada.

À Professora Reggiani pela oportunidade de novos trabalhos e aprendizado e, também, à Mariáurea, Branham, Sérgio e João Victor por todos os aprendizados e auxílio durante meu trabalho no laboratório de Patologia experimental do Departamento de Biologia animal – UFV.

Ao Prof. Wagner Vilegas e a doutoranda Ana Zanatta do Campus Experimental de São Vicente, UNESP, Universidade do Estado de São Paulo, Sao Vicente - SP pela obtenção dos dados de análise de LC-MS.

Ao Antônio de Pádua Alvarenga (EPAMIG), pelas contribuições e sobre manejo de *Croton urucurana* adaptados do manejo de *Hevea brasiliensis* L

## **BIOGRAFIA**

Camila Graça Pinheiro, nascida na cidade Salvador, estado da Bahia em 28 de abril de 1989, filha de Marcus Túlio de Freitas Pinheiro e Neide Souza Graça Pinheiro.

Bacharel em Farmácia pela Universidade do Estado da Bahia (2013) ingressou no curso de pós-graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado (2016).

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| Lista de abreviaturas e símbolos.....   | vii  |
| Lista de Figuras.....   | viii |
| Lista de Tabelas.....   | ix   |
| Resumo.....   | x    |
| Abstract.....   | xi   |
| 1 Introdução Geral.....   | 1    |
| 2 Justificativa.....  | 3    |
| 3 Referencial teórico.....  | 4    |
| 3.1 Bioprospecção farmacêutica.....   | 4    |
| 3.2 Busca de produtos naturais bioativos em plantas.....  | 5    |
| 3.3 Atividade antioxidante e estresse oxidativo.....  | 7    |
| 3.3.1 Enzimas antioxidantes.....  | 9    |
| 3.3.2 Compostos antioxidantes e defesas não enzimáticas.....  | 10   |
| 3.4 Técnicas <i>in vitro</i> empregadas na análise de atividade antioxidante de extratos vegetais.....                                      | 13   |
| 3.5 Família <i>euphorbiaceae</i> .....  | 14   |
| 3.5.1 <i>Croton</i> spp. ....   | 14   |
| 3.6 <i>Croton urucurana</i> baillon.....  | 16   |
| 4 Objetivos.....  | 19   |
| 4.1 Objetivos gerais.....   | 19   |
| 4.2 Objetivos Específicos.....  | 19   |
| Referências.....  | 20   |
| <b>Capítulo 1 - Caracterização fitoquímica e atividade antioxidante <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Croton urucurana</i> Baillon</b> |      |
| 1 Introdução.....   | 28   |
| 2 Materiais e Métodos.....  | 28   |
| 2.1 Obtenção dos derivados vegetais.....  | 28   |
| 2.2 Prospecção fitoquímica por CCD.....   | 29   |
| 2.2.1 Escolha da fase móvel.....  | 29   |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2 Classes de metabólitos secundários pesquisadas.....   | 30 |
| 2.2.3 Obtenção do extrato alcaloídico.....  | 31 |
| 2.3 Determinação de fenólicos totais.....   | 32 |
| 2.3.1 Preparo das amostras.....   | 32 |
| 2.3.2 Reação colorimétrica de Folin-Ciocalteu.....  | 32 |
| 2.3.3 Curva de calibração.....  | 32 |
| 2.4 Determinação de taninos totais.....   | 33 |
| 2.4.1 Preparo das amostras.....   | 34 |
| 2.4.2 Reação colorimétrica de Folin-Ciocalteu.....  | 34 |
| 2.4.3 Curva analítica.....  | 34 |
| 2.5 Determinação de Flavonóides totais.....   | 34 |
| 2.5.1 Preparo das Amostras.....   | 35 |
| 2.5.2 Reação colorimétrica com Cloreto de Alumínio.....   | 35 |
| 2.5.3 Curva de Calibração.....  | 35 |
| 2.6 Análise por FIA-ESI-IT-MS/MS <sup>n</sup> .....   | 36 |
| 2.6.1 Clean up por SPE.....   | 36 |
| 2.6.2 Análise por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> .....  | 37 |
| 2.7 Atividade Antioxidante in vitro - Ensaio de Captura do radical DPPH.....                                    | 37 |
| 2.8 Atividade antioxidante em fragmentos de pele - Modelo de realização de feridas cutâneas em camundongos..... | 38 |
| 2.8.1 Realização das feridas para coleta periódica de fragmentos.....   | 38 |
| 2.8.2 Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.....   | 38 |
| 2.8.2.1 Preparo dos homogenatos.....  | 38 |
| 2.8.2.2 Atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD).....   | 38 |
| 2.8.2.3 Atividade enzimática de Catalase (CAT).....   | 39 |
| 2.8.2.4 Atividade enzimática de Glutathione-S-Transferase (GST).....  | 39 |
| 2.8.2.5 Determinação do teor de proteínas totais.....   | 40 |
| 2.9 Análise estatística.....  | 40 |
| 3 Resultados e Discussão.....   | 40 |
| 3.1 Obtenção dos derivados vegetais.....  | 40 |
| 3.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....                                       | 41 |
| 3.2.1 Análise Cromatográfica.....   | 41 |
| 3.3 Determinação de Fenólicos totais, Taninos totais e Flavonóides totais.....                                  | 42 |
| 3.4 Análise de ECU e LCU por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> .....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 3.5 Atividade antioxidante in vitro - ensaio de captura do radical DPPH..... | 55 |
| 3.6 Atividade antioxidante in vivo - Atividades de SOD, CAT e GST.....       | 55 |
| 4 Conclusões.....  | 59 |
| 5 Agradecimentos.....  | 59 |
| Referências .....  | 60 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>ABTS</b>                       | 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico  |
| <b>CAT:</b>                       | Catalase   |
| <b>CF:</b>                        | Compostos fenólicos  |
| <b>CG-EM</b>                      | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas   |
| <b>CID</b>                        | Dissociação Induzida por Colisão   |
| <b>DPPH</b>                       | (2,2-difenil) picrilhidrazila  |
| <b>ECU:</b>                       | Extrato etanólico das cascas de <i>Croton urucurana</i>  |
| <b>ERN:</b>                       | Espécie(s) reativa(s) de nitrogênio  |
| <b>ERO:</b>                       | Espécie(s) reativa(s) de oxigênio  |
| <b>ESI</b>                        | Ionização por <i>Eletrospray</i>   |
| <b>FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>:</b> | Espectrometria de massas de fluxo direto com ionização por eletrospray e analisador de massas ion trap |
| <b>FIA</b>                        | Fluxo direto   |
| <b>G6PD</b>                       | Glicose-6-fosfato desidrogenase  |
| <b>GSH</b>                        | Glutationa reduzida  |
| <b>GSH-Px</b>                     | Glutationa peroxidase  |
| <b>GSH-Rd</b>                     | Glutationa redutase  |
| <b>GSSG</b>                       | Glutationa oxidada   |
| <b>GST:</b>                       | Glutationa-S-transferase   |
| <b>IT</b>                         | <i>Ion Trap</i>  |
| <b>LCU:</b>                       | Látex de <i>Croton urucurana</i>   |
| <b><i>m/z</i></b>                 | Razão massa/carga  |
| <b>NADPH</b>                      | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato   |
| <b>PA:</b>                        | Proantocianidinas  |
| <b>RMN <sup>1</sup>H</b>          | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  |
| <b>SOD:</b>                       | Superóxido dismutase   |
| <b>SPE</b>                        | Extração em fase sólida  |

## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| Figura 1          | Esquema geral da obtenção de extratos vegetais e pesquisa de atividade biológica.....                                | 6  |
| Figura 2          | Reação de Haber-Weiss.....   | 8  |
| Figura 3          | Ácido ascórbico e a-tocoferol.....   | 10 |
| Figura 4          | Carotenoides (licopeno e b-caroteno) .....   | 11 |
| Figura 5          | Compostos fenólicos antioxidantes (Catequina, antocianina, Ácido benzoico e Ácido cinâmico) .....                    | 11 |
| Figura 6          | Formas radicalar e não radicalar do DPPH.....  | 13 |
| Figura 7          | Mecanismo de estabilização do radical ABTS.....  | 13 |
| Figura 8          | Compostos presnetes no látex de <i>C. urucurana</i> .....  | 17 |
| Figura 9          | Ácido acetilaleuritólico, campesterol, b-sitosterol e sonderianina.....  | 18 |
| <b>Capítulo 1</b> |  |    |
| Figura 1          | Formas de obtenção do derivado vegetal.....  | 29 |
| Figura 2          | Desenho de mistura de solventes para fase móvel de CCD.....  | 30 |
| Figura 3          | Esquema da estrutura básica do monômero de PA.....   | 45 |
| Figura 4          | Unidades monoméricas formadoras de PA mais comuns: (2,3-trans) ( $\pm$ ) catequina e (2,3-cis) (+) epicatequina..... | 45 |
| Figura 5          | Perfil fitoquímico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> (modo negativo) de ECU.....  | 49 |
| Figura 6          | Perfil fitoquímico por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> (modo negativo) de LCU.....  | 50 |
| Figura 7          | Proposta de fragmentação de proantocianidinas.....   | 51 |
| Figura 8          | Alcalóides encontrados em ECU e LCU.....   | 52 |
| Figura 9          | Proposta de fragmentação dos alcaloides em ECU e LCU.....  | 52 |
| Figura 10         | Espectro por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> (modo positivo) da magnoflorina.....   | 53 |
| Figura 11         | Espectro por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> (modo positivo) da tembetarina.....  | 54 |
| Figura 12         | Resultados para as atividades enzimáticas de SOD, CAT e GST.....   | 56 |

**LISTA DE TABELAS**

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Delineamento experimental.....   | 30 |
| Tabela 2 | Fases móveis, reveladores e padrões de referência utilizados para<br>prospecção fitoquímica de ECU e LCU.....  | 31 |
| Tabela 3 | Concentração das soluções referências de ácido gálico utilizadas na<br>construção da curva de calibração de polifenóis totais por<br>espectrofotometria..... | 33 |
| Tabela 4 | Concentração das soluções referências de rutina utilizadas na construção da<br>curva de calibração de flavonoides totais por<br>espectrofotometria.....      | 36 |
| Tabela 5 | Prospecção fitoquímica por CCD de ECU e LCU.....   | 41 |
| Tabela 6 | Teor de compostos fenólicos totais, taninos totais, flavonoides totais<br>encontrado no ECU e LCU) de <i>C.urucurana</i> .....                               | 42 |
| Tabela 7 | Dados dos Íons precursores e suas respectivas fragmentações obtidas por<br>FIA-ESI-IT-MSn de ECU e LCU (modo negativo) .....                                 | 43 |
| Tabela 8 | Dados dos Íons precursores e suas respectivas fragmentações obtidas por<br>FIA-ESI-IT-MSn de ECU e LCU (modo positivo) .....                                 | 51 |
| Tabela 9 | Atividade antioxidante in vitro – Captura do radical DPPH.....   | 55 |

## RESUMO

PINHEIRO, Camila Graça, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Caracterização fitoquímica e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de *Croton urucurana* Baillon**. Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadora: Reggiani Vilela Gonçalves.

As atividades de bioprospecção farmacêutica proporcionam a descoberta de compostos bioativos que têm potencial para tratamento de uma série de enfermidades, sendo os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais importantes fontes para o desenvolvimento de produtos que podem tratar doenças inflamatórias, neoplasias, doenças de trato gastrointestinal, respiratórias dentre outras. O Brasil é um grande representante da biodiversidade mundial e oferece muitas possibilidades de trabalho na bioprospecção farmacêutica e o bioma da mata atlântica de grande relevância nesse processo. Nele são encontradas espécies adaptadas de diversas famílias botânicas de interesse medicinal. Dentre elas está a família Euphorbiaceae, detentora do gênero *Croton* e mais especificamente de *Croton urucurana* que tradicionalmente é utilizada pela população da região no tratamento de feridas cutâneas, doenças inflamatórias e infecções bacteriana e viral. Este estudo buscou esclarecer sobre as formas de obtenção dos derivados vegetais de *Croton urucurana* (extrato etanólico das cascas e látex – ECU e LCU), comparando-as quanto à influência sobre a composição química desses derivados. A comparação da composição química de ambos os derivados vegetais foi realizada através de análises por cromatografia em camada delgada (CCD), FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> e por espectrofotometria para quantificação de compostos fenólicos totais, taninos totais e flavonoides totais. A atividade antioxidante foi avaliada por métodos *in vitro* (ensaio de captura de Radical DPPH) e *in vivo* (atividade enzimática de SOD, CAT e GST) para o ECU. Após a realização dessas análises, observou-se que a forma tradicional de obtenção do derivado vegetal representa um risco para a preservação da espécie e pode futuramente gerar um impacto ambiental indesejável para atividades de reflorestamento. Foi observado também que ambos os derivados vegetais são ricos em compostos fenólicos, principalmente em taninos condensados, justificando a também elevada atividade antioxidante *in vitro*. O ECU apresentou boa atividade antioxidante *in vivo*, representando uma possível forma de redução das lesões por estresse oxidativo. No entanto, são necessários mais estudos para agregar mais informações à cerca da atividade biológica de *C. urucurana*, principalmente em termos comparativos entre os derivados vegetais obtidos a partir dela.

## ABSTRACT

PINHEIRO, Camila Graça, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Phytochemical characterization and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities from *Croton urucurana* Baillon.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-adviser: Reggiani Vilela Gonçalves.

Pharmaceutical bioprospecting activities provide the discovery of assets that have the potential to increase the possibilities of treatment of a series of diseases, being the secondary metabolites synthesized by vegetables an important source for the development of products that can treat inflammatory diseases, neoplasias, gastrointestinal and respiratory tracts diseases. Brazil is a great representant of the world's biodiversity and offers many possibilities of work in pharmaceutical bioprospecting and the Atlantic forest biome is relevant in this process. In it adapted species from several botanical families of medicinal interest are found. Among them there is Euphorbiaceae family that holds the genus *Croton* and specifically *Croton urucurana* that is used by the local population in the treatment of cutaneous wounds, inflammatory diseases and bacterial and viral infections. The popular use of this plant is related to its rich chemical composition, mainly phenolic compounds that are characterized as potent antioxidant agents. However, there are few data on this plant in literature, both in terms of its chemical composition and in what refers to the confirmation of its biological activities. In this context, this study sought to clarify the ways of obtaining *Croton urucurana* plant derivatives (ethanolic extracts from barks and latex - ECU and LCU), comparing them to their chemical composition. The chemical composition of both vegetable derivatives was investigated by thin layer chromatography (TLC), FIA-ESI-IT-MSn and spectrophotometry for the quantification of total phenolic compounds, total tannins and total flavonoids. The antioxidant activity was evaluated by *in vitro* methods (Radical DPPH capture assay) and *in vivo* (enzymatic activity of SOD, CAT and GST) for the ECU. After these analyzes, it was observed that the traditional way of obtaining of the vegetal derivative represents a risk for the preservation of the species and may generate an undesirable environmental impact for reforestation activities in near future. It was also observed that both vegetable derivatives are rich in phenolic compounds, mainly in condensed tannins, justifying the high antioxidant activity *in vitro*. The ECU had good antioxidant activity *in vivo*, representing a possible form of reduction of lesions caused by oxidative stress. However, further studies are needed to aggregate more information about the biological activity of *C.urucurana*, mainly in comparative terms among the vegetable derivatives obtained from it.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As atividades de bioprospecção farmacêutica proporcionam a descoberta de ativos que têm potencial para aumentar as possibilidades de tratamento de uma série de enfermidades. A pesquisa em plantas medicinais é um importante eixo da bioprospecção de produtos naturais devido à grande variedade de rotas biossintéticas pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais. Os metabólitos produzidos possuem diversas funções ecológicas referentes à preservação das espécies como por exemplo a herbivoria e atração de animais polinizadores (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Esses mesmos compostos possuem atividades sobre a saúde humana, apresentando uso potencial para diversas doenças inflamatórias, neoplasias, doenças de trato gastrointestinal, respiratórias entre outras e são extraídas dos vegetais de diversas maneiras a fim de darem origem a extratos que serão avaliados quanto às suas atividades biológicas, tanto em sua forma bruta quanto em forma de frações ou compostos isolados. Esse processo é uma etapa importante para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos e de descoberta de novas atividades biológicas (ARAÚJO et al., 2008).

Nesse cenário de bioprospecção, o Brasil ocupa um lugar de importância pois é caracterizado por ser megabiodiverso, sendo composto por biomas de características muito peculiares com vegetais especificamente adaptados (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Dentre esses biomas encontra-se a Mata Atlântica, bioma considerado como hotspot de biodiversidade detentor de grande variedade de fauna e flora, ainda que reduzido a menos de 10% da sua extensão territorial. Nele, é possível encontrar plantas de diversas famílias botânicas com reconhecido uso medicinal por exemplo: Asteraceae, Myrtaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Piperaceae e Euphorbiaceae (DUTRA et al., 2016).

Dentre as Euphorbiaceae de uso medicinal da mata atlântica, estão as plantas do gênero *Croton*. Elas estão relacionadas ao tratamento de doenças inflamatórias com a artrite reumatoide, gastrite, tratamento de feridas cutâneas (um dos usos principais), neoplasias e infecções bacterianas e virais. A *Croton urucurana* é uma espécie encontrada na zona da mata mineira e é utilizada pelos raizeiros da região para o tratamento das enfermidades citadas anteriormente. As partes mais utilizadas da planta são o látex (que é o exudato da casca) e as cascas do tronco, que são ricas em compostos polifenólicos conhecidos como proantocianidinas ou taninos condensados (GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA, 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

As proantocianidinas (PA) são derivadas de flavonoides da classe dos flavan-3-óis, se apresentando como oligômeros ou polímeros desses flavonoides que são denominados de catequinas. Farmacologicamente, possuem atividade de precipitação de proteínas, que se reflete

em atividade antibiótica e antiinflamatória. Possuem também atividade antioxidante potente, podendo sequestrar radicais livres e agir sobre metais de transição, devido a sua estrutura química rica em regiões de deslocalização eletrônica o que favorece à acomodação dos elétrons livres das espécies radicalares orgânicas e dos metais como Fe (III) e Cu (II) (MONTEIRO et al., 2005;COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Os radicais livres são espécies químicas geradas no curso normal do metabolismo aeróbio celular, e são, de maneira geral, combatidos de maneira fisiológica pela defesa antioxidante endógena representada pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e enzimas ativadas por glutathiona (GST, GSH-Rd e GSH-Px). Quando ocorre alguma lesão tecidual, os níveis dos radicais livres aumentam decorrentes processo de peroxidação lipídica (FERREIRA; ABREU, 2007).

O aumento demasiado de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO e ERN) se relaciona com diversas condições clínicas como feridas cutâneas, neoplasias, artrite reumatoide e doenças neurodegenerativas, sendo de grande relevância se estudar fontes de compostos que tenha a capacidade de reduzir o estresse oxidativo causado pelo aumento de radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), como por exemplo as proantocianidinas de *C. urucurana* citadas.

Nesse sentido, o presente trabalho pretende fazer uma caracterização fitoquímica de *C. urucurana* bem como avaliar o seu potencial antioxidante a fim de aumentar o conhecimento sobre essa espécie vegetal e poder propor uma possível fonte de pesquisa em novos fitoterápicos com atividade antioxidante. Além disso, pretende-se comparar as formas de obtenção do derivado vegetal quanto à influência sobre a composição química dos derivados.

## 2. JUSTIFICATIVA

Plantas do gênero *Croton* já são utilizadas como agentes terapêuticos para diversos fins, dentre eles o cicatrizante, na região Amazônica, sendo a *Croton lechleri* a espécie de onde se extrai o látex para comércio e produção das tinturas. Neste trabalho, será estudada a espécie *Croton urucurana*, pertencente ao bioma Mata Atlântica. Uma vez que há registro de utilização do látex de outra espécie do mesmo gênero da região amazônica na medicina popular, existe uma forte especulação que *C.urucurana* também possa ser utilizada para os mesmos fins que *C.lechleri*.

Como para essa última já existem comércio e mercado, a *C. urucurana* pode representar uma fonte de produto florestal não madeireiro para a biodiversidade da Mata Atlântica.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 BIOPROSPECÇÃO FARMACÊUTICA**

Produtos naturais estão relacionados ao desenvolvimento de fármacos desde a antiguidade, apresentando uma importância histórica para a terapêutica. Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente de plantas, sendo a investigação de vegetais utilizados na medicina tradicional realizada de forma sistemática desde o início desse período (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A descoberta da atividade de substâncias de origem vegetal representou o surgimento de novos grupos de moléculas com estruturas diferenciadas, bem como originou a identificação de novas possibilidades de intervenção terapêutica (CALIXTO, 2003).

Apesar do avanço nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, parte dos fármacos continua sendo obtida de matérias-primas vegetais, seja pela dificuldade de síntese, seja por viabilidade econômica (SIMÕES, 2016).

No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento tinham as plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde e, no Brasil, o consumo da flora medicinal nativa tem ocorrido com pouca comprovação de suas propriedades farmacológicas (OLIVEIRA; ROPKE, 2016).

No panorama de atividades de bioprospecção farmacêutica, é importante se levar em consideração a diversidade biológica como fator de relevância para a realização de pesquisas em países considerados megabiodiversos. Neste contexto, o Brasil é incluído como detentor de 170 a 210 mil espécies biológicas conhecidas (10% da biota mundial já estudada), tendo uma projeção de atingir 1,8 milhão de espécies biológicas, o que constitui um desafio para os pesquisadores brasileiros atuantes nessa área. Sendo assim, a biodiversidade do Brasil é uma das mais ricas do planeta (15 a 25% de todas as espécies vegetais do mundo, com alta taxa de endemismo biológico, ou seja, distribuição em biomas únicos) (FUNARI; FERRO, 2005). Essa biodiversidade é estudada por farmacêuticos, químicos, biólogos e outros profissionais, levando ao isolamento de grande variedade de metabólitos micro e macromoleculares, dentre os quais vários apresentam atividades biológica e farmacológica relevantes com potencial para desenvolvimento de fármacos, cosméticos, agroquímicos e suplementos alimentares (JOLY; VERDADE; BERLINCK, 2011).

Segundo Dutra et al. (2016), existe um grande interesse por parte dos brasileiros no uso de fitomedicamentos para tratamento de diversas doenças. No entanto, apesar da grande

diversidade e do notável interesse no uso de drogas vegetais, o mercado de fitoterápicos no Brasil ainda é muito modesto, havendo também uma notável dissociação entre o número de publicações científicas sobre plantas e o desenvolvimento de novos agentes fitoterapêuticos que poderiam servir para diversos usos como: atividade sobre o sistema nervoso central, analgésico, antiinflamatório, ação contra distúrbios respiratórios, gastrintestinais e metabólicos (HASENCLEVER et al., 2017).

Dentro da vasta biodiversidade brasileira, o bioma Mata Atlântica é considerado uma região *hotspot* mundial. De acordo com Di Stasi et al. (2002), a diversidade vegetal desse bioma possibilita que 114 espécies vegetais, distribuídas entre 50 famílias e 99 gêneros, sejam utilizadas para produção de 290 remédios, que popularmente são orientados para 628 usos diferentes, que variam de acordo com as tradições locais. Dentre as famílias que possuem o maior número de espécies reportadas têm-se: Asteraceae, Lamiaceae, Piperaceae, Cucurbitaceae, Myrtaceae, Fabaceae, Arecaceae, Caesalpiniaceae, Solanaceae e Euphorbiaceae.

A Mata Atlântica, mesmo reduzida e fragmentada, ainda possui uma vasta biodiversidade que apresenta um grande potencial de pesquisa em trabalhos de bioprospecção, na busca de ativos que tenham importantes atividades biológicas, como a antitumoral, antiinflamatória e cicatrizante.

### **3.2 BUSCA DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS EM PLANTAS**

A busca de substâncias bioativas é um processo complexo e longo, envolvendo a análise de compostos que geralmente se encontram em pequenas concentrações nos vegetais, mas que podem ser os principais responsáveis pelos efeitos biológicos. Neste processo, é importante frisar a utilização do critério etnofarmacológico para a seleção da espécie vegetal a ser pesquisada, aumentando a possibilidade de se encontrar a atividade biológica em plantas com alegação de uso popular do que em plantas escolhidas de forma aleatória (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

A técnica de fracionamento biomonitorado aliada a obtenção do perfil fitoquímico dos extratos e frações se faz importante para o encaminhamento do isolamento e identificação das substâncias com a atividade biológica de interesse, por exemplo, a atividade antioxidante (MACIEL et al., 2002). Neste sentido, uma busca sistemática é realizada, começando da preparação dos extratos brutos e indo até o isolamento dos compostos puros como mostrado na Figura 1 (ANDREO; JORGE, 2006).

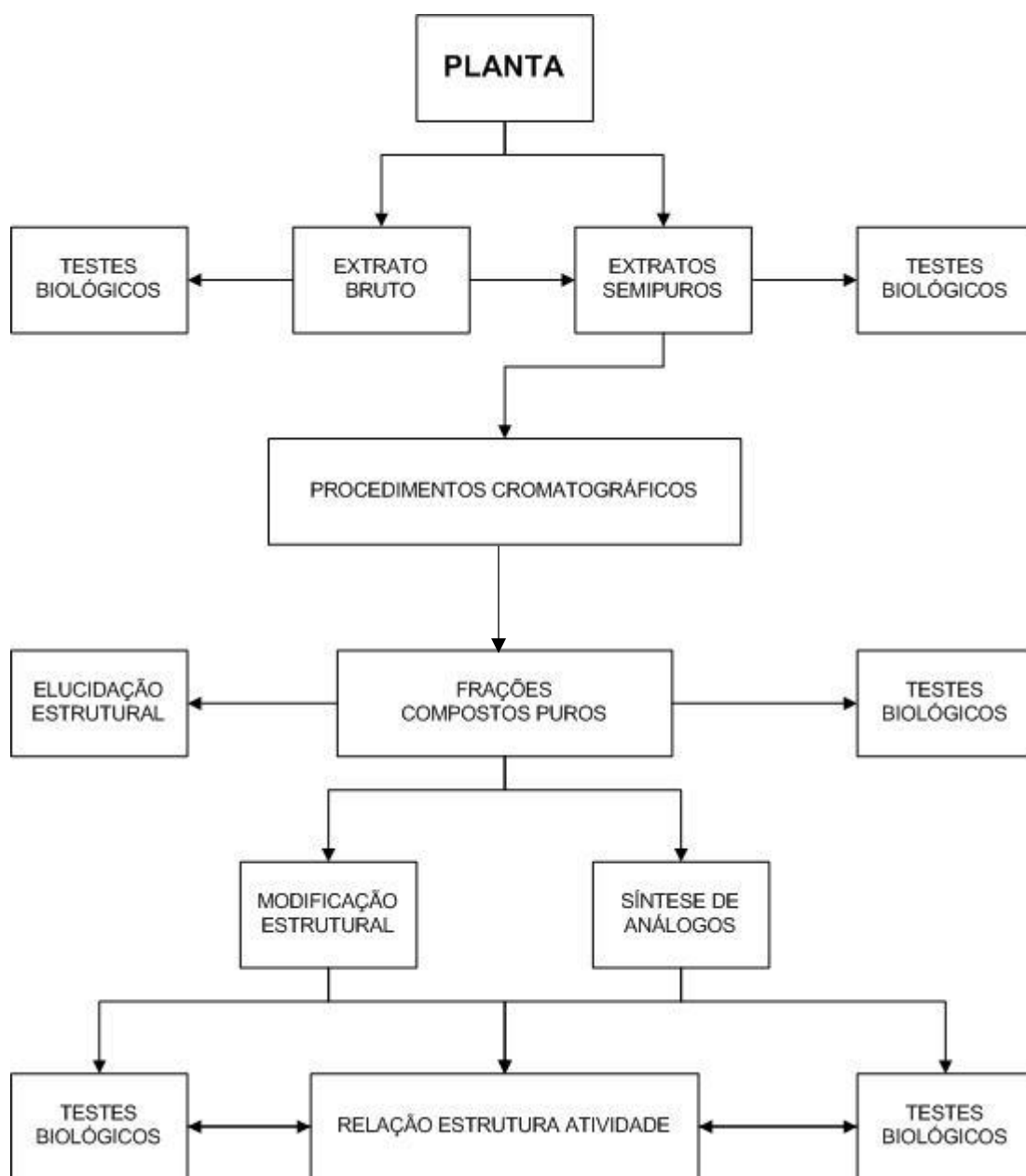


Figura 1. Esquema geral de obtenção de extrato vegetal e pesquisa de atividade biológica adaptado de CECHINEL-FILHO; YUNES, (1998).

O extrato bruto pode ser obtido de diversas maneiras, por exemplo: maceração e percolação. Já os solventes extratores podem variar muito a depender da natureza dos compostos que se pretende extrair, mas geralmente são escolhidos o etanol e a água por questões de disponibilidade e de segurança de utilização. Podem, também, ser utilizados solventes como o acetado de etila, o diclorometano, a acetona e o metanol (MARQUES, 2014).

Uma vez obtido o extrato bruto, parte-se para a pesquisa da atividade biológica desse

extrato e simultaneamente busca-se purificá-lo através de seu fracionamento e consequente isolamento dos compostos puros. Outro caminho que se pode seguir é a utilização de técnicas analíticas hífenadas para a análise direta dos extratos brutos e frações, visto que elas desempenham papel importante na elucidação da composição química complexa dessas amostras, sem gerar a necessidade de um processo longo de fracionamento que muitas vezes resulta no isolamento de substâncias já conhecidas. As técnicas acopladas devem gerar informações diferentes, como resultado da combinação entre duas ou mais técnicas analíticas de diferentes propósitos (por exemplo: a combinação de técnicas de separação com técnicas espectroscópicas, como observado em análises de combinação de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE – espectrometria de massas – EM) (RODRIGUES et al., 2006).

De posse das informações discutidas até esta sessão, inicia-se agora uma discussão mais específica acerca do vegetal explorado neste trabalho, a *Croton urucurana* Baillon, que pertence à família botânica Euphorbiaceae e que popularmente é utilizada para tratamento de feridas cutâneas e de processos inflamatórios em geral por conta da presença de metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos e alcaloides (ESMERALDINO; SOUZA; SAMPAIO, 2005).

### **3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO**

A capacidade antioxidante compreende uma combinação de mecanismos que anulam a reatividade ou inibem a síntese de radicais livres, levando a uma redução do seu tempo de meia vida (GOMES et al., 2013). Antioxidantes, em geral, são caracterizados por serem moléculas de natureza endógena ou exógena que tem a capacidade de acomodação de elétrons livres em sua estrutura química e de maneira mais abrangente, os antioxidantes exógenos são absorvidos pelo organismo através da dieta e apresentam diferentes origens biossintéticas, principalmente quando de origem vegetal, como por exemplo: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), carotenóides e compostos fenólicos (AVELLO e SUWALSKY, 2006).

Antioxidantes endógenos são responsáveis por reduzir a vida média de  $O_2^{\bullet-}$  /  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$ , e o estado antioxidante do plasma é resultado da combinação de muitos compostos e interações metabólicas sistêmicas como a interação entre sistemas enzimáticos e a concentração plasmática de antioxidantes de baixo peso molecular (ANDRADE et al., 2010; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005).

Os efeitos deletérios dos radicais livres sobre o organismo ocorrem pela formação de moléculas reativas com elétrons desemparelhados no curso natural do metabolismo energético,

podendo levar a efeitos tóxicos quando a concentração dessas espécies – espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) - ultrapassa um limite específico de concentração, caracterizando a condição de estresse oxidativo tecidual (VASCONCELOS et al., 2007).

ERO's apresentam potencial destrutivo por conta da capacidade do oxigênio de deixar o estado de dirradical ( $O_2$ ) e se apresentar na forma de radical livre (radical superóxido -  $O_2 \bullet^-$ ) ou oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). O processo de formação desses tipos de radical é compreendido como Reação de Haber-Weiss (Figura 2), que demonstra como ocorre a propagação da síntese de ERO catalisada por metais de transição como Ferro e Cobre (ANTUNES-NETO; SILVA, L.P.; MACEDO, 2006).

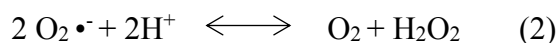
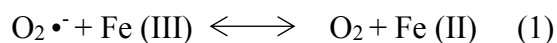


Figura 2. Reação de Haber-Weiss. Adaptado de Antunes-Neto; Silva; Macedo (2006)

ERO's são formadas no curso natural da cadeia respiratória, quando um elétron é adicionado à molécula de oxigênio ocorrendo a produção do radical superóxido (reação 1). Ele serve de precursor para o peróxido de hidrogênio (reação 2), que tem a capacidade de atravessar membranas celulares e também de receber elétrons provenientes de metais de transição como o ferro e o cobre, produzindo o radical hidroxil (reação 3) (SOARES et al., 2015; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1990).

Os radicais livres possuem alta instabilidade e reagem facilmente com grupos doadores de elétrons presentes nos fosfolipídios de membrana, proteínas, DNA nuclear e mitocondrial, sendo os sistemas enzimáticos antioxidantes o principal meio de defesa intracelular que compete com a formação dessas espécies radicalares (ECKL; BRESGEN, 2017; RIBEIRO et al., 2005).

As espécies reativas de nitrogênio são os radicais óxido nítrico ( $NO\bullet$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ). A maior parte delas apresenta reatividade relativamente alta, tendo alto poder deletério no meio intracelular, porém algumas são capazes de agir somente sobre lipídios ( $NO_2^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

### 3.3.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O sistema antioxidante natural no organismo para eliminação dos radicais livres pode ser dividido em enzimático e não enzimático – compostos antioxidantes presentes no plasma adquiridos através da dieta. O primeiro é representado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), e as enzimas que utilizam a glutatona (GSH, GSH-Rd, GSH-Px) para anulação dos radicais atuando na detoxificação antes de ser iniciada a lesão e na anulação da atividade dos radicais produzidos após a lesão (VASCONCELOS et al., 2007).

A glutatona reduzida (GSH), um dos agentes de defesa antioxidante mais importante das células, apresenta o grupo tiol como responsável pela sua capacidade redutora devida ao grupamento -SH. Essa enzima protege a célula contra lesão de íons ferro, oxgênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Atua também como transportadora e reservatório de cisteína e anula atividade dos produtos de lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A glutatona redutase (GSH-Rd) atua na recuperação da glutatona reduzida após o processo de sua oxidação (formação de GSSG), mantendo assim, o funcionamento normal do sistema de proteção celular. É caracterizada como uma flavoproteína dependente de NADPH e consequentemente dependente da integridade da via das pentoses. Uma baixa concentração de NADPH, seja por jejum ou por deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), reduz sua função (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). A glutatona peroxidase (GSH-Px) tem a função de reduzir peróxidos orgânicos, inclusive o peróxido de hidrogênio, através da conversão de GSH em GSSG (TORRES; SOARES; MAIA, 2004).

A catalase (CAT) reduz o peróxido de hidrogênio em água e radical hidroxila e está presente, principalmente, no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado, sendo dependente de NADPH (FERRO et al., 2010). Já a enzima superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , existindo em duas isoformas nos eucariontes: SOD-cobrezinco (citoplasmática) e a SOD-mangânese (mitocondrial) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além da defesa antioxidante endógena, representada pelas enzimas citadas nesta sessão, uma variedade de compostos orgânicos, principalmente de origem vegetal, desempenham o papel de antioxidantes exógenos atuando na defesa contra danos oxidativos em nível plasmático e auxilia o sistema de defesa endógeno (FERREIRA; ABREU, 2007).

### 3.3.2 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E DEFESA NÃO ENZIMÁTICA CONTRA ERO's.

Compostos antioxidantes exógenos podem ser absorvidos pelo organismo em virtude da dieta, tendo o seu desempenho antioxidante ligado a fatores como tipo de radicais formados, análise e métodos para identificação dos danos e doses ideais de proteção. Podem agir em sinergismo na proteção de células e tecidos, porém, frequentemente se percebe que o bom desempenho de um antioxidante em um determinado sistema pode causar danos/falha da proteção de outros sistemas e tecidos, sendo importante o equilíbrio entre as atividades desses compostos (OLIVEIRA et al., 2009a).

Bianchi e Antunes (1999) trazem o registro dos principais antioxidantes presentes na dieta sendo eles os compostos fenólicos, a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e carotenóides.

A vitamina E é caracterizada como composto antioxidante lipídico, sendo sua forma mais ativa o  $\alpha$ -tocoferol, encontrada em lipoproteínas e membranas agindo no bloqueio da cadeia de peroxidação lipídica sequestrando os radicais peroxila formados. A vitamina C (ácido ascórbico) possui muitas funções fisiológicas incluindo o alto poder antioxidante e a capacidade de reciclar a vitamina E (SOUSA et al., 2007).

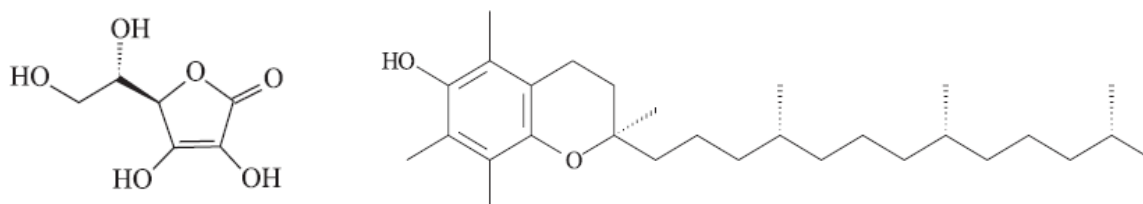


Figura 3. Ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol (ALVES et al., 2010)

Os carotenoides (Figura 4) protegem dos danos oxidativos inativando o oxigênio singlete, sem sofrer degradação. O mecanismo de sua atividade antioxidante envolve a capacidade de acomodação dos elétrons desemparelhados em sua estrutura de ligações duplas conjugadas (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

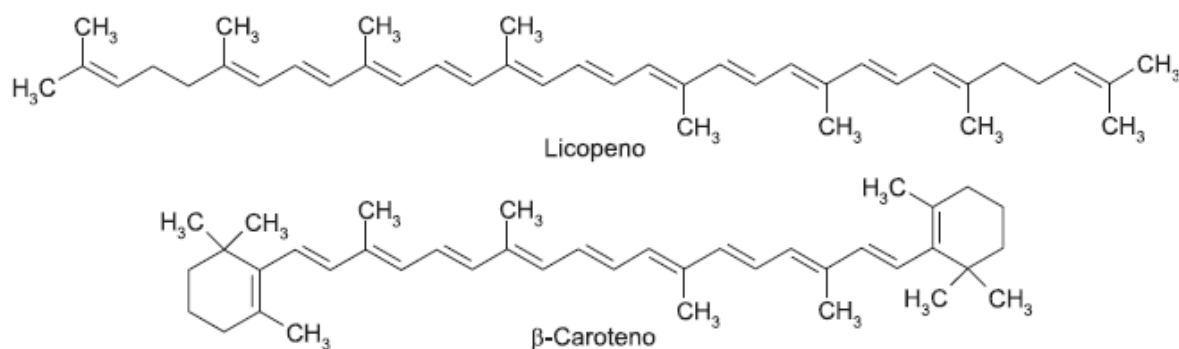


Figura 4. Alguns carotenoides (licopeno e b-caroteno, respectivamente) (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Outra classe de antioxidantes de origem vegetal que tem ganhado atenção é a dos compostos fenólicos (Figura 5), que têm sua atividade devida a neutralização e sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto de propagação do processo oxidativo. Eles geram intermediário relativamente estáveis por conta da deslocalização eletrônica característica dos anéis aromáticos em sua estrutura. Podem ser classificados em diversas categorias: fenólicos simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas, ligninas (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

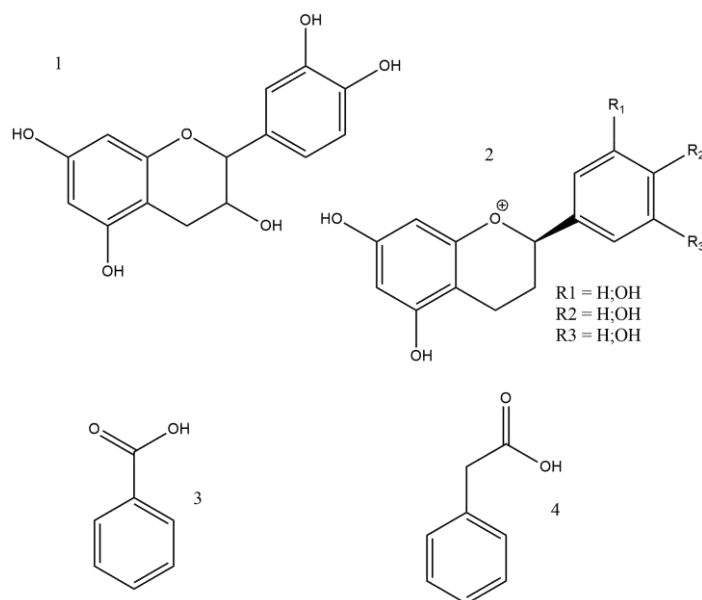


Figura 5. Alguns compostos fenólicos antioxidantes: 1 - Catequina, 2 - antocianina, 3 - ácido benzoico, 4 - ácido cinâmico (LORDÉLO et al., 2010).

### **3.4 TÉCNICAS *IN VITRO* EMPREGADAS NA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS**

Existem diversos métodos para a avaliação de atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, e se enquadram desde ensaios químicos com substratos lipídicos até ensaios mais complexos que utilizam as mais diversas técnicas instrumentais. Para uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, bem como seu mecanismo de produção, o local e a extensão do dano causado. Assim, há a necessidade de aplicação de técnicas mais específicas capazes de definir quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes, determinando também as condições, sistemas e alvos de proteção (ALVES et al., 2010).

A análise da capacidade antioxidante total (CAOT) pode ser realizada por diversos métodos que variam com relação ao radical gerado e ao indicador de oxidação escolhido. São ensaios denominados como de captura (“trap assays”) nos quais ocorre a geração de radical e sua reação com moléculas alvo que é expressa de variadas maneiras (produção de cor, redução de cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais ESR – ressonância de spin eletrônica). Essas metodologias são divididas de acordo com o mecanismo de inibição de radical que são: transferência de átomos de hidrogênio (TRAP, ORAC) e transferência de elétrons (FRAP, TEAC ou ABTS e DPPH).

Dentre as metodologias de determinação da capacidade antioxidante total se destacam os métodos de captura do radical DPPH e captura do radical ABTS, que são métodos espectrofotométricos.

A determinação da captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um dos métodos mais antigos para a avaliação da capacidade antioxidante. Ele visa descobrir as espécies doadoras de hidrogênio tanto em amostras naturais como em sintéticas e é de grande importância no campo da pesquisa em produtos naturais. Além disso, não necessita de condições drásticas de temperatura e oxigenação. O DPPH pode reagir com compostos fenólicos (fenilpropanóides, flavonóis, cumarinas, quitosana com diferentes pesos moleculares, antocianinas, antocianidinas, rutina, kaempferol etc.), bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento e carotenóides, tanto isolados quanto presente em extratos vegetais (BORGES et al., 2011).

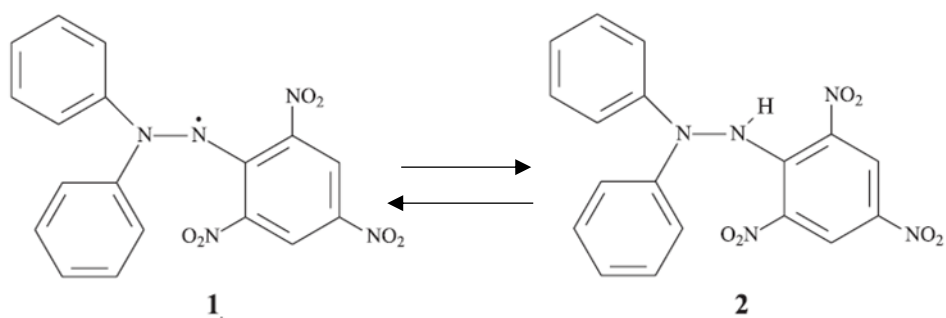


Figura 6. Formas radicalar e não radicalar do DPPH (1 e 2 respectivamente) (ALVES et al., 2010).

O radical DPPH, quando em solução metanólica, assume a coloração púrpura, que tem absorção máxima no comprimento de onda de 516 nm. Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina (Figura 6). Essa transformação é visualizada através da mudança de coloração púrpura para amarela, com desaparecimento da absorção, sendo representada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados espectrofotométricos obtidos é possível se calcular a porcentagem de inibição bem com a concentração efetiva de compostos antioxidantes capaz de capturar 50% das formas radicalares de DPPH livres ( $EC_{50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, menor será sua concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) e maior sua atividade antioxidante. (MOLYNEUX, 2004).

O ensaio utilizando o ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) mede a atividade de compostos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos e o seu radical reage de forma energética com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido na forma não colorida de ABTS. A maneira mais comum de obtenção desse radical consiste na reação de ABTS com radical ferromioglobina e  $H_2O_2$  na presença de peroxidase. Quando em contato com agentes antioxidantes, o radical ABTS é capturado de forma a alterar a coloração do meio de verde-azulado intenso para verde claro, por conta do mecanismo de estabilização (figura 4) (BORGES et al., 2011).

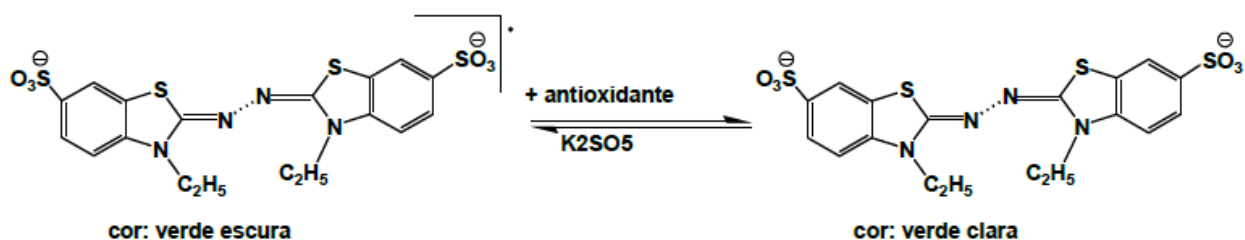


Figura 7. Mecanismo de estabilização do radical ABTS (BORGES et al., 2011)

Este ensaio apresenta relativa simplicidade, além de mostrar a capacidade da amostra de não só reagir com o ABTS mas também de inibir processos oxidativos. Porém, é uma técnica que depende do tempo de incubação, da taxa da amostra quantificada e exibe pouca seletividade na reação com espécies doadoras de hidrogênio (FLOEGEL et al., 2011).

Para se chegar ao ponto da análise das propriedades antioxidantes de produtos naturais é necessário antes se fazer uma triagem de plantas que possam apresentar essa atividade, e esse processo se inicia com atividades de bioprospecção.

### **3.5 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE**

A família Euphorbiaceae representa o quarto maior grupo das angiospermas, com 6.000 espécies de hábitos que variam de herbáceo ao arbóreo, sendo encontradas em praticamente todo o território global com exceção dos polos (SÁTIRO; ROQUE, 2008). Se dividem em 5 subfamílias e em mais de 300 gêneros e algumas espécies têm importância econômica para a sociedade moderna, trazendo uma série de benefícios para a espécie humana. Um exemplo importante é o da *Hevea brasiliensis* (seringueira) que juntamente com a *H. benthamiana* são as principais espécies utilizadas na produção de borracha mundial (PRITCHARD, 2003).

Por serem detentoras de composições químicas diversas, as espécies de Euphorbiaceae possibilitam seu uso econômico para diversos fins como produção de tintas, de plásticos e plastificantes, sabões, cosméticos e fertilizantes. É relatado na literatura a presença de compostos como flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (ERNST et al., 2015; SILVA et al., 2014). No Brasil, Euphorbiaceae possui um grande potencial de aproveitamento, com mais de 1.100 espécies, todas nativas ou aclimatadas no território nacional. O uso popular medicinal de diversos gêneros é recorrente principalmente de espécies dos gêneros *Croton*, *Jatropha* e *Mabea* (TRINDADE E LAMEIRA, 2014).

#### **3.5.1 *Croton* spp.**

Segundo estudo realizado por pesquisadores do Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia (IPAM) em 2008, plantas do gênero *Croton* são encontradas em florestas com planície de inundação, geralmente próximas a cursos de água como rios. As espécies de *Croton* são consideradas pioneiras, com ciclo de vida variando de 5 a 20 anos, sendo importantes na dinâmica de sucessão ecológica, chegando a predominar na floresta secundária até o décimo ano e, no processo de recuperação da floresta, o gênero *Croton* é o que possui maior valor

ecológico (MAROYI, 2017). Vegetais desse gênero apresentam ciclo fenológico de aproximadamente 5 meses, sendo organizado da seguinte maneira: floração - julho e agosto, frutificação - agosto, maturação - setembro e disseminação - setembro e outubro. A fase de floração coincide com o período seco e a disseminação com início do período de chuvas. Pelo fato de as sementes serem pequenas, podem facilmente ser disseminadas pelo vento, por aves e pela água (AZEVEDO et al., 2008).

O gênero está distribuído nas regiões amazônicas da Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil. Ainda no Brasil, também estão distribuídas nos estados do Acre, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (NARDI et al., 2006).

Representantes do gênero *Croton* oferecem uma série de produtos como a “casca cascarilla” obtida de *C. eluteria*, que é usada para fazer um tônico amargo medicinal. *C. tiglium* produz substância conhecida como óleo de Cróton que apresenta atividade carcinogênica e é utilizado para pesquisas voltadas ao tratamento do câncer (PRITCHARD, 2003).

A *C. lechleri*, uma espécie de *Croton* já explorada em alguns países da América do Sul, tem alegação de uso popular para tratamento de infecções fúngicas e bacterianas, câncer, distúrbios digestivos, febre, hemorragias, "limpeza" do sangue, úlceras gástricas, feridas, úlceras bucais, sendo também utilizada com secativo por conta de suas características adstringentes (ALONSO-CASTRO et al., 2012; MONTOPOLI et al., 2012). De acordo com Fischer et al.(2004), o látex de *C. lechleri* é largamente utilizado na América do Sul como remédio de uso geral no tratamento, principalmente, de diarreia, tosse, resfriado e tratamento tópico de herpes simples. Em seu estudo, os autores concluíram que o látex pode ser uma fonte importante na produção de medicamento antidiarreico que age reduzindo a atividade excessiva de canais de cloreto tipo CFTR durante episódios de diarreia líquida. Além disso, o extrato do látex pode servir como complemento alternativo de tratamento para diarreia pediátrica, bem como para tratamento de episódios diarreicos em pacientes que apresentam SIDA.

O extrato de *C. lechleri* também apresentou atividade constritora de musculatura lisa vascular e gástrica, tendo atividade mais pronunciada na musculatura vascular (FROLDI et al., 2009). Lopes et al. (2004) demonstraram capacidade antioxidante, em especial em células haplóides de leveduras com crescimento estacionário, devido a presença de compostos fenólicos, e atividade mutagênica.

No látex de *C. lechleri* foi também identificada a presença de um alcaloide denominado de taspina, o qual apresentou a capacidade de inibir a proliferação de uma linhagem de

melanoma humano (SK23) e de câncer de cólon (HT29). Este estudo realizado por Montopoli et al., (2012) comparou a atividade do látex e da taspina com a de fármacos de uso de referência (Taxol e Vinblastina), e a atividade antiproliferativa do látex foi constatada das concentrações de 100 a 1 ug/mL. Foi constatado, com isso, que o látex de *C. lechleri* e taspina podem inibir a proliferação celular, com alta potência, de células de melanoma SK23, apoiando o uso empírico do látex como agente anticâncer na etnomedicina e a taspina como agente anticâncer presente no látex, concordando com estudos de atividade antimutagênica realizados por Rossi et al. (2003).

Diversos compostos químicos podem ser responsáveis por essas e outras atividades biológicas de *C. lechleri*. Em um perfil fitoquímico do óleo essencial da casca, obtido por Rossi et al. (2011), através de análise por CG-EM, foram detectados e identificados 74 compostos compreendidos nas classes químicas dos sesquiterpenos e monoterpenos, sendo a estrutura química confirmada por CG-EM e RMN 1H. Neste caso, o óleo não apresentou potencial antioxidante relevante pelos métodos de captura de radical DPPH e no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

### **3.6 *Croton urucurana* Baillon**

*Croton urucurana* Baill. é nativa do Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil, caracterizada como espécie arbórea e popularmente conhecida como sangra d'água (BARBIERI et al., 2014).

É empregada na medicina tradicional por conta de suas atividades anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes de feridas cutâneas, além de ser utilizada para tratamento da gastrite (ESMERALDINO; SOUZA; SAMPAIO, 2005). As cascas e o látex apresentam composições químicas diferentes, como o trabalho de Cordeiro et al. (2016) ressalta. Neste trabalho, os autores obtiveram o perfil fitoquímico do extrato metanólico das cascas de *C. urucurana* através do uso de UHPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS e testaram suas atividades antiinflamatória e antinociceptiva. O perfil fitoquímico mostrou a presença de 4 flavonóides (catequina, epicatequina, galocatequina e procianidina B3), 3 alcalóides (tembetarina, magnoflorina e taspina) e 3 diterpenos (metil-3-oxo-12-epibarbascoato, metil-12-epibarbascoato e ácido Hardwickico), respectivamente exibidos na Figura 8 abaixo.

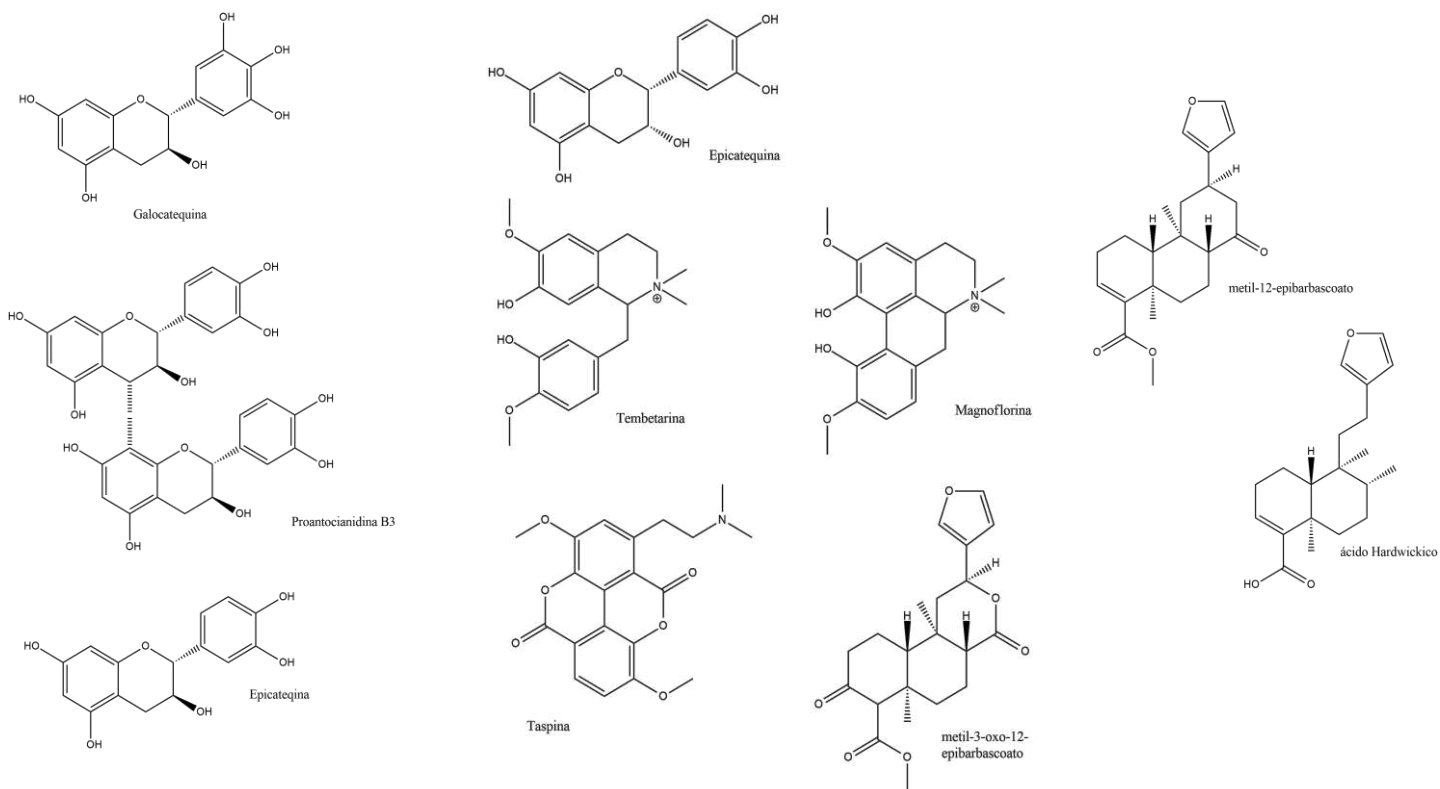


Figura 8. Compostos presentes no látex de *C. urucurana* identificados por Cordeiro et al. (2016). Galocatequina, proantocianidina B3, catequina, epicatequina, tembatarina, magnoflorina, taspina, metil-3-oxo-12-epibarbatoato, metil-12-epibarbatoato e ácido Hardwickico.

Cordeiro et al. (2016) também confirmaram a alegação de uso para atividade antiinflamatória e antinociceptiva pelo modelo de edema de pata induzido por carragena, sendo que a atividade antinociceptiva compreende rotas de ação centrais e periféricas, podendo estar relacionadas com os compostos encontrados.

Peres et al. (1997) já haviam também identificado alguns desses compostos anteriormente em extrato hidroalcoólico das cascas de *C. urucurana*. Foram identificados, na ocasião, ácido acetil-aleurítico,  $\beta$ -sitosterol-O-glicosídeo, campesterol, catequina, galocatequina e sonderianina (Figura 9).

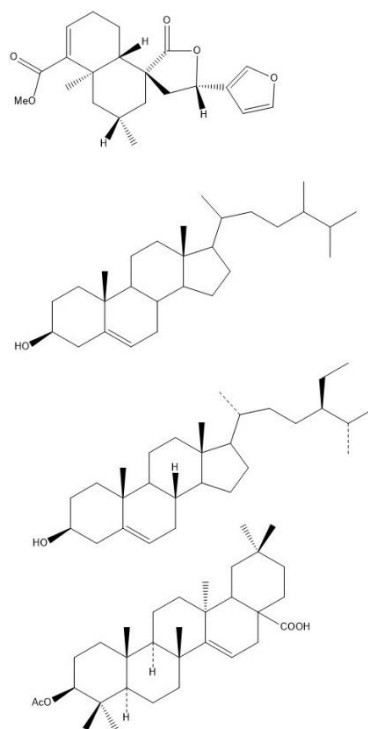


Figura 9. Estruturas químicas do ácido acetil aleuritólico, campesterol,  $\beta$ -sitosterol e sonderianina (de cima para baixo, respectivamente).

Os compostos encontrados em *C.urucurana* mostrados nas figuras 8 e 9 são diretamente responsáveis por seus efeitos farmacológicos cicatrizante, anti-inflamatório e antibacteriano. Grande parte dessas substâncias é classificada como compostos fenólicos que são conhecidos por sua capacidade antioxidante importante auxiliando na proteção contra danos oxidativos que são provável causa para doenças crônico-degenerativas e neoplasias por exemplo (DORNAS et al., 2007).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar comparativamente a composição química e atividades antioxidantes *in vivo* e *in vitro* de derivados vegetais de *C. urucurana* (Látex- LCU e Extrato Etanólico das Cascas – ECU).

### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar influência das técnicas para extração dos derivados nas suas respectivas composições químicas;
- Realizar análise química comparativa por FIA-ESI-IT-MSn do látex (LCU) e extrato etanólico das cascas de *C. urucurana* (ECU);
- Realizar prospecção fitoquímica comparativa por cromatografia em camada delgada (CCD);
- Quantificar polifenóis totais, flavonoides totais e taninos totais no LCU e ECU;
- Avaliar atividade antioxidante *in vitro* do LCU e ECU;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do ECU.

## REFERENCIAS

ALONSO-CASTRO, A.J. *et al.* Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 438–442, 2012.

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

ANDRADE, E. R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B.CEPPA, Curitiba**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D. V. Biomarcadores de Estresse Oxidativo: Novas Possibilidades de Monitoramento. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 19, p. 73–79, 2006.

ARAÚJO, T. A. S. *et al.* A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008.

AVELLO, M.; SUWALSKY, M. Radicales Libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. **Atenea**, n. 494, p. 161–172, 2006.

AZEVEDO, K. *et al.* **Guia Prático para extração de sangue de Grado (*Croton lechleri* Müll. Arg).** Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia, 2008.

BARBIERI, D. S. V *et al.* Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 887–896, 2014.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BORGES, L. L. *et al.* Uma abordagem sobre Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–20, 2011.

CALIXTO, J. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 200, p. 37–39, 2003.

CECHINEL-FILHO, V. C.; 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.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CORDEIRO, K. W. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 128–135, 2016.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

DISTASI, L. C. *et al.* Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69–91, 2002.

DORNAS, W. C. *et al.* Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 31, p. 241–249, 2007.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016.

ECKL, P. M.; BRESGEN, N. Genotoxicity of lipid oxidation compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 244–252, 2017.

ERNST, M. *et al.* Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 90–101, 2015.

ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v. 12, n. 8, p. 570–576, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 2, p. 32–39, 2007.

FERRO, C. D. O. *et al.* Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 31–38, 2010.

FISCHER, H. *et al.* A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 351–357, 2004.

FLOEGEL, A. *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.

FROLDI, G. *et al.* Activity of sap from *Croton lechleri* on rat vascular and gastric smooth muscles. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 768–775, 2009.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178–182, 2005.

GOMES, G. *et al.* Método de Avaliação da Defesa Antioxidante : Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231–238, 2013.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 361–380, 2007.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 129–135, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1–8, 1990.

HASENCLEVER, L. *et al.* A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559–2569, 2017.

JOLY, C. A.; VERDADE, M.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista Usp**, v. 89, p. 114–133, 2011.

LOPES, M. I. L. E. *et al.* Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 437–445, 2004.

LORDÊLO, M. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAROYI, A. Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of *Croton sylvaticus* Hochst. ex C. Krauss. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 423–429, 2017.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 74–76, 2014.

MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. December 2003, p. 211–219, 2004.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MONTOPOLI, M. *et al.* *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 747–753, 2012.

NARDI, G. M. *et al.* Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 73–78, 2006.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 185–198, 2016.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009a.

OLIVEIRA, F. C. *et al.* Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 590–605, 2009b.

PRITCHARD, A. Economically valuable members of the Euphorbiaceae. **Introduction to the Euphorbiaceae**. Cactus & Co. libri: Tradate, Itália. p. 58-59. 2003.

RIBEIRO, S.M.R; QUEIROZ, J. H.; GOUVEIA, C. A Formação E Os Efeitos Das Espécies Reativas De Oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

RODRIGUES, M. V. N. *et al.* O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multi Ciência**, n. October 2006, p. 14, 2006.

ROSSI, D. *et al.* Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* Müll. Arg. latex. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 10, n. 2–3, p. 139–144, 2003.

ROSSI, D. *et al.* Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 837–848, 2011.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 99–118, 2008.

SILVA, S. I. *et al.* Seed oils of Euphorbiaceae from the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 124–134, 2014.

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

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95–100, 2005.

SOARES, E. D. R. *et al.* Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 3, p. 64–72, 2015.

SOUSA, C. M. D. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. D. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243–248, 2004.

TRINDADE, M. J. S.; LAMEIRA, O. A. Espécies de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, p. 1–24, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

## **Capítulo 1**

### **CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *in vivo* DE *Croton urucurana* Baillon.**

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade presente na Mata Atlântica brasileira é fonte importante para atividades de bioprospecção de produtos naturais, principalmente no que se refere à pesquisa de substâncias com importantes atividades biológicas por exemplo: antioxidante, antiinflamatória e antitumoral (DI STASI et al., 2002).

Dentro dessa diversidade se inclui *Croton urucurana*, um vegetal de hábito arbóreo pertencente à família Euphorbiaceae, popularmente conhecido como Sangue de drago, Drago, Sangre d'água etc (BARBIERI et al., 2014). Essa planta tem alegação de uso para tratamento de doenças inflamatórias, feridas cutâneas e infecções bacterianas e virais.

As atividades biológicas de *C. urucurana* são consequência da composição química do látex presente em sua casca constituída principalmente de compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides, sendo a composição majoritária de compostos fenólicos (CORDEIRO et al., 2016).

Esses compostos têm a capacidade de capturar radicais livres, bloquear a cadeia de peroxidação lipídica e quelar metais de transição, o que reflete uma capacidade antioxidante potente, justificando o uso de plantas ricas em compostos fenólicos para tratamento de doenças diretamente relacionadas com aumento do estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Nesse sentido, o presente trabalho pretende fazer uma caracterização fitoquímica de *C. urucurana* bem como avaliar o seu potencial antioxidante a fim de aumentar o conhecimento sobre essa espécie vegetal poder propor uma possível fonte de pesquisa em novos fitoterápicos. Pretende também fazer uma análise comparativa entre as formas de obtenção do derivado vegetal e como isso influencia na composição química do derivado vegetal obtido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção dos derivados vegetais

O material vegetal foi coletado no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) localizada na região da Zona da Mata Mineira, nas coordenadas 20°33' - 21°00'S e 42°40' - 40°20'W onde predomina a Mata Atlântica no estado de Minas Gerais Brasil. Uma exsicata foi depositada no herbário VIC da UFV (exsicata n°47.928)

Para obtenção dos derivados vegetais, dois métodos foram empregados. No primeiro método, a retirada da casca foi conduzida de acordo com a forma tradicional utilizada pelos raizeiros da região. É dessa maneira que eles obtêm o látex para preparo das tinturas que são

utilizadas nas feridas e para uso oral. Os fragmentos retirados seguiram a extensão vertical do caule como observado na Figura 1. As cascas da *C. urucurana* (1,950kg) foram cortadas em pequenos pedaços e submetidas à maceração sequencial (3 ciclos de 1 semana, com troca de solvente a cada início de ciclo) a frio com etanol P.A (95%) na razão de 1:2 (500 g de casca: 1L de etanol). O extrato (ECU) obtido foi filtrado a vácuo e concentrado em rotaevaporador a 80°C

No segundo método, o látex foi coletado no período inicial da manhã (até as dez horas) por meio de cortes feitos no caule da árvore, seguindo o padrão de corte "espinha de peixe" (um corte central vertical e cortes laterais inclinados) (Figura 1), padrão utilizado na extração do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Para isso foi utilizada uma faca do tipo Jebong, que permite que o corte tenha uma profundidade adequada de até 5 mm. O látex foi guiado para as tigelas de coleta por uma bica de alumínio fincada na parte inferior do corte central, e, após esse passo, o material coletado foi armazenado em frascos de vidro ou plástico para posteriores análises.

O látex (LCU) coletado foi seco à temperatura ambiente, se convertendo em um pó fino, sem necessidade de processo de secagem adicional e foi utilizado dessa maneira nas análises posteriores.



Figura 1. Formas de obtenção do derivado vegetal. Na foto da esquerda: forma tradicional de obtenção. Na foto da direita: forma proposta para a obtenção seguindo o modelo de extração utilizado na *Hevea brasiliensis* (seringueira).

## 2.2. Prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

### 2.2.1. Escolha da fase móvel

Realizou-se um delineamento experimental com o objetivo de se avaliar a melhor fase móvel para o ECU e LCU. Para isso, foi feito um desenho de mistura levando-se em

consideração três solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano P.A, acetato de etila P.A e metanol P.A (Tabela 1). As proporções de cada solvente foram determinadas através do delineamento experimental realizado no software Minitab 7.1. Usou-se como revelador uma solução etanólica de ácido sulfúrico 10% de forma a encontrar a proporção do solvente que possibilitou a melhor separação das bandas (melhor resolução) das duas amostras. O desenho de mistura foi feito considerando um volume final de fase móvel de 40 mL (Figura 2) e a melhor fase móvel encontrada foi a de número 3 (Tabela 1).

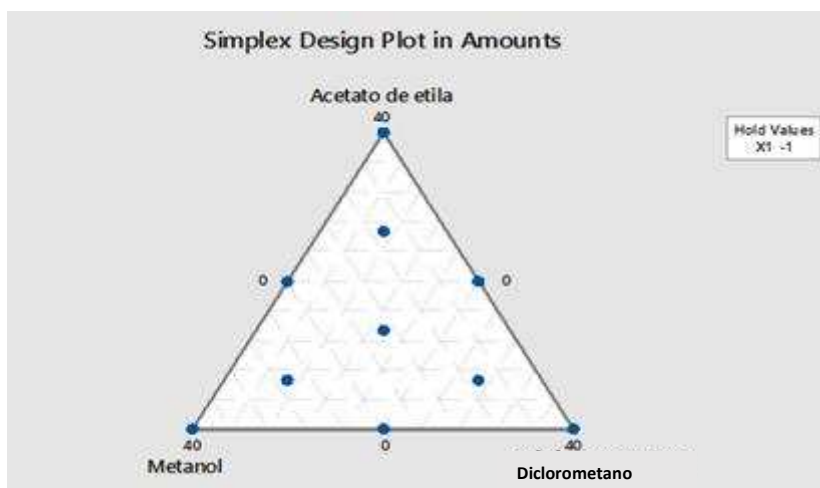


Figura 2- Desenho de mistura com diclorometano, acetato de etila e metanol.

Tabela 1- Delineamento experimental com diclorometano, acetato de etila e metanol para volume final de 40 mL de fase móvel.

| FM* | Diclorometano (mL) | Acetato de etila (mL) | Metanol (mL) |
|-----|--------------------|-----------------------|--------------|
| 1   | 20                 | 0                     | 20           |
| 2   | 0                  | 20                    | 20           |
| 3   | 26,7               | 6,7                   | 6,7          |
| 4   | 0                  | 40                    | 0            |
| 5   | 6,7                | 6,7                   | 26,7         |
| 6   | 0                  | 0                     | 40           |
| 7   | 20                 | 20                    | 0            |
| 8   | 40                 | 0                     | 0            |
| 9   | 6,67               | 26,7                  | 6,7          |
| 10  | 13,3               | 13,3                  | 13,3         |

\*FM = Fase Móvel

### 2.2.2. Classes de metabólitos secundários pesquisadas

Foi investigada a presença de metabólitos secundários das seguintes classes: fenólicos, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, óleos essenciais, triterpenos e esteroides, saponinas e alcaloides – em ECU e LCU. As corridas cromatográficas foram realizadas seguindo as

metodologias descritas por Wagner (1996) e Harbone (1984) com adaptações, utilizando cromatofolhas com fase estacionária sílica-gel UV254 (Alugran), com a fase móvel escolhida através do delineamento experimental, empregando reveladores e padrões fitoquímicos específicos para cada grupo de metabólitos secundários. Para flavonoides, cumarinas e antraquinonas, foram necessárias visualizações na região do ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Os resultados obtidos pela cromatografia foram confrontados com os padrões de referência com relação aos fatores de retenção (Tabela 2). O volume de fase móvel preparado foi de 40 mL. Logo, as proporções foram ajustadas para esse volume.

*Tabela 2- Fases móveis, reveladores e padrões de referência utilizados para prospecção fitoquímica de ECU e LCU.*

| Metabólito secundário  | Revelador                       | Padrão de referência     |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Polifenol              | Reagente de Barton              | Ácido Pirogálico         |
| Flavonoides            | NP/PEG* ou AgCl <sub>3</sub> ** | Rutina                   |
| Cumarinas              | KOH** 5%                        | Venaloft                 |
| Antraquinonas          | KOH 5%                          | 1,8 diidroxiantraquinona |
| Óleos Essenciais       | Anisaldeído sulfúrico           | Eugenol                  |
| Triterpenos Esteróides | Reagente Lerberman-Burchard     | b-sisterol               |
| Saponinas              | Anisaldeído Sulfúrico           | 18-b-glicirretínico      |
| Alcaloides             | Dragendorff                     | Quinina                  |

\*Solução etanólica de Aminoetil-difenilborato e Polietilenoglicol; \*\*Cloreto de Alumínio; \*\*\* Hidróxido de Potássio.

### **2.2.3. Obtenção do extrato alcaloídico**

A confirmação de presença de alcaloides nas amostras foi feita por meio de prospecção específica para identificação de alcaloides, utilizando fase móvel composta por clorofórmio e metanol na proporção de 38:2. Para a obtenção de um extrato alcaloídico, foi realizada uma marcha de extração a fim de concentrar os alcaloides presentes em ECU e LCU. Após pesar 1 g do ECU, este foi ressuspenso em 50 mL de água destilada e o pH da solução aquosa ajustado para 2 com a adição de HCl 4M. Após agitação e solubilização do extrato, a solução foi filtrada e o filtrado resultante basificado para pH 10, pela adição de NaOH 1M. Este foi então submetido a uma partição líquido-líquido utilizando 50 mL de clorofórmio como solvente orgânico em funil de separação. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com o intuito de se realizar uma extração exaustiva. A fração clorofórmica contendo os alcaloides obtida foi separada e o solvente evaporado por concentração em rotaevaporador. O resíduo obtido foi utilizado para a prospecção de alcaloide. O mesmo procedimento foi realizado para LCU.

### **2.3. Determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu**

O procedimento de quantificação de polifenóis totais baseou-se na metodologia espectrofotométrica descrita por Gontijo et al. (2017), com algumas adaptações. Esta técnica foi adaptada para LCU e ECU. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g amostra. As análises foram realizadas em triplicata, no laboratório de Biodiversidade (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal de Viçosa).

#### **2.3.1. Preparo das amostras**

Para a quantificação de compostos fenólicos totais, uma massa de 30 de cada amostra foi transferida para um béquer e dissolvida em 20 mL com auxílio de um bastão de vidro de metanol. Essas soluções, após filtradas foram transferidas para balões volumétricos e avolumados para 25 mL, um para cada amostra (ECU e LCU).

#### **2.3.2. Reação colorimétrica de Folin-Ciocalteu**

Uma alíquota de 1,0 mL do filtrado foi transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se, em seguida, 7,5 mL de água. Após agitação foi adicionado 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, misturando-se, novamente, por agitação. Após três minutos da adição do reagente, foi adicionado 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (p/v). A solução, depois de homogeneizada, foi deixada em repouso por 60 minutos, sendo determinada a absorbância no comprimento de onda de 720 nm, no espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g amostra (mg EAG/g amostra). Uma prova em branco foi realizada, utilizando-se água destilada em substituição ao filtrado. O procedimento foi realizado em triplicata.

#### **2.3.3. Curva de Calibração**

Em um balão volumétrico de 25 ml, uma solução metanólica de ácido gálico de concentração correspondente a 0,5 mg/ml foi preparada. Posteriormente, alíquotas de 10, 25, 50, 60, 75, 100 e 150 µl desta solução foram transferidas para um tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio, foi acrescentada água, de acordo com a Tabela 3, e em seguida foram obedecidos os

mesmos passos presentes na sessão 2.3.2.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão linear, pelo método de mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta ( $y = 0,0998x - 0,0632$ ) e o coeficiente de correlação linear ( $R^2 = 0,9968$ ).

*Tabela 3- Concentração das soluções referências de ácido gálico utilizadas na construção da curva de calibração de polifenóis totais por espectrofotometria.*

| <i>Tubos</i> | <i>Vol. Ácido gálico 0,5 mg/ml (uL)</i> | <i>H<sub>2</sub>O (mL)</i> | <i>Reagente FC* (mL)</i> | <i>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (7,5%) (mL)</i> | <i>[ácido gálico] final (ug/mL)</i> |
|--------------|---|----------------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|
| 1            | 10                                      | 8,490                      | 0,5                      | 1,0   | 0,50                                |
| 2            | 25                                      | 8,475                      | 0,5                      | 1,0   | 1,25                                |
| 3            | 50                                      | 8,450                      | 0,5                      | 1,0   | 2,50                                |
| 4            | 60                                      | 8,440                      | 0,5                      | 1,0   | 3,00                                |
| 5            | 75                                      | 8,425                      | 0,5                      | 1,0   | 3,75                                |
| 6            | 100                                     | 8,400                      | 0,5                      | 1,0   | 5,00                                |
| 7            | 150                                     | 8,350                      | 0,5                      | 1,0   | 7,50                                |

*\*Reagente de Folin-Ciocalteu*

*\*\* Solução aquosa de Carbonato de Cálcio 7,5% p/v*

#### **2.4. Determinação de Taninos totais**

O procedimento de quantificação de taninos totais foi baseado na metodologia descrita por Gontijo et al. (2017), com algumas adaptações. Esta técnica foi adaptada para o ECU e LCU. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g amostra (mg EAG/g amostra). Essa técnica representa uma forma de determinação indireta de taninos totais subtraindo-se o valor da concentração de fenólicos após a adição da polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich) do valor do teor de fenólicos totais obtido pelo método descrito em 2.3. A polivinilpirrolidona é um polímero que interage com os taninos presentes na amostra e ocasiona sua precipitação, deixando apenas os compostos fenólicos não tânicos livres para reagirem com o reagente colorimétrico. As análises foram realizadas em triplicata, no laboratório de Biodiversidade (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal de Viçosa).

### 2.4.1. Preparo das amostras

Para a quantificação de taninos totais, uma massa de 30 mg das amostras foi transferida para um béquer e dissolvida em 20 mL de metanol com auxílio de bastão de vidro. As soluções foram filtradas e a elas foram adicionados 50 mg de polivinilpirrolidona sendo submetidas a agitação frequente por 60 minutos, com auxílio de agitador magnético. Em seguida, as misturas foram filtradas e os filtrados transferidos para balões volumétricos e avolumados com metanol P.A para 25 mL, um para cada amostra (ECU e LCU).

### 2.4.2. Reação colorimétrica de Folin-Ciocalteu

Uma alíquota de 1,0 mL do filtrado foi transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se, em seguida, 7,5 mL de água. Após agitação, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, misturando-se, novamente, por agitação. Após três minutos da adição do reagente, foi adicionado 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (p/v). A solução, depois de homogeneizada, foi deixada em repouso por 60 minutos, ao abrigo de luz, sendo determinada a absorvância em 720 nm, no espectrofotômetro. Uma prova em branco foi realizada, utilizando-se metanol em substituição ao filtrado. Os resultados foram expressos em mg EAG/g amostra e foram obtidos através do cálculo:

$$\text{Teor de taninos totais} = (\text{teor de fenólicos totais}) - (\text{teor de fenólicos não tânicos})$$

### 2.4.3. Curva analítica

A curva analítica foi a mesma utilizada para a determinação de compostos fenólicos totais (Tabela 3). Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão linear, pelo método de mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta ( $y = 0,0998x - 0,0632$ ) e o coeficiente de correlação linear ( $R^2 = 0,9968$ )

### 2.5. Determinação do teor de Flavonóides totais

O procedimento de quantificação de flavonoides totais foi baseado na técnica espectrofotométrica empregando reagente de cloreto de alumínio, como descrita por Quettier-Deleu et al., (2000). Esta técnica foi adaptada e validada para ECU e LCU. As análises foram realizadas em triplicata, no laboratório de Biodiversidade (Departamento de Bioquímica e

### **2.5.1. Preparo das amostras**

Foram pesados 125 mg da amostra ECU e LCU em um béquer contendo 25 mL de metanol e, em seguida, deixada em ultra-som a temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi filtrada em papel de filtro e transferida para um balão volumétrico de 25 mL.

### **2.5.2. Reação colorimétrica por cloreto de alumínio**

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,5 mL da solução preparada em 2.5.1. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL de  $\text{AlCl}_3$  2% p/v em metanol e 2,5 mL de metanol. O ensaio foi realizado em triplicata. Para o branco, foram utilizados 0,5 mL de metanol em substituição à amostra. Após exatos 60 minutos em repouso na ausência de luz, a absorvância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm.

### **2.5.3 Curva de calibração para flavonoides totais**

Em um balão volumétrico de 25 mL, uma solução de rutina a 5 mg/mL em metanol foi preparada. Em seguida, alíquotas de 4,0; 9,0; 18,0; 26,0 e 44,0 uL desta solução foram transferidas para o tubo de ensaio. Para cada tubo de ensaio, foi acrescentado 0,5 mL da solução de  $\text{AlCl}_3$  e adicionado metanol. Para a realização deste branco, foram adicionados 3,5 mL de metanol e 0,5 mL de  $\text{AlCl}_3$  2% p/v em metanol. Após exatos 60 minutos em repouso na ausência de luz, a absorvância foi medida no comprimento de onda de 415 nm (Tabela 4).

Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão linear, pelo método de mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta ( $y = 0,0332x - 0,0232$ ) e o coeficiente de correlação linear ( $R^2 = 0,9983$ ).

Tabela 4 - Concentração das soluções referências de rutina utilizadas na construção da curva de calibração de flavonoides totais por espectrofotometria.

| <i>Tubos</i> | <i>Solução Padrão de rutina(uL)</i> | <i>MeOH* (mL)</i> | <i>AlCl<sub>3</sub>** 2% (mL)</i> | <i>Rutina (ug/mL)</i> |
|--------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 1            | 4,0                                 | 2,996             | 0,5                               | 6,3                   |
| 2            | 9,0                                 | 2,992             | 0,5                               | 12,6                  |
| 3            | 18,0                                | 2,9825            | 0,5                               | 25                    |
| 4            | 26,0                                | 2,9737            | 0,5                               | 37,6                  |
| 5            | 44,0                                | 2,9562            | 0,5                               | 62,6                  |

\* Metanol P.A; \*\* Solução metanólica de Cloreto de Alumínio

## 2.6. Análise por FIA-ESI-IT-MS/MS<sup>n</sup>

Os perfis cromatográficos do ECU e LCU foram obtidos empregando-se a análise de infusão por fluxo direto (FIA) adaptada do trabalho de Tala et al., (2013), usando uma bombaseringa com velocidade de fluxo de 10 µL/min, em espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray (ESI), nos modos positivo e negativo (Thermo, San Jose, EUA) equipado com analisador ion trap (IT) linear (Thermo Scientific LTQ XL) e software Xcalibur. A tensão capilar foi -35 V, a tensão de pulverização de 5 kV e lente de tubo de -100 V. A temperatura do capilar foi de 280 °C. Nitrogênio foi usado como gás carreador do fluxo e como nebulizante. A análise completa de varredura foi registrada na faixa m/z 100-2.000. As fragmentações em vários estágios (ESI-MS<sup>n</sup>) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra o gás hélio para ativação dos íons. Dois eventos foram realizados durante a análise no espectrômetro de massas, sendo primeiramente obtido o espectro de massa de varredura completa (“full-scan”) a fim de adquirir os dados dos compostos ionizados dentro da faixa estabelecida. No segundo evento foi realizado experimento MS/MS com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms., empregando dados de varredura dependente do full scan. A energia de colisão para MS/MS foi ajustada em 30 a 40eV. Aos íons produtos obtidos sucessivas fragmentações foram obtidas.

### 2.6.1. Clean up em SPE

A preparação do extrato consistiu em uma etapa de clean up por extração em fase sólida empregando cartuchos de RP18. Os cartuchos foram preconditionadas com MeOH (4 mL) e equilibrados com MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15, v/v) (4 mL). Os extratos (10 mg) a serem aplicados no

suporte de SPE foram previamente solubilizados em 1,5 mL da solução MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v), eluídos com a mesma proporção de fase móvel e posteriormente, secos em ar comprimido. Após a secagem, o extrato foi pesado e ressuspendido em MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) com quantidade necessária para fornecer uma solução com concentração de 1mg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, as soluções foram filtradas em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm. Ao final, 10 µl do extrato a 1 mg/mL foram transferidos para um vial e o volume completado com 990 µl de metanol grau LC-MS, obtendo-se uma solução a 10 ppm que foi injetado no espectrômetro de massa.

#### **2.6.2. Análise por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>**

A injeção das amostras foi realizada por fluxo direto empregando analisador “ion trap” Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletropray (ESI), nos modos positivo e negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Foi utilizado um tubo capilar de sílica fundida a 280 ° C, tensão de pulverização de 5,00 kV, tensão capilar de -35 V, lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5,0 µL de min<sup>-1</sup>. A análise completa de varredura foi registrada na faixa m / z de 100-1500. As fragmentações de vários estágios (ESI-MS<sup>n</sup>) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra o hélio para a ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquela faixa m/z. O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS realizado usando uma análise dependente de dados nas moléculas dessolvadas dos compostos de interesse em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons dos produtos foram então submetidos a fragmentações sucessivas nas mesmas condições.

#### **2.7. Atividade antioxidante *in vitro* dos derivados vegetais – Ensaio de captura do radical DPPH**

O ensaio de captura do radical DPPH foi realizado de acordo com Bekhit et al., (2011) com algumas modificações. A solução estoque foi preparada pela dissolução de 2,4 mg de DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) em 100mL de metanol e armazenada a 20 °C. Foram preparadas soluções metanólicas a 1 mg/ml das amostras ECU e LCU e do padrão de Catequina (Sigma-Aldrich) e em seguida foram preparadas diluições de 1:1, 1:3 e 1:5 (cada um em triplicata). Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foram postos para reagir com 3.900 µL da solução de DPPH por 30 minutos ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 515 nm. Resultados de EC50 foram expressos em mg de amostra/ g DPPH. As determinações foram realizadas em triplicata.

## **2.8. Análise *in vivo* da Atividade Antioxidante de ECU em fragmentos de pele – modelo de realização de feridas cutâneas em camundongos**

### **2.8.1. Realização das feridas para coleta periódica de fragmentos**

Os animais (Camundongos - *Mus musculus* - Knockout IL-10) foram anestesiados por injeção intramuscular de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e tiveram a região dorsolateral depiladas e a área foi desengordurada com éter (Merck®, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida houve a aplicação tópica de etanol (70%) e iodopovidona (10%) para a antisepsia (Johnson Diversey®, Rio de Janeiro, Brasil). Após a etapa de assepsia, uma ferida circular, de 10 mm de diâmetro foi feita por incisão cirúrgica na pele e tecido subcutâneo com um bisturi, até a exposição da fáscia muscular dorsal (MUNIZ et al., 2013). O experimento foi conduzido em 6 tratamentos com 12 repetições cada: Sal (controle; animais tratados com solução salina a 0,9%, VH animais tratados com 0,6 g da pomada base (Macrogol 400 (Polietilenoglicol 400), Macrogol 4000 (Polietilenoglicol 4000), Propilenoglicol ), grupo SS animais tratados com 0,6 g de sulfadiazina de prata (1%) (controle positivo), CR1: animais tratados com pomada a base de ECU (5% p/v); CR2: animais tratados com pomada a base de ECU (10% p/v). Em todos os grupos, as feridas foram limpas diariamente com solução salina 0,9% antes de cada tratamento. As feridas foram tratadas diariamente durante 14 dias. A cada 7 dias se recolhiam os fragmentos de metade dos ratos de cada grupo com posterior eutanásia. Esses fragmentos foram submetidos à análise da atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST). O ensaio foi realizado apenas com amostra de ECU. O projeto foi registrado em comitê de ética da Universidade Federal de Viçosa, sob nº 41/2017.

### **2.8.2. Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes**

#### **2.8.2.1. Preparo dos homogenatos**

Os fragmentos foram triturados com auxílio de homogeneizador de tecidos em tampão fosfato com EDTA pH 7,4, de forma a resultar em soluções de concentração correspondente a 100 mg.ml<sup>-1</sup>. Esses homogenatos foram utilizados para todas as análises de atividade antioxidante *in vivo* apresentadas nos itens de 2.8.2.2 a 2.8.2.5.

#### **2.8.2.2. Determinação da atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD)**

A determinação da concentração de SOD seguiu o protocolo desenvolvido por (SIDDIQUI; TARDIF; WARIS, 2005) com adaptações. Para a análise, foram preparadas

soluções de MTT a  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  e pirogalol a  $0,01 \text{ mg.ml}^{-1}$  e tampão fosfato pH 7,0. Em seguida, 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram pipetados em placas de 96 poços, juntamente com 45  $\mu\text{L}$  de tampão para os poços destinados aos brancos e 30  $\mu\text{L}$  de tampão para os poços destinados ao padrão. Posteriormente, em todos os poços foram adicionados 99  $\mu\text{L}$  de tampão, seguidos de 6  $\mu\text{L}$  da solução de MTT e 15  $\mu\text{L}$  da solução de pirogalol apenas para os poços das amostras e padrões. As placas foram encubadas por 5 min em estufa a  $37^\circ\text{C}$ . Para finalizar a reação, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de DMSO para leitura a 570 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína. Cálculo para obtenção do teor de SOD:  $[(\text{média-branco})/\text{padrão}]/\text{prtsOD}$ . O procedimento foi realizado em triplicata.

#### **2.8.2.3. Determinação da atividade enzimática de Catalase (CAT)**

A determinação da atividade de catalase seguiu o protocolo apresentado por (FERRO et al., 2010) com adaptações. Uma solução de peróxido de hidrogênio em tampão pH 7,0 a 0,2% v/v foi preparada para análise espectrofotométrica a 240nm. Em uma cubeta foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 1000  $\mu\text{L}$  de tampão pH 7,0 para zerar o equipamento, seguido da leitura da amostra (10  $\mu\text{L}$  de amostra + 1000  $\mu\text{L}$  de solução de peróxido de hidrogênio). O valor das absorvâncias foi observado no tempo zero ( $t_0$ ), em 30 segundos ( $t_{30}$ ) e em 60 segundos ( $t_{60}$ ), para cálculo de valor de delta ( $t_0-t_{60}$ ) que serviu para a determinação da concentração de catalase expressa em U CAT/mg de proteína. Cálculo para obtenção do teor de CAT:  $(\text{delta} \times 2,361) / \text{prt}_{\text{CAT}} \times \text{ABS}_{t_0}$ . O procedimento foi realizado em triplicata.

#### **2.8.2.4. Determinação da atividade enzimática da Glutathione -S- transferase (GST)**

A determinação da atividade de GST seguiu o protocolo apresentado por (TORRES; SOARES; MAIA, 2004) com adaptações. Uma solução de 2 ml de CDNB em álcool etílico 80% v/v (20,3 mg/ml) e uma solução de GSH reduzida em tampão fosfato pH 7,0 (30,7 mg/ml) foram preparadas, sendo a última sempre mantida no gelo. Para determinação da concentração de GST, 970  $\mu\text{L}$  de tampão foram adicionados a 10  $\mu\text{L}$  de CDNB, 10  $\mu\text{L}$  de homogenato e 10  $\mu\text{L}$  de GSH (nessa ordem) em uma cubeta de quartzo de 1ml. O branco da análise foi preparado sem a utilização do homogenato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm e o valor das absorvâncias foi observado no tempo zero  $t_0$ , em 30 segundos ( $t_{30}$ ), em 60 segundos ( $t_{60}$ ) e em 90 segundos ( $t_{90}$ ) para o cálculo do valor de delta ( $t_{90}-t_{30}$ ). O procedimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram calculados segundo a fórmula:  $[\text{delta amostra} - \text{delta branco}] \times 104,17 = \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de GST

### **2.8.2.5. Determinação do teor de proteínas totais**

A determinação da concentração de proteínas totais seguiu o protocolo apresentado por (BRADFORD, 1976) Bradford (1976) com adaptações. Em uma placa de 96 poços são colocados 20  $\mu\text{L}$  de amostra (2 poços por amostra) e 200  $\mu\text{L}$  de solução tampão ABC. Em seguida a placa é encubada por 10 minutos no escuro e após esse período foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de Folin a 30% v/v para posterior leitura a 700 nm. Na mesma placa das amostras é montada uma curva padrão de albumina com 9 pontos de concentração (de 0,25 a 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), utilizando dois poços para cada ponto e procedendo mesma maneira para as amostras. O teor de proteínas totais é expresso em  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  e os teores calculados vão auxiliar na obtenção dos valores referentes a concentração de SOD e CAT através da sua multiplicação pelos respectivos fatores de conversão (33,3 e 166,6 respectivamente).

### **2.9. Análise Estatística**

Os resultados serão expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). A normalidade na distribuição dos dados será avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. A variância dos dados será avaliada por meio de análise de variância unifatorial (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos serão comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de  $p < 0,05$  serão considerados estatisticamente significativos.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Obtenção do derivado vegetal**

Foi observado que a forma tradicional de extração do látex de *C. urucurana* (Figura 1) representa uma injúria pois lesiona o caule em uma extensão considerável quando na retirada da casca obedecendo o sentido vertical do tronco. Isso se reflete em calosidades e redução da vida do vegetal pois prejudica todo o processo de condução de seiva, já que é na casca onde estão as estruturas responsáveis por esse processo (PAULA; ALMEIDA, 2017). No contexto da sustentabilidade e preservação dos indivíduos da espécie, essa forma de obtenção do derivado vegetal se constitui em risco para a continuidade de *C. urucurana* no meio, ameaçando a reposição vegetal nos fragmentos de mata atlântica reflorestados e ameaçando as atividades dos raizeiros. Quando obtido por sangria, o látex é recolhido sem material de casca, aumentando a garantia de que não haverá contaminação por fragmentos, dando a oportunidade de avaliação

da sua composição mais específica. Além disso, a retirada por sangria consome uma extensão de casca muito pequena, o que prolonga a integridade e favorece a rápida recuperação da planta (AZEVEDO et al., 2008).

### 3.2. Prospecção Fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

#### 3.2.1 Análise cromatográfica

A prospecção fitoquímica do ECU revelou-se positiva para todas as classes de metabólitos pesquisadas (fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, óleos essenciais, saponinas, alcaloides e triterpenos e esteroides). Para o LCU não foi observada a presença de flavonoides, o que pode ser explicado pela sua reduzida concentração neste derivado vegetal. Os resultados da prospecção fitoquímica podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de ECU e LCU.

| <i>Metabólito secundário</i>    | <i>ECU</i> | <i>LCU</i> |
|---------------------------------|------------|------------|
| <i>Cumarinas</i>                | +          | +          |
| <i>Antraquinonas</i>            | +          | +          |
| <i>Óleos Essenciais</i>         | +          | +          |
| <i>Triterpenos e Esteroides</i> | +          | +          |
| <i>Saponinas</i>                | +          | +          |
| <i>Alcalóides</i>               | +          | +          |
| <i>Fenólicos</i>                | +          | +          |
| <i>Taninos</i>                  | +          | +          |
| <i>Flavonoides</i>              | +          | -          |

Plantas do gênero *Croton* são fonte abundante de metabólitos secundários, e uma das razões para isso é o seu crescimento rápido que favorece a síntese de substâncias de atividade fisiológica como alcaloides e terpenóides que são parte da defesa qualitativa do vegetal (SAVIETTO et al., 2013).

Para que a *Croton* consiga sintetizar seus metabólitos, há necessidade de grande oferta de recursos, pois plantas de crescimento rápido precisam de um maior aporte de nutrientes, luz e água para sobreviverem, uma vez que têm pouco tempo para se desenvolverem, como estabelecido pela teoria da alocação de recursos (COLEY, 1985).

Os compostos encontrados em *C.urucurana* possuem diferentes funções biológicas de proteção do vegetal e diferentes atividades biológicas para o uso humano, principalmente no

tratamento de doenças inflamatórias, infecções e neoplasias, sendo os compostos polifenólicos, taninos e flavonóides diretamente relacionados a essas atividades (CAI; CHEN; PHILLIPSON, 1993; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; DORNAS et al., 2007; MACIEL et al., 2006; SOARES et al., 2015).

### 3.3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais, taninos totais e flavonoides totais.

Os resultados para os teores de compostos fenólicos totais, taninos totais e flavonoides totais são expressos na Tabela 6 abaixo.

*Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais, taninos totais, flavonoides totais encontrado no extrato etanólico da casca (ECU) e no látex (LCU) de C.urucurana.*

| <i>Amostra</i> | <i>Fenólicos totais<br/>(mg EAG/g)</i> | <i>Taninos totais*</i><br><i>(mg EAG/g)</i> | <i>Taninos<br/>Totais (%)</i> | <i>Flavonóides totais<br/>(mg ER/g)</i> |
|----------------|--|---|-------------------------------|---|
| <i>ECU</i>     | $235,3 \pm 8,9^a$                      | $204,7 \pm 9,1^a$                           | $86,9 \pm 0,7$                | $7,9 \pm 0,2^a$                         |
| <i>LCU</i>     | $296,1 \pm 9,8^b$                      | $270,7 \pm 9,9^b$                           | $91,4 \pm 0,5$                | $6,4 \pm 0,1^a$                         |

*Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância  $p < 0,05$ . \* = Calculado pela diferença apresentada no item 2.4.2.*

Os teores de compostos fenólicos (CF) encontrados no ECU e LCU entram em concordância com o que já é apresentado em literatura com relação à composição fenólica dos extratos da casca e do látex de *C. urucurana* (CORDEIRO et al., 2012; FAVARETTO et al., 2011; PERES et al., 1997). Porém, como pode ser observado, existe uma diferença significativa entre os teores de CF de ECU e LCU, sendo LCU a amostra mais rica nessas substâncias, bem como em taninos totais.

Como a determinação do teor de taninos totais é metodologicamente semelhante à de fenólicos totais, pode-se estabelecer uma relação direta entre esses resultados. Na Tabela 5, é possível notar que o teor de taninos totais representa a maior parte dos compostos fenólicos totais presentes nas duas amostras. Em termos percentuais, os taninos de ECU representam em média 86,9% dos CF contidos na amostra e em LCU representam em média 91,4%.

Essas grandes proporções de taninos chamam atenção para o fato de que as principais alegações de uso para *C. urucurana* giram em torno das atividades biológicas dos taninos, principalmente, taninos condensados ou proantocianidinas (PA), que envolvem atividade cicatrizante, antiinflamatória e antibacteriana (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Quanto à concentração de flavonoides totais, nota-se um teor relativamente baixo tanto em ECU quanto em LCU, quando comparados aos teores de fenólicos totais e de taninos totais, evidenciando que a planta produz esses compostos em baixas concentrações. Também não há diferença significativa entre as concentrações de flavonoides das amostras.

Os resultados encontrados para o teor de flavonóides nas amostras seguem a tendência verificada quando se analisa outras espécies de *Croton* e outras amostras vegetais que apresentam altos teores de proantocianidinas (BERNARDES et al., 2011; DA SILVA BRITO et al., 2018).

A importância medicinal dos compostos fenólicos como antioxidantes está ligada, dentre outras ações, à sua capacidade de bloquear a cadeia de propagação da peroxidação lipídica através de diversos mecanismos entre eles: captura de radical livre e quelação de metais de transição. Isso se reflete em alta capacidade antioxidante, que pode ser relacionada com o uso de plantas ricas nesses compostos para tratamento de doenças inflamatórias, infecções bacterianas, de feridas cutâneas, neoplasias e infecções virais (MORRY; NGAMCHERDTRAKUL; YANTASEE, 2017). Uma das principais alegações de uso de *C. urucurana* está ligada ao tratamento de feridas cutâneas com utilização do látex retirado diretamente da casca ou da tintura feita a partir dela (ANTONIAZZI, et al., 2016;CORDEIRO et al., 2016;CORDEIRO et al., 2012). A composição química desse látex e do extrato feito a partir das cascas apresenta, como já foi explicado anteriormente nesta seção, grandes teores de compostos fenólicos, principalmente proantocianidinas. Portanto eram esperados resultados relevantes para atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

### 3.4. Análise de ECU e LCU por FIA-ESI-IT-MSn

Pelos compostos identificados nas amostras analisadas por FIA-ESI-IT-MSn no modo negativo pode-se observar uma presença majoritária de derivados de flavan-3-óis (Catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina) (Tabela 7).

Tabela 7. Dados dos Íons precursores e suas respectivas fragmentações obtidas por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de ECU e LCU (modo negativo)

| N | [M-H] <sup>-</sup> | MS <sup>n</sup>                   | Composto   | ECU | LCU |
|---|--------------------|-----------------------------------|--|-----|-----|
| 1 | 289                | 271, 245, 203, 175                | ( <i>epi</i> )catequina  | +   | -   |
| 2 | 305                | 191                               | ( <i>epi</i> )galocatequina  | +   | +   |
| 3 | 441                | 289                               | galato( <i>epi</i> )catequina  | +   | +   |
| 4 | 577                | 559, 451, 425, 407, 389, 281, 253 | Procianidina B3<br>( <i>epi</i> )catechin-<br>( <i>epi</i> )catechin | +   | -   |

|    |      |  |  |   |   |
|----|------|--|--|---|---|
| 5  | 593  | 425, 423, 407, 289                                   | ( <i>epi</i> )galocatequina-(4,8')-( <i>epi</i> )catequina ou ( <i>epi</i> ) catequina-(4,8')-( <i>epi</i> ) galocatequina               | + | + |
| 6  | 609  | 441, 432, 305  | ( <i>epi</i> )galocatequina-(4,8')-( <i>epi</i> )galocatequina   | + | + |
| 7  | 761  | 609, 591, 423, 405, 305                              | ( <i>epi</i> )galocatequina-(4,8')-3'- <i>O</i> -galoil( <i>epi</i> )galocatequina   | + | - |
| 8  | 865  | 713  | Trímero de Procianidina B3<br>( <i>epi</i> )catechin-<br>( <i>epi</i> )catechin-<br>( <i>epi</i> )catechin                               | + | - |
| 9  | 881  | 863, 755, 695, 593, 467, 425                         | ( <i>epi</i> )catequina- <i>O</i> -galato-<br>( <i>epi</i> )catequina- <i>O</i> -galato ou<br>( <i>epi</i> )catequina- <i>O</i> -galato- | + | - |
| 10 | 897  | 729, 711, 693, 559, 543, 477<br>709, 682<br>575, 483 | ( <i>epi</i> )galocatequina<br>( <i>epi</i> )catequina- <i>O</i> -galato-<br>( <i>epi</i> )galocatequina- <i>O</i> -galato               | + | - |
| 11 | 913  | 787, 761, 743  | ( <i>epi</i> )galocatequina- <i>O</i> -galato-<br>( <i>epi</i> )galocatequina- <i>O</i> -galato  | + | + |
| 12 | 1185 | n.a  | ( <i>epi</i> )catequina-<br>( <i>epi</i> )catequina-<br>( <i>epi</i> )galocatequina-<br>( <i>epi</i> )galocatequina                      | + | - |
| 13 | 1201 | n.a  | ( <i>epi</i> )catequina-<br>( <i>epi</i> )galocatequina-<br>( <i>epi</i> )galocatequina( <i>epi</i> )galocatequina                       | + | - |
| 14 | 1217 | n.a  | ( <i>epi</i> )galocatequina-<br>( <i>epi</i> )galocatequina-<br>( <i>epi</i> )galocatequina( <i>epi</i> )galocatequina                   | + | + |

\*n.a = não analisado

Os flavan-3-óis são as unidades monoméricas formadoras das PAs (formas oligoméricas e poliméricas). As unidades básicas dos monômeros estruturalmente de acordo com a estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel C e do número de hidroxilas do anel B (Figura 3), sendo a subclasse estruturalmente mais complexa dos flavonoides, indo de simples monômeros até as PA oligoméricas e poliméricas (CORTÉS et al., 2010; JORGE et al., 2001).

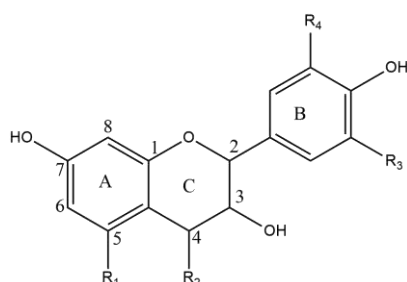


Figura 3. Esquema da estrutura básica do monômero de PA adaptado de Jorge et al.( 2001)

As unidades (2-3-trans)-( $\pm$ ) catequina e (2-3-cis)-( $\pm$ ) epicatequina são os monômeros mais comuns em PA (figura 4) e elas como oligômeros ou polímeros desses monômeros e, a depender da ligação interflavânica, são classificadas em dois tipos: A (ligações O-C) e B (ligações C4-C8 ou C4-C6) (MONTEIRO et al., 2005). Elas possuem a habilidade de ligação de proteínas pelos seus grupos fenólicos associado com as posições O-dihidroxi e O-trihidroxi do anel fenólico (ZUITER, 2014).

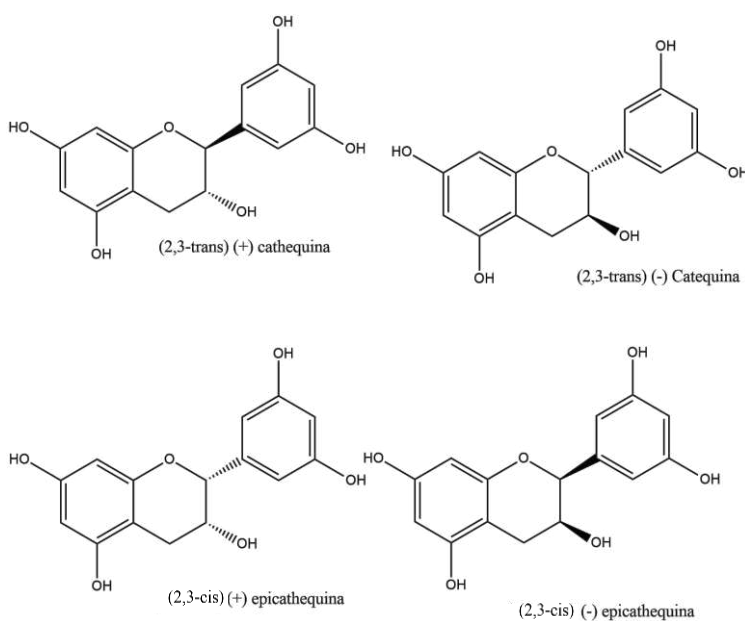


Figura 4. Unidades monoméricas formadoras de PA mais comuns: (2,3-trans) ( $\pm$ ) catequina e (2,3-cis) (+) epicatequina. Adaptado de Zwitter (2014).

Para a análise de proantocianidinas presentes em ECU e LCU a ionização em modo negativo se mostrou mais sensível e seletivo que no modo positivo, provavelmente devido à

caráter ácido dos grupos fenólicos. As Figuras 5 e 6 mostram o espectro de massa em *full scan* indicando os íons  $[M-H]^-$  dos metabólitos secundários presentes em ECU e LCU. A fragmentação de segunda-ordem (MS/MS) para os íons relacionados a proantocianidinas levou à identificação de diferentes arranjos oligoméricos, sendo que a estereoquímica dos carbonos C2 e C3 de catequinas e galocatequinas monoméricas e oligoméricas não puderam ser diferenciadas pelos experimentos de MS realizados. Assim, passaremos a denominar fragmentos de  $m/z$  289 como sendo referente à (epi)catequina e os fragmentos de  $m/z$  305 de (epi)galocatequina.

As informações obtidas no modo negativo dos íons moleculares e suas fragmentações (Tabela 7) mostraram que ECU consiste principalmente de uma mistura de proantocianidinas quando comparados com dados da literatura para estes compostos. A (epi)catequina e a (epi)galocatequina e seus derivados foram identificados nos extratos pelos padrões de fragmentação obtidos pelos espectros de MS. O composto 1 foi atribuído aos diastereoisômeros de catequina e epicatequina pela confirmação do íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  289. MS/MS deste íon levou a formação dos íons produto de  $m/z$  271, referente à perda de uma molécula de água  $[M-18-H]^-$ , e do íon produto de  $m/z$  245, derivado da perda de 42 Da ( $HC\equiv C-OH$ ). O íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  305, cuja fragmentação em segunda-ordem do íon precursor levou à formação íon produto de  $m/z$  191  $[M-162-H]^-$  sugeriu a presença de outro monômero, que de acordo com dados da literatura está em concordância com isômeros de galocatequina. Fragmentação do íon precursor  $m/z$  441 produziu íon de  $m/z$  289  $[M-H-152]^-$  correspondente a perda de uma unidade de galato, sugerindo a presença de galato(epi)catequina.

As proantocianidinas que consistem exclusivamente em (epi)catequina são chamadas de procianidinas e os íons de  $m/z$  577 e  $m/z$  865 visualizados no *scan full* do MS de ECU são indicativos de procianidinas diméricas e triméricas do tipo B, respectivamente. No entanto, como em outras técnicas de MS, não é possível diferenciar entre os possíveis estereoisômeros, impossibilitando a confirmação quanto a posição e estereoquímica da ligação inter-flavânica (4→6 ou 4→8).

Dados da literatura indicam que as procianidinas com ligações 4 → 8 são preferidas estereoquimicamente (BEN SAID et al., 2017). O íon quasi-molecular de  $m/z$  577 sugere que seja um dímero constituído de duas unidades de (epi)catequina, que produziu após  $MS^3$  os íons produto de  $m/z$  425 e  $m/z$  407, decorrentes de uma fragmentação do tipo *retro-Diels-Alder* (RDA), fornecendo informações sobre a hidroxilação do anel B (confirmando tratar-se de unidade catequina) e o tipo de ligação entre as duas unidades monoméricas. O íon de  $m/z$  407

é devido a subsequente perda de uma molécula de água do anel C (Figura 7). A fragmentação do íon quasi-molecular de  $m/z$  865, ao comparar os seus dados de fragmentações com os da literatura levou à identificação da procianidina trimérica. Para tal afirmação, foi verificada a formação do íon produto  $m/z$  713  $[M-H^+ -152]$  decorrente de uma fragmentação RDA, provavelmente ocorrido no anel C de uma das unidades de (epi)catequina (BEN SAID et al., 2017).

Os íons *quasi-moleculares* de  $m/z$  593 e 609 também foram atribuídos a proantocianidinas diméricas tipo-B, sendo um desses formado pela condensação de uma unidade de catequina com outra de galocatequina ( $m/z$  593) e outro formado pela condensação de duas unidades de galocatequina ( $m/z$  609). O pico detectado de  $m/z$  593 produziu um pico base de  $m/z$  407 formado pela perda de um fragmento RDA (168 Da) de um dos monômeros do dímero seguido da perda de uma molécula de água (18 Da). A presença de um fragmento de  $m/z$  289 confirmou a presença de uma unidade de (epi)catequina, enquanto que os fragmentos de  $m/z$  407  $[M-H^+ -186 Da]$  e 425  $[M-H^+ -168 Da]$  confirmaram a presença de uma unidade de (epi)galocatequina. Esse mesmo critério de análise foi utilizado para a identificação do íon *quasi-molecular* de  $m/z$  609. As fragmentações  $MS^n$  levaram a formação dos íons precursores de  $m/z$  441, 423 e 305.

A adição de um radical galoil à estrutura da proantocianidina também tem sido frequentemente relatada na literatura, com a hidroxila do C-3 sendo o sítio mais comum para esta galoilação (JAISWALL et al., 2012). A presença de proantocianidinas esterificadas com unidade de galoil foi atribuída para alguns dos compostos identificados em ECU. Assim, para o íon precursor de  $m/z$  441 foi atribuída como galato da unidade monomérica de (epi)catequina. O pico base de  $m/z$  289  $[M-H^+ -152 Da]$  foi atribuída a perda de um resíduo de galoil. A perda de uma unidade de galoil também foi observada para o íon precursor de  $m/z$  761, correspondente ao galato do dímero prodelfinidina. Este produziu o pico base  $MS^2$  de  $m/z$  609, oriundo da perda de um resíduo de galoil, e também de  $m/z$  305 proveniente de um fragmento quinona metídeo, confirmando a presença de (epi)galocatequina.

Os íons *quasi-moleculares* de  $m/z$  881, 897 e 913 representam outra série de proantocianidinas correspondentes a dímeros formados por unidades de (epi)catequinas e/ou (epi)galocatequinas, com resíduos de galoil. Fragmentações  $MS^n$  do íon precursor de  $m/z$  881 produziu o íon de  $m/z$  729  $[M-H-152]^-$  correspondente a perda de uma unidade de galato e o íon de  $m/z$  577  $[M-H-304]^-$  que pode corresponder a perda de duas unidades de galato e/ou a um resíduo de galocatequina (TALA et al., 2013). Fragmentações  $MS^n$  do íon precursor  $m/z$

897 apresentou fragmentos de íons de  $m/z$  745 [M-H<sup>+</sup> -152], atribuído a perda de unidade galoil e  $m/z$  de 727 [M-H<sup>+</sup> -170] oriundo da perda de ácido gálico. A presença dos íons produtos  $m/z$  287 e 305 Da, provenientes da fissão quinonametídeo sugeriu a presença das unidades de (epi)catequina e (epi)galocatequina. O mesmo padrão de fragmentação foi observado para o íon precursor  $m/z$  913, aparecendo os íons precursores  $m/z$  761 [M-H<sup>+</sup> -152] e  $m/z$  743 [M-H<sup>+</sup> -170] decorrente da perda de ácido gálico, sendo então atribuído ao galato do dímero constituído de unidades de (epi)galocatequina.

Os três íons *quasi-moleculares* de  $m/z$  1.185, 1.201 e 1.217 foram relacionados a tetrâmeros formados por unidade de (epi)catequinas e (epi)galocatequinas. Suas identificações foram realizadas com base do íon molecular e suas fragmentações obtidas por MS<sup>n</sup> (TALA et al., 2013).

É observado na Tabela 7 que o LCU apresenta composição de proantocianidinas menos variada em relação ao ECU. Isso se justifica pela maneira de obtenção do ECU que além de incluir o látex também inclui compostos originários do material das cascas, o que enriquece a composição de ECU.

ECU neg (2); #2024 RT: 6,85 AV: 1 NL: 2,22E4  
F: [MMS- c ESI Full ms [200,00-1500,00]]

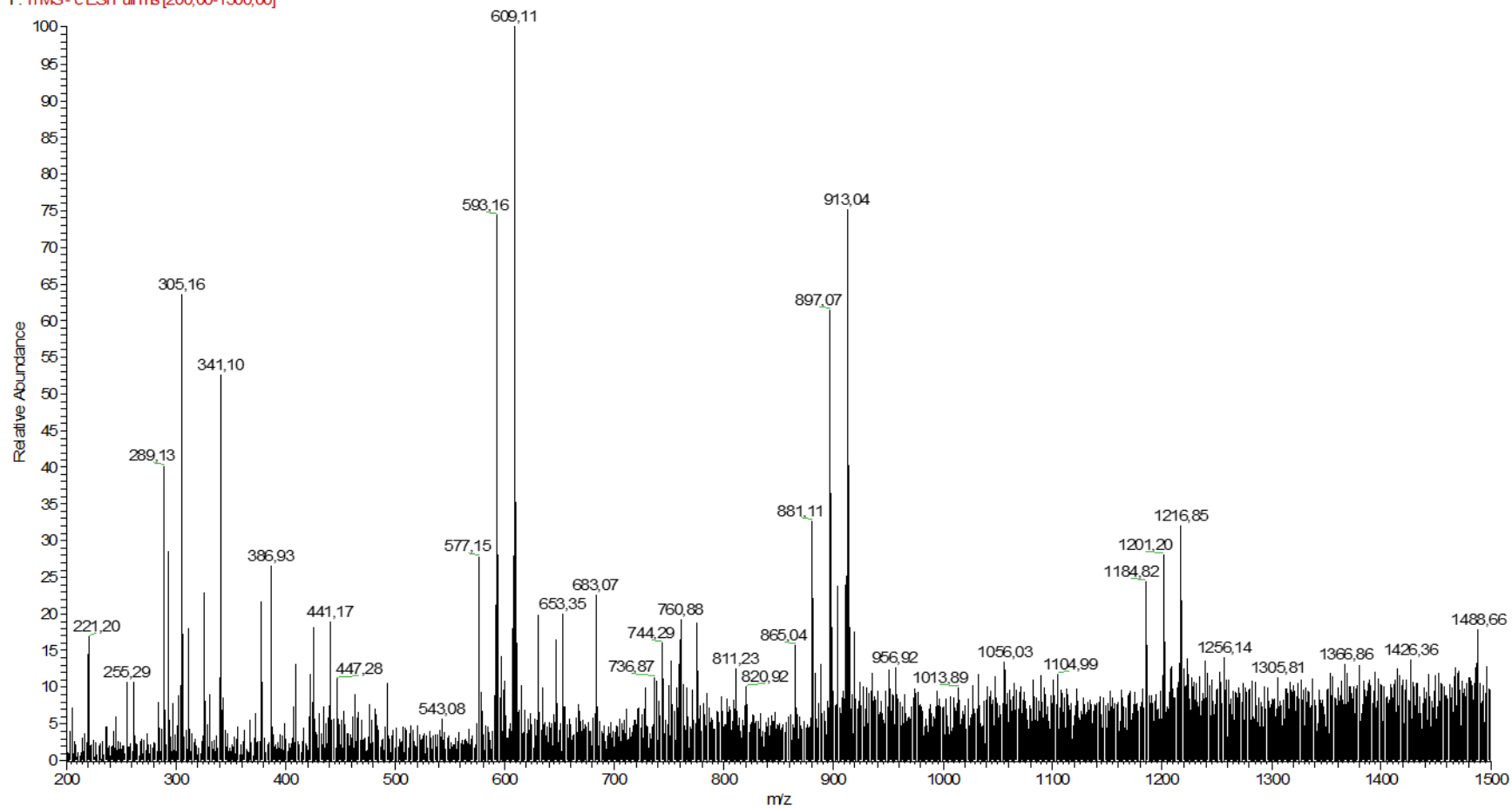


Figura 5. Perfil fitoquímico obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo *full scan* (modo negativo) do ECU

LCU\_neg (1) #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 5,02E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [150,00-2000,00]

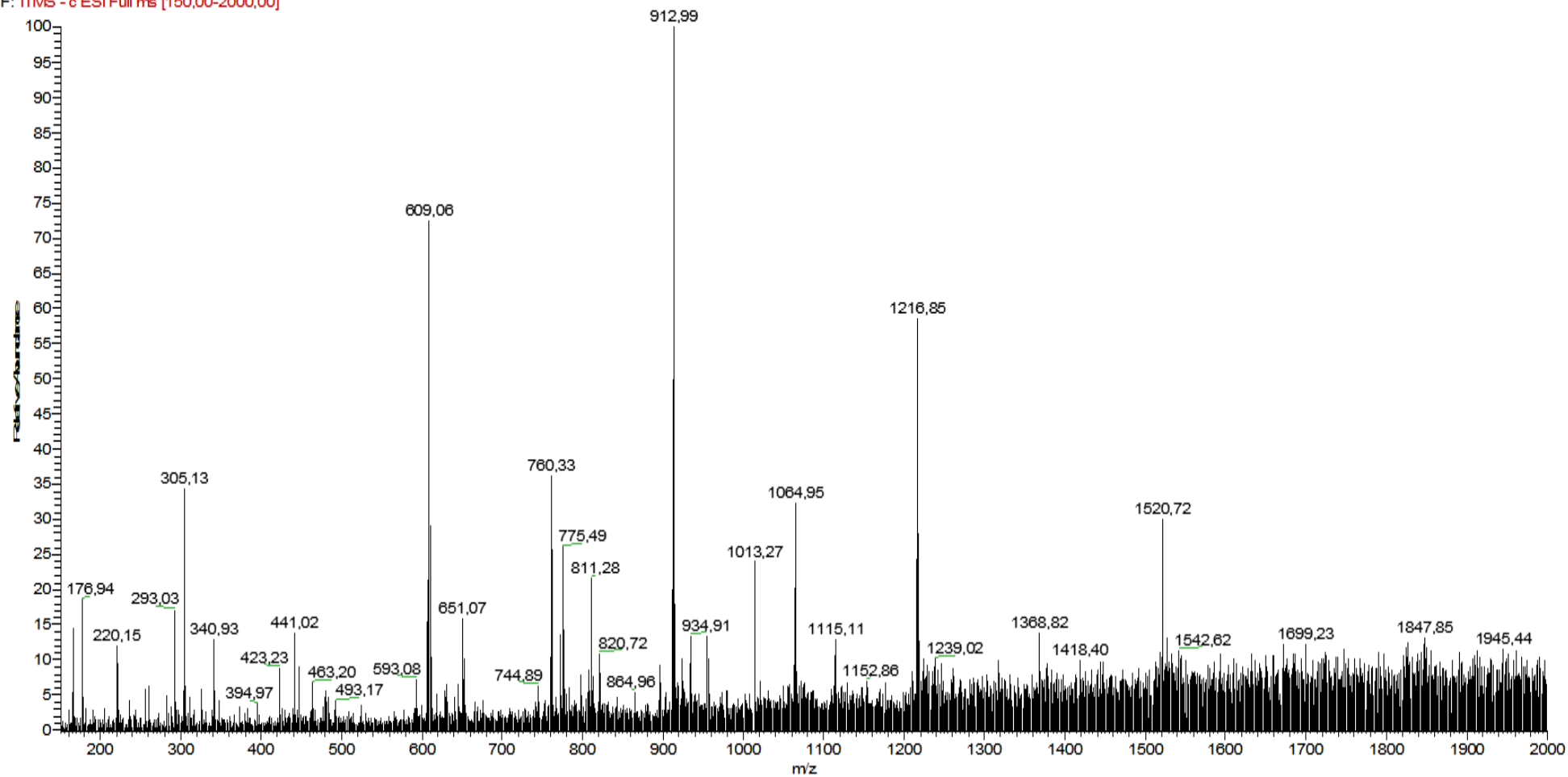


Figura 6. Perfil fitoquímico obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo *full scan* (modo negativo) do LCU

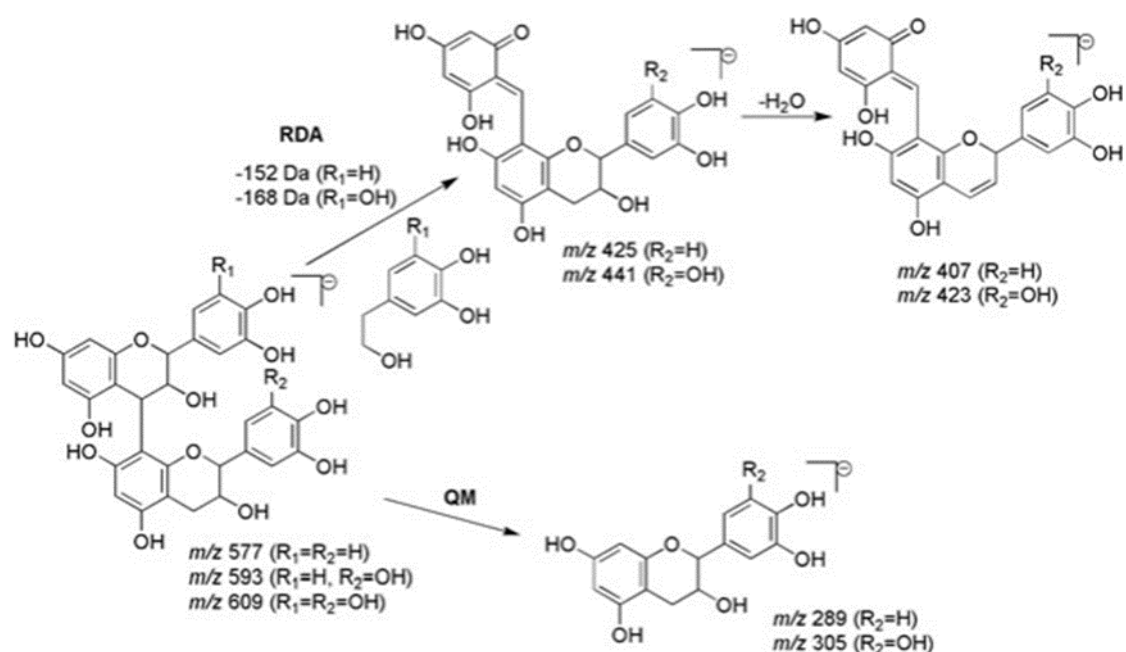


Figura 7. Proposta de fragmentação de proantocianidinas diméricas tipo B presentes em *Croton urucurana* (Adaptado de Jaiswall et al., 2012). RDA: fragmentação retro-Diels-Alder; QM: fragmentação quinona metídeo.

No modo positivo, os espectros de MS mostram a presença de dois alcaloides, anteriormente já relatados para *C. urucurana* (CORDEIRO et al., 2016). As análises dos íons protonados e as respectivas fragmentações observadas pelo FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de m/z 342 [M]<sup>+</sup> e m/z 344 [M]<sup>+</sup> (Tabela 8) foram consistentes com os dados da literatura descritos para os compostos magnoflorina e tembetarina (Figura 8) (YAN et al., 2013).

Tabela 8. Dados dos Íons precursores e suas respectivas fragmentações obtidas por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de ECU e LCU (modo positivo)

| N  | [M-H] <sup>+</sup> | MS <sup>n</sup>    | Composto     | ECU | LCU |
|----|--------------------|--------------------|--------------|-----|-----|
| 15 | 342                | 297, 282, 265, 237 | magnoflorina | +   | +   |
| 16 | 344                | 299, 253           | tembetarina  | +   | +   |

A presença desses dois alcaloides foi relatada na casca de *C. urucurana* por Cordeiro et al. (2016). Provavelmente, a tembetarina seja precursor biossintético da magnoflorina.

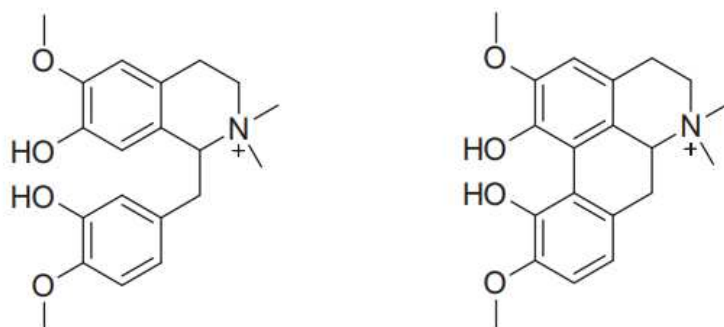


Figura 8. Alcaloides identificados no extrato de *Croton urucurana*, determinados por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> no modo positivo.

Para ambos os alcaloides, o padrão de fragmentação favoreceu a formação do pico base com a perda de uma unidade de C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>N característica. A perda inicial do grupo amina e as sucessivas perdas dos grupos substituintes são bem estabelecidas para fragmentações por ESI de alcaloides aporfínicos (Figuras 9, 10 e 11) (SILVA et al., 2012).

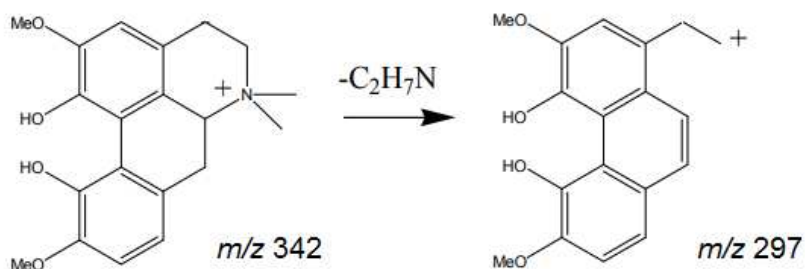


Figura 9. Proposta de mecanismo de fragmentação do alcaloide magnoflorina (Adaptado de Yan et al., 2013)

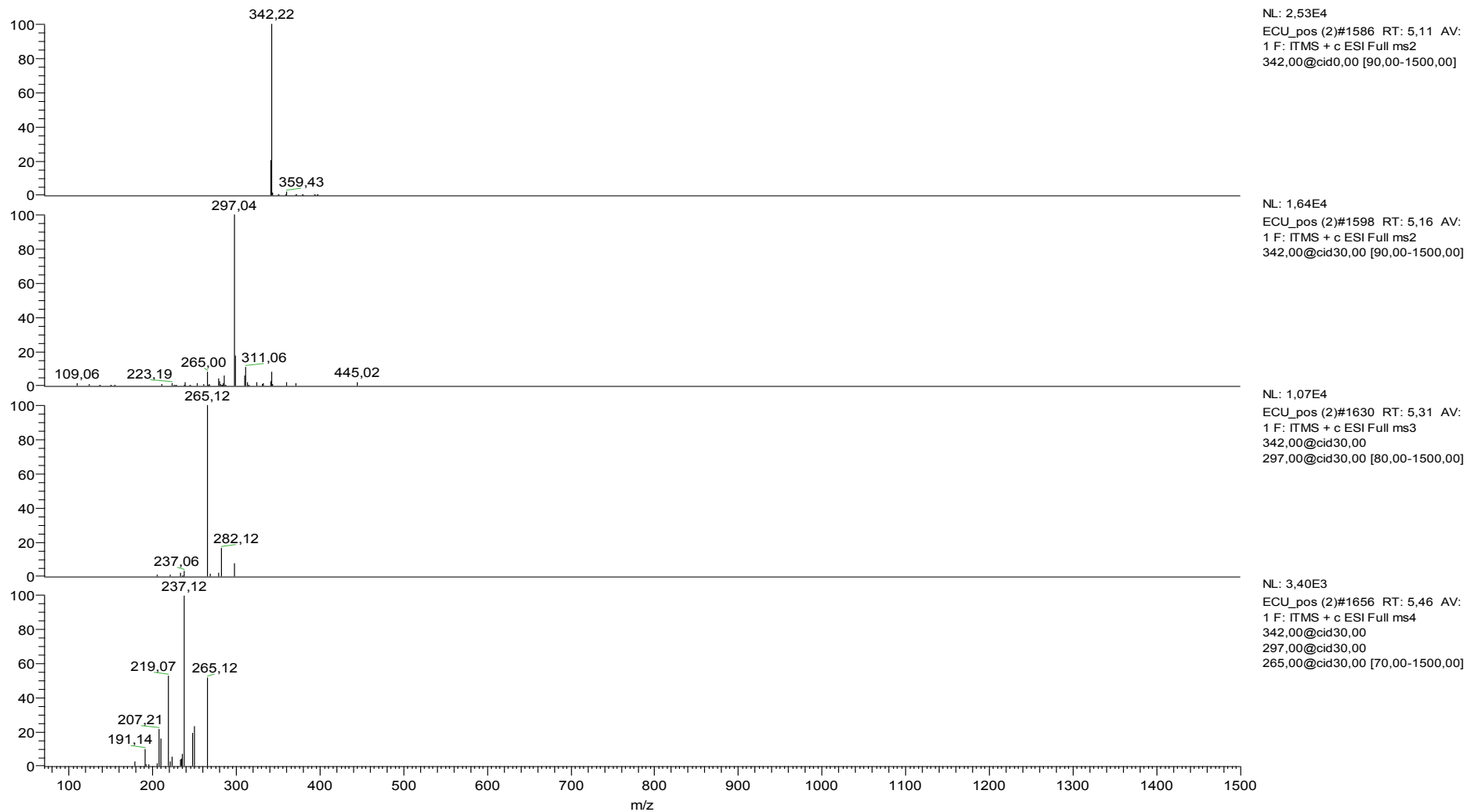
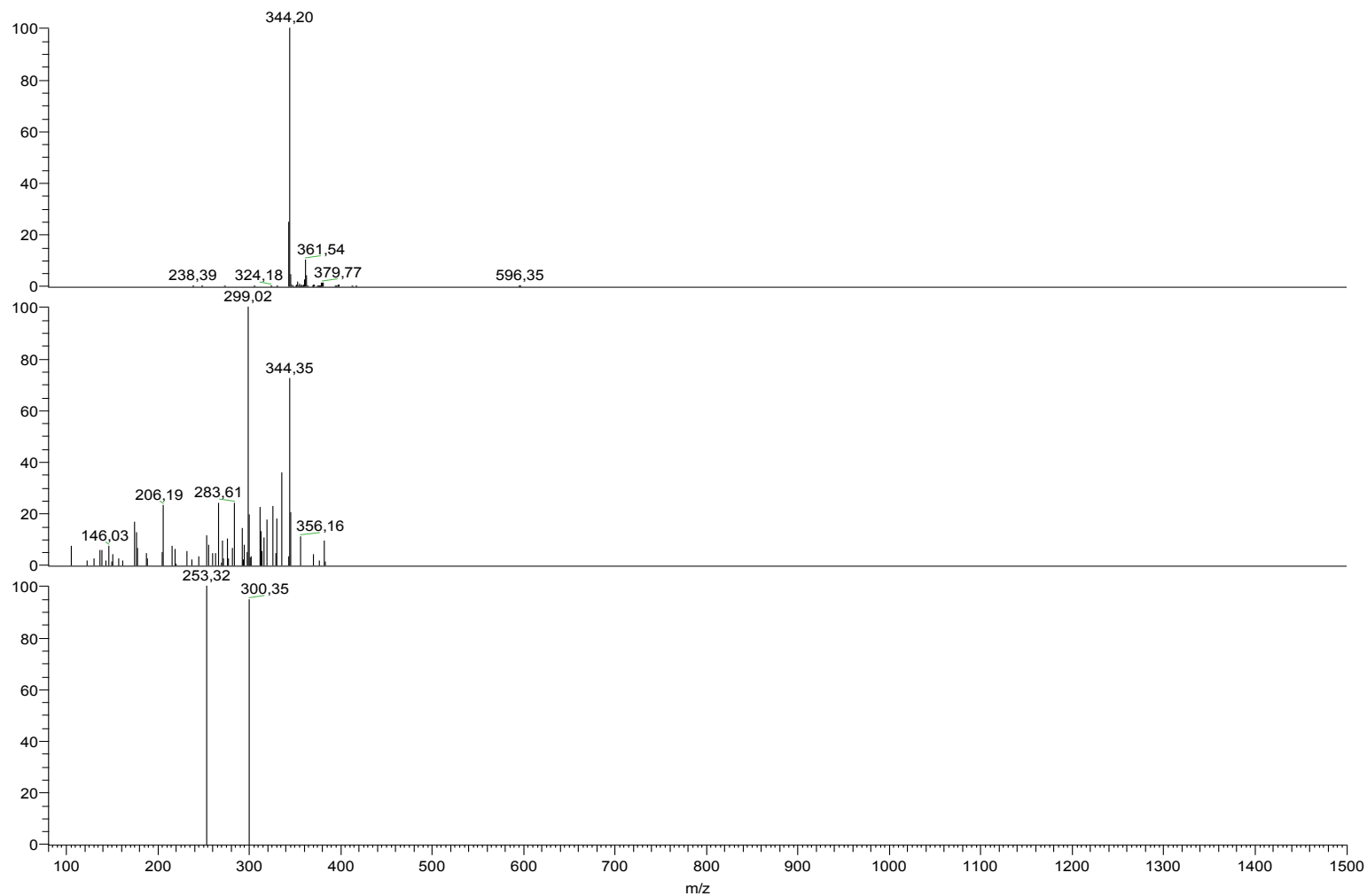


Figura 10. Espectro de FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de ECU do íon protonado de  $m/z$  342, no modo positivo.



NL: 2,33E3  
 ECU\_pos (2)#1381 RT:  
 4,08 AV: 1 F: ITMS + c ESI  
 Full ms2 344,00@cid0,00  
 [90,00-1500,00]

NL: 6,04E2  
 ECU\_pos (2)#1397 RT:  
 4,16 AV: 1 F: ITMS + c ESI  
 Full ms2 344,00@cid35,00  
 [90,00-1500,00]

NL: 1,41E1  
 ECU\_pos (2)#1497 RT:  
 4,68 AV: 1 F: ITMS + c ESI  
 Full ms3 344,00@cid36,00  
 299,00@cid36,00  
 [80,00-1500,00]

Figura 11. Espectro de FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> de ECU do íon protonado de  $m/z$  344, no modo positivo.

### 3.5. Atividade Antioxidante *in vitro* – Ensaio de Captura de radical DPPH

Os resultados obtidos para atividade antioxidante revelam que as amostras possuem baixas EC50 (tabela 9).

Tabela 9. Atividade antioxidante *in vitro* – Captura do radical DPPH.

| Amostra   | EC <sub>50</sub> *(mg <sub>amostra</sub> /g DPPH) |
|-----------|---|
| ECU       | 9,8 ± 0,4 <sup>a</sup>                            |
| LCU       | 7,6 ± 0,5 <sup>b</sup>                            |
| Catequina | 17,8 ± 0,2 <sup>c</sup>                           |

\*Concentração efetiva da amostra para capturar 50% das espécies radicalares de DPPH livres.

Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância p<0,05

Isso é interpretado como alto poder antioxidante, uma vez que é necessária uma quantidade menor de amostra para capturar os radicais de DPPH livres no meio.

Tanto o LCU quanto o ECU mostraram baixas EC50, quando comparados ao padrão utilizado (catequina) mas o látex apresentou uma atividade antioxidante significativamente maior, o que leva a uma importante constatação: nas amostras estudadas, a atividade antioxidante varia de maneira proporcional à medida que o conteúdo de compostos fenólicos aumenta, semelhante ao encontrado por Brito et al., (2018). Como o LCU apresenta maiores teores de compostos fenólicos, conseqüentemente, apresenta um maior potencial antioxidante, quando feita a análise pelo método de captura de radical DPPH.

Os compostos fenólicos e as proantocianidinas presentes em ECU e LCU podem auxiliar no processo de reparo tecidual, por terem a capacidade de retardar processos inflamatórios desencadeados por reações de peroxidação lipídica e as espécies reativas geradas no processo (ROSA et al., 2015).

Assim, além da atividade antioxidante *in vitro* significativa das amostras é também plausível um aumento da atividade de enzimas antioxidantes nas análises *in vivo* realizadas.

### 3.6. Atividade antioxidante *in vivo* - Atividade de SOD, Catalase e de Glutathione-S-transferase

A avaliação da atividade antioxidante *in vivo* foi realizada utilizando os fragmentos de feridas cutâneas retirados dos camundongos pertencentes aos grupos citados na sessão 2.14.

O modelo experimental utilizado foi escolhido para ser concordante com a alegação de uso principal de *C. urucurana* na região da coleta que é a atividade cicatrizante. Dessa forma seria possível relacionar essa atividade biológica com o aumento das defesas antioxidantes endógenas desencadeado pelos compostos presentes em ECU, amostra utilizada para a confecção das pomadas utilizadas nos tratamentos.

O ECU foi escolhido pois era a amostra que tinha maior massa e, portanto, viabilizava a produção das pomadas em quantidade suficiente para todo o período de experimento. Portanto, estudos empregando pomadas a base de LCU são importantes de serem realizados de forma a possibilitar a comparação dos resultados. Os resultados para ECU são observados na Figura 12 a seguir.

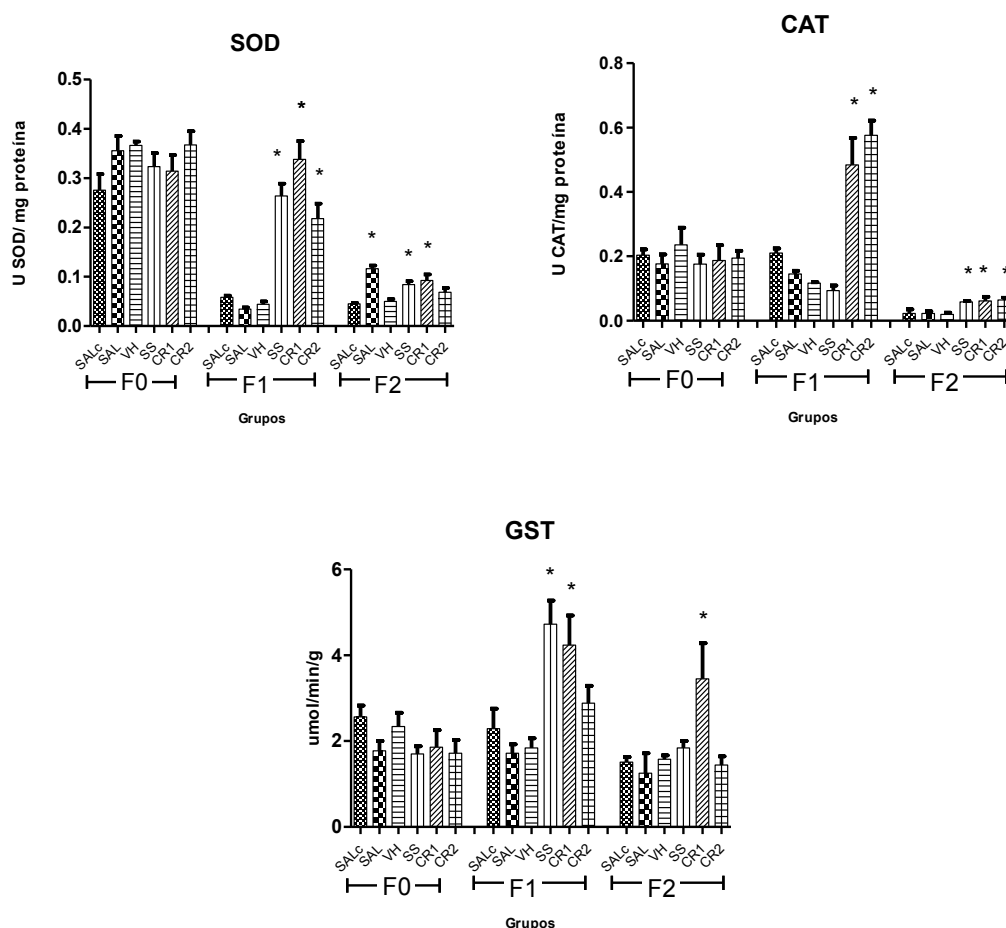


Figura 12. Resultados para atividades enzimáticas de SOD, CAT e GST, nos períodos F0, F1 e F2 respectivamente. (\*) indica diferença significativa ao nível de significância de 5% em relação aos demais grupos. Grupos: SALc = animais Black C57 tratados com solução salina 0,9%; SAL = animais Knockout IL-10 tratados com solução salina 0,9%; VH = animais animais Knockout IL-10 tratados com veículo da pomada; SS = animais Knockout IL-10 tratados com pomada de Sulfadiazina de Prata 1%; CR1 = animais Knockout IL-10 tratados com pomada a base de ECU 5%; CR2 = animais Knockout IL-10 tratados com pomada a base de ECU 10%.

No caso da superóxido dismutase (SOD), o ECU foi capaz de aumentar sua atividade quando todos os outros tratamentos utilizados não mostraram esse comportamento em F1. Porém, ao final do tratamento (14º dia – F2), os níveis de SOD decresceram significativamente com relação ao 7º dia de tratamento nos grupos tratados com a pomada a base de ECU.

A SOD é responsável pela conversão dos radicais superóxido em radicais peróxido, sendo a enzima que atua anulando as espécies radicalares iniciais produzidas nas reações de peroxidação lipídica, sendo a primeira defesa antioxidante acionada quando se inicia a propagação de radicais (FERREIRA; ABREU, 2007).

O ECU agiu aumentando significativamente a atividade de Catalase (CAT) em F1 (após 7 dias de tratamento). Em F2, o comportamento para atividade de catalase se assemelhou ao observado para atividade de SOD. A catalase é responsável por agir sobre o radical peróxido convertendo-o em água (H<sub>2</sub>O) e •OH. Dessa maneira, executa um papel importante na defesa antioxidante, uma vez que impede o prosseguimento da cadeia de peroxidação e a conversão dos radicais peróxido em radicais hidroxila – os mais reativos e deletérios gerados no processo (VASCONCELOS et al., 2007).

O aumento da atividade de Glutathione-S-transferase (GST) confirma a atividade antioxidante do ECU, uma vez que o aumento significativo da concentração dessa enzima (principalmente em F1) se reflete no aumento da eliminação de produtos de lipoperoxidação gerados no processo oxidativo. A GST possibilita a obtenção da forma reduzida da Glutathione (GSH) que é importante para a eliminação de produtos da peroxidação (age com redutora desses produtos), se convertendo em sua forma oxidada (GSSG) para sua posterior reconstituição pela Glutathione redutase (GSH – rd). A atividade desse sistema enzimático é entendida como uma das defesas antioxidantes finais, pois age sobre os radicais resultantes de todo o processo oxidativo (ANTUNES-NETO; SILVA, L.P.; MACEDO, 2006).

O aumento da atividade de SOD pelo ECU favorece a recuperação tecidual, juntamente com o aumento da atividade de CAT e GST. Nesse contexto, o aumento da atividade antioxidante tecidual em F1 auxiliou a rápida recuperação da pele ao fim do experimento. Uma vez reduzindo os níveis de radicais livres, ocorre uma redução da resposta inflamatória e uma aceleração do processo de cicatrização.

É importante ressaltar que houve diferença significativa entre os tratamentos com as pomadas a base de ECU com 5% e 10% (m/m) para atividade das enzimas analisadas, sendo a pomada de 5% de concentração de ECU a que mais favoreceu o aumento da atividade enzimática de SOD e GST, principalmente em F1, sendo observado um efeito dose dependente

entre a atividade enzimática e a concentração de ECU. O fato de ECU ter apresentado melhor resposta na menor concentração pode estar relacionado à ocupação efetiva de sítios de ação disponíveis poder ser possível na concentração de 5% de ECU.

A diminuição da atividade de SOD e GST em F1 com o aumento da concentração para 10% de ECU pode estar relacionada a uma provável toxicidade apresentada pela amostra em altas dosagens. Outras análises devem ser realizadas para confirmar esta hipótese.

A composição química do ECU contribui para o aumento das defesas antioxidantes pois os CF, dentre eles as PA, de ECU têm capacidade de capturar radicais livres e de quelar metais de transição como Fe (III) e Cu (II) impedindo-os de catalisarem as reações da cadeia de peroxidação devido à sua estrutura rica em anéis aromáticos e potenciais zonas estáveis para a acomodação de elétrons livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Com isso, os CF são fonte de constante pesquisa sobre suas atividades no tratamento de doenças neurodegenerativas, câncer e doenças inflamatórias, representando uma possibilidade de terapia complementar para essas doenças (MORRY; NGAMCHERDTRAKUL; YANTASEE, 2017; ROLEIRA et al., 2015).

A grande concentração de taninos, dentre eles as proantocianidinas, pode ser a responsável por gerar os resultados de resposta enzimática. As proantocianidinas são conhecidas por sua atividade antioxidante e cicatrizante, o que indica que elas podem ser os principais agentes responsáveis pela aceleração do processo cicatricial (DORNAS et al., 2007). Além disso, formam uma espécie de filme protetor na área da ferida, protegendo-a de infecções e de injúrias adicionais causadas por agentes externos, permitindo que o processo de reparo ocorra dentro da normalidade, sem ação de interferentes (MONTEIRO et al., 2005).

A capacidade antioxidante das PA confere a elas atividades biológicas relacionadas a redução de resposta inflamatória, e como consequência dessa atividade, uma aceleração do processo de regeneração tecidual e recuperação da lesão, além de proteção contra danos no DNA e na produção de proteínas relacionados ao aumento do estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997; MALDONADO et al., 2005; PARK et al., 2011).

#### 4. CONCLUSÕES

As formas de obtenção dos derivados vegetais influenciaram nas suas composições químicas, principalmente referentes à composição por compostos fenólicos. O LCU revelou-se mais concentrado nesses compostos, porém ECU apresentou uma variedade maior como mostrado pela análise espectrométrica.

Os dois derivados, ainda, apresentaram atividade antioxidante *in vitro* significativa justificada pelas altas concentrações de compostos fenólicos e taninos totais. Esses compostos são relacionados também com a prevenção de danos causados pelo aumento do estresse oxidativo no organismo e para ECU, isso foi observado nos resultados das atividades enzimáticas de SOD, catalase e GST.

No entanto, são necessárias análises que evidenciem a atividade antioxidante *in vivo* do LCU para comparação entre os dois derivados vegetais quanto à atividade sobre essas enzimas antioxidantes.

Nesse sentido, *C. urucurana* é uma espécie da biodiversidade brasileira que apresenta potencial para auxiliar no desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos, conforme aumento de estudos sobre suas atividades biológicas.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Wagner Vilegas e a doutoranda Ana Zanatta do Campus Experimental de São Vicente, UNESP, Universidade do Estado de São Paulo, São Vicente - SP pela obtenção dos dados de análise de LC-MS. Ao Antônio de Pádua Alvarenga (EPAMIG), pelas contribuições e sobre manejo de *Croton urucurana* adaptados do manejo de *Hevea brasiliensis* L.

## REFERÊNCIAS

- ANTONIAZZI, C.A. *et al.* Estudo etnobotânico de *Croton urucurana* Baill (Euphorbiaceae) na comunidade Salobra Grande, Porto Estrela-MT. **Biodiversidade**, v. 15, n. 2, p. 40–52, 2016.
- ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D. V. Biomarcadores de Estresse Oxidativo: Novas Possibilidades de Monitoramento. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 19, p. 73–79, 2006.
- AZEVEDO, K. *et al.* **Guia Prático para extração de sangue de Grado (*Croton lechleri* Müll. Arg)**. . [S.l.]: Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia. , 2008
- BARBIERI, D. S. V *et al.* Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 887–896, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BEKHIT, A. E. D. A *et al.* Antioxidant activities, sensory and anti-influenza activity of grape skin tea infusion. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 837–845, 2011.
- BERNARDES, N. R. *et al.* Quantification of the levels of tannins and total phenols and evaluation of the antioxidant activity of fruits of pepper tree. **Revista Vértices**, v. 13, n. 3, p. 117–128, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRITO, S. S. S. *et al.* *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. August 2017, p. 308–315, 2018.

CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 265–268, 1993.

COLEY, P. D. Resource Availability and Plant Antiherbivore . **Advancement Of Science**, v. 230, n. 4728, p. 895–899, 1985.

CORDEIRO, K.W. *et al.* Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 331–337, 2012.

CORDEIRO, K. W. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 128–135, 2016.

CORTÉS, S. *et al.* Identification of proanthocyanidins extracted from *Pinus radiata* D . Don bark. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 37, n. 2, p. 15–25, 2010.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

DI STASI, L. C. *et al.* Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69–91, 2002.

DORNAS, W. C. *et al.* Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 31, p. 241–249, 2007.

FAVARETTO, V. F. *et al.* Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 20–28, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 2, p. 32–39, 2007.

FERRO, C. D. O. *et al.* Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 31–38, 2010.

GONTIJO, D. C. *et al.* Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. **Food Chemistry**, v. 230, p. 618–626, 2017.

JORGE, F. C. *et al.* Aplicações para as Cascas de Árvores e para os Extractos Taninosos: Uma Revisão Fernando. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 225–236, 2001.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Pharmacological and biochemical profiling of lead compounds from traditional remedies: the case of *Croton cajucara*. **Advances in Phytomedicine**, v. 2, n. C, p. 225–253, 2006.

MALDONADO, P. D. *et al.* Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1996–2001, 2005.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MORRY, J.; NGAMCHERDTRAKUL, W.; YANTASEE, W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. **Redox Biology**, v. 11, p. 240–253, 2017.

MUNIZ, C. F. *et al.* Avaliação macroscópica do efeito do látex de *Croton urucurana* Baillon no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Amazônia**, v. 1, n. 1, p. 5–12, 2013.

PARK, Y. S. *et al.* Antioxidant activity and analysis of proanthocyanidins from pine (*Pinus densiflora*) needles. **Nutrition research and practice**, v. 5, n. 4, p. 281–287, 2011.

PAULA, C. M.; ALMEIDA, C. G. Abordagem etnobotânica acerca da extração e riscos de extinção de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville em um bairro do município de campo mourão, paraná, brasil. **Revista Iniciare**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2017.

PERES, M. T. L. P. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 223–226, 1997.

ROLEIRA, F. M. F. *et al.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

ROSA, D. D. *et al.* Extract of the bark of *Bathysa cuspidata* attenuates the development of chemically-induced preneoplastic colorectal lesions in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 5, p. 732–740, 2015.

SAVIETTO, J. P. *et al.* Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 662–667, 2013.

SIDDIQUI, A.; TARDIF, K. D.; WARIS, G. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 159–163, 2005.

SOARES, E. D. R. *et al.* Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 3, p. 64–72, 2015.

TALA, V. R. S. *et al.* Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by flow injection analysis - Electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2803–2820, 2013.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. D. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243–248, 2004.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

ZUITER, A. S. Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From Phenolic Compounds to Proanthocyanidins. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. 2014.