

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Botânica

JOCIMAR OLIANI

***Croton floribundus* e *Croton urucurana*: Fontes de flavonoides e enzimas para a biocatálise de acilação.**

Croton floribundus and *Croton urucurana*: Sources of flavonoids and enzymes for acylation biocatalysis

São Paulo

2018

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Botânica

Jocimar Oliani

***Croton floribundus* e *Croton urucurana*: Fontes de flavonoides e enzimas para a biocatálise de acilação.**

Croton floribundus and *Croton urucurana*: Sources of flavonoids and enzymes for acylation biocatalysis

VERSÃO REVISADA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Cesarino

São Paulo

2018

Ficha catalográfica

Oliani, Jocimar

Croton floribundus e *Croton urucurana*: fontes de flavonoides e enzimas para a biocatálise de acilação
226 paginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Croton urucurana* 2. *Croton floribundus* 3. Flavonoides 4. tilirosideo 5. acilação enzimática I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Luiza F. Salatino por sua orientação, paciência, ensinamentos e incentivo durante meu doutorado.

Ao Prof. Dr. Igor Cesarino pela co-orientação, auxílio e ensinamentos durante os ensaios práticos de sua área de conhecimento.

Ao Prof. Dr. Antonio Salatino pela ajuda e conselhos dados durante o projeto.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira pela valiosa ajuda na caracterização de flavonoides por meio de ensaios de ressonância magnética nuclear.

À Professora Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, do Departamento de Biologia Vegetal da UNICAMP pela realização da cromatografia líquida de ultra eficiência-espectrometria de massas (UPLC/MS).

À Prof. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por sua orientação durante meu mestrado e pela indicação ao Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Mourisa de Souza Ferreira, Aline Cruz e Leandro S. Santos, pessoal técnico do Laboratório de Fitoquímica, pelo auxílio nas atividades de laboratório.

Aos amigos, colegas e ex-colegas do Laboratório de Fitoquímica, pelo auxílio e incentivo durante a pós-graduação.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Botânica e programa de pós-graduação do Instituto de Biociências - USP.

A meus pais, Sebastiana e Osmar, por carinho e apoio.

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	11
Capítulo I – Introdução Geral.....	13
I.Introdução.....	14
I.1.Flavonoides.....	16
I.2.Atividades biológicas de flavonoides.....	19
I.3.Modificação molecular.....	23
I.4.Euphorbiaceae e o gênero <i>Croton</i>	25
I.5. <i>Croton floribundus</i> e <i>Croton urucurana</i>	28
I.6.Justificativa e Objetivos.....	31
I.7.Referências bibliográficas.....	32
Capitulo II – Flavonoides de <i>Croton floribundus</i> e <i>C.urucurana</i>	42
Resumo.....	43
Abstract.....	45
II.1.Introdução.....	47
II.1.1.Flavonoides.....	47
II.1.2.Euphorbiaceae e <i>Croton</i>	47
II.1.3. <i>Croton floribundus</i> e <i>C.urucurana</i>	54
II.1.4.Justificativa e Objetivos.....	55
II.2. Materiais e Métodos.....	56
II.2.1. Material botânico.....	56
II.2.2. Extração.....	56
II.2.3. Fracionamento de flavonoides.....	57
II.2.4. Perfis cromatográficos.....	57
II.2.5. Determinação estrutural dos flavonoides.....	58
II.3.Resultados e Discussão.....	59
II.3.1.Rendimento dos extratos metanólicos.....	59
II.3.2.Análise por CLAE dos extratos metanólicos.....	60
II.3.2.1. <i>C.floribundus</i>	60
II.3.2.2. <i>C.urucurana</i>	61
II.3.3.Fracionamento da fase metanólica.....	63
II.3.4.Identificação Estrutural dos flavonoides.....	65

II.3.4.1. <i>C.floribundus</i>.....	67
Flavonoide 1 - Subfração Ffl10-2.....	67
Flavonoide 2 - Subfração Ffl8-2.....	73
Flavonoide 3 – subfração Ffl7-2.....	79
Flavonoide 4 - Subfração Ffl12-4.....	82
Flavonoide 5 - Subfração Ffl16-5.....	85
Flavonoide 6 - Subfração Ffl13-6.....	89
Flavonoides 7 e 9 - Subfração Ffl7-7.....	92
Flavonoide 8 - Subfração Ffl12-5.....	97
Flavonoide 10 - Subfração Ffl8-3.....	100
II.3.2.2. <i>C.urucurana</i>.....	103
Flavonoide 11 - Subfração Fur9/10-1.....	103
Flavonoide 12 - Subfração Fur7-4.....	105
Flavonoide 13 - Subfração Fur6-4/5/6-2.....	107
Flavonoide 14 - Subfração Fur9/10-2.....	111
Flavonoide 15 - Precipitado obtido na concentração da Fração Fur4...	115
Flavonoide 5*- Subfração Fur11/12-1.....	118
Flavonoide 16 - Subfração Fur13/14-8.....	120
II.4.Considerações Finais.....	123
II.5.Referências Bibliográficas.....	126
Capítulo III – Acilação Enzimática de Flavonoides.....	138
Resumo.....	139
Abstract.....	140
III.1.Introdução.....	141
III.1.1.Flavonoides acilados.....	141
III.1.2.Métodos de acilação.....	143
III.1.3. <i>Croton</i>.....	146
III.2.Materiais e Métodos.....	147
III.2.1.Material botânico.....	147
III.2.2.Extração de Proteínas Totais.....	147
III.2.3.Síntese combinatória com substrato por acilação enzimática.....	148
III.2.4.Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	149
III.3.Resultados e Discussão.....	150

III.3.1. Seleção de fase de coleta.....	150
III.3.2. Rendimento de extração enzimática.....	151
III.3.3. Ensaio de atividade de aciltransferase em extratos de <i>Croton</i> <i>urucurana</i>.....	152
III.3.4. Ensaio de atividade de aciltransferase em extratos de <i>Croton</i> <i>floribundus</i>.....	167
III.4. Considerações Finais.....	172
III.5. Referências Bibliográficas.....	172
Anexo 1.....	177
Anexo 2.....	209

Resumo

Croton é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.300 espécies, sendo 300 delas existentes no Brasil em diversos biomas. Usadas mundialmente na medicina tradicional, várias espécies apresentam um característico látex vermelho-sangue, chamado “sangue-de-dragão”. Estudos químicos indicam a presença de múltiplas classes de compostos, sendo as principais: diterpenos (clerodanos, labdanos, kauranos e traquilobanos), óleos voláteis, esteroides e triterpenoides, alcaloides, proantocianidinas e flavonoides. Estes últimos são metabólitos secundários com grande variedade estrutural, possuindo atividades biológicas reconhecidas e de potencial interesse medicinal. *Croton floribundus* Spreng. e *Croton urucurana* Baill., por apresentarem várias atividades biológicas de interesse medicinal, são utilizadas na medicina tradicional. Entretanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de se conhecer melhor aquela classe de substâncias fenólicas.

Um dos objetivos deste trabalho corresponde ao isolamento e identificação de flavonoides de folhas de *Croton floribundus* e *Croton urucurana*. O material pulverizado foi extraído por refluxo com metanol 80% e concentrado. O extrato seco foi tratado com tolueno e diclorometano. A fase metanólica resultante foi fracionada e subfracionada por meio de cromatografia em coluna de PVPP e Sephadex LH-20, e cromatografia em papel. Depois de fracionadas, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os compostos identificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) ou por CLAE com co-injeção de amostras autênticas.

Em ambas as espécies foi identificado o flavonoide acilado tilirosídeo (**5**). Este parece ser um flavonoide característico do gênero. É um derivado acilado de kaempferol, isolado de um grande número de espécies de *Croton*. Em *C. floribundus* foram identificados três triglicosídeos: alcsefolisídeo (**1**), mauritianina (**2**), e isoramnetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (**3**). Foram identificados também: quercetina-3-O-glucosídeo (**4**), helicrisosídeo-3'-metil-éter (**6**), kaempferol (**7**), isoramnetina (**8**), 3-O-metil-kaempferol (**9**) e 3-O-metil isoramnetina (**10**),

Em *C. urucurana*, foram identificados: orientina (**11**), rutina (**12**), vitexina (**13**), quercetina-7-O-ramnosídeo (**14**), ramnetina-3-O-ramnosídeo (**15**) e quercetina (**16**).

Os flavonoides **1**, **3**, **14** mostraram-se inéditos, tanto para o gênero, quanto para a família. O flavonoide **15** foi inédito para o gênero, tendo sido encontrado na família, porém, na subfamília Euphorbioideae.

Com a detecção do tilirosídeo, foi verificada a possibilidade de se utilizar os extratos proteicos de folhas jovens dessas duas espécies para acilar enzimaticamente flavonoides de interesse, pois estudos na literatura indicam que a acilação pode aumentar a estabilidade e biodisponibilidade de flavonoides, e também melhorar suas atividades biológicas. Para isso, folhas jovens foram coletadas e mantidas em N₂ líquido, trituradas e extraídas com tampão de extração. O extrato obtido foi concentrado, sua concentração proteica foi determinada e, posteriormente, foi utilizado para acilar os substratos quercetina-3-O-glucosídeo, kaempferol-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo e quercetagina-7-O-glucosídeo. *p*-Cumaroil-CoA e uma mistura de ácido *p*-cumárico e Coenzima A, foram utilizados como agentes acilantes. Foi verificado que o rendimento do extrato proteico de *C.floribundus* foi menor que o de *C.urucurana*. Enquanto o extrato de *C.urucurana* acilou os substratos glicosilados na posição 3, (kaempferol-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo e quercetina-3-O-galactosídeo), não acilou o mono-glicosilado na posição 7 (quercetagina-7-O-glucosídeo), indicando que as aciltransferases dessa espécie são regiosseletivas quanto à posição do resíduo de açúcar. Também demonstrou capacidade de acilação usando como agentes acilantes *p*-cumaroil-CoA e a combinação ácido *p*-cumárico + CoA + ATP. O extrato proteico de *C.floribundus*, talvez por ter apresentado um menor rendimento de extração, acilou apenas o kaempferol-3-O-glucosídeo, resultando no tilirosídeo, o flavonoide acilado característico do gênero.

Keywords: *Croton urucurana*, *Croton floribundus*, flavonoides, tilirosídeo, acilação enzimática.

Abstract

Croton is the second largest genus of Euphorbiaceae, with approximately 1,300 species, 300 among them native from Brazilian biomes. Several species of the genus, are used worldwide in traditional medicine and possess a characteristic blood colored latex, called “dragon’s blood”. Chemical studies about *Croton* species have uncovered multiple classes of secondary metabolites, such as diterpenes (clerodanes, labdanes, kauranes and trachylobanes), volatile oils, steroids and triterpenoids, alkaloids, proanthocyanidins and flavonoids. The latter are secondary metabolites with high structural diversity and recognized as having biological activities with medicinal potential. *Croton floribundus* Spreng. and *C. urucurana* Baill. have shown several medicinally promising biological activities and are used in traditional medicine. However, few investigations have been performed aiming the flavonoid chemistry of any of the two species.

One of the objectives of the present study is the isolation and identification of flavonoids from leaves of *C. floribundus* and *C. urucurana*. Powdered material from both species was extracted by reflux with 80% methanol. The dry extracts were treated with toluene and dichloromethane, lyophilized and solubilized in methanol. The methanol solution was analyzed by polyvinylpyrrolidone column chromatography (PVPP-CC). The fractions obtained were further analyzed by PVPP-CC, Sephadex LH-20 column chromatography and paper chromatography. The fractions and isolated compounds obtained were analyzed by HPLC. Isolated compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR and HPLC co-chromatography with authentic samples.

The acylated flavonol tiliroside was obtained from extracts of both species. It seems to be a characteristic marker of the genus, having been reported for a high number of *Croton* species. From the leaf extract of *C. floribundus* three triglycosides were obtained in the present work: alcesefoliside (**1**), mauritianin (**2**) and isorhamnetin-3-O-(2,6-dirhamnosyl)-galactoside (**3**). Other glycosides identified were quercetin-3-O-glucoside (**4**), tiliroside (**5**), 3'-helichryoside-3-O-methyl ether (**6**), kaempferol (**7**), isorhamnetin (**8**), 3-O-methyl-kaempferol (**9**) and 3-O-methyl-isorhamnetin (**10**).

The following compounds were obtained from *C. urucurana*: orientin (**11**), rutin (**12**), vitexin (**13**), quercetin-7-O-rhamnoside (**14**), rhamnetin-3-O-rhamnoside (**15**) and quercetin (**16**).

Flavonoids **1**, **3** and **14** are new regarding genus *Croton* and family Euphorbiaceae. Flavonoid **15** was previously found in subfamily Euphorbioideae and is now reported for the first time in *Croton*.

Taking into account the detection of tiliroside in the material analyzed, and that acylation increases both stability and bioavailability of flavonoids, while enhancing their biological activity, an approach was planned to use protein extracts of young leaves of both species aiming the enzymatic acylation of several flavonoids. Young leaves were maintained in liquid N₂, ground and treated with extraction buffer. The extract obtained was concentrated and mixed with *p*-coumaroyl-CoA and a mix of *p*-coumaric acid and Coenzyme A. The extract was used in assays aiming the acylation of quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-3-O-galactoside and quercetageitin-7-O-glucoside. The concentration of the protein extract from *C. floribundus* was lower than that of *C. urucurana*. The extract from *C. urucurana* acylated the 3-O-glycosylated substrata kaempferol-glucoside, quercetin-glucoside and quercetin-galactoside, but was ineffective toward quercetageitin-7-O-glucoside. These results suggest that acyltransferases in the extract are regioselective about the position of attachment of the sugar moiety. They were shown to be effective using either *p*-coumaroyl or the combination *p*-coumaroyl-CoA + ATP. *C. floribundus* protein extract acylated only kaempferol-3-O-glucoside, yielding tiliroside, the characteristic acylated flavonoid of *Croton*.

Keywords: *Croton urucurana*, *Croton floribundus*, flavonoids, tiliroside, enzymatic acylation.

Capítulo I – Introdução Geral

I.Introdução Geral

Desde a antiguidade, a humanidade utilizou os produtos de origem vegetal como fontes de alimento, combustível, proteção, sabores e fragrâncias. Não menos importante, entretanto, foi a utilização de plantas como medicamentos no tratamento das mais diversas enfermidades. Atualmente, as plantas contribuem com algum de seus componentes em pelo menos 50% dos medicamentos de uso clínico, dos quais 25% são originários de angiospermas. Em áreas como a oncologia, a proporção de medicamentos derivados de plantas pode chegar a 60% (CALIXTO, 2005, GURIB-FAKIM, 2006, DUTRA et al., 2016). Uma única espécie vegetal pode apresentar substâncias anti-inflamatórias, antioxidantes, bactericidas, antifúngicas, diuréticas, e neuroativas, entre outras.

Desde a papoula, cultivada pelos sumérios a pelo menos 5 mil anos e conhecida como “Planta da Alegria” e usada em misturas para sedação de crianças segundo o Papiro de Ebers (1552 a.C) (DUARTE, 2005), as espécies vegetais têm sido tanto fonte direta de agentes terapêuticos, quanto fonte de matéria prima de compostos semi-sintéticos. Como exemplo, no primeiro caso, pode-se citar a quinina, composto antimalárico encontrado em 1820 na casca de *Cinchona officinalis*, utilizada por povos indígenas da América do Sul para o tratamento de febres, e a D-tubocurarina, um relaxante muscular extraído até hoje de *Chondrodendron tomentosum*. Como compostos semi-sintéticos cita-se como exemplo os extratos de saponinas de espécies do gênero *Dioscorea*, que são modificados nas sapogeninas utilizadas para a produção de medicamentos esteroidais, e a cocaína extraída de *Erythroxylum coca*, que serviu de modelo para uma classe de anestésicos locais e utilizada como fonte de biocompostos para novas drogas sintéticas (GURIB-FAKIM, 2006, DUTRA et al., 2016).

Entre outros exemplos da utilização de fármacos de origem vegetal temos a reserpina e outros alcaloides anti-hipertensivos e tranquilizantes obtidos a partir de espécies de *Rauwolfia*, e dois agentes anticâncer utilizados para o tratamento de leucemia infantil e doença de Hodgkin a partir de *Catharathus roseus* (GURIB-FAKIM, 2006).

A importância das plantas como fonte popular de medicamentos é tal que entre 65 a 80% da população mundial utiliza plantas como parte de seus sistemas tradicionais de saúde, desempenhando, dessa maneira, um importante papel nos sistemas de saúde do restante da população, segundo a Organização Mundial da Saúde (CALIXTO, 2005, GURIB-FAKIM, 2006). Segundo esse último autor, 25% das formulações prescritas nos Estados Unidos no período de 1959 a 1980 apresentavam princípios ativos ou extratos de origem vegetal. Foram consideradas como medicamentos de relevância, 119 substâncias presentes em 90 espécies, sendo que 74% foram descobertas por estudos químicos voltados ao isolamento de princípios ativos de plantas usadas tradicionalmente, o que demonstra a importância e o potencial da etnobotânica para esse fim. Segundo ALARCON-AGUILERA et al. (1998), cerca de 800 espécies apresentam potencial atividade antidiabética.

Compostos de origem vegetal são produzidos pelo seu metabolismo endógeno, que se divide em metabolismo primário e secundário.

O metabolismo primário consiste na produção de compostos que participam de processos metabólicos essenciais a todas as plantas, como a fotossíntese, ciclos das pentoses e do ácido cítrico, glicólise, transporte de elétrons, fosforilação e regulação energética, sendo estes os carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (DEWICK, 2009).

Por meio do metabolismo secundário, são produzidos os metabólitos secundários, um grupo extremamente grande e diversificado de substâncias com mais de 200 mil compostos identificados. São compostos biossinteticamente derivados de precursores originados do metabolismo primário, participando de um metabolismo especializado que depende do tipo celular ou de uma resposta ao ambiente. Apresentam distribuição mais limitada no reino vegetal, restringindo-se a um determinado grupo taxonômico, seja espécie, gênero, família ou um grupo de famílias afins. Caracterizados pela grande variedade de estruturas, esses compostos influenciam na interação planta-ambiente, seja atuando como mecanismo de defesa contra microrganismos, insetos e outros predadores, seja como agentes alelopáticos, na atração de polinizadores ou ainda na adaptação a estresses ambientais (BALANDRIN et al., 1985, BOURGUAD et al., 2001., DEWICK, 2009, BUCHANAN, 2015).

Os metabólitos secundários podem ser classificados em grupos, de acordo com sua estrutura química, sendo que os mais bem estudados são os terpenoides, os compostos nitrogenados (principalmente alcaloides) e os compostos fenólicos (BUCHANAN, 2015). Deste último, destacam-se os flavonoides.

I.1.Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos que apresentam grande diversidade estrutural, por seu núcleo básico conter 15 átomos de carbono, em uma configuração $C_6-C_3-C_6$, formada por dois anéis aromáticos ligados a três unidades de carbono que podem ou não formar um terceiro anel (Fig. I.1).

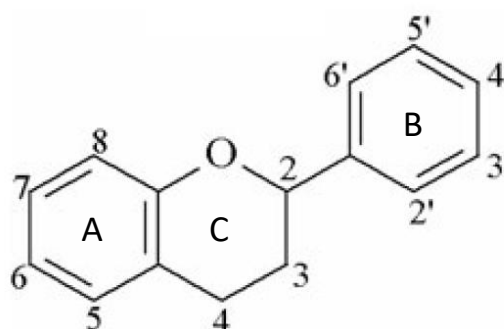


Figura I.1. Núcleo básico dos flavonoides

São compostos de biossíntese mista, originados da condensação de três moléculas de malonil-CoA, precursor advindo da via do acetato-malonato (origem do anel A), com o 4-cumaroil-CoA, também conhecido como hidroxicinamil-CoA (origem do anel B e dos três carbonos do anel C). Este último é produto da via do ácido chiquímico, que tendo como catalisador a enzima chalcona sintase, condensa-se com o produto formado pela via do acetato-malonato, resultando o intermediário 4,2',4'',6'-tetra-hidroxi chalcona (também conhecido como naringenina-chalcona). Este derivado atua como precursor de uma ampla variedade de substâncias, incluindo flavanonas, flavonas, flavonóis e antocianinas (Fig. I.2). Os mesmos precursores podem formar o resveratrol, um estilbeno, sob a ação da enzima estilbeno sintase (DEWICK, 2009, BUCHANAN, 2015).

Para a formação das classes de flavonoides citadas acima, a 4,2',4'',6'-tetra-hidroxi chalcona é convertida na flavanona naringenina por ação da enzima chalcona isomerase, a partir da qual são formadas outras flavanonas e as flavonas, por ação das enzimas flavona sintase I e II, e os di-hidroflavonóis, por ação da flavanona 3-hidroxilase. A partir deste último composto, podem ser obtidos os flavonóis, por ação da enzima flavonol sintase, e os flavan-3,4-dióis por meio da di-hidroflavonol-4 redutase. Estes últimos podem originar os flavan-3-óis (catequinas e epicatequinas), por ação da leucoantocianidina redutase, ou as antocianidinas, por ação da antocianidina sintase (DEWICK, 2009). A condensação de catequinas com flavan-3,4-dióis origina dímeros chamados proantocianidinas, incluindo os dímeros com uma ligação, como a procianidina B, ou com duas, como a procianidina A2. A continuação da polimerização origina os taninos condensados (VICKERY & VICKERY, 1981, DEWICK, 2009). Da 4,2',4'',6'-tetra-hidroxi chalcona, também podem ser formadas as di-hidrochalconas, as auronas e os isoflavonoides (Fig. 1.2).

Além da variedade de núcleos, os flavonoides podem apresentar diversas modificações moleculares, incluindo: 1) aumento ou redução da hidroxilação do núcleo, originando diferentes agliconas; 2) glicosilação dos grupos hidroxila, dando origem aos flavonoides O-glicosilados; 3) glicosilação diretamente nos núcleos flavonoídicos, produzindo flavonoides C-glicosilados. Outras modificações possíveis são: metilação ou isoprenilação dos grupos hidroxila ou do núcleo flavonoídico, metilenação dos grupos orto-di-hidroxila, dimerização, formação de bissulfatos e finalmente a acilação dos grupos hidroxila dos açúcares (MARKHAM, 1982). Como exemplo da última modificação mencionada, temos o tilirosídeo, majoritário em várias espécies de *Croton*, um gênero de Euphorbiaceae (MATOS, 2011).

Considerando esses fatores, a variedade estrutural do grupo permite teorizar a existência de cerca de 2×10^6 compostos dessa classe (HAVSTEEN, 2002), sendo que mais de 8 mil foram identificados até 2014 (LAGO et al., 2014) e apresentam uma grande probabilidade de moléculas com atividade biológica e potencial como medicamentos (MARKHAM, 1982).

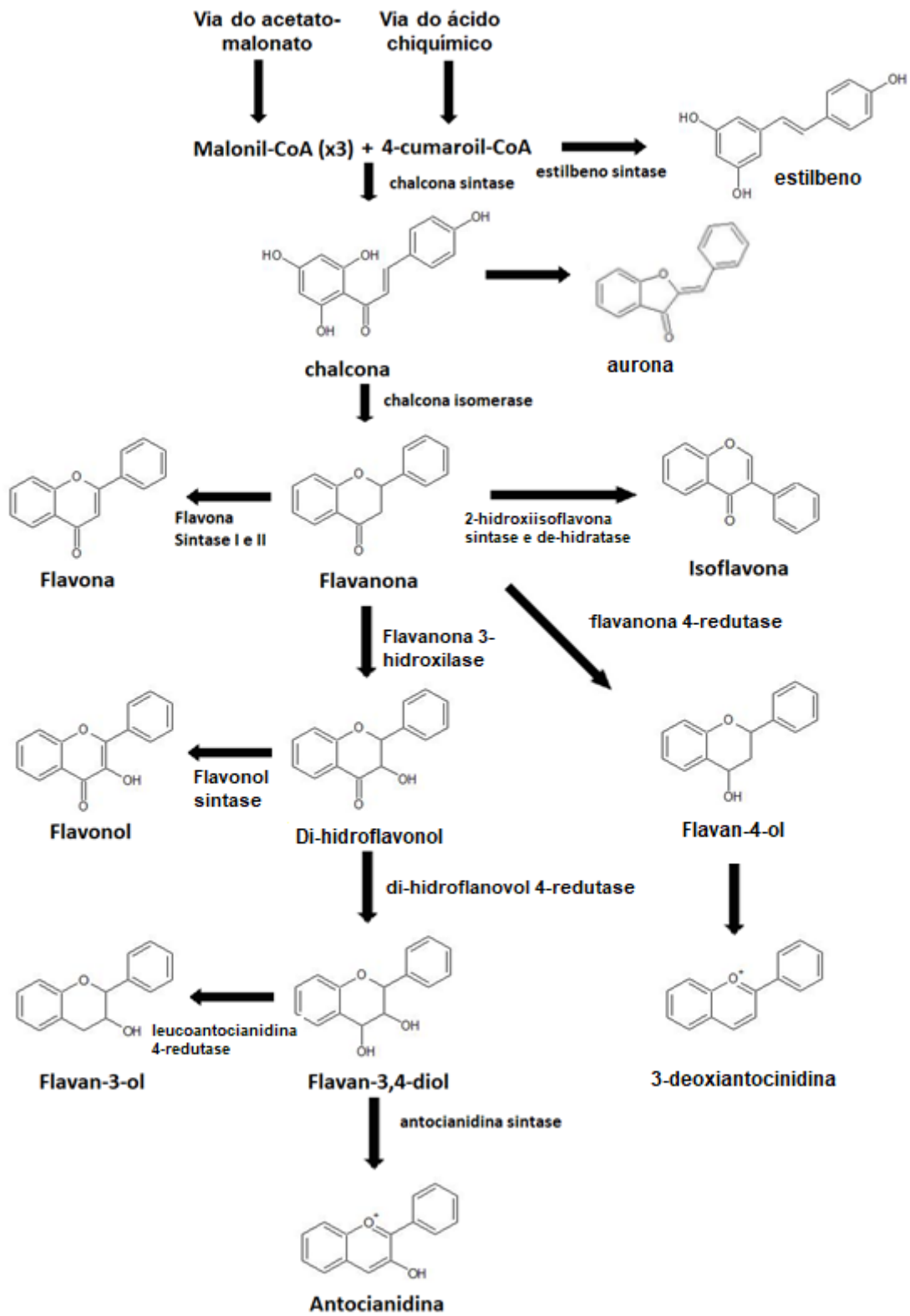


Figura I.2. Esquema da biossíntese de flavonoides (adaptado de DEWICK, 2009)

Normalmente, associados à função de pigmentação, devido às antocianinas, os flavonoides são constituintes essenciais das células das plantas superiores. Devido à sua coloração, as antocianinas atraem polinizadores que agem também como dispersores de sementes (por exemplo, pássaros e insetos). Os flavonoides têm ainda outras funções importantes, tais como: proteger as células vegetais de danos por fotoxidação; ativar e regular os genes sensíveis à luz e ao crescimento das plantas, bem como no transporte de auxinas; proteger o DNA contra radiação ultravioleta por absorverem num comprimento de onda próximo daquele deletério ao DNA; proteger as plantas contra fitopatógenos; atuar na sinalização do processo de nodulação de bactérias fixadoras de nitrogênio; e proteger o vegetal contra o estresse, devido a sua ação como antioxidante (HAVSTEEN, 2002, FERREIRA et al., 2008, DEWICK, 2009, FERREYRA et al., 2012).

I.2. Atividades biológicas de flavonoides

A diversidade estrutural dos flavonoides permite a eles diversas atividades biológicas de grande interesse medicinal, agindo como antimicóticos, antibacterianos, anti-inflamatórios, anticâncer, antivirais, antioxidantes, cicatrizantes de ferimentos, anestésicos locais e anti-hipertensivos (p. ex.: HAVSTEEN, 2002; FOWLER & KOFFAS, 2009; GHASEMZADEH & GHASEMZADEH, 2011).

Para demonstrar a importância da ação dos flavonoides em atividades biológicas foram selecionados alguns exemplos que apresentam uma ampla discussão na literatura. São eles: 1) quercetina e rutina, muito comuns nas angiospermas; 2) naringina, uma flavona glicosilada comum na casca do fruto e de outros órgãos de *Citrus*; 3) quercetagetina, um flavonoide 6-hidroxilado; 4) vitexina, um flavonoide C-glicosilado. Além destes, será descrita a importância terapêutica do tilirosídeo, substância de interesse deste trabalho.

A ação terapêutica da quercetina (uma aglicona de flavonol) é bem relatada na literatura. Um dos relatos mais recentes demonstrou a inibição *in vitro* da proliferação de células U251 de glioblastoma, assim como a indução de sua apoptose (LIU et al., 2017). ÇEVIK et al. (2013) mostraram seu benefício no controle do dano provocado pela isquemia/reperfusão do tecido dos corpos

cavernosos de ratos, devido a seus efeitos anti-inflamatório, antiapoptótico e antioxidante. A aglicona também demonstrou efeitos anti-inflamatórios e anti-histamínicos ao agir sobre o balanço Th1/Th2 de um modelo murino de asma (PARK et al., 2009). CHEN et al. (2010) revisaram os estudos do efeito modulador do composto sobre a resistência múltipla de células tumorais a drogas, enquanto DAJAS (2012) revisaram os estudos *in vitro* e *in vivo* sobre suas atividades neuroprotetora e anticâncer.

A rutina melhorou a memória em ratos transgênicos com doença de Alzheimer, ao diminuir o nível de placas β -amiloides, além de possuir atividade antioxidante e anti-inflamatória (XU et al., 2013). Apresentou efeito semelhante ao de antidepressivos em camundongos, provavelmente por aumentar a disponibilidade de serotonina e noradrenalina (MACHADO et al., 2008). Em doses de 50 mg/kg aplicadas imediatamente após uma isquemia cerebral em ratos, a rutina apresentou atividade neuroprotetora (RODRIGUES et al., 2013). Agiu contra a artrite séptica causada por *Candida albicans* em camundongos BALB/c ao inibir a produção de óxido nítrico pela proliferação de macrófagos e células T (HAN, 2009). Aliviou a cardiomiopatia diabética de ratos ApoE knock out diabéticos ao reverter a hipertrofia miocárdica, diminuir a deposição de colágeno extracelular e o acúmulo de lipídios, ao mesmo tempo que aumentou a densidade capilar em tecidos miocárdicos, além de diminuir a glicose sanguínea (HUANG et al., 2017). O composto demonstrou atividade antitumoral *in vivo* em camundongos com tumores de células de câncer de colo SW480 (ALONSO-CASTRO et al., 2013).

A naringina (naringenina-7-O-neo-hesperidosídeo) demonstrou atividade anticâncer ao inibir o crescimento de células tumorais de câncer de mama triplo-negativo *in vitro* e *in vivo*; inibiu também um modelo de tumor em camundongos com xenógrafo, ao suprimir a via de sinalização da β -catenina (LI et al., 2013). Segundo GOPINATH et al. (2011), a naringina inibiu a atividade neuroprotetora ao modular a cascata apoptótica induzida por ácido 3-nitropropiónico em ratos Wister, aumentando a atividade de antioxidantes enzimáticos e os níveis de antioxidantes não enzimáticos. A naringina, assim como a rutina, inibiram a atividade da tireoide em ratos com hipertireoidismo por indução L-T₄, possivelmente pelo sequestro de radicais livres (PANDA & KAR, 2014). KAWAGUCHI et al. (2011) revisaram a ligação entre a atividade

anti-diabetes tipo II da naringina e a modulação da atividade do fator de necrose tumoral α .

A quercetagina demonstrou atividade antiviral ao inibir a replicação *in vitro* do citomegalovírus humano (COTIN et al., 2012). Diminuiu a fosforilação de enzimas com papéis críticos em doenças crônicas como o câncer, diabetes tipo II e obesidade, reduzindo também a transformação dessas células; atuou também no índice tumoral, reduzindo seu volume no modelo de carcinogênese em ratos (BAEK et al., 2013). Além disso, demonstrou atividade antioxidante, antidiabética e antilipidêmica *in vitro* (WANG et al., 2016).

A vitexina previne danos celulares devido a estresse de calor, ao induzir a expressão da proteína Hsp90 *in vitro*; apresentou atividade antioxidante e causou indução de autofagia mediada por estresse do retículo endoplasmático (BHARDWAJ et al., 2015). Segundo ZHANG et al. (2017) a vitexina preveniu o dano endotelial induzido por lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, em células endoteliais de veias umbilicais humanas *in vitro*, ao ativar a autofagia celular através da sinalização AMPK. Em camundongos, demonstrou atividade anti-nociceptiva através do mecanismo do sistema opioide (ÖZKAY & CAN, 2013). Em modelo murino de asma alérgica induzida por ovalbumina, diminuiu a migração de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares no fluido bronqueoalveolar e suprimiu a infiltração de leucócitos e produção de muco e edema pulmonar, demonstrando atividade de anti-hipersensibilidade alérgica (VENTURINI et al., 2018). Segundo revisão por HE et al. (2016), a vitexina apresenta atividade anti-inflamatória, antineoplásica, anti-nociceptiva, antiepilética e anticonvulsivante, tendo ação contra hipóxia, isquemia e doença de Alzheimer.

O tilirosídeo (kaempferol 3-O- β -D-6"-O-cumaroil glucopiranosídeo) é um derivado do kaempferol, ligado na posição 3 do anel C à glucose, que por sua vez é ligada a um grupo *p*-cumaroil, sendo, portando, um flavonoide acilado. Esse composto apresenta atividades biológicas interessantes, como efeito antiobesidade em ratas, por meio da sinalização da adiponectina, com aumento da oxidação dos ácidos graxos no fígado (GOTO et al., 2012), atividade hepatoprotetora em camundongos, provavelmente devido à inibição do fator α de necrose tumoral (MATSUDA et al., 2002), e atividades anti-inflamatória e antioxidante *in vitro*, em ratos (SALA et al., 2003). Também reduziu a glicose

no sangue de ratos diabéticos em doses de 25 mg/kg (IKECHUKWU et al., 2016).

Entretanto, o possível uso terapêutico de substâncias do metabolismo secundário de plantas, como as citadas acima, pode ser limitado devido à baixa estabilidade e solubilidade de alguns desses compostos em fases aquosas e lipídicas durante os processamentos e armazenamentos. Ademais, essas substâncias são sensíveis à degradação, devido à presença de duplas ligações presentes em suas estruturas, além de grupos hidroxílicos e cetônicos (MELLOU et al., 2005, CHEBIL et al., 2007; CHEBIL et al., 2006; VISKUPICOVÁ et al., 2009, QIAO et al., 2014).

Por exemplo, ao se avaliar a estabilidade de naringina, rutina, catequina, e quercetina de amostras de *Centella asiatica* submetidas a três métodos de secagem, “freeze drying”, forno à vácuo e estufa com fluxo de ar, verificou-se que a rutina apresentou a menor degradação quando submetida aos três métodos de secagem (31,4%, 63,3% e 76,8%, respectivamente) enquanto a quercetina se mostrou a mais sensível a eles (73,5%, 87,6% e 97%, respectivamente) (MOHD ZAINOL et al., 2009).

As antocianidinas apresentam baixa estabilidade em relação ao calor, degradando-se durante o processamento térmico de alimentos, como evidenciado pelas antocianidinas dos frutos de sabugueiro (*Sambucus nigra* L. - “elderberry”), reduzidas a 50% do valor original depois de 3 horas a 95°C. O purê de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) perdeu 43% do teor original de antocianidinas monoméricas por escaldamento (95°C por 3 minutos) e pasteurização. Outro dado interessante mostrou que durante a estocagem, ocorreu perda de mais de 50% do teor total de antocianidinas monoméricas. O suco de mirtilo, por exemplo, perdeu 50% do teor total de antocianidinas após 60 dias de estocagem a 23°C (PATRAS et al., 2010).

Flavonoides glicosilados, como rutina, naringina e luteolina-7-O-glucosídeo, apresentam maior resistência à degradação do que agliconas como mesquitol, eriodictiol e luteolina, quando aquecidos em solução aquosa por duas horas (CHABAAN et al., 2016).

Os flavonoides apresentam baixa solubilidade em água, porém nas espécies vegetais, eles normalmente são glicosilados, o que os torna menos reativos e mais hidrossolúveis, pois a glicosilação aumenta a hidrofiliabilidade do

composto pelo acréscimo de açúcares, permitindo seu armazenamento no vacúolo das células (MARKHAM, 1982, CHEBIL et al., 2006, CHEBIL et al., 2007). Porém, a glicosilação ao mesmo tempo em que aumenta a estabilidade e solubilidade do composto, diminui sua biodisponibilidade, uma vez que os glicosídeos são hidrolizados no intestino delgado pela enzima lactase-florizina hidrolase antes que possam ser absorvidos e metabolizados por enzimas de conjugação e hidrólise no intestino delgado, fígado e cólon. Todos, então, são conjugados, formando O-glucoronídeos, O-metil ésteres e flavonoides sulfatados (CARLO et al., 1999, VISKUPICOVÁ et al., 2008, CROZIER et al., 2010, THILAKARANTHNA & RUPASINGHE, 2013). Isso é demonstrado pelo fato da biodisponibilidade da quercetina-4'-O-glucosídeo, depois de perder o açúcar e ser absorvida pelo intestino delgado, ser cinco vezes maior que a da quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina) que é absorvida pelo cólon. Do mesmo modo, a biodisponibilidade da genisteína aglicônica foi maior que a de sua forma glicosilada (THILAKARANTHNA & RUPASINGHE, 2013).

I.3. Modificação molecular

Uma vez que, como citado acima, a utilização de substâncias vegetais bioativas possam sofrer limitações em seu uso por apresentarem pouca estabilidade e solubilidade, há a necessidade de modificações moleculares para melhorar esses atributos, assim como suas biodisponibilidades e atividades biológicas, que podem ser inclusive aumentadas.

Uma opção seria o aumento de sua lipossolubilidade e de sua estabilidade frente à glicosidases, pela reação de acilação, que consiste na ligação de grupos acila alifáticos ou aromáticos aos grupos hidroxilas dos açúcares de flavonoides glicosilados, por meio de reações de esterificação ou transesterificação (ISHIHARA & NAKAJIMA, 2003; MELLOU et al., 2005; CHEBIL et al., 2006; AGUIAR et al., 2007; VISKUPICOVÁ et al., 2009).

Embora seja possível realizar a acilação de flavonoides por processos químicos, a falta de regioselectividade desse processo pode determinar a acilação aleatória de grupos hidroxila responsáveis, por exemplo, pela atividade antioxidante da substância. Nesse caso, há a necessidade de várias etapas de proteção e desproteção desses grupos, o que aumenta a

complexidade do processo. Além disso, as condições severas necessárias para a reação podem levar à degradação do flavonoide utilizado como substrato, assim como a formação de produtos colaterais (MOZHAEV et al., 1998, CHEBIL et al., 2006, GAZAK et al., 2010, ARAUJO et al., 2017).

A desejada regioseletividade é atingida pelo processo de acilação enzimática (MOZHAEV et al., 1998; KONTOGIANNI et al., 2001, 2003; ISHIHARA & NAKAJIMA, 2003; CHEBIL et al., 2006; MELLOU et al., 2006; WANG et al., 2010, KUMAR et al., 2016, ARAUJO et al., 2017). Nesse processo, diversas enzimas podem ser utilizadas, como lipases, transferases e isomerases, que por sua vez podem ser quimiosseletivas, regioseletivas ou estereosseletivas (CHEBIL et al., 2006; WANG et al., 2010, KUMAR et al., 2016). Além disso, sistemas enzimáticos (NAKAJIMA et al., 2000), que agem como biocatalisadores podem ser utilizados para modificar quimicamente os compostos de interesse, processo este chamado de biotransformação (POLLIER et al., 2011, NAKAJIMA et al., 2000). Essa é uma forma de biossíntese combinatória, na qual a capacidade biossintética de diferentes organismos é utilizada para a obtenção de novos compostos (MOZHAEV et al., 1998; POLLIER et al., 2011; WANG et al., 2010).

A acilação da rutina e naringina com ácidos alifáticos insaturados por lipase (extraída de *Candida antartica* - Novozym 435) reduziu mais eficientemente a liberação do fator de crescimento endotelial vascular por células K562 de linfoblastoma *in vitro*, melhorando sua propriedade antiangiogênica e antitumoral (MELLOU et al., 2006).

A ação inibitória da enzima xantina oxidase, bem como a atividade antiproliferativa contra células tumorais Caco2A pela isoramnetina-3-O-glucosídeo foi aumentada com a adição tanto de laurato quanto de butirato de etila à molécula. Entretanto, essas modificações causaram uma diminuição de sua capacidade de varredura de radicais livres (SALEM et al., 2011).

A acilação por lipase (de *Candida antartica*) do crisoeirol-7-O- β -D-(3''-E-p-cumaroil)-glucopiranosídeo e do crisoeirol-7-[6'''-O-acetil- β -D-alosil-(1->2)- β -D-glucopiranosídeo com laurato de vinila aumentou de forma significativa suas atividades antioxidantes em relação à LDL em modelo de soro, *in vitro* (MELLOU et al., 2005). Estes autores também relataram que o segundo

composto acilado teve sua atividade antimicrobiana aumentada contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

STEVENSON et al. (2006) deram preferência por glucosídeos com um grupo hidroxila alifático primário no açúcar, ao acilar a naringina e a isoquercetina, assim como extratos de maçã e mirtilo, usando ácido palmítico, cinâmico e fenilpropionico como agentes acilantes, tendo como enzima, a lipase B (de *Candida antarctica*).

Os exemplos mencionados acima demonstram não apenas o potencial da acilação enzimática para produzir flavonoides de interesse, mas também para a melhoria de suas atividades biológicas.

I.4. Euphorbiaceae e o gênero *Croton*.

Euphorbiaceae, pertencente à ordem Malpighiales (APG IV, 2016) é uma das mais diversificadas e complexas famílias das Angiospermas, sendo a sexta maior delas, com cerca de 8.000 espécies, amplamente distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com representantes herbáceos, arbustivos e arbóreos, tanto aquáticos quanto terrestres (OGASAWARA, 2012).

Suas espécies apresentam grande importância econômica, alimentícia, medicinal e ornamental. Entre elas citam-se a seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.), espécie de grande importância econômica devido ao seu látex, usado para a produção de produtos de borracha natural (CARUZO, 2005), e a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), amplamente usada na alimentação, *in natura* ou na forma de farinha (MATOS, 2011; OGASAWARA, 2012), além de ter um grande potencial como fonte de etanol.

Croton é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.300 espécies, distribuídas pelas zonas tropicais e subtropicais das Américas, Ásia e África, com 300 espécies ocorrendo em vários dos biomas brasileiros (MATOS, 2011) (Fig. I.3).



Figura I.3. Distribuição mundial de *Croton* (modificado de BERRY et al, 2005)

Várias espécies de *Croton* produzem látex, que em alguns casos é conhecido como “sangue de dragão” por possuir cor vermelho-sangue, como em *C. draco*, *C. draconoides*, *C. erythrochilus*, *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. urucurana* e *C. xalapensis*. De acordo com a revisão de GUPTA et al. (2008), essas espécies de *Croton* apresentam vários usos na medicina popular, como por exemplo, no tratamento de diarreia e cólera, e na cicatrização de ferimentos, tendo demonstrado diversas atividades biológicas de interesse, como antimicrobiana, antiviral, antitumoral, citotóxica, anti-hemorragica e imunomoduladora.

Croton apresenta várias classes de compostos, tais como: diterpenos, óleos voláteis, esteroides e triterpenoides, alcaloides, proantocianidinas e flavonoides (SALATINO et al., 2007).

Os diterpenos são compostos da classe dos terpenoides, com 20 átomos de carbono (4 unidades de isopentenil-difosfato), formados a partir de geranylgeraniolpirofosfato (GGPP), vindo da via do metileritritolfosfato (MEP). Apresentam grande variedade estrutural devido à ciclização da estrutura do GGPP (DEWICK, 2009).

Entre as várias subclasses presentes no gênero, têm-se a dos diterpenos tipo clerodanos, que são diterpenos bicíclicos, formados por rearranjo do esqueleto dos labdanos, dos quais diferem pelas posições dos grupos metila (NURMUKHAMEDOVA & SIDYAKIN, 1987); labdanos propriamente ditos (NGADJUI et al., 1999; DEMETZOS & DIMAS, 2001); ésteres de forbol (GOEL et al., 2007); kauranos (KATAEV et al., 2011) e traquilobanos pentacíclicos (FRAGA, 1994). Esses terpenoides apresentam propriedades farmacológicas para vários tipos de doenças, além de alguns deles apresentarem atividade citotóxica (EL-MEKKAWY et al., 2000; BLOCK et al., 2002; COSTA et al., 2007; THOUNG et al., 2012, TIAN et al., 2017).

Nota-se que clerodanos e ésteres de forbol são de distribuição ampla no gênero, enquanto que a distribuição dos outros diterpenoides, labdanos, kauranos e traquilobanos, tende a se restringir a alguns grupos de espécies (por exemplo, *C. joufra*, *C. oblongifolius* e *C. zambesicus*, para labdanos) que se encontram na África, Ásia e Austrália.

Algumas espécies de *Croton* apresentam óleos voláteis, tanto derivados de terpenoides (mono e sesquiterpenos) quanto de fenilpropanoides (CAMURÇA- VASCONCELOS et al., 2007; KANEGAE, 2007; SALATINO et al., 2007).

Os triterpenos são uma das maiores classes de metabólitos secundários. São biossintetizados pela via de acetato-mevalonato, por meio da união de duas moléculas de farnesilpirofosfato (FPP) para formar o precursor esqualeno (DEWICK, 2009; THIMMAPPA et al., 2014). Um exemplo dessa classe é o ácido acetilaleuritólico, encontrado no látex de *C. urucurana*, que tem a capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

Relacionados aos triterpenos, os esteroides apresentam o sistema tetracíclico do lanosterol, porém sem três grupos metila em C-4 e C-14 (DEWICK, 2009). Embora associados normalmente à via do acetato-mevalonato (DEWICK, 2009; THIMMAPPA et al., 2014), há relatos na literatura ligando a biossíntese de β -sitosterol e de estigmasterol de *Croton sublyratus* Kurz à via do metileritritolfosfato (DE-EKNAMKUL et al., 2003).

Algumas espécies de *Croton* apresentam taspina, um alcaloide pouco usual devido ao seu átomo de nitrogênio estar na cadeia lateral de uma

estrutura dilactônica, semelhante a do ácido elágico, ao invés de estar em um anel heterocíclico, como na maioria dos alcaloides. Encontrado em *Croton draco*, *C. lechleri* e *C. palanostigma*, apresenta atividade anti-inflamatória, além de ser cicatrizante e inibidora de células de melanoma humano SK23 e de câncer de colo HT29 (VAISBERG et al., 1989; MONTOPOLI et al., 2012). Porém, o principal grupo de alcaloides encontrados no gênero corresponde aos alcaloides benzilisoquinolínicos, como a glaucina, encontrada em *Croton draco* e *C. hemiargyreus*, com atividade antitussígena, antinociceptiva, anticonvulsivante, neuroléptica, anti-inflamatória, antipirética, causando também diminuição da pressão sanguínea e dos batimentos cardíacos (IZZU et al., 1999; SALATINO et al., 2007).

A presença de alcaloides e de óleos voláteis de terpenoides como componentes majoritários tendem a ocorrer em espécies do Novo Mundo. Uma exceção é *C.draco*, espécie que ocorre no Velho Mundo, e que apresenta tanto diterpenos quanto alcaloides (SALATINO et al., 2007).

Em *Croton*, os flavonoides podem se apresentar como: i) agliconas (formas livres), como kaempferol e quercetina; ii) glicosídeos (conjugados com açúcar), como rutina; iii) C-glicosídeos (com o açúcar ligado diretamente a estrutura carbônica), como a vitexina (KANEGAE, 2007; SALATINO et al., 2007; SAVIETTO, 2011). As proantocianidinas (ou taninos condensados), substâncias polifenólicas formadas pela combinação de monômeros de catequinas, são consideradas importantes princípios ativos do “sangue de dragão” (SALATINO et al., 2007; GUPTA et al., 2008).

1.5. *Croton floribundus* e *Croton urucurana*

Croton floribundus Spreng, conhecida como “capixingui”, é uma espécie arbórea, de até 10 m de altura (Fig. 1.4), com ramos cilíndricos, apresentando ramos menores, anguloso-obtusos, revestidos de epiderme pardo-escura ou violácea, subverrucosos e com tricomas estrelados; folhas alternas, pecioladas, estipuladas, oblongo-ovadas ou oblongo-elípticas, agudas, subinteiras, com limbo de até 12 cm de comprimento e 6 cm de largura, escuras e com tricomas estrelados e hirto-escabrosos na face adaxial e prateadas na face abaxial, com

flores brancas dispostas em racemos compridos. É nativa da bacia do Rio Paraná (CORREA, 1984; FLORA DO BRASIL 2020, 2018a)

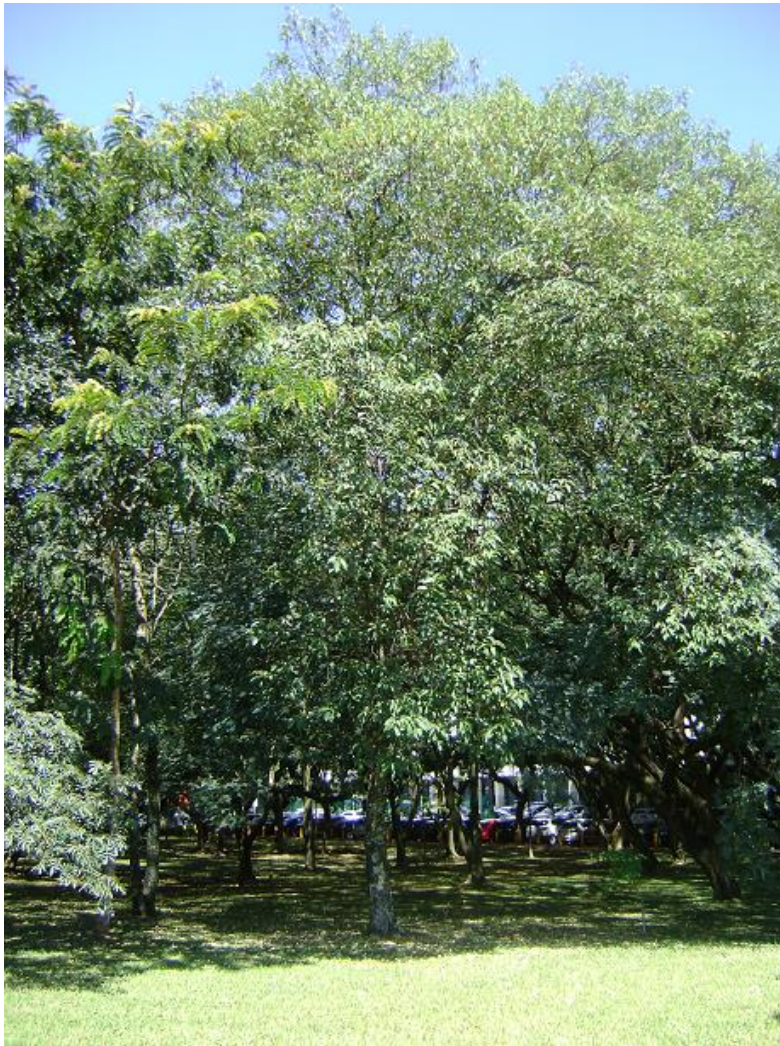


Figura I.4. *Croton floribundus* Spreng. (Campus Butantã, USP)

A espécie é usada popularmente como anti-inflamatória, no tratamento da sífilis e de úlceras, apesar de apresentar poucos estudos sobre sua composição química. UCHOA et al. (2013) isolou da casca da raiz vários diterpenos dos tipos traquilobano e kaurano. O extrato metanólico do seu caule apresentou alta atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, relatada por MEDINA et al. (2009), enquanto os extratos alcoólicos de folhas e cascas do caule demonstraram atividade citotóxica e anticolinesterásica (BARTH et al., 2011).

Croton urucurana Baill. é uma espécie arbórea de 6 a 8 m de altura (Fig.1.5), de copa aberta e tronco claro, com folhas cordiformes, que ficam vermelho-amareladas na senescência e flores pequenas e esbranquiçadas, em inflorescências do tipo espiga, terminais. Encontrada em terrenos úmidos e pantanosos, está distribuída pela Amazônia, Nordeste e Sudeste do Brasil. É conhecida popularmente como “sangra-d’água” (LORENZI & MATOS, 2002, FLORA DO BRASIL 2020, 2018b).



Figura 1.5. *Croton urucurana* Baill. (Campus Butantã, USP)

Seu látex, chamado “sangue de dragão”, é usado popularmente para o tratamento de reumatismo, ferimentos, úlceras, diarreia e câncer (RAO et al., 2007) demonstrando também atividade antiviral, antidiarreica, bactericida, antifúngica e cicatrizante de ferimentos (PERES et al., 1997; GURGEL et al., 2001; ESMERALDINO et al., 2005; GURGEL et al., 2005; RAO et al., 2007),

além de diminuir a nocicepção (percepção da dor) visceral em camundongos (RAO et al., 2007).

O extrato metanólico do caule apresentou atividade anti-ulcerogênica (CORDEIRO et al., 2012), enquanto as folhas demonstraram atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Nesse extrato foram identificadas várias catequinas, os alcaloides tembetarina, magnoflorina e taspina, e diterpenos furano-lactônicos, além do ácido hardwickiico (CORDEIRO et al., 2016). Segundo ESMERALDINO et al. (2005), o extrato aquoso da casca do caule de *C. urucurana* agiu contra a atividade hemorrágica do veneno de jararaca. PERES et al. (1997) isolaram ácido acetilaleuritólico, vários esteroides, sonderianina (um diterpeno), e várias catequinas, sendo que o primeiro composto apresentou a melhor concentração inibitória mínima contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* dentre os testados. Os mesmos compostos, com exceção da sonderianina, foram testados com relação à atividade analgésica (PERES et al., 1998).

Os extratos metanólico e acetato-metanólico inibiram a formação *in vitro* de biofilmes de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (BARBIERI et al., 2014). O extrato aquoso de seu látex causou toxicidade em ratos, causando problemas no desenvolvimento fetal (MORAES-SOUZA et al., 2017). O látex liofilizado demonstrou também atividade anticolinesterásica ao inibir *in vitro* a enzima acetilcolinesterase (TREVISAN & MACEDO, 2003)

SIMIONATTO et al. (2009) analisaram a composição química do óleo volátil de *C. urucurana*, e sua atividade antibacteriana e antifúngica.

I.6. Justificativa e Objetivos

Devido aos poucos dados sobre os perfis flavonoídicos de *Croton floribundus* e *C. urucurana* encontrados na literatura, decidiu-se realizar um estudo mais aprofundado dessa classe de substâncias fenólicas, uma vez que as plantas são usadas há muito tempo na medicina tradicional brasileira e seus extratos apresentaram atividades antiulcerogênica, anti-inflamatória, citotóxica e anticolinesterásica, entre outros. Para tanto, foram definidos os seguintes objetivos:

1. O estudo químico de *Croton.urucurana* Baill. e *C.floribudus* Spreng, com o objetivo de identificar e isolar seus principais constituintes flavonoídicos, por meio de Cromatografia em Coluna de Polivinilpolipirrolidona (PVPP), Cromatografia em Coluna de Sephadex LH-20, Cromatografia em Papel e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a identificação estrutural foi utilizada Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C e co-cromatografia com amostras autênticas.
2. Uma vez que *Croton urucurana* e *C. floribundus* apresentam flavonoides acilados, detectados em um estudo prévio, os extratos proteicos de suas folhas foram utilizados como biocatalisadores, para a biossíntese de derivados acilados de flavonoides glicosilados, como kaempferol-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo e quercetina-7-O-glucosídeo, utilizados como substratos. Como agentes acilantes foram usados a *p*-cumaroil-CoA e os reagentes ácido *p*-cumárico e Coenzima A.

I.7.Referências bibliográficas

- AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M., TSAI, S.M., PARK, Y.K. (2017) Transformações enzimáticas de flavonoides. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de alimentos, 25.
- ALARCON-AGUILERA, F.J., ROMAN-RAMOS, R., PEREZ-GUTIERREZ, S., AGUILAR-CONTRERAS, A., CONTRERAS-WEBER, C.C., FLORES-SAENZ, J.L., (1998) Study or the anti-hyperglycaemic effect or plants used as antidiabetics. J. Ethnopharmacol. 61 (2), 101–110.
- ALONSO-CASTRO, A.J., DOMÍNGUEZ, F., GARCÍA-CARRANCÁ, A. (2013) Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. Archives of Medical Research, 44: 346-35.
- APG IV. (2016). An Update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, 181: 1-20.
- ARAUJO, M.E.M.B., FRANCO, Y.E.M., MESSIAS, M.C.F., LONGATO, G.B., PAMPHILE, J.A., CARVALHO, P.O. (2017) Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits. Planta Medica, 83: 7-22.
- BAEK, S., KANG, N.J., POPOWICK, G.M., ARCINIEGA, M., JUNG, S.K., BYUN, S., SONG, N.R., HEO, Y.-S., KIM, B.Y., LEE, H.J., HOLAK, T.A., AUGUSTIN, M., BODE, A.M., HUBER, R., DONG, Z., LEE, K.W. (2013) Structural and functional

- analysis of the natural JNK1 inhibitor quercetagenin. *Journal of Molecular Biology*, 425(2): 411–423.
- BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S., BOLLINGER, W.H. (1985) Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228 (4704), 1154-1160
- BARBIERI, D.S.V., TONIAL, F., LOPEZ, P.V.A., SALES MAIA, B.H.L.N., SANTOS, G.D., RIBAS, M.O., GLIENKE, C., VICENTE, V.A. (2014) Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology*, 59, 887-896.
- BARTH, E.F., DILELI, P., BIAVATTI, D.C., SILVA, Y.L., GARNÉS, F.L.S., ROMAGNOLO, M.B., TAKEMURA, O.S., LAVERDE JR., A. (2011) Atividades anticolinesterásicas e citotóxicas de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- BERRY, P.E., HIPPEL, A.L., WURDACK, K.J., VAN EEL, B., RIINA, R. (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNL DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 92:1520-1534.
- BHARDWAJ, M., PAUL, S., JAKHAR, R., KANG, S.C. (2015) Potential role of vitexin in alleviating heat stress-induced cytotoxicity: regulatory effect of Hsp90 on ER-stress-mediated autophagy. *Life Sciences*, 142: 36-48.
- BLOCK, S., STÉVIGNY, C., DE PAUW-GILLET, M.-C., DE HOFFMAN, E., LLABRES, G., ADJAKIDJE, V., QUETIN-LECLERCQ, J. (2002) *ent*-Trachyloban-3 β -ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambescus*. *Planta medica*, 68: 647-649.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A. MILESI, S., GONTIER, E. (2001) Productions of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- BUCHANAN. B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. (2015) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists: Wiley Blackwell. 1280p.
- CALIXTO, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A Personal View. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 131-134.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., BEVILAQUA, C.M.L., MORAIS, S.M., MACIEL, M.V., COSTA, C.T.C., MACEDO, I.T.F., OLIVEIRA, L.M.B., BRAGA, R.R., SILVA, R.A., VIEIRA, L.S. (2007) Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, 148: 288-294.
- CARLO, G.D., MASCOLO, N., IZZO, A.A., CAPASSO, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65: 337-353
- CARUZO, M.B.R. (2005). Estudo taxonômico e biogeográfico do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado, 143p.
- ÇEVİK, Ö., ÇADIRCI, S., ŞENER, T.E., TINAY, I, AKBAL, C., TAVUKÇU, H. H., ÇETINEL, S., KIRAN, D., ŞENER G. (2013) Quercetin treatment against

- ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: a role on apoptosis and oxidative stress. *Free Radical Research*. 47 (9): 683-691.
- CHABAAN, H., IOANNOU, I., CHEBIL, L., SLIMANE, M., GÉRARDIN, C., PARIS, C., CHARBONNEL, C., CHEKIR, I., GHOUL, M. (2016) Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. 41: e13203.
- CHEBIL, L., HUMEAU, C., FALCIMAIGNE, A., ENGASSER, J.-M., GHOUL, M. (2006) Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. 41: 2237-2251.
- CHEBIL, L., HUMEAU, C., ANTHONI, J., DEHEZ, F., ENGASSER, J.-M., GHOUL, M. (2007) Solubility of flavonoids in organic solvents. *Journal of chemical and engineering data*. 52:1552-1556.
- CHEN, C., ZHOU, J., JI, C. (2010) Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*. 87: 333-338.
- CORDEIRO, K.W., PINTO, L.A., FORMAGIO, A.S.N., ANDRADE, S.F., KASSUYA, C.A.L., FREITAS, K.C. (2012) Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 331-337.
- CORDEIRO, K.W., FELIPE, J.L., MALANGE, K.F., PRADO, P.R., FIGUEIREDO, P.O., GARCEZ, F.R., FREITAS, K.C., GARCEZ, W.S., TOFFOLI-KADRI, M.C. (2016) Anti-inflammatory and aninocceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 128-135.
- CORREA, P. (1984) *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Desenvolvimento Florestal
- COSTA, M.P., MAGALHÃES, N.S.S., GOMES, F.E.S., MACIEL, M.A.A. (2017) Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17: 275-286.
- COTIN, S., CALLISTE, C.-A., MAZERON, M.-C., HANTZ, S., DUROUX, J.-L., RAWLINSON, W.D., PLOY, M.-C., ALAIN, S. (2012). Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral Research*. 96: 181-186.
- CROZIER, A., DEL RIO, D., CLIFFORD, M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoid and phenolic compounds, 31: 446-467.
- DAJAS, F. (2012). Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 383-396
- DE-EKNAMKUL, W., POTDUANG, B. (2003) Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, 62: 389-398.
- DEMETZOS, C., DIMAS, K.S. (2001) Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity. *Studies in Natural products chemistry*, 25: 235-292.
- DEWICK, P.L. (2009). *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 3ed. John Wiley and Sons. 539p.

- DUARTE, D.F. (2005). Uma breve história do ópio e dos opioides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 55(1): 135-146.
- DUTRA, R.C., CAMPOS, M.M., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. (2016). Medicinal Plants in Brazil: Pharmacological studies, drug Discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112: 4-29.
- ESMERALDINO, L.E., SOUZA, A.M., SAMPAIO, S.V. (2005). 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*. 12:570-576.
- EL-MEKKAWY, S., MESELHY, M.R., NAKAMURA, N., HATTORI, M., KAWAHATA, T., OTAKE, T. (2000) Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, 53: 457.
- FERREIRA, M.M.M., OLIVEIRA, A.H.C., SANTOS, N.S. (2008). Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. *Revista Agro@ambiente On-line*, 2: 57-60.
- FERREYRA, M.L.F, RIUS, S.P., CASATI, P. (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3: 1-15.
- FLORA DO BRASIL 2020 (2018a) *Croton floribundus* Spreng. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.ibri.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17512>> Acesso em 15 de julho de 2018.
- FLORA DO BRASIL 2020 (2018b) *Croton urucurana* Baill. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.ibri.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17546>> Acesso em 15 de julho de 2018.
- FOWLER, Z.L., KOFFAS, M.A.G. (2009). Biosynthesis and biotechnological production of flavonones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 799-808.
- FRAGA, B.R. (1994) The Trachylobane Diterpenes. *Phytochemical Analysis*, 5: 49-56.
- GAZAK, R., PURCHARTOVÁ, K., MARHOL, P., ZIVNA, L., SEDMERA, P., VALENTOVÁ, K., KATO, N., MATSUMURA, H., KAIHATSU, K., KREN, V. (2010) Antioxidant and antiviral activities of silybin fatty acid conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 1059-1067.
- GHASEMZADEH, A., GHASEMZADEH, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 6697-6703.
- GOEL, G., MAKKAR, H.P.S., FRANCIS, G., BECKER, K. (2007) Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology*, 26: 279-288.

- GOPINATH, K., PRAKASH, D., SUDHANDIRAN, G. (2011) Neuroprotective effect of naringin, a dietary flavonoid against 3-Nitropropionic acid-induced neuronal apoptosis. *Neurochemistry International*. 59: 1066-1073.
- GOTO, T., TERAMINAMI, A., LEE, J.-Y., OHYAMA, K., FUNAKOSHI, K., KIM, Y.-I., HIRAI, S., UEMURA, T., YU, R., TAKAHASHI, N., KAWADA, T. (2012) Tiliroside, a glycoside flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 23: 768-776.
- GUPTA, D., BLEAKLEY, B., GUPTA, R.K. (2008) Dragon's Blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 361-380.
- GURGEL, L.A., SILVA, R.M., SANTOS, F.A., MARTINS, D.T.O., MATTOS, P.O., RAO, V.S.N. (2001) Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's Blood from *Croton urucurana*. *Phytotherapy Research*, 15: 319-322.
- GURGEL, L.A., SIDRIM, J.J.C., MARTINS, D.T., CECHINEL FILHO, V., RAO, V.S. (2005) In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 409-412.
- GURIB-FAKIM, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27: 1-93.
- HAN, Y. (2009) Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, 9: 207-211.
- HAVSTEEN, B.H. (2002). The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96: 67-202.
- HE, M., MIN, J.-W., KONG, W.-L., HE, X.-H., LI, J.-X., PENG, B.-W. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115: 74-85.
- HUANG, R., SHI, Z., CHEN, L., ZHANG, Y., LI, J., NA, Y. (2017) Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy and improves cardiac function in diabetic ApoE knockout mice. *European Journal of Pharmacology*, 814:151-160.
- IKECHUKWU, O.J., IFEANYI, O.S. (2016) The Antidiabetic Effects of The Bioactive Flavonoid (Kaempferol-3-O- β -D-6{P-Coumaroyl} Glucopyranoside) Isolated From *Allium cepa*. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 11: 44-52.
- ISHIHARA, K., NAKAJIMA, N. (2003). Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 23: 411-417.
- IZZO, A.A., BORRELLI, F., CAPASSO, F., CAPASSO, R., PINTO, L., CRISTONI, A., MASCOLO, N. (1999) Contractile effect of (+)-glaucine in the isolated guinea-pig ileum. *European Journal of Pharmacology*, 337: 215-218.

- KANEGAE, J.M. (2007). Óleos voláteis e flavonoides de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae). Pesquisa em Biologia. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- KATAEV, V.E., KHAYBULIN, R.N., SHAPIROVA, R.R., STROBYKINA, I.Y. (2011) Ent-Kaurane Diterpenoids and Glycosides: isolation, properties and chemical transformations. Review Journal of Chemistry, 1: 93-160.
- KAWAGUCHI, K., MATSUMOTO, T., KUMAZAWA, Y. (2011). Effects of antioxidant polyphenols on THF-Alpha-related diseases. Current Topics in Medicinal Chemistry. 11:1767-1779.
- KONTOGIANNI, A., SKOURIDOU, V., SERETI, V., STAMATIS, H., KOLISIS, F.N. (2001). Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. European Journal of Lipid Science and Technology. 103: 655-660.
- KONTOGIANNI, A., SKOURIDOU, V., SERETI, V., STAMATIS, H., KOLISIS, F.N. (2003). Lipase-catalysed esterification of rutin and narigenin with fatty acids of medium carbon chain. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic. 21: 59-62.
- KUMAR, V., JAHAN, F., MAHAJAN, R.V. SAXENA, R.K. (2016) Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant. Bioresource technology, 218: 1246-1248.
- LAGO, J.H.G., TOLEDO-ARRUDA, A., MERNAK, M., BARROSA, K.H., MARTINS, M.A., TIBÉRIO, I.F.L.C., PRADO, C.M. (2004). Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Disease. Molecules, 19: 3570-3595.
- LI, H., YANG, B., HUANG, J., XIANG, T., YIN, X., WAN, J., LUO, F., ZHANG, L., LI, H., REN, G. (2013). Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β -catenin signaling pathway. Toxicology Letters. 220: 219-228.
- LIU, Y., TANG, Z.-G., LIN, Y., QU, X.-Q., LV, W., WANG, G.-B., LI, C.-L. (2017) Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. Biomedicine & Pharmacology, 92: 33-38.
- LORENZI, H.E., MATOS, F.J. DE A. (2002) Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512p.
- MACHADO, D.G., BETTIO, L.E.B., CUNHA, M.P., SANTOS, A.R.S., PIZZOLATTI, M.G., BRIGHENTE, I.M.C., RODRIGUES, A.L.S. (2008) Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. European Journal of Pharmacology. 587: 163-168.
- MARKHAM, K.R. 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London.
- MATOS, L.M.M. (2011) Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 123p.

- MATSUDA, H., NINOMIYA, K., SHIMODA, H., YOSHIKAWA, M. (2002)
Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10: 707-712.
- MEDINA, J.M., PEIXOTO, J.L.B., SILVA, A.A., HARAGUSHI, S.K., FALAVIGNA, D.L.N., ZAMUNER, M.L.M., SARRAGIOTTO, M.H., VIDOTTI, G.J. (2009)
Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. *Revista Brasileira de Farmacologia*. 19(1B): 207-211.
- MELLOU, F., LAZARI, D., SKAL TSA, H., TSELEPIS, A.D., KOLISIS, F.N., STAMATIS, H. (2005) Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. 116: 295-304.
- MELLOU, F., LOUTRARI, H., STAMATIS, H., ROUSSOS, C., KOLISIS, F.N. (2006)
Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry*. 41:2029-2034.
- MOHD ZAINOL, M.K., ABDUL-HAMID, A., ABU BAKAR, A., PAK DEK, S. (2009)
Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*, 16: 531-537.
- MONTOPOLI, M., BERTIN, R., CHEN, Z., BOLCATO, J., CAPARROTTA, L., FRONDI, G. (2012) *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 144: 747-753.
- MORAES-SOUZA, R.Q., SOARES, T.S., CARMO, N.O.L., DAMASCENO, D.C., CAMPOS, K.E., VOLPATO, G.T. (2017) Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology*, 199: 328-333.
- MOZHEAV, V.V., BUDDE, C.L., RICH, J.O., USYATINSKY, A.Y., MICHELS, P.C., KHMELMITSKY, Y.L., CLARK, D.S., DORDICK, J.S. (1998) Regioselective enzymatic acylation as a tool for producing solution-phase combinatorial libraries. *Tetrahedron*. 54: 3971-3982.
- NAKAJIMA, N., ISHIHARA, K., HAMADA, H., KAWABE, S.-I., FURUKA, T. (2000)
Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90 (3): 347-349.
- NGADJUI, B.T., FOLEFOG, G.G., KEUMEDJIO, F., DONGO, E., SONDEGAM, B.L., CONNOLLY, J.D. (1999) Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the stem bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*, 51: 171-174.
- NURMUKHAMEDOVA, M.R., SIDYAKIN, G.T. (1987) Diterpenoids of the clerodane series. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2: 169-185.

- OGASAWARA, D.C. (2012) Constituintes químicos e atividades antioxidantes e antiproliferativa de extratos de *Astraea Klotzsch* e *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 90p.
- ÖZKAY, Ü.D., CAN, Ö.D. (2013) Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 109: 23-30.
- PANDA, S., KAR, A. (2014) Antithyroid effects of naringin, hesperidin and rutin in L-T₄ induced hyperthyroid rats: possible mediation through 5'DI activity. *Pharmacological Reports*. 66: 1092-1099.
- PARK, H.-J., LEE, C.-M., JUNG, I.D., LEE, J.S., JEONG, Y.-I., CHANG, J.H., CHUN, S.-H., KIM, M.-J., CHOI, I.-W., AHN, S.-C., SHIN, Y.K., YEOM, S.-R., PARK, Y.-M. (2009) Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*. 9: 261-267.
- PATRAS, A., BRUNTON, N.P., O'DONNELL, C., TIWARI, B.K. (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 3-11.
- PERES, M.T.L.P., MONACHE, F.D., CRUZ, A.B., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. (1997) Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 56:223-226
- PERES, M.T.L.P., MONACHE, F.D., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., BEIRITH, A., CALIXTO, J.B., YUNES, R.A. (1998) Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. *Phytotherapy research*, 12: 209-211.
- POLLIER, J., MOSES, T., GOOSSENS, A. (2011) Combinatorial biosynthesis in plants: A (p)review on its potential and future exploitation. *Natural Products Reports*. 28: 1897-1916.
- QIAO, L., SUN, Y., CHEN, R., FU, Y., ZHANG, W., LI, X., CHEN, J., SHEN, Y., YE, X. (2014) Sonochemical effects on 14 flavonoids common in Citrus: relation to stability. *PLOS One*, 9: e87766.
- RAO, V.S., GURGEL, L.A., LIMA-JUNIOR, R.C.P., MARTINS, D.T.O., CECHINEL-FILHO, V., SANTOS, F.A. (2007) Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 357-360.
- RODRIGUES, A.M.G., MARCILLO, F.S., MUZITANO, M.F., GIRALDI-GUIMARÃES, A. (2013) Therapeutic potential of treatment with the flavonoid ritun after cortical focal ischemia in rats. *Brain Research*. 1503: 53-61.
- SALA, A., RECIO, M.C., SCHINELLA, G.R., MÁÑEZ, S., GINER, R.M., CERDÁ-NICOLAS, M., RIOS, J.-L. (2003) Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*. 461: 53-61.

- SALATINO, A., SALATINO, M.L.F., NEGRI, G. (2007) Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18: 11-33.
- SALEM, J.H., CHEVALOT, I., HARSCOAT-SCHIAVO, C., PARIS, C., FICK, M., HUMEAU, C. (2011) Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. 124:486-494.
- SAVIETTO, J.P. (2011) Análise fitoquímica e atividade antiproliferativa de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 111p.
- SIMIONATTO, E., CANDIDO, A.C.S., POPPI, N.R., PERES, M.T.L.P., OGUMA, P.M., SANTOS, E.C., MATOS, M.F.C., HESS, S.C., BONANI, V.F.L., CARVALHO, J.E., DIRAIMO, D.L.. (2009) Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* (Baillon) (Euphorbiaceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 12:250-261.
- STEVENSON, D.E., WIBISONO, R., JENSEN, D.J., STANLEY, R.A., COONEY, J.M. 2006. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme and Microbial technology*, 39: 1236-1241.
- THILAKARANTHNA, S.H., RUPASINGHE, H.P.V. (2013) Flavonoid Bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5:3367-3387.
- THIMMAPPA, R., GEISLER, K., LOUVEAU, T., O'MAILLE, P., OSBOURN, A. (2014) Triterpene biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 65: 16.1-16.33.
- THUONG, P.T., PHAM, T.H.M., LE, T.V.T., DAO, T.T., DANG, T.T., NGUYEN, Q.T., OH, W.H. (2012) Symmetric dimers of *ent*-kaurane diterpenoids with cytotoxic activity from *Croton tonkinensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22: 1122-1124.
- TIAN, J.-L., YAO, G.-D., WANG, Y.-X., GAO, P.-Y., WANG, D., LI, L.-Z., LIN, B., HUANG, X.-X., SONG, S.J. (2017) Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27 (5):1237-1242.
- TREVISAN, M.T.S., MACEDO, F.V.V. (2003) Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer, *Quimica Nova*, 26(3): 301-304.
- UCHOA, P.K.S., SILVA JR, J.N., SILVEIRA, E.R., LIMA, M.A.S., BRAZ-FILHO, R., COSTA-LOTUFO, L.V., ARAUJO, A.J., MORAES, M.O., PESSOA, C.O. (2013) Trychlobane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* Spreng. *Quimica Nova*, 36 (6): 778-782.
- VAISBERG, A.J., MILLA, M., PLANAS, M.C., CORDOVA, J.L., AGUSTI, E.R., FERREYA, R., MUSTIGA, M.C., CARLIN, L., HAMMOND, G.B. (1989) Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Medica*, 55: 140-143.

- VENTURINI, C.L., MACHO, A., ARURACHALAM, K., ALMEIDA, D.A.T., ROSA, S.I.G., PAVAN, E., BALOGUN, S.O., DAMAZO, A.S.D., MARTINS, D.T.O. (2018). Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97: 143-151.
- VICKERY, M.L., VICKERY, B. (1981) *Secondary Plant Metabolism*. Macmillan. 334p.
- VISKUPICOVÁ, J., ONDREJOVIC, M., STURDIK, E. (2008). Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47: 151-162.
- VISKUPICOVA, J., ONDREJOVIC, M., STURDIK, E. (2009). The potential and practical applications of acylated flavonoids. *Pharmazie*. 64(6): 355-360
- WANG, A., ZHANG, F., HUANG, L., YIN, X., LI, H., WANG, Q., ZENG, Z., XIE, T. (2010). New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(10):847-856
- WANG, W., XU, H., CHEN, H., TAI, K., LIU, F., GAO, Y. (2016) *In vitro* antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta L.*) inflorescences residues. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (6): 2614-2624.
- XU, P.-X., WANG, S.-W., YU, X.-L., SU, Y.-J., WANG, T., ZHOU, W.-W., ZHANG, H., WANG, Y.-J, LIU, R.-T. 2014. (Rutin) improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behavioural Brain Research*. 264: 173-180
- ZHANG, S., GUO, C., CHEN, Z., ZHANG, P., LI, J., LI, Y. (2017). Vitexin alleviates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing autophagy via AMPK signaling activation. *Molecular Immunology*, 85: 241-221

**Capítulo II – Flavonoides de *Croton floribundus*
e *Croton urucurana***

Resumo

Croton é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.300 espécies, das quais 300 ocorrem em diversos biomas brasileiros. Pertence à subfamília Crotonoideae. Espécies do gênero são usadas mundialmente na medicina tradicional, assim como o látex vermelho, chamado “sangue-de-dragão”, característico de várias espécies. Classes de substâncias do metabolismo secundário estão presentes em *Croton*, incluindo os flavonoides, que apresentam uma grande variedade estrutural e atividades biológicas reconhecidas e com potencial interesse medicinal.

Croton floribundus Spreng. e *Croton urucurana* Baill., são espécies utilizadas na medicina tradicional há muitos anos. Apresentam várias atividades biológicas de interesse medicinal, embora do ponto de vista químico tenham sido muito pouco estudadas, especialmente no que se refere aos flavonoides.

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil flavonoídico de folhas de *Croton floribundus* e *Croton urucurana*. O material pulverizado foi extraído por refluxo com metanol 80% por três vezes e concentrado. O extrato seco foi tratado com tolueno e diclorometano e solubilizado em metanol. A fase metanólica resultante foi fracionada e subfracionada por meio de cromatografia em coluna de PVPP e Sephadex LH-20, e cromatografia em papel. Depois de fracionadas, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os compostos identificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) ou por CLAE com co-injeção de amostras autênticas.

O flavonoide acilado tilirosídeo (**5**) foi identificado em ambas as espécies. É um derivado acilado de kaempferol, isolado de um grande número de espécies do gênero e parece ser característico de *Croton*.

Em *C. floribundus* foram identificados três triglicosídeos: alcesefolisídeo (**1**), mauritianina (**2**), e isoramnetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (**3**). Foram identificados também: quercetina-3-O-glucosídeo (**4**), helicrisosídeo-3'-metil éter (**6**), kaempferol (**7**), isoramnetina (**8**), 3-O-metil-kaempferol (**9**) e 3-O-metil-isoramnetina (**10**).

Em *C. urucurana*, foram identificados: orientina (**11**), rutina (**12**), vitexina (**13**), quercetina-7-O-ramnosídeo (**14**), ramnetina-3-O-ramnosídeo (**15**) e quercetina (**16**).

Os flavonoides **1**, **3** e **14** mostraram-se inéditos, tanto para o gênero, quanto para a família. O flavonoide **15** foi inédito para o gênero, tendo sido encontrado na família, porém, na subfamília Euphorbioideae.

C. floribundus e *C. urucurana* estão distantes entre si na filogenia do gênero, o primeiro na seção mais derivada *Lasiogyne* e o segundo na seção mais basal *Cyclostigma*. A

relação distante entre as duas espécies está de acordo com os distintos perfis químicos observados, com apenas o tilirosídeo em comum, um composto que é aparentemente uma sinapormorfia química de *Croton*.

Abstract

Croton is the second largest genus of Euphorbiaceae, with approximately 1,300 species, 300 of them native from Brazilian biomes. It belongs to the subfamily Crotonoideae. Species of the genus are worldly used in traditional medicine, as well is their red latex, called “dragon’s blood”, characteristic of several species. Substances from several classes of secondary metabolites have been reported for *Croton* species, including flavonoids. These substances have a wide structural diversity and exert biological activities with medicinal potentials that have been recognized.

Croton floribundus Spreng. and *C. urucurana* Baill. are species that have been used in traditional medicine for many years. Several biological activities potentially useful medicinally been pointed out regarding both species. However, chemical studies about the two species has been neglected, particularly regarding flavonoids.

The aim of the present work was to establish the flavonoid profile of *C. floribundus* and *C. urucurana*. Leaf powdered material of both species was extracted by reflux with 80% methanol. The dry residue was defatted with toluene and dichloromethane, then dissolved in methanol. The residue was dissolved in methanol and the resultant solution was analyzed by PVPP column chromatography (PVPP-CC). The fractions obtained were further analyzed by PVPP-CC, paper chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. Fractions and isolated compounds were analyzed by HPLC-DAD chromatography. Isolated compounds were identified by ¹H RMN and ¹³C RMN or HPLC co-chromatography with authentic samples.

The acylated flavonol glycoside tiliroside (**5**) was identified in extracts of both species. It was previously detected in flavonoid studies of most *Croton* species and seems to be a chemical marker of *Croton*.

Three triglycosides were identified from *C. floribundus*: alcesefoliside (**1**), mauritianin (**2**) and isorhamnetin-3-O-(2,6-dirhamnosyl)-galactoside (**3**). Other flavonoids identified were: quercetin-3-O-glucoside (**4**), helichryoside-3'-methyl ether (**6**), kaempferol (**7**), isorhamnetin (**8**), 3-O-methyl-kaempferol (**9**) and 3-O-methyl-isorhamnetin (**10**).

From *C. urucurana*, the following flavonoids were identified: orientin (**11**), rutin (**12**), vitexin (**13**), quercetin-7-O-rhamnoside (**14**), rhamnetin-3-O-rhamnoside (**15**) and quercetin (**16**).

Flavonoids **1**, **3** and **14** are reported for the first time for genus *Croton* and family Euphorbiaceae. Flavonoid **15** is new regarding *Croton* and was previously reported for subfamily Euphorbiaceae.

C. floribundus and *C. urucurana* are distantly positioned in the phylogeny of the genus, the former in the more derived section *Lasiogyne* and the latter in the more basal section

Cyclostigma. The distant relatedness between the two species is in agreement with the observed far distinct chemical profiles of the two species, with only tiliroside in common, a compound that is seemingly a chemical synapomorphy of *Croton*.

II.1.Introdução

II.1.1.Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários com grande variedade estrutural, tanto de núcleos como de padrões de substituição. Por meio de uma biossíntese mista, unindo a via do acetato-malonato à via do ácido chiquímico, são formadas as várias classes de flavonoides, dando ênfase às flavonas, flavonóis, antocianinas, chalconas, auronas, flavanonas, isoflavonoides e biflavonas, entre outras (MARKHAM, 1982, DEWICK, 2009). Devido a essa grande variedade de substâncias, apresentam diversas atividades biológicas de potencial interesse medicinal, como por exemplo, antimicóticas, antibacterianas, anti-inflamatórias, anticâncer, antivirais, antioxidantes, cicatrizante de ferimentos, anestésicas locais e anti-hipertensivas (HAVSTEEN, 2002; GHASEMZADEH & GHASEMZADEH, 2011).

As antocianinas, por apresentarem coloração entre o vermelho e o azul, são constituintes celulares associados à pigmentação de uma grande parte das angiospermas, agindo como atrativos de pássaros e insetos, na polinização e dispersão de sementes. Os flavonoides apresentam, entretanto, várias outras importantes funções, podendo ser considerados constituintes universais das angiospermas. Por absorverem na região do UV em comprimentos de onda próximos à desnaturação do DNA, agem como protetores celulares, impedindo que essa degradação ocorra. Por apresentarem várias hidroxilas em seus anéis, protegem o vegetal contra o estresse, pela captura de radicais livres. Além disso, os flavonoides agem em vários outros processos metabólicos das células vegetais, constituindo a elas proteção e sinalização, principalmente nos processos de nodulação de bactérias fixadoras de nitrogênio (HAVSTEEN, 2002; FERREIRA et al., 2008; DEWICK, 2009; FERREYRA et al., 2012).

II.1.2. Euphorbiaceae e *Croton*.

Euphorbiaceae, pertencente à ordem Malpighiales (APG IV, 2016) é uma das mais diversificadas e complexas famílias das Angiospermas, sendo a sexta

maior delas, com cerca de 300 gêneros e 8.000 espécies (MWINE & VAN DAMME, 2011), amplamente distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com representantes herbáceos, arbustivos e arbóreos, tanto aquáticos quanto terrestres (OGASAWARA, 2012).

As Euphorbiaceae *sensu lato* eram divididas filogeneticamente em três subfamílias (Euphorbioideae, Crotonoideae e Acalyphoideae) (LIMA, 2006). Porém, várias outras classificações foram sugeridas, sendo que uma das mais recentes sugere que Euphorbiaceae Jussieu s.s. é composta por 218 gêneros e 5.735 espécies, subdivididas em quatro clados: Chelosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae (citado por MWINE & VAN DAMME, 2011).

Suas espécies apresentam grande importância econômica, alimentícia, medicinal e ornamental. Entre elas podemos citar a seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.), de grande importância econômica devido ao seu látex, usado para a produção de produtos de borracha natural (CARUZO, 2005), e a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) amplamente usada na alimentação, *in natura* ou na forma de farinha (MATOS, 2011, OGASAWARA, 2012), além de apresentar, atualmente, um grande potencial como fonte de etanol.

Croton é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.300 espécies, distribuídas pelas zonas tropicais e subtropicais das Américas, Ásia e África, sendo que no Brasil, 300 espécies ocorrem em nossos vários biomas (MATOS, 2011).

Várias espécies de *Croton* são usadas na medicina tradicional ao redor do mundo. Na América do Sul, podem ser citadas: *C. celtidifolius*, no tratamento de doenças inflamatórias, leucemia, úlcera e reumatismo; *C. cajucara* para melhorar sintomas de diabetes, colesterol, problemas gastrointestinais e hepáticos; *C. zehntneri*, como sedativo, estimulante de apetite, ação anti-anorexígena e alívio de problemas gastrointestinais. Na América do Norte, *C. draco* é usada internamente para tosse, gripe, diarreia e úlceras estomacais, e topicamente na cicatrização de ferimentos. Na África, *C. zambesicus* é usada para febre, diarreia, convulsões e como anti-hipertensiva e antimicrobiana, enquanto *C. penduliflorus* age positivamente no tratamento de doenças inflamatórias. *C. caudatus* var. *tomentosus* é usada na Ásia para a cura da malária, febre, convulsões e artrite reumática (SALATINO et al., 2007; ADEROGBA et al., 2013; BISCARO et al., 2013; SONG et al., 2015).

Estudos filogenéticos moleculares indicam as várias relações entre as espécies de *Croton* e outros gêneros de Euphorbiaceae. VAN EE et al. (2011) combinam marcadores moleculares, tais como o espaçador transcrito interno ribossomal nuclear (ITS), o plastídeo *trnL-F*, e os genes *EMP2765* (nuclear) e *rps3* (mitocondrial), para obter a filogenia de *Croton*, como a mostrada na Figura II.1. O cladograma indica a relação genética entre as espécies do gênero e seu agrupamento infragenérico em subgêneros e seções.

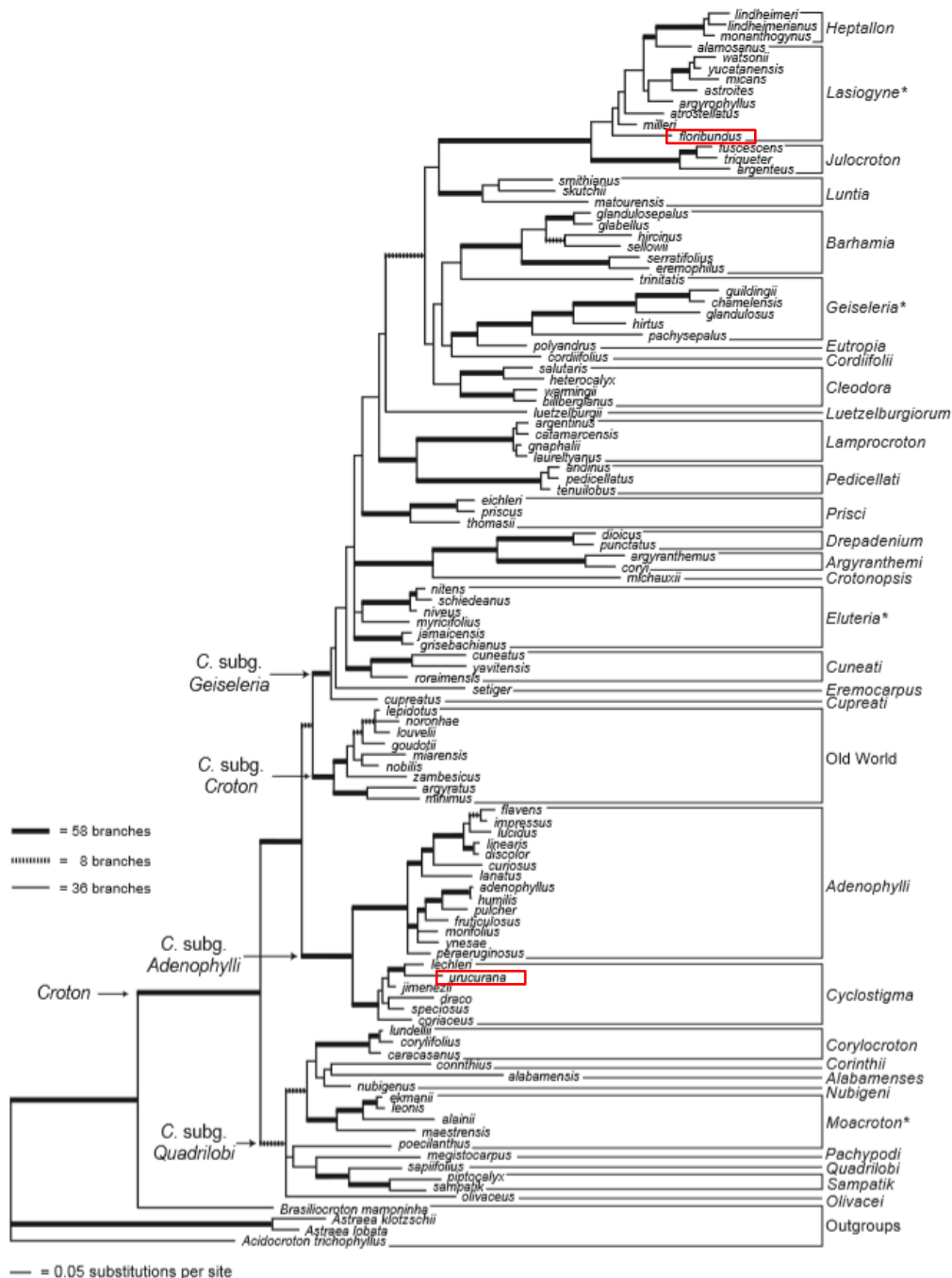


Figura II.1. Filogenia de *Croton*, com a divisão infragenérica em seções, baseada em sequências de DNA (ITS, *TrnL-F*, *EMP2765* e *rps3*). *Brasilocroton* e *Astraea* figuram como grupos externos (VAN EE et al., 2011). As espécies marcadas em **vermelho** correspondem àquelas estudadas neste trabalho.

Usado popularmente no tratamento de diarreia, cólera, e na cicatrização de ferimentos, várias espécies do gênero (*C. urucurana*, *C. lechleri*, *C. draconoides*, *C. draco*, *C. xalapensis*, *C. erythrochilus* e *C. palanostigma*) apresentam látex vermelho-sangue, conhecido como “sangue de dragão”. Demonstrou também atividade antimicrobiana, antiviral, antitumoral, citotóxica, anti-hemorragica e imunomoduladora. São considerados princípios ativos do látex as proantocianidinas (ou taninos condensados), substâncias polifenólicas formadas pela combinação de monômeros de catequinas (SALATINO et al., 2007; GUPTA et al., 2008).

Croton apresenta várias classes de substâncias, sendo as principais: diterpenos (clerodanos, labdanos, kauranos e traquilobanos), óleos voláteis, esteroides e triterpenoides, alcaloides, proantocianidinas e flavonoides (SALATINO et al., 2007).

Já foi comentado anteriormente que os flavonoides de *Croton* podem se apresentar como agliconas, O-glicosídeos e C-glicosídeos (KANEKAE, 2007; SALATINO et al., 2007; SAVIETTO, 2011), além de flavonoides acilados. Um deles, denominado tilirosídeo, derivado de kaempferol, tendo o ácido *p*-cumárico ligado à glicose na posição 3 da molécula, é uma substância comum em várias espécies do gênero (MATOS, 2011).

Foi feito um levantamento, na literatura, dos flavonoides de *Croton*, que está sendo apresentado no Quadro 1, abaixo. Foram catalogados os flavonoides identificados de 63 espécies.

Quadro 1. Flavonoides de *Croton* relatados na literatura. (Levantamento feito entre 2015 e 2018).

Espécie	Compostos	Referências
<i>Croton andinus</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton antisiphiliticus</i>	Tilirosídeo; quercitrina; rutina; isoquercitrina; vitexina; orientina; iso-orientina.	MATOS, 2011, REIS et al., 2014
<i>Croton argentinus</i>	Tilirosídeo; quercitrina; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton betulaster</i>	Vitexina, casticina; penduletina; dimetoxiflavona; orientina; iso-orientina; 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.	MATOS, 2011, COELHO et al., 2016, BARBOSA et al., 2003

Quadro 1. (Continuação).

Espécie	Compostos	Referências
<i>Croton brasiliensis</i>	Casticina; artemetina; penduletina; crisosplenol-D.	PALMEIRA JR et al., 2005
<i>Croton cajucara</i>	Kaempferol-3,4',7-trimetiléter; kaempferol-3,7-dimetiléter.	MACIEL et al., 2000
<i>Croton campestris</i>	Tilirosídeo; quercetina; rutina; quercitrina; isoquercitrina; vitexina; kaempferol; catequina; epicatequina; quercetina 3-O-β-D-apiofuranosil-(1->2)-galactopiranosídeo; hiperina; guaijaverina	OGASAWARA, 2012, JUNIOR et al., 2014, SANTOS et al., 2005
<i>Croton catamarcensis</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton caudatus</i> Geisel var. <i>tomentosus</i> Hook.	Tilirosídeo; kaempferol-3-O-rutinosídeo; rutina; kaempferol; crotoncaudatina; 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona; tangeretina; nobeletina; sinensetina; 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona.	ZOU et al., 2010
<i>Croton celtidifolius</i>	Quercetina; kaempferol; miricetina; catequina; epicatequina; galocatequina; (-)-epigalocatequina; catequina-(4α->8)-catequina; galocatequina-(4 α->8)-catequina.	BISCARO et al., 2013, HORT et al., 2012, NARDI et al., 2013
<i>Croton ciliatoglanduliferus</i>	Retusina; pachipodol.	GONZALES-VAZQUEZ et al., 2006
<i>Croton cordobensis</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton curiosus</i>	Tilirosídeo; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton dichrous</i>	Tilirosídeo, apigenina di-hexosídeo.	SAVIETTO et al., 2013
<i>Croton draco</i>	Quercitrina; miricetrina; (+)-catequina; (-)-epicatequina; (+)-galocatequina; (-)-epigalocatequina.	TSACHEVA et al., 2004
<i>Croton echinocarpus</i>	Tilirosídeo; vitexina.	ATHAYDE, 2013
<i>Croton echioides</i>	3-O-metilkaempferol; 3-O-metilquercetina; 3,7-di-O-metilquercetina; 3,3'-di-O-metilquercetina.	NOVELLO et al., 2016
<i>Croton erithroxylodes</i>	Tilirosídeo; apigenina di-hexosídeo.	SAVIETTO et al., 2013
<i>Croton glabellus</i>	Quercetina; quercitrina; ayanina; 3-O-metilkaempferol; 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavonoide	CORREA & BERNAL, 1992, NOVOA et al., 1985, GARCIA et al., 1986, 2006
<i>Croton glandulosus</i>	Tilirosídeo; rutina.	OGASAWARA, 2012
<i>Croton glutinosus</i>	Rutina	MATOS, 2011
<i>Croton gnaphalii</i>	Tilirosídeo.	LENCINA et al., 2001
<i>Croton grandivelum</i>	Tilirosídeo.	MATOS, 2011
<i>Croton gratissimus</i>	Tilirosídeo, isovitexina; kaempferol.	NDHLALA et al., 2013

Quadro 1. (Continuação).

Espécie	Compostos	Referências
<i>Croton gossypifolius</i>	Quercitrina; miricitrina; - kaempferol-3-O-ramnosídeo.	QUINTYNE-WALCOTT et al., 2007
<i>Croton hemiargyreus</i>	Tilirosídeo; vitexina.	MATOS, 2011
<i>Croton hovarum</i>	Vitexina.	KREBS & RAMIARANTSOA, 1997
<i>Croton insularis</i>	Isokaempferida.	GRAIKOU et al., 2005
<i>Croton klozchianus</i>	Quercetina.	GOVINDARAJAN et al., 2007
<i>Croton lachnostachyus</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton laevigatus</i>	Quercetina; kaempferol; kaempferol-3-O-rutinosídeo; - isoramnetina; kaempferol-3-O- α -L-arabinosídeo; isoramnetina-3-O-(6''-O-E-cafeoil)- β -D-galactopiranosídeo; isoramnetina-3-O-rutinosídeo; kaempferol-3-O- β -D-galactosídeo; kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1->2)- β -D-galactopiranosídeo; mauritianina; kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosil-(1->3)-[α -L-ramnopiranosil-(1->2)]-[α -L-ramnopiranosil-(1->6)]- β -D-galactopiranosídeo.	ZOU et al., 2012
<i>Croton lanatus</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; rutina.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton lechleri</i>	Rutina; vitexina; (+)-catequina; (-)-epicatequina; (+)-galocatequina; (-)-epigalocatequina; procianidina B-1; procianidina B-4; catequina-(4 α ->8)-epigalocatequina; galocatequina-(4 α ->8)-epigalocatequina; galocatequina-(4 α ->8)-epicatequina; galocatequina-(4 α ->6)-epigalocatequina; -epicatequina 4-benziltioéter; -catequina 4-benziltioéter; epigalocatequina 4-benziltioéter; catequina-(4 α ->8)-galocatequina-(4 α ->8)-galocatequina; galocatequina-(4 α ->8)-galocatequina-(4 α ->8)-epigalocatequina.	ALONSO-CASTRO et al., 2012, CAI et al., 1991, PHILLIPSON, 1995
<i>Croton limae</i>	Kaempferol-3-O-glucosídeo; ombuína-3-O-rutinosídeo.	SOUZA et al., 2015
<i>Croton lobatus</i>	Tilirosídeo; isovitexina; vitexina	LAGNIKA et al., 2009
<i>Croton lundianus</i>	Tilirosídeo	OGASAWARA, 2012
<i>Croton menthodoros</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-(2-O- β -apiofuranolsil) rutinosídeo; kaempferol-3-O-rutinosídeo; rutina.	CAPASSO et al., 1998, CAPASSO et al., 2000
<i>Croton menyharthii</i>	Miricitrina; quercetina-3-O-ramnosídeo; quercetina.	ADEROGBA et al., 2013c
<i>Croton cf montevidensis</i>	Tilirosídeo; rutina.	MATOS, 2001

Quadro 1. (Continuação).

Espécie	Compostos	Referências
<i>Croton myrianthus</i>	Tilirosídeo; apigenina di-hexosídeo.	SAVIETTO et al., 2013
<i>Croton muscicarpa</i>	Retusina; ombuina; casticina; 3,7,4'-trimetoxikaempferol; pachipodol; kaempferol; artemetina; 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona.	BARRETO et al., 2013
<i>Croton oblongifolius</i>	Kaempferol 3-O-β-d-(2"-O-β-apiofuranosil) glucopiranosídeo 7-O-α-L-ramnopiranosídeo; kaempferol 3-O-β-D-(2"-O-β-D-apiofuranoil, 6"-O-α-L-ramnopiranosil) glucopiranosídeo 7-O-α-L-ramnopiranosídeo; kaempferitrina; quercetina; isoramnetina; quercetina-3-O-galactosídeo.	TAKESHIGE et al., 2012, SUBRAMANIAN et al., 1971
<i>Croton pallidulus var. pallidulus</i>	Tilirosídeo; quercetina; rutina; quercitrina; vitexina; quercetina-3-O-galactosídeo; kaempferol-3-O-galactosídeo.	SOARES, 2013
<i>Croton panamensis</i>	Quercitrina; miricitrina; (+)-catequina; (-)-epicatequina; (+)-galocatequina; (-)-epigalocatequina.	KOSTOVA et al., 1999
<i>Croton pedicellatus</i>	Tilirosídeo; kaempferol-6"-O-p-coumaroil-β-galactopiranosídeo; helicrisosídeo-3'-metil eter; quercetina-3-O-glucopiranosídeo; kaempferol; alpinumisoflavona	LOPES et al., 2012
<i>Croton penduliflorus</i>	quercetina-3-O-ramnosídeo; kaempferol-3-O-ramnosídeo.	ADEROGBA et al., 2013
<i>Croton pullei var glabrior</i> Lanj.	Quercitrina	BARBOSA et al., 2007
<i>Croton cf pycnocephalus</i>	Tilirosídeo; rutina; vitexina; orientina; iso-orientina.	MATOS, 2001
<i>Croton saltensis</i>	Tilirosídeo; quercetina-3-O-ramnosídeo; rutina; quercetina-3-O-galactosídeo.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton schiedeanus</i>	Ayanina; quercetina-3,7-dimetiléter; 3-O-metilquercetina.	GUERRERO et al., 2002, PUEBLA et al., 2003, CORREA-HERNANDEZ et al., 2008
<i>Croton sellowii</i>	Tilirosídeo; casticina; artemetina; penduletina; crisoplenetina.	PALMEIRA et al., 2006
<i>Croton serratifolius</i>	Tilirosídeo; rutina; quercetina-3-O-galactosídeo.	FURLAN et al., 2015
<i>Croton sparsiflorus</i>	Quercetina-3-O-ramnosídeo; kaempferol.	SUBRAMANIAN et al., 1971, MEHMOOD & MALIK, 2010
<i>Croton sphaerogynus</i>	Quercetina; quercitrina; rutina; kaempferol; quercetina-3-O-metiléter; kaempferol-3-O-metiléter.	SANTOS et al., 2016
<i>Croton splendidus</i>	Tilirosídeo; vitexina.	SAVIETTO et al., 2013

Quadro 1. (Continuação).

Espécie	Compostos	Referências
<i>Croton steenkampianus</i>	Quercetina; tamarixetina; eriodictiol.	ADELEKAN et al., 2008
<i>Croton sylvaticus</i>	Quercetina; kaempferol.	ADEROGBA et al., 2013 b
<i>Croton tonkinensis</i>	Tilirosídeo; isovitexina; vitexina.	GIANG et al., 2004
<i>Croton triqueter</i>	Tilirosídeo; rutina.	OGASAWARA, 2012
<i>Croton urucurana</i>	(+)-Catequina; (-)-epicatequina; (+)-galocatequina; procianidina B-3.	ESMERALDINO et al., 2005, PERES et al., 1997, CORDEIRO et al., 2016
<i>Croton vulnerarius</i>	Tilirosídeo; vitexina.	ATHAYDE, 2013
<i>Croton zambesicus</i>	Tilirosídeo; helicrisosídeo-3'-metiléter; isovitexina; vitexina; saponaretina; orientina; iso-orientina; vicenina-1.	ADEROGBA et al., 2011, NDHLALA et al., 2013, MOHAMED et al., 2000, WAGNER et al., 1970

Os principais flavonoides encontrados foram: tilirosídeo (34 espécies), rutina (21 espécies), vitexina (15 espécies) e quercitrina (10 espécies).

Os dados relatados no Quadro 1 são consistentes com a observação de MATOS (2011) que relata a presença de glicosídeos de flavonóis e suas agliconas, como quercetina e kaempferol, e especificamente de flavonas altamente metoxiladas, como nobiletina (com seis metoxilas) em *C. caudatus*; artemetina (com cinco metoxilas) em *C. brasiliensis*, *C. muscicarpa* e *C. sellowii*; e penduletina (com três metoxilas) em *C. betulaster*, *C. brasiliensis* e *C. sellowii* (PALMEIRA JR et al., 2005; PALMEIRA et al., 2006; ZOU et al., 2010; BARRETO et al., 2013; COELHO et al., 2016).

II.1.3. *Croton floribundus* e *C.urucurana*.

Croton floribundus Spreng. (Subgênero *Geiseleria*, Seção *Laisogyne*), conhecida como “capixingui”, é uma espécie arbórea, nativa da bacia do Rio Paraná, usada popularmente como anti-inflamatória.

Poucos estudos existem sobre sua composição química, tendo sido isolados apenas diterpenos da classe dos traquilobanos, como no trabalho de UCHOA et al. (2013). O extrato metanólico do seu caule apresentou alta atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (MEDINA et al., 2009),

enquanto os extratos alcoólicos de folhas e cascas de caule demonstraram atividade citotóxica e anticolinesterásica (BARTH et al., 2011).

Croton urucurana Baill. (Subgênero *Adenophylli*, seção *Cyclostigma*) é uma espécie arbórea encontrada no Sudeste e Nordeste do Brasil, usada popularmente para o tratamento de reumatismo, ferimentos, úlceras, diarreia e câncer (RAO et al., 2007).

Seu látex, chamado “sangue de dragão”, demonstrou atividade antiviral, antidiarreica, bactericida, antifúngica e cicatrizante de ferimentos (PERES et al., 1997; GURGEL et al., 2001; ESMERALDINO et al., 2005; GURGEL et al., 2005; RAO et al., 2007), além de diminuir a nocicepção (percepção da dor) visceral em camundongos (RAO et al., 2007). Também foram detectadas na espécie, proantocianidinas (ESMERALDINO et al., 2005), procianidina B3 e catequinas [(+)-galocatequina, catequina e (-)-epicatequina] nos extratos metanólicos da casca e das folhas (PERES et al., 1997; CORDEIRO et al., 2016). No extrato das folhas foram também identificados tembetarina, magnoflorina, taspina, metil-3-oxo-12-epi-basbascoato, metil-12-epi-barbascoato e ácido hardwickiico (CORDEIRO et al., 2016). PERES et al. (1997) isolaram ácido acetilaleurítico, estigmasterol, β -sitosterol, β -sitosterol-O-glucosídeo, sonderianina e campesterol.

SIMIONATTO et al. (2009) analisaram a composição química de seu óleo volátil, tendo como componentes principais, borneol (14,7%), acetato de bornila (5,2%), 1-isopropil-7-metil-4-metileno-1,3,4,5,6,8-hexaidro-2H-naftalen-4a-ol (14,7%), sesquicineol (10,5%) e epóxido de γ -gurjuneno (5,4%). Foi determinada também a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo.

II.1.4. Justificativa e Objetivos

Pelos relatos acima, nota-se que muito pouco se sabe do perfil flavonoídico dessas duas espécies de *Croton*, havendo a necessidade de um estudo mais aprofundado dessa classe de substâncias fenólicas, dada as atividades biológicas já demonstradas nos estudos citados acima.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de estudar mais profundamente o perfil flavonoídico dessas duas espécies, *C.urucurana* Baill. e *C.floribundus* Spreng, relacionado a flavonóis e flavonas, com intuito de isolar e identificar

essas substâncias por meio de cromatografia em coluna de PVPP e Sephadex LH-20, cromatografia em papel, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C).

II.2. Materiais e Métodos

II.2.1. Material botânico

Folhas de *Croton urucurana* Baill. e *Croton floribundus* Spreng. foram coletadas no Campus USP- SP, nas coordenadas 23°56' sul e 46°74' oeste para a primeira e 23°55' sul e 46°74' oeste para a última.

A identificação foi feita pela Profa. Dra. Lucimar Barbosa da Motta, baseada nas exsicatas das partes aéreas das espécies estudadas, depositadas no Herbário SPF do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob os vouchers Oliani 1 (SPF) – *C. urucurana*, e Oliani 2 (SPF) - *Croton floribundus*.

II. 2.2. Extração

Os extratos metanólicos foram obtidos a partir da extração com metanol 80%, por três vezes sob refluxo, de folhas secas em estufa com ventilação forçada de ar (45°C) (Estufa Fanem® Modelo 330) de *C. floribundus* e de *C. urucurana*, após pulverização em moinho de facas tipo Willye (modelo Star FT 80 Fortinox®). Os extratos foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório Buchi® Modelo R-200, à pressão reduzida, para a total eliminação do solvente (BONFIM-PATRICIO et al., 2001; MOTTA et al., 2009), sendo então liofilizados em liofilizador K202 Liotop®. Suas massas foram determinadas.

A fim de serem eliminadas substâncias pouco polares, os extratos liofilizados foram ressuspensos com tolueno e diclorometano. Esse tratamento foi feito três vezes com cada solvente, utilizando-se volumes de 200 mL cada vez. Após os tratamentos, o resíduo resultante foi seco e extraído com metanol, por três vezes, filtrado em papel de filtro e seco em rotaevaporador.

As fases toluênica e diclorometânica também foram concentradas em evaporador rotatório, à pressão reduzida, para a total eliminação do solvente e

armazenadas. A fase metanólica foi utilizada para a separação e identificação dos flavonoides das espécies estudadas.

II. 2.3. Fracionamento de flavonoides

Para o fracionamento dos extratos das fases metanólicas de *C. floribundus* e *C. urucurana* foram realizadas cromatografias em coluna por via úmida de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma®), usando metanol como eluente (MABRY et al., 1970). O fracionamento foi monitorado por luz UV (BONFIM-PATRÍCIO et al., 2001), e, posteriormente, as frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a fim de se obter seus perfis cromatográficos. Dependendo da sua complexidade, elas foram novamente fracionadas como descrito a seguir.

Algumas frações, tanto de *C. floribundus* quanto de *C. urucurana*, foram solubilizadas em metanol e fracionadas novamente por colunas cromatográficas de Sephadex LH-20 (GE Healthcare®), usando metanol como eluente (BONFIM-PATRÍCIO et al., 2001).

Outras frações foram solubilizadas em metanol, filtradas, e submetidas à cromatografia em papel cromatográfico Whatman® 3MM, usando ácido acético 15% como fase móvel. Após a corrida, as faixas foram visualizadas com lâmpada UV e aquelas de interesse foram recortadas. Os flavonoides foram extraídos do papel com várias lavagens de metanol fervente, reunidas e concentradas em evaporador rotatório, à pressão reduzida (MARKHAM, 1982).

Aquelas frações que depois de secas apresentaram um perfil cromatográfico complexo e com massa suficiente foram solubilizadas em metanol e subfracionadas por meio de coluna cromatográfica de PVPP, de modo semelhante ao já descrito.

II.2.4. Perfis cromatográficos

Alíquotas de 1 mg/ mL dos extratos metanólicos brutos, das fases metanólicas, das frações e subfrações de *C. floribundus* e *C. urucurana* tiveram seus perfis determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Agilent 1200/1260, usando coluna Zorbax SB-C18 (250 x 5,6mm, 5

µm). Como fase móvel, foi utilizada uma solução aquosa de ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), empregando-se o gradiente a seguir: 12% de B em A nos primeiros cinco minutos; elevação para 20% entre 5-8 min, mantendo isocrático por 20 minutos; 50% de B em A entre 28-38 min; 65% de B em A entre 38-48min, e 100% de B entre 48-50 min, mantendo isocrático por 5 min; redução para 12% de B em A entre 55-60 min. O fluxo foi de 0,4 mL/min, temperatura da coluna constante em 40°C, e a detecção realizada em 352 nm (MOTTA et al., 2009).

II.2.5. Determinação estrutural dos flavonoides

As frações e subfrações de *C.floribundus* e de *C.urucurana* foram analisados por CLAE-DAD, utilizando os equipamentos e condições descritos em II.2.4. Os flavonoides que apresentaram, no CLAE, tempos de retenção próximos ao de flavonoides presentes na biblioteca do cromatógrafo usado para análise, foram co-injetados com as amostras autênticas disponíveis.

As amostras que apresentaram pureza e quantidade suficientes e não tiveram nenhum padrão para comparação foram analisadas por ensaio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), em espectrômetro Bruker AIII 300 MHz e Bruker AIII 500 MHz, operando a 300 e 500MHz. Algumas amostras foram submetidas à análise bidimensional de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC) no espectrômetro Bruker AIII 500 MHz operando a 500 MHz para RMN ¹H e 125 MHz para RMN ¹³C. Os ensaios foram realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os espectros foram obtidos em dimetilsulfóxido deuterado, da Tédia Brazil, como solvente.

Quando houve necessidade de definir se os resíduos de açúcar dos glicosídeos eram glucose ou galactose, além da ramnose, foi aplicada a técnica de hidrólise ácida. Nesta, a uma alíquota de 10 mg da amostra pura a ser analisada foi acrescentada 10 mL de HCl 1 N e mantida por uma hora em banho-maria fervente. As agliconas foram separadas por meio de três extrações da solução aquosa ácida com 5 mL de acetato de etila. A fase aquosa ácida foi seca em banho-maria e, posteriormente, os açúcares nela contida foram solubilizados com poucas gotas de água. Essa solução foi aplicada em placa de celulose Alugram CEL300 (Nacherey-Nagel), juntamente com padrões de

glucose, ramnose e galactose. A fase móvel utilizada foi piridina : acetato de etila : ácido acético : água (36:36:7:21). Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram reveladas com a aplicação de uma mistura de fosfato de anilina : acetona (2:3) e aquecimento em estufa a 100°C por 5 minutos (MARKHAM, 1982).

II.3. Resultados e Discussão

II.3.1. Rendimento dos extratos metanólicos.

As massas de folhas secas de *C.floribundus* e *C.urucurana*, das quais foram obtidos os extratos metanólicos brutos e os rendimentos desses extratos estão mostrados na Tabela 1. São mostrados na Tabela 1 as massas e os rendimentos das fases metanólicas.

Tabela II.1. Massas de folhas secas, dos extratos metanólicos brutos, e dos rendimentos (%) dos extratos de *C.floribundus* e *C.urucurana*.

Espécie	Folhas secas (g)	Extrato metanólico (g)	Rendimento (%)	Fase metanólica (g)	Rendimento (%)
<i>C. floribundus</i>	412,06	88,68	21,5	71,7	80,8%
<i>C. urucurana</i>	394,28	78,40	19,9	49,5	76,8%

Os rendimentos mostrados na Tabela 1 para *C. floribundus* e *C. urucurana* (21,5% e 19,9%, respectivamente) foram muito semelhantes aquele obtido por SOARES (2013) para *Croton pallidulus* var. *pallidulus* que foi de 22%.

Devido a presença de grupos hidroxilas e metoxilas em suas moléculas, vários artigos descrevem a extração de flavonoides, dando preferência ao uso de metanol 80%, sob refluxo, por três vezes, como descrito neste trabalho. Em sequência, faz-se a purificação desse extrato com tolueno, solvente pouco polar, a fim de serem eliminados os contaminantes de baixa polaridade (MOTTA et al., 2009; FURLAN et al., 2015), como por exemplo, diterpenos, substâncias muito comuns em *Croton*. UCHOA et al. (2013), utilizaram *n*-hexano para isolar e identificar diterpenos de *Croton floribundus*, enquanto LAGNIKA et al. (2009)

fracionaram os extratos metanólicos de *Croton lobatus*, obtidos por extração com Soxhlet, usando ciclohexano, diclorometano e acetato de etila. No trabalho aqui apresentado, como já citado, os extratos metanólicos secos de *C. floribundus* e *C. urucurana* foram tratados com tolueno e diclorometano, antes de serem solubilizados novamente em metanol, constituindo-se nas fases metanólicas utilizadas para o isolamento e identificação de seus flavonoides majoritários.

II.3.2. Análise por CLAE dos extratos metanólicos

II.3.2.1. *C. floribundus*

O perfil cromatográfico obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato metanólico de *C. floribundus* encontra-se na Fig. II.2.

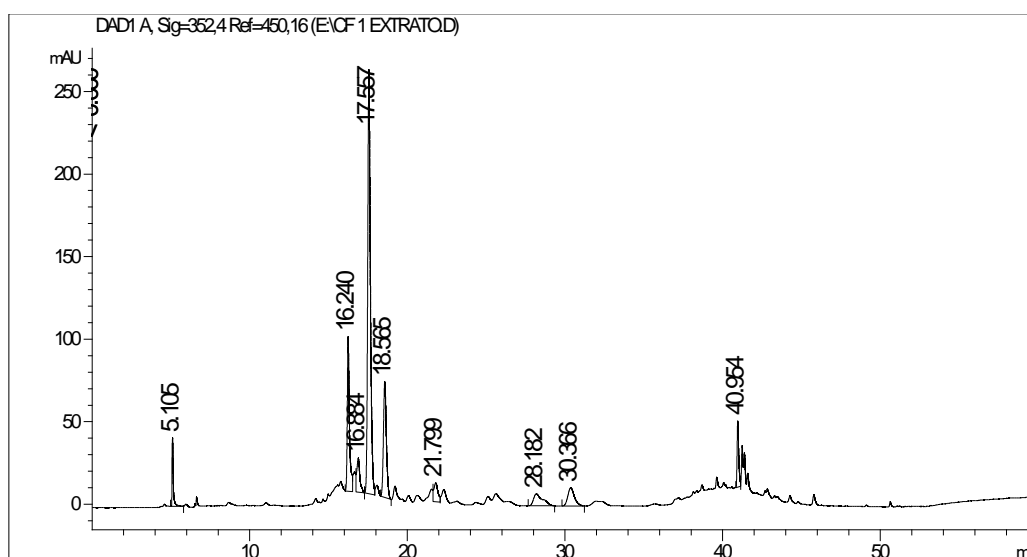


Figura II.2 Cromatograma do extrato metanólico bruto de *Croton floribundus* Spreng, obtido por CLAE..

A Fig. II.3. mostra o perfil cromatográfico obtido por CLAE da fase metanólica (após tratamento com tolueno e diclorometano) de *C. floribundus* que, posteriormente, foi fracionada a fim de isolar e identificar seus flavonoides majoritários.

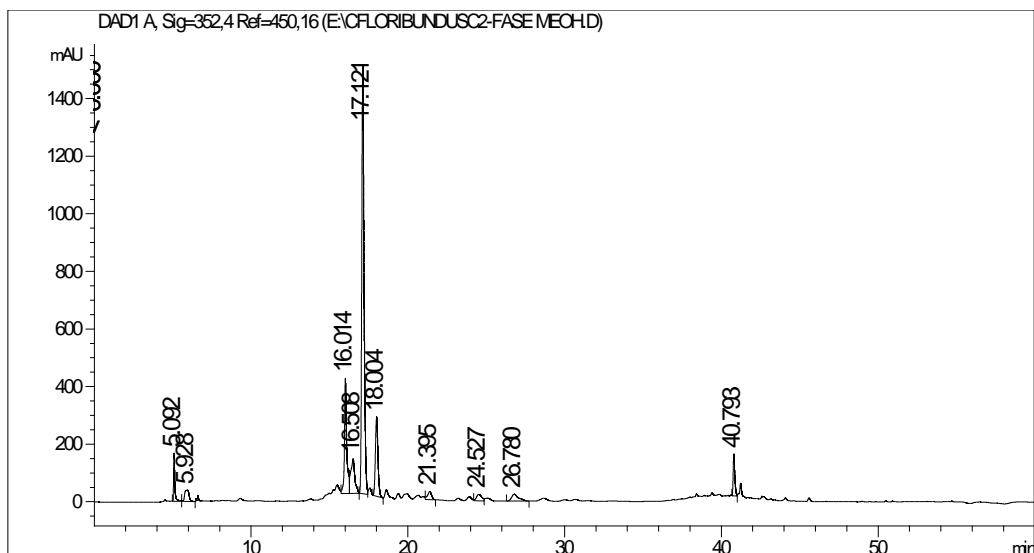


Figura II.3 – Cromatograma da fase metanólica de *Croton floribundus* Spreng, obtido por CLAE.

Comparando-se as Figs II.2 e II.3 percebe-se que a abundância da fase metanólica é maior do que a do extrato bruto, embora os perfis cromatográficos sejam os mesmos, indicando que houve uma concentração dos compostos fenólicos depois do tratamento com os solventes apolares.

II.3.2.2. *C.urucurana*

O perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato metanólico bruto de *C.urucurana* é mostrado na Fig. II.4.

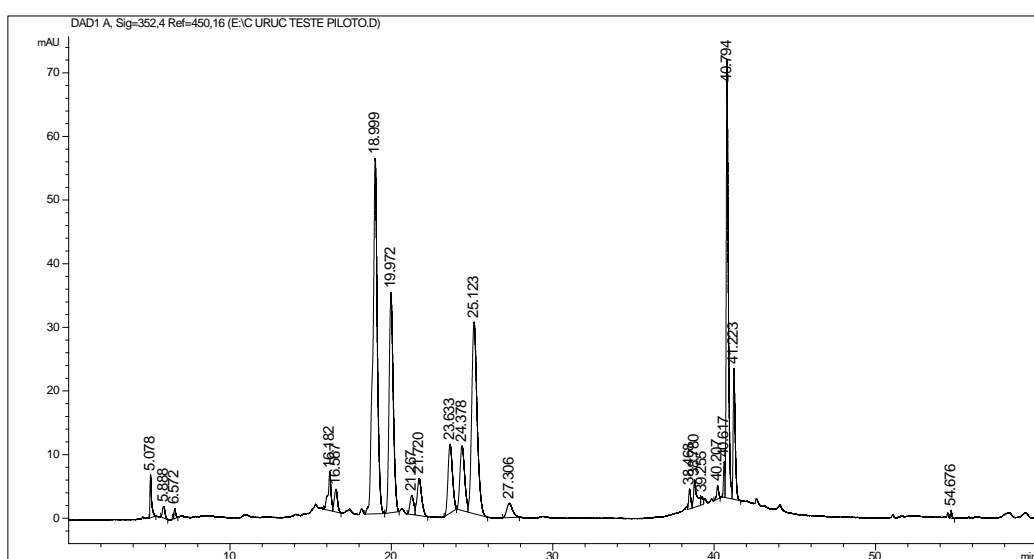


Figura II.4 – Cromatograma obtido por CLAE do extrato metanólico bruto de *Croton urucurana* Baill.

A fase metanólica (após tratamento com tolueno e diclorometano) que foi utilizada para o isolamento e identificação de seus flavonoides majoritários está mostrado na Fig. II.5.

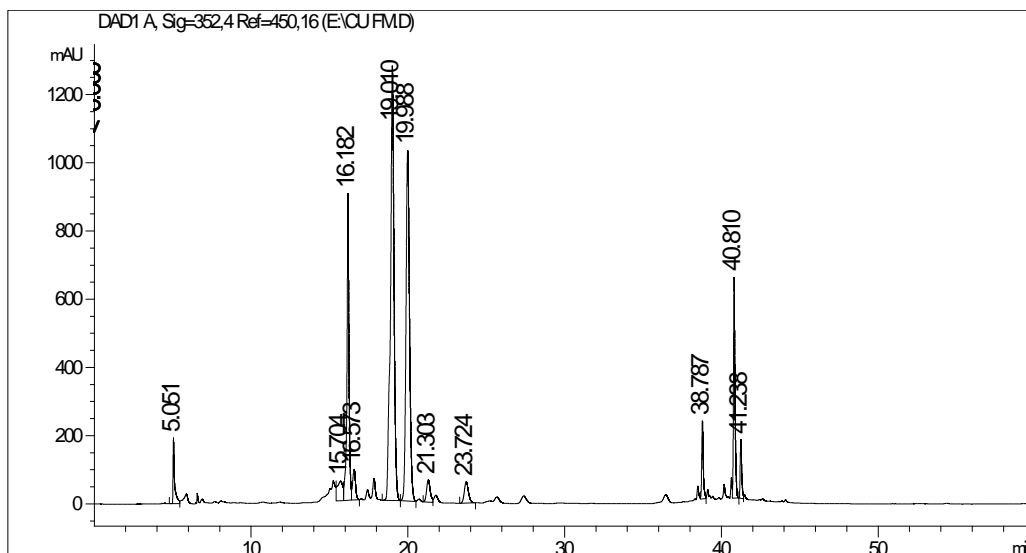


Figura II.5 – Cromatograma obtido por CLAE da fase metanólica do extrato metanólico bruto de *Croton urucurana* Baill.

O mesmo comentário feito para *C. floribundus* é possível ser feito para *C. urucurana*, ao serem comparadas as Flgs II.4 e II.5.

II.3.3. Fracionamento da fase metanólica

Os fluxogramas das Figs II.6 e II.7 mostram as frações e subfrações obtidas pelos procedimentos de isolamento dos flavonoides que constituíram os compostos majoritários da fase metanólica de *C. floribundus* e *C. urucurana*.

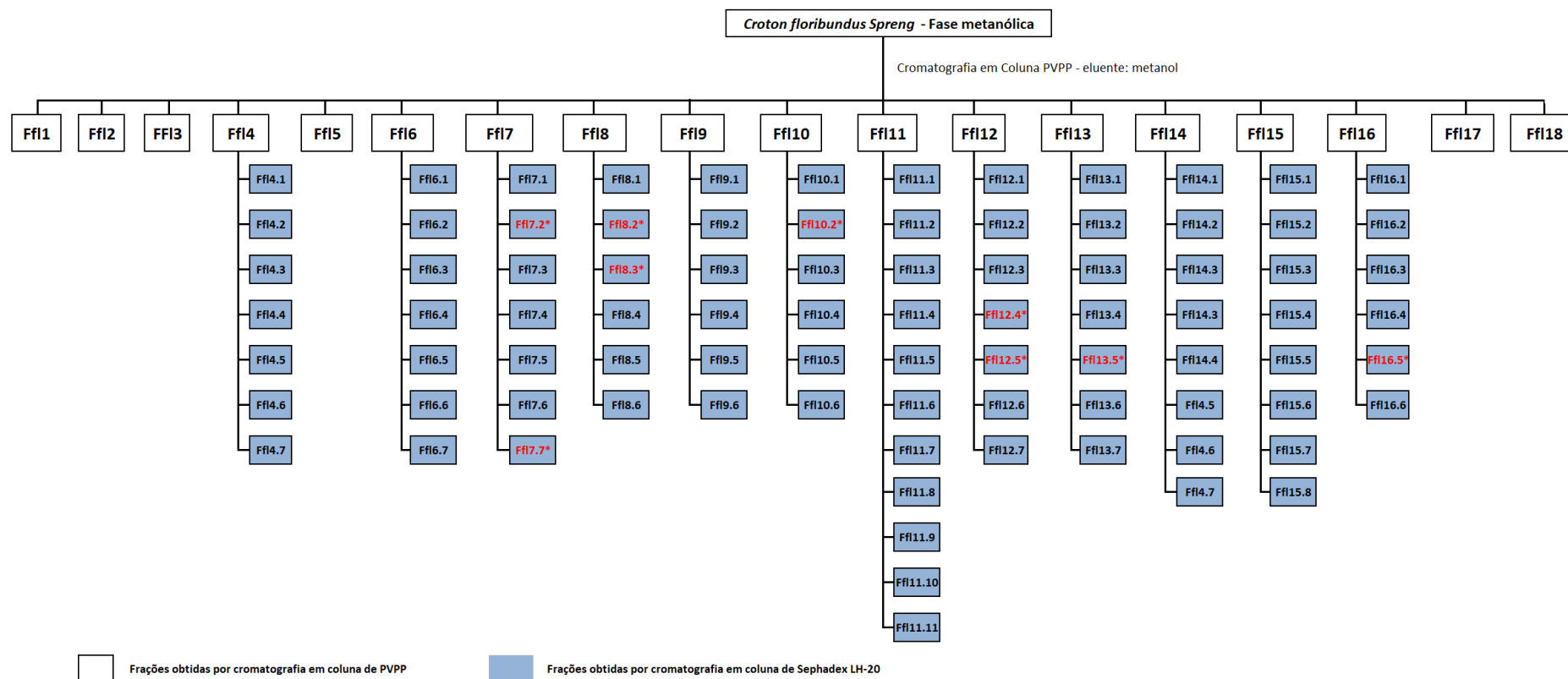


Figura II.6 – Fluxograma do fracionamento da fase metanólica de *C. floribundus* Spreng. As subfrações selecionadas para análise estão escritas em **vermelho**.

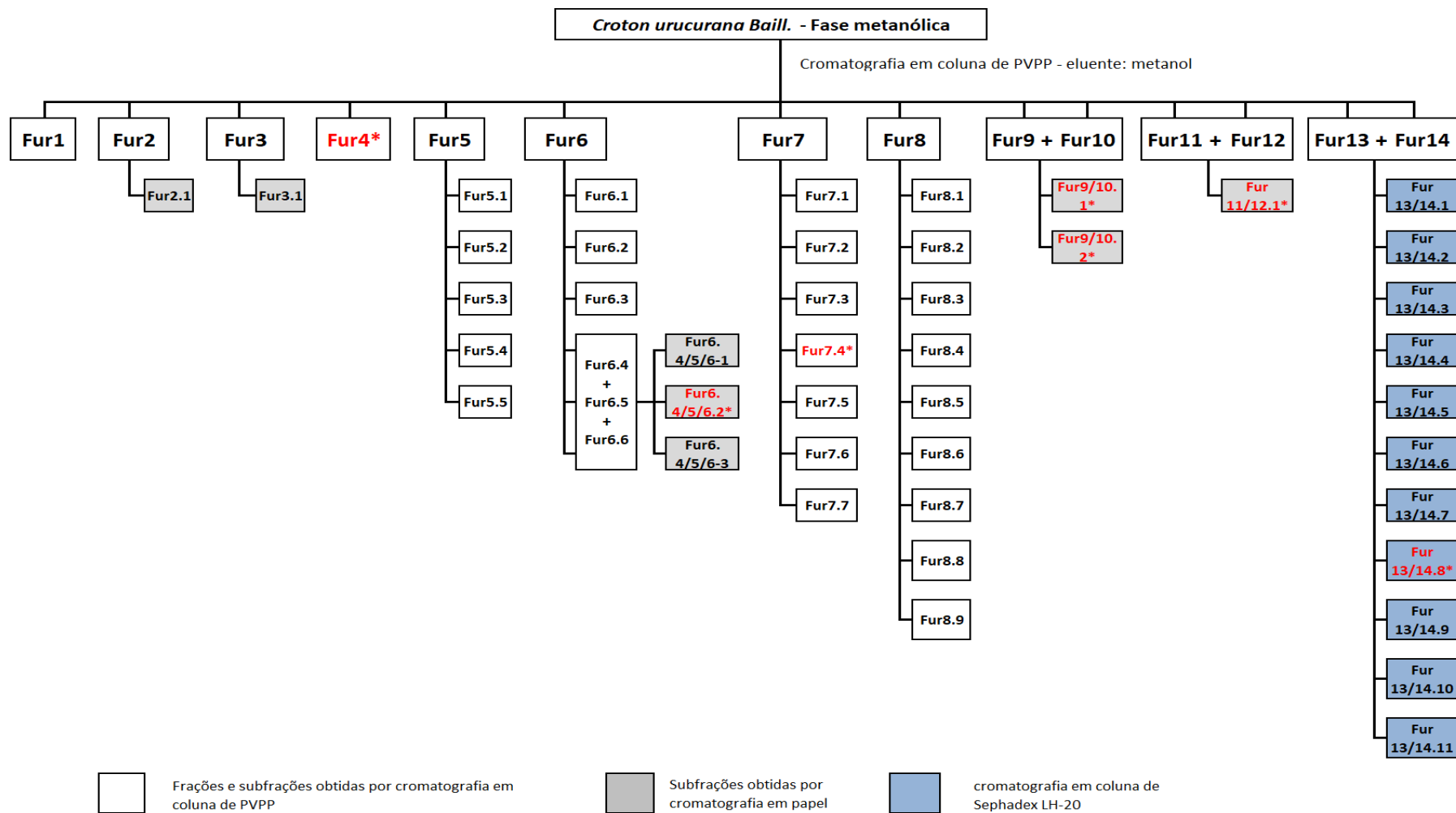


Figura II.7 – Fluxograma de fracionamento da fase metanólica de *Croton urucurana* Baill. As subfrações selecionadas para análise estão escritas em **vermelho**.

Para a obtenção das frações, extraídas da fase metanólica por cromatografia em coluna de PVPP, foram utilizadas massas de 64,5 g de extrato de *C.floribundus* e 44,6 g de *C.urucurana*. As massas das frações obtidas estão relacionadas na Tabela II.2.

Tabela II.2. Massas (g) das frações da fase metanólica obtidas por cromatografia em coluna de PVPP de *C.floribundus* e de *C. urucurana*.

<i>C. floribundus</i> (Ffl)		<i>C. urucurana</i> (Fur)	
Fração	Massa (g)	Fração	Massa (g)
Ffl 1	0,52	Fur 1	-
Ffl 2	0,54	Fur 2	2,29
Ffl 3	0,32	Fur 3	0,46
Ffl 4	0,61	Fur 4	0,69
Ffl 5	0,29	Fur 5	1,12
Ffl 6	0,56	Fur 6	2,14
Ffl 7	0,76	Fur 7	0,78
Ffl 8	0,86	Fur 8	2,42
Ffl 9	0,48	Fur 9	0,24
Ffl 10	0,72	Fur 10	0,69
Ffl 11	0,99	Fur 11	0,91
Ffl 12	0,95	Fur 12	2,98
Ffl 13	0,95	Fur 13	2,24
Ffl 14	0,72	Fur 14	1,69
Ffl 15	0,91		
Ffl 16	2,39		
Ffl 17	0,31		
Ffl 18	2,84		

II.3.4. Identificação Estrutural dos flavonoides

Após a purificação das frações, que se mostraram com potencial para identificação de seus constituintes, por meio de coluna de Sephadex LH-20, cromatografia em papel ou mesmo uma segunda cromatografia em coluna de PVPP em coluna, foram obtidas subfrações, algumas vezes puras ou majoritárias. Passou-se, então, para a identificação desses

flavonoides. As subfrações selecionadas, cujos compostos majoritários apresentaram tempo de retenção semelhante aos de compostos conhecidos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com co-injeção do padrão correspondente. Aquelas cujos compostos majoritários apresentaram massa suficiente foram submetidas à análise de ensaio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e, quando necessário, a análise de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C) e análise bidimensional de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC), quando necessário.

A Tabela II.3 reproduz os flavonoides isolados de *C.floribundus* e *C.ururcurana*, suas correspondentes subfrações, seus tempos de retenção (T_R), os valores de seus espectros de UV/vis e os métodos utilizados para suas identificações.

Tabela II.3. Flavonoides identificados de *C.floribundus* e *C.ururcurana*, com seus tempos de retenção (min), subfrações à qual pertencem, valores de espectro UV/vis (nm) e métodos de análise.

Flavonoide	Tempo de retenção (TR) (min)	Fração e Subfração	UV/vis (nm)	Método de análise
<i>C.floribundus</i>				
1	16,071	Ffl10-2	250, 264, 290 (om), 350 (om), 364	RMN
2	17,271	Ffl8-2	264, 294 (om), 346	RMN
3	18,261	Ffl7-2	254, 264 (om), 354	RMN
4	21,960	Ffl12-4	256, 264 (om), 292 (om), 354	Co-injeção com quercetina-3-O-glucosídeo
5	40,827	Ffl16-5	266, 300 (om), 314, 348 (om)	RMN
6	41,250	Ffl13-6	256, 266, 300 (om), 314, 348 (om)	RMN
7	44,147	Ffl7-7	266, 294 (om), 318 (om), 366	RMN
8	44,653	Ffl12-5	254, 264 om, 290 (om), 370	RMN
9	44,669	Ffl7.7	254, 269 (om), 293 (om), 370	RMN
10	45,644	Ffl8.3	254, 262, 290 (om), 354	RMN

Tabela II.3. (Continuação).

Flavonoide	Tempo de retenção (TR) (min)	Fração e Subfração	UV/Vis (nm)	Método de análise
<i>C.urucurana</i>				
11	17,418	Fur9/10-1	256, 268, 300 om, 348	Co-injeção com orientina
12	18,929	Fur7-4	256, 264 (om), 292 (om), 354	Co-injeção com rutina
13	19,990	Fur6-4/5/6-2	268, 290 (om), 308 (om), 338	Co-injeção com vitexina
14	19,846	Fur7-1	270, 336	Co-injeção com vitexina
14	21,263	Fur9/10-2	256, 264, 290 (om), 354	RMN
15	38,758	Fur4*	256, 264, 298 om, 354	RMN
5**	40,845	Fur11/12-1	266, 306 (om), 314, 348 (om)	Co-injeção com padrão (tilirosideo)
16	41,419	Fur13/14-8	256, 265, 294 (om), 370	RMN

*Precipitado formado durante a concentração da fração Fur4; **encontrado anteriormente em *C.floribundus*.

II.3.4.1. *C.floribundus*

Flavonoide 1 - Subfração Ffl 10-2

A fração Ffl10 (0,72 g) foi subfracionada (ver Fig. II.5) e analisada por CLAE (item II.2.3), obtendo-se a subfração Ffl10-2 cujo flavonoide teve a sua estrutura elucidada. Na Fig. II.8 são encontrados seu cromatograma em CLAE e seu espectro UV/vis.

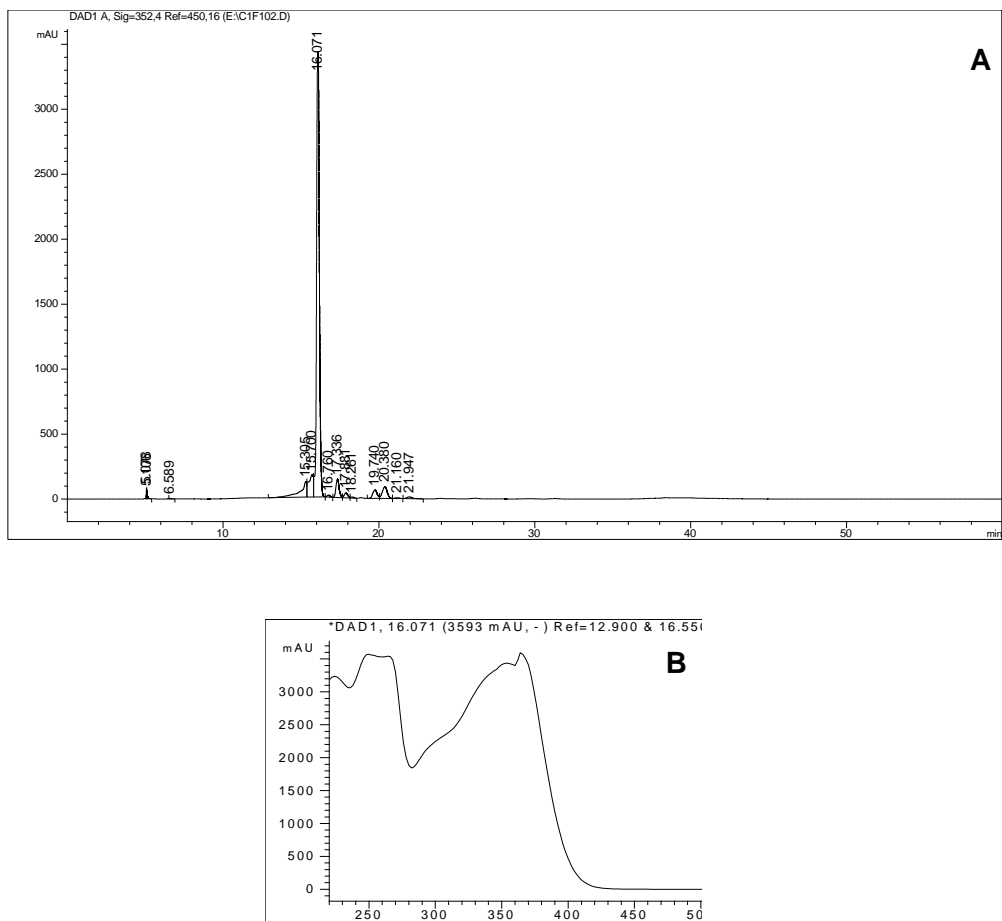


Figura II.8 – Cromatograma **(A)** e espectro UV/vis **(B)** obtidos por CLAE do **flavonoide 1**, correspondente à subfração **Ff110-2** de *C.floribundus*, com $T_R = 16,071$ min.

Por apresentar massa suficiente (23,4 mg), a amostra foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida às análises de RMN 1H , ^{13}C e gHMBC (item II.2.5), obtendo-se os espectros abaixo (Figs. II.9-II.11).

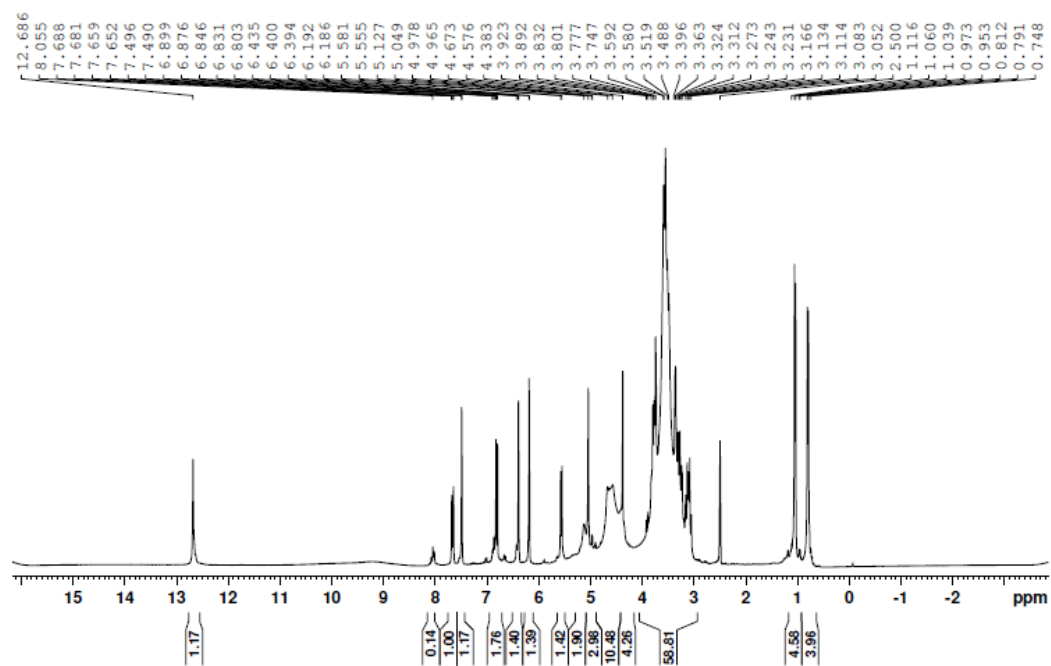


Figura II.9 – Espectro de RMN ^1H da subfração **Ff110-2** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

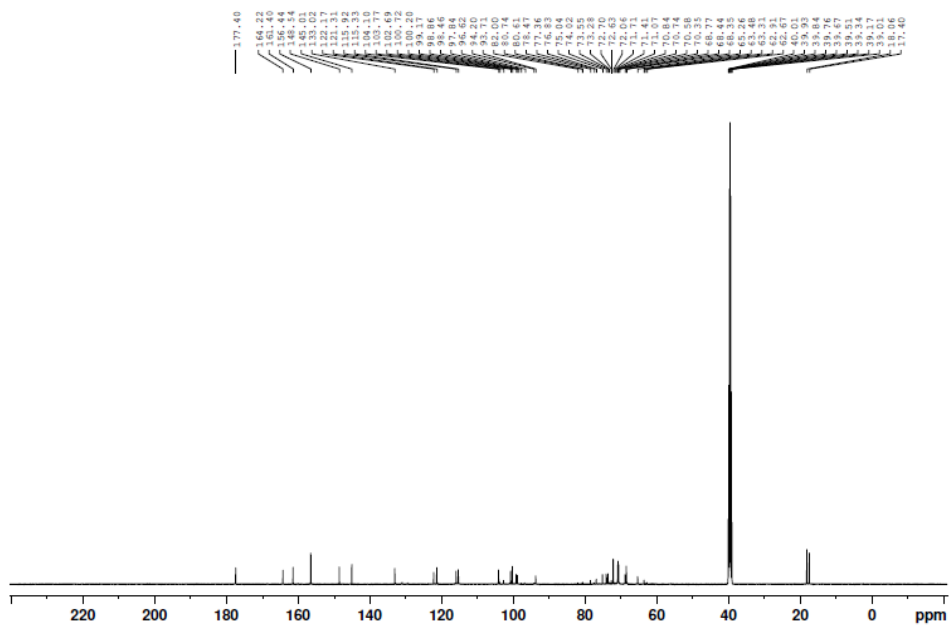


Figura II.10 – Espectro de RMN ^{13}C da subfração **Ff110-2** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

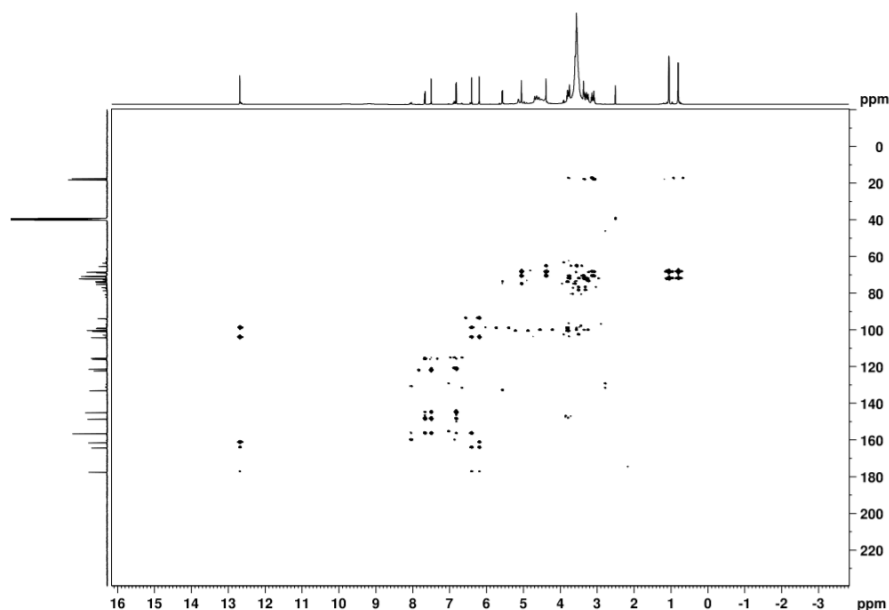


Figura II.11 – Espectro RMN HMBC da subfração **Ff10-2** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ^1H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol quercetina com dois dupletos em δ 7,49 (1H, $J=1,8\text{Hz}$) e δ 6,82 (1H, $J=8,4\text{Hz}$) e um duplo-duplete em δ 7,67 (1H, $J=2,1; 8,4\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B disubstituído nas posições C-3' e C-4' e mais dois singletos em δ 6,19 (1H) e δ 6,40 (1H) referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A disubstituído nas posições C-5 e C-7.

No espectro ainda são visualizados um duplete em δ 5,57 (1H, $J=8,4\text{ Hz}$) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, confirmando a presença de um glicosídeo.

Adicionalmente, foram visualizados mais dois singletos em δ 4,38 e δ 5,05 referentes a mais duas unidades de açúcar na estrutura, as quais foram caracterizadas como ramnose devido à presença de duas metilas correspondentes a dois dupletos em δ 0,80 ($J=6,3\text{ Hz}$) e δ 1,05 ($J=6,3\text{ Hz}$). A dúvida que permaneceu foi a identificação da outra hexose que poderia corresponder à glicose ou galactose.

Após a hidrólise ácida da amostra e a realização de cromatografia em camada delgada para a identificação de açúcares, foi confirmada a presença de galactose e ramnose.

Adicionalmente, um singlete em δ 12,69 permitiu a inferência da presença de uma hidroxila fenólica no carbono C-5.

Foi realizada também, para esse flavonoide, espectrometria de RMN ^{13}C , que apresentou 31 sinais confirmando a presença de três unidades de açúcar na estrutura, através dos três sinais de carbonos anoméricos em δ 99,17, δ 100,2 e δ 100,7, de treze carbonos carbinólicos (δ 76,8, δ 75,0, δ 68,4, δ 74,0, δ 65,3, δ 70,8, δ 70,6, δ 72,1, δ 68,4, δ 70,4 e δ 68,8) e duas metilas em δ 17,4 e δ 18,1, atribuídos a duas unidades de ramnose, conforme Tabela II.4. Os treze sinais restantes confirmam o flavonoide como sendo um derivado de quercetina.

Através do espectro de gHMBC foi possível visualizar várias correlações, entre as quais as três mais relevantes para elucidação da estrutura são: 1) a correlação do hidrogênio anomérico em δ 5,57 (H-1'') com o carbono em δ 133,0 (C-3) confirmando que a galactose encontra-se ligada na posição 3 da quercetina; 2) as correlações dos hidrogênios anoméricos de uma das ramoses em δ 4,38 (H-1''') com o carbono em δ 65,3 (C-6''); 3) as correlações dos hidrogênios anoméricos da outra ramnose em δ 5,05 (H-1''''') com o carbono em δ 76,8 (C-2''). Esses dados permitiram inferir que as unidades de ramnose estão ligadas nos carbonos C-2 e C-6 do resíduo de galactose.

Comparando-se os dados acima com os da literatura para quercetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (YASUKAWA et al., 1989) (Tabela II.4) pode-se sugerir a presença deste flavonoide, conhecido como alcesefolisídeo (Fig. II.12) na subfração Ffl10-2 de *C. floribundus*.

Tabela II.4. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o flavonoide da subfração Ffl10-2 e os valores da literatura correspondentes à quercetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (YASUKAWA et al, 1989), conhecido como alcesefolisídeo.

Posição	Experimental			Literatura	
	^1H	RMN ^{13}C	HMBC	^1H	^{13}C
2	---	156,4	---	---	156,4
3	---	133,0	---	---	133,0
4	---	177,4	---	---	177,4

Tabela II.4. (Continuação).

Posição	Experimental			Literatura	
	¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	¹ H	RMN ¹³ C
5	---	161,4	---	---	161,3
6	6,19d (J=1,8 Hz)	98,86	C4, C5, C7, C8, C10	6,23d (J= 1,9 Hz)	98,8
7	---	164,2	---	---	164,0
8	6,40d (J= 1,8 Hz)	93,7	C4,C6,C7, C9, C10	6,41d (J= 1,9 Hz)	93,6
9	---	156,4	---	---	156,4
10	---	104,2	---	---	104,2
1'	---	121,3	---	---	121,9
2'	7,49d (J= 1,8 Hz)	115,3	C2,C1', C3', C4'	7,55d (J=1,9 Hz)	115,3
3'	---	145,0	---	---	144,8
4'	---	148,5	---	---	148,2
5'	6,82d (J= 8,4 Hz)	115,9	C2, C1', C3', C4'	6,87d (J= 8,7 Hz)	116,1
6'	7,67 dd (J= 2,1 e 8,4 Hz)	122,17	C2, C3', C4', C5'	7,65 dd (J= 1,9 e 8,7 Hz)	121,6
Gal					
1''	5,57 d (J= 7,8 Hz)	99,17	C3,C3''	5,59 d (J= 7,3 Hz)	99,2
2''	3,0-3,9 m	76,8	---	---	75,7
3''	3,0-3,9 m	75,0	---	---	73,9
4''	3,0-3,9 m	68,4	---	---	68,8
5''	3,0-3,9 m	74,0	---	---	73,8
6''	3,0-3,9 m	65,3	---	---	65,8
Rha6					
1'''	4,38 s	100,2	C6''', C2''', C3''', C5'''	4,46 s	100,3
2'''	3,0-3,9 m	70,8	---	---	70,9
3'''	3,0-3,9 m	70,6	---	---	70,5
4'''	3,0-3,9 m	72,1	---	---	72,2
5'''	3,0-3,9 m	68,4	---	---	68,3
6'''	0,80 d (J= 6,31 Hz)	18,1	C4''', C5'''	0,91 d (J=6,3 Hz)	17,7
Rha2					
1''''	5,05 s	100,7	C2''', C3''', C5''''	5,12 s	100,6
2''''	3,0-3,9 m	70,7	---	---	70,9
3''''	3,0-3,9 m	70,6	---	---	70,5
4''''	3,0-3,9 m	72,1	---	---	72,2
5''''	3,0-3,9 m	68,8	---	---	68,9
6''''	1,05 d (J= 6,3 Hz)	17,4	C4''', C5''''	1,10 d (J= 6,3 Hz)	17,2
OH-C5	12,69 s			12,78s	

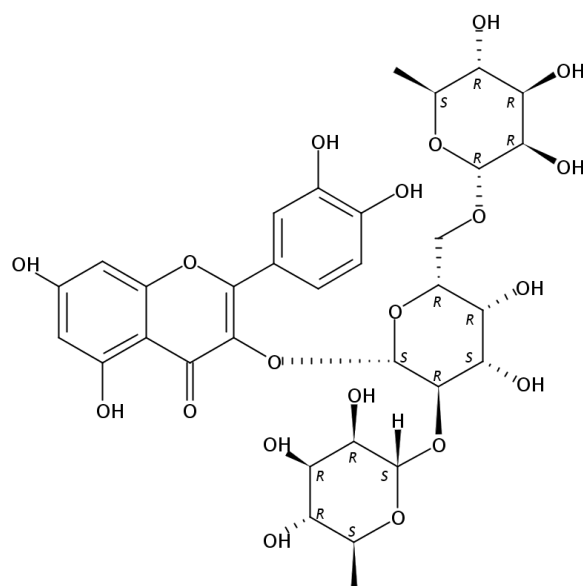


Figura II.12 - Estrutura do **flavonoide 1** - quercetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (alcesefolisídeo) isolado da fase metanólica da subfração **Ffl 10-2** de *C.floribundus*.

Este composto não foi encontrado anteriormente no gênero *Croton* ou em Euphorbiaceae, sendo, portanto, inédito para a família. Em trabalhos, nos quais esse flavonoide foi testado, ele apresentou significativa atividade citoprotetora em hepatócitos de rato submetidos a estresse oxidativo induzido por tert-Butil hidroperóxido (Tert-BuOOH), atividade similar à da silimarina, testada a 60 µg/mL (KRASTEVA et al., 2015) e baixa atividade inibitória de α-glucosidase (KIM, 2016).

Flavonoide 2 - Subfração Ffl 8-2

A fração Ffl8 (0,86 g) foi subfracionada por meio de coluna de Sephadex LH-20 em seis subfrações, sendo que a subfração Ffl 8-2 teve a sua estrutura elucidada. A Fig. II.13 mostra seu cromatograma e o espectro UV/vis obtidos por CLAE.

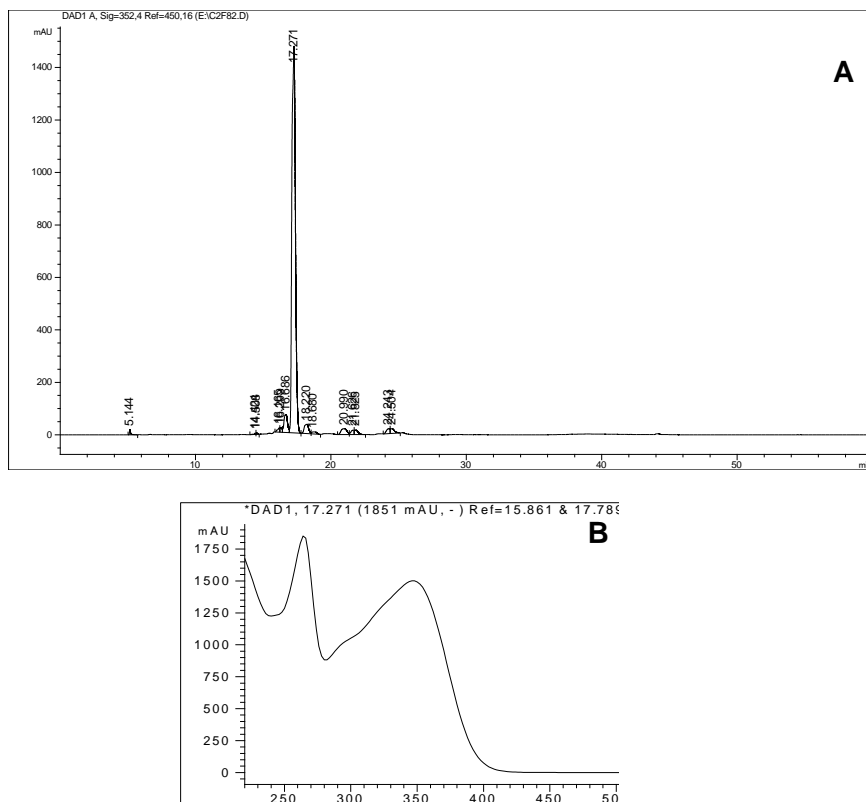


Figura II.13 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 2 correspondente à subfração Ffl 8-2 de *C.floribundus*, com $T_R=17,271$ min.

Devido a sua massa (326,4 mg), a amostra que apresentou um $T_R = 17,271$ min, foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida às análises de RMN 1H , ^{13}C e HMBC (item II.2.5), obtendo-se os espectros abaixo (Figs. II.14-II.16).

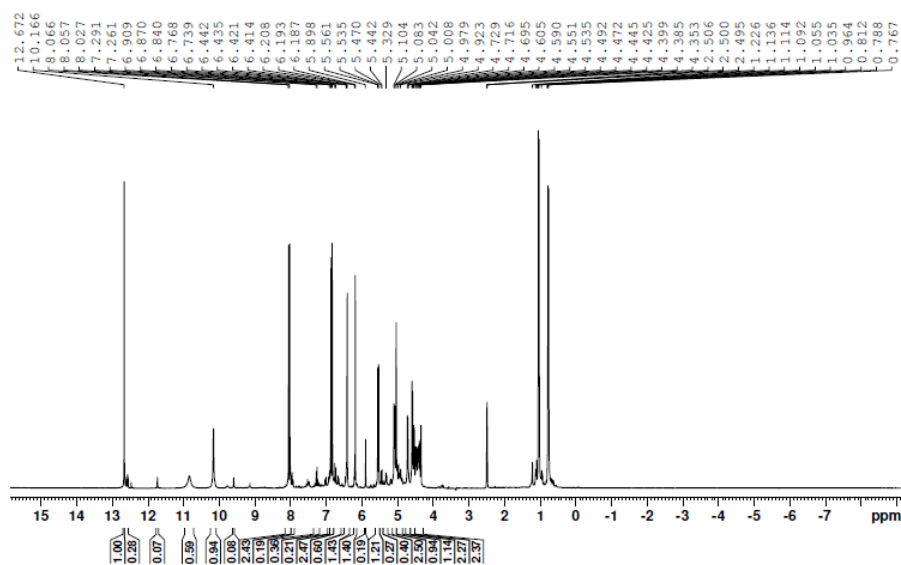


Figura II.14 – Espectro de RMN 1H da fração Ffl 8-2 de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

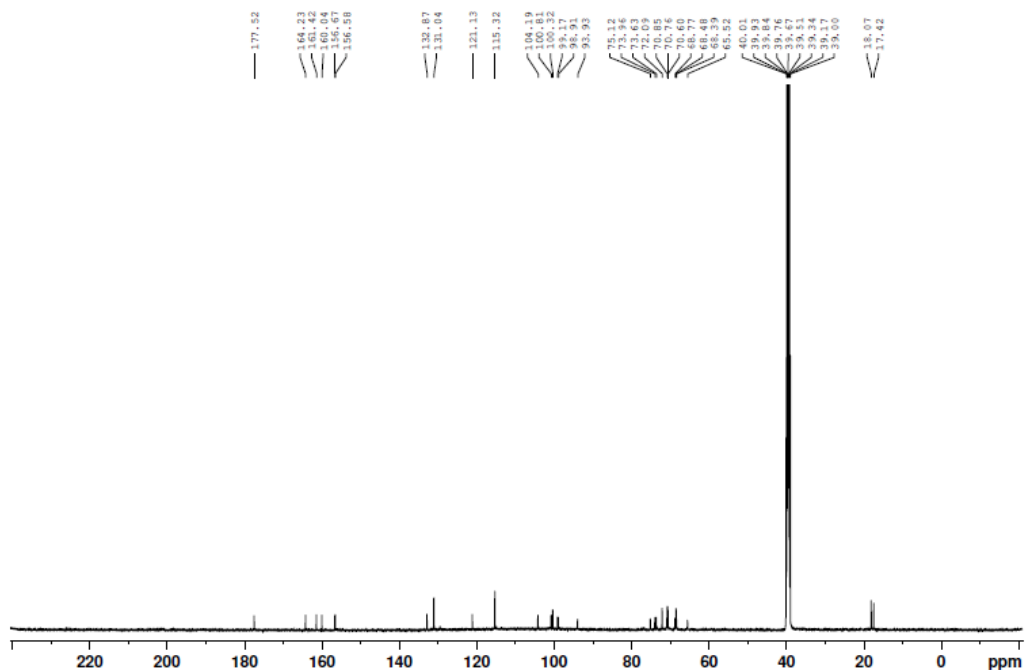


Figura II.15 – Espectro de RMN ^{13}C da fração **Ffl 8-2** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

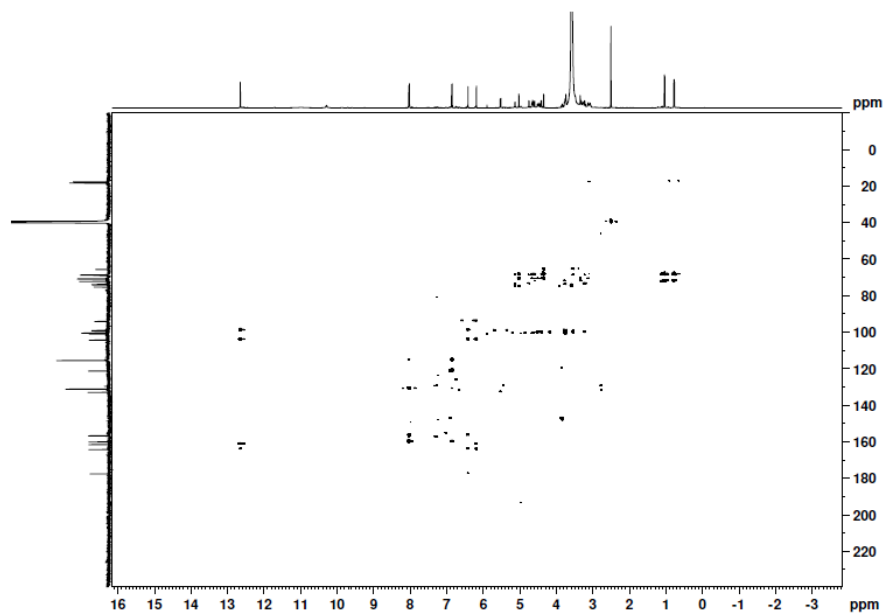


Figura II.16 – Espectro de RMN HMBC da fração **Ffl 8-2** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ^1H nota-se na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol kaempferol com dois dupletos em δ 8,05 (2H, $J= 9,0\text{Hz}$) e δ 6,86 (2H, $J= 9,0\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos aos pares de hidrogênios em orto H'-2 e H'-6, e H'-3 e H'-5 do anel B, e mais dois dupletos em δ 6,20

(1H, $J= 1,8\text{Hz}$) e $\delta 6,43$ (1H, $J= 1,8\text{ Hz}$), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

No espectro ainda são visualizados um dubleto em $\delta 5,56$ (1H, $J=7,5\text{ Hz}$) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, confirmando a presença de um glicosídeo na substância, que poderia ser glicose ou galactose. Adicionalmente, foram visualizados mais dois singletos em $\delta 4,36$ e $\delta 5,05$ referentes a mais duas unidades de açúcar na estrutura, as quais foram caracterizadas como ramnose devido à presença de dois dupletos em $\delta 0,79$ ($J= 6,3\text{ Hz}$) e $\delta 1,05$ ($J= 6,3\text{ Hz}$), correspondentes a duas metilas.

Após a hidrólise ácida da amostra e a realização de cromatografia em camada delgada para a identificação de açúcares, foi confirmada a presença de galactose e ramnose.

Adicionalmente, três singletos em $\delta 12,68$, $\delta 10,85$ e $\delta 10,18$ permitiram inferir a presença de três hidroxilas fenólicas nos carbonos C-5, C-7 e C-4', respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 31 sinais confirmando a presença de três unidades de açúcar na estrutura, através dos três sinais de carbonos anoméricos em $\delta 99,2$, $\delta 100,3$ e $\delta 100,8$, de treze carbonos carbinólicos ($\delta 75,1$, $\delta 74,0$, $\delta 73,6$, $\delta 72,1$, $\delta 70,9$, $\delta 70,8$, $\delta 70,6$, $\delta 68,5$, $\delta 68,4$ e $\delta 65,5$) e duas metilas em $\delta 17,4$ e $\delta 18,0$, atribuídos as duas unidades de ramnose, conforme Tabela II.6. Os treze sinais restantes confirmam o flavonoide como um derivado de kaempferol.

Através do espectro de gHMBC foi possível visualizar várias correlações, entre as quais as três mais relevantes para elucidação da estrutura são: 1) a correlação do hidrogênio anomérico em $\delta 5,56$ (H-1'') com o carbono em $\delta 132,9$ (C-3) confirmando que a galactose encontra-se ligada na posição 3 do kaempferol; 2) foram observadas as correlações dos hidrogênios anoméricos de uma das ramoses em $\delta 4,36$ (H-1''') com o carbono em $\delta 65,5$ (C-6''); 3) foram observadas as correlações dos hidrogênios anoméricos da outra ramnose em $\delta 5,05$ (H-1''''') com o

carbono em δ 75,1 (C-2''). Esses dados permitiram inferir que as unidades de ramnose estão ligadas nos carbonos C-2 e C-6 do resíduo de galactose.

Comparando-se os dados citados acima com os da literatura para kaempferol-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo ou mauritanina, como é conhecido (LIN et al., 2011) (Tabela II.5) pode-se sugerir a presença deste flavonoide (Figura II.17), na subfração Ffl8-2.

Tabela II.5. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto majoritário da fração **Ffl8-2** ($T_R=17,271$ min) e os valores da literatura para o kaempferol-3-O-(2,6-di-ramnosil) galactosídeo (LIN et al., 2011), conhecido como mauritanina.

Posição	Experimental			Literatura	
	^1H	RMN ^{13}C	HMBC	^1H	RMN ^{13}C
2	---	156,7	---	---	156,9
3	---	132,9	---	---	132,6
4	---	177,5	---	---	177,2
5	---	161,4	---	---	161,2
6	6,20d (J= 1,8 Hz)	98,9	C5, C7, C8, C10	6,18d (J= 2,0 Hz)	98,6
7	---	164,2	---	---	164,0
8	6,43d (J= 1,8 Hz)	93,9	C6,C7, C9, C10	6,38d (J= 2,0 Hz)	93,5
9	---	156,6	---	---	156,4
10	---	104,2	---	---	104,0
1'	---	121,1	---	---	120,9
2'	8,05d (J= 9 Hz)	131,0	C2,C4', C2'ou 6', C3' ou 6'	7,93d (J=8,5 Hz)	130,7
3'	6,86d (J= 9 Hz)	115,3	C1', C4', C3' ou 5'	6,86d (J= 8,5 Hz)	115,0
4'	---	160,0	---	---	159,8
5'	6,86d (J= 9 Hz)	115,3	C1', C4', C3' ou 5'	6,86d (J= 8,5 Hz)	115,0
6'	8,05d (J= 9 Hz)	131,0	C2,C4', C2'ou 6', C3' ou 6'	7,93d (J=8,5 Hz)	130,7
Gal					
1''	5,56 d (J= 7,5 Hz)	99,2	C3	5,47 d (J= 7,5 Hz)	98,7
2''	---	75,1	---	---	77,2
3''	---	73,6	---	---	75,7
4''	---	70,9	---	---	70,6
5''	---	74,0	---	---	77,2

Tabela II.5. (Continuação)

Posição	Experimental			Literatura	
	¹ H	RMN ¹³ C	HMBC	¹ H	¹³ C
6''	---	65,5	---	---	66,9
Rha6					
1'''	4,36 s	100,8	---	4,30 s	100,8
2'''	---	70,6	---	---	70,3
3'''	---	70,8	---	---	70,5
4'''	---	72,1	---	---	71,8
5'''	---	68,5	---	---	68,3
6'''	0,79 d (J= 6,3 Hz)	17,4	---	0,79 d (J=6,0 Hz)	17,3
Rha2					
1''''	5,05 s	100,3	---	5,04 sl	100,6
2''''	---	70,6	---	---	70,3
3''''	---	70,8	---	---	70,6
4''''	---	72,1	---	---	71,8
5''''	---	68,4	---	---	68,2
6''''	1,05 d (J= 6,3 Hz)	18,0	---	0,94 d (J= 6,0 Hz)	17,7
OH-C5	12,68 s	---	---	12,63 s	---
OH-C7	10,85 s	---	---	10,80 s	---
OH-C4'	10,18 s	---	---	10,10 s	---

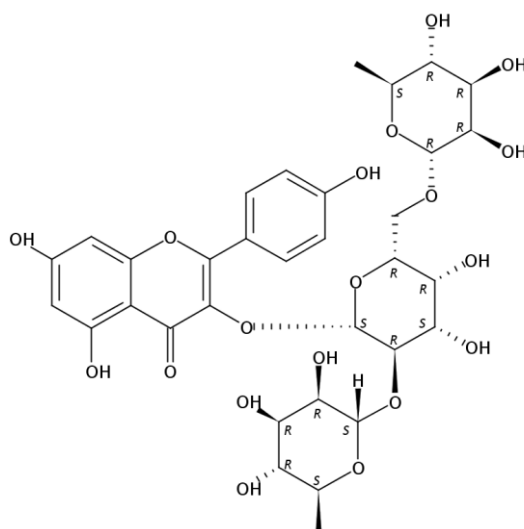


Figura II.17 – Estrutura do **flavonoide 2** - kaempferol-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (mauritianina) isolado da fase metanólica da subfração **Ffl 8-2** de *C. floribundus*.

Esta substância foi anteriormente descrita em *Croton laevigatus* (ZOU et al., 2012). Apresentou a mesma atividade mostrada pelo alcesefolisídeo (flavonoide 1) (KRASTEVA et al., 2015; KIM, 2016). Demonstrou ainda a capacidade de inibir a enzima DNA topoisomerase I (MA et al., 2005), e aumentou a hipersensibilidade tardia do tipo 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol em camundongos, indicando que esse flavonoide pode aumentar a resistência imunológica ao câncer (NISHIBE et al., 1996).

Flavonoide 3 – subfração Ffl 7-2

A fração Ffl 7 (0,76 g) foi subfracionada por meio de coluna de Sephadex LH-20 em sete subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Ffl 7-2 teve sua estrutura elucidada. A Figura II.18 mostra seu cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE.

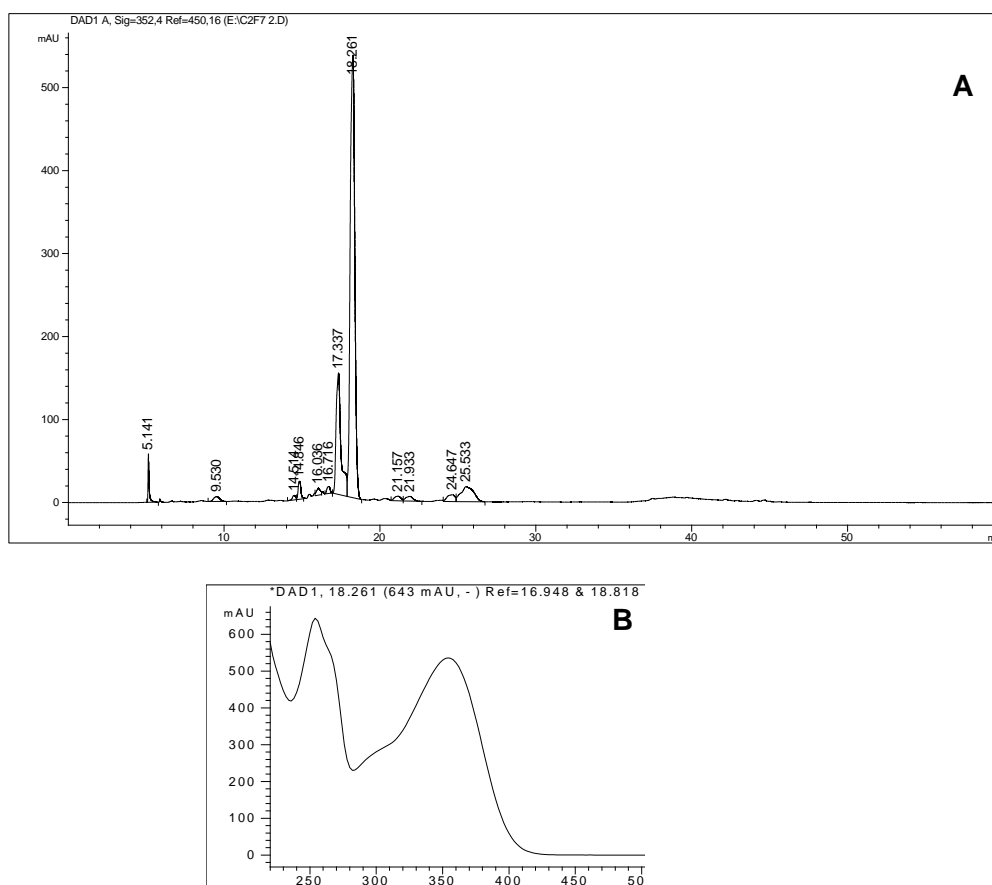


Figura II.18 –Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 3 correspondente à subfração Ffl 7-2 de *C. floribundus*, com $T_R=18,261$ min.

Devido a sua massa (175,7 mg), a amostra, que apresentou um $T_R=18,261$ min, foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida a análise de RMN 1H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.19).

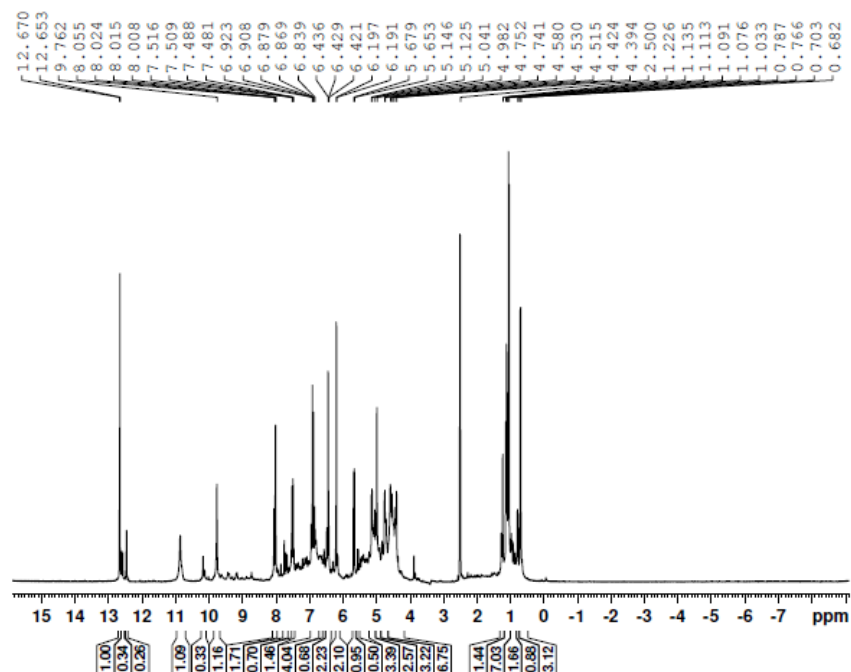


Figura II.19 – Espectro de RMN 1H da fração **Ffl 7-2** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN 1H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol isoramnetina com dois dupletos em δ 8,02 (1H, $J=2,1$ Hz) e δ 6,90 (1H, $J=8,7$ Hz) e um duplo-dupletos em δ 7,51 (1H, $J=2,1$ 8,7Hz) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4', e mais dois dupletos em δ 6,20 (1H, $J=1,8$ Hz) e δ 6,44 (1H, $J=1,8$ Hz), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

No espectro ainda são visualizados um dupletos em δ 5,68 (1H, $J=7,5$ Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, confirmando a presença de um glicosídeo. Adicionalmente, foram visualizados mais dois singletos em δ 4,40 e δ 4,99 referentes a mais duas unidades de açúcar na estrutura, as quais foram

caracterizadas como ramnose devido a presença de dois dupletos em δ 0,70 ($J= 6,0$ Hz) e δ 1,05 ($J= 6,0$ Hz), correspondentes a duas metilas.

Adicionalmente, três singletos em δ 12,66, δ 10,87 e δ 9,77 permitiram inferir a presença de três hidroxilas fenólicas nos carbonos C-5, C-7 e C-4', respectivamente. Neste caso, como nos outros dois já citados houve dúvidas com relação ao outro açúcar ligado à ramnose.

Após a hidrólise ácida da amostra e a realização de cromatografia em camada delgada para a identificação de açúcares, foi confirmada a presença de galactose e ramnose.

Comparando-se esses dados aos da literatura (YAKUSAWA et al., 1989, RASTRELLI et al., 1995) (Tabela II.6) pode-se sugerir a presença da isoramnetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (Figura II.20) na subfração Ffl7-2.

Tabela II.6. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Ffl 7-2** ($T_R=18,261$) e os valores da literatura para a isoramnetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (YAKUSAWA et al, 1989*, RASTRELLI et al, 1995**).

Posição	Experimental	Literatura	
	RMN 1H	1H	RMN 1H
6	6,20 d ($J= 1,8$ Hz)	6,23 d ($J= 1,9$ Hz)	6,20 d ($J= 2,0$ Hz)
8	6,44 d ($J= 1,8$ Hz)	6,41 d ($J= 1,9$ Hz)	6,41 d ($J= 2,0$ Hz)
2'	8,02 d ($J= 2,1$ Hz)	7,55 d ($J= 1,9$ Hz)	8,10 d ($J= 2,0$ Hz)
5'	6,90 d ($J= 8,7$ Hz)	6,87 d ($J= 8,8$ Hz)	6,93 d ($J=8,5$ Hz)
6'	7,51 dd ($J= 2,1$ e 8,7 Hz)	7,65 dd ($J= 1,9$ e 8,8 Hz)	7,55 dd ($J= 2,0$ e 8,5 Hz)
OCH3-	3,89s	3,91 s	4,02 s
Gal			
1''	5,68d ($J= 7,5$ Hz)	5,59 d ($J= 7,3$ Hz)	5,82 s ($J= 7,5$ Hz)
2''-6''	3,5-3,85 m		
Rha6			
1'''	4,40 s	4,46 s	4,58 d ($J=1,5$ Hz)
2'''-5'''	3,5-3,85 m	---	---
6'''	0,70 d ($J= 6,0$ Hz)	0,91 d ($J= 6,3$ Hz)	1,20 d ($J=6,0$ Hz)
Rha2			
1'''	4,99 s	5,12 s	5,18 d ($J=1,5$ Hz)
2'''-5'''	3,5-3,85 m	---	---
6'''	1,05 d ($J= 6,0$ Hz)	1,10 d ($J= 6,3$ Hz)	0,89 d ($J=6,0$ Hz)
OH-C5	12,66 s	---	---

Tabela II.6. (Continuação).

Posição	Experimental	Literatura	
	RMN ¹ H	¹ H	¹ H
OH-C7	10,87 s	---	---
OH-C4'	9,77 s	---	---

*realizada com DMSO; **realizada com CD₃OD

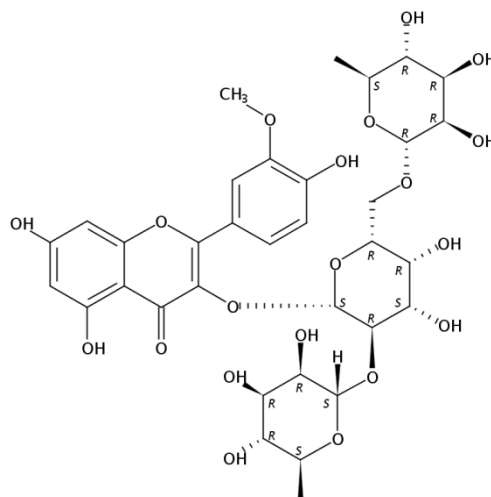


Figura II.20 – Estrutura do **flavonoide 3** - isoramnetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo, isolado da fase metanólica da subfração Ffl 7-2 de *C. floribundus*.

Este flavonol triglicosilado é inédito, tanto em *Croton* quanto em Euphorbiaceae (Malpighiales). Foi identificado em *Lysimachia fortunei* (Primulaceae - Ericales) e *Chenopodium palliducaule* (Amaranthaceae - Caryophyllales) (YAKUSAWA et al., 1989, RASTRELLI et al., 1995). As famílias das espécies acima estão muito separadas de Euphorbiaceae, não havendo nenhuma relação filogenética entre elas (APG III, 2008). Provavelmente, como *C. floribundus* apresentou outros dois flavonoides triglicosilados, com os mesmos açúcares (ramnose e galactose) e possui também a isoramnetina (ver **flavonoide 6, 9 e 10**), deve possuir as enzimas responsáveis por essa combinação inédita para o gênero e a família.

Flavonoide 4 - Subfração Ffl 12-4

A fração Ffl 12 (0,31 g) foi subfracionada por coluna de Sephadex LH-20 em sete subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Ffl 12-4 (11,6 mg) teve sua estrutura

elucidada. A Figura II.21 mostra seu cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE.

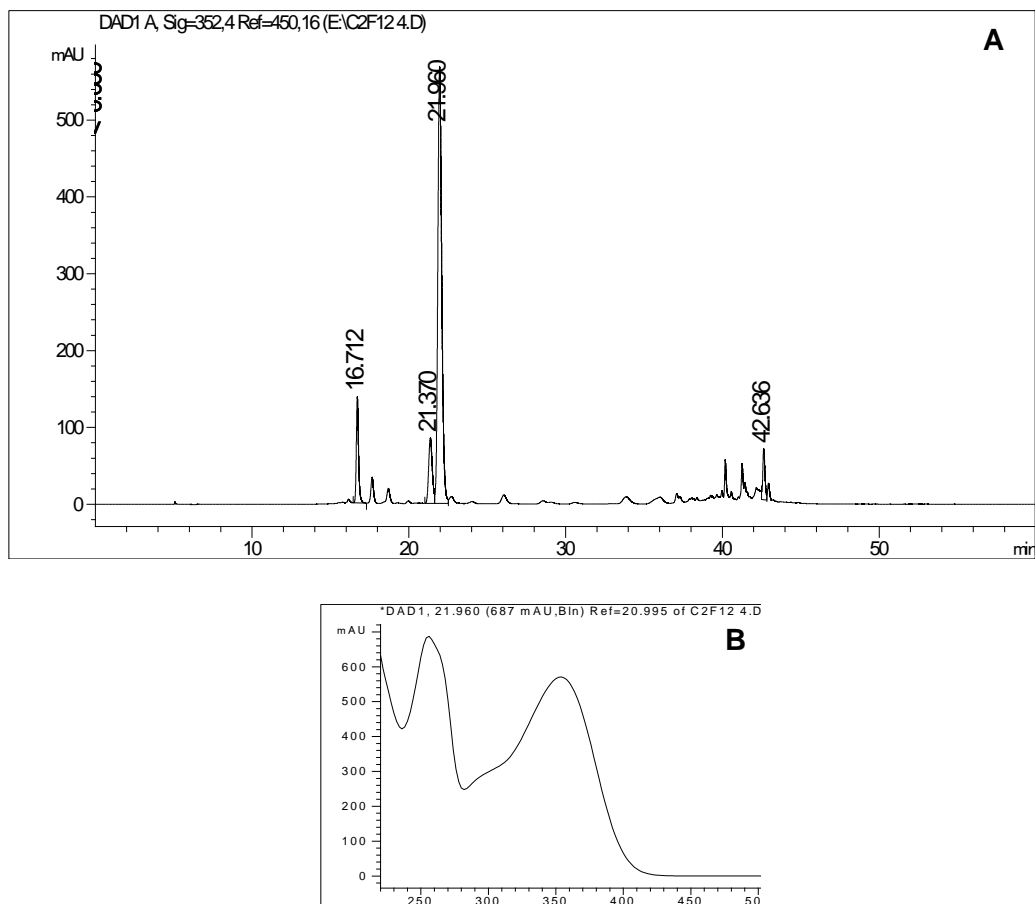


Figura II.21 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 4**, correspondente à subfração **Ffl 12-4** de *C.floribundus* com $T_R=21,960$ min.

O tempo de retenção da amostra, $T_R=21,960$ min. e o espectro de UV/vis são consistentes com o flavonol quercetina-3-O-glucosídeo. Dessa maneira, foi realizada uma co-injeção no CLAE de uma amostra autêntica e da amostra correspondente ao Ffl 12-4. O cromatograma e o espectro UV/vis dessa co-injeção estão mostrados na Fig. II.22.

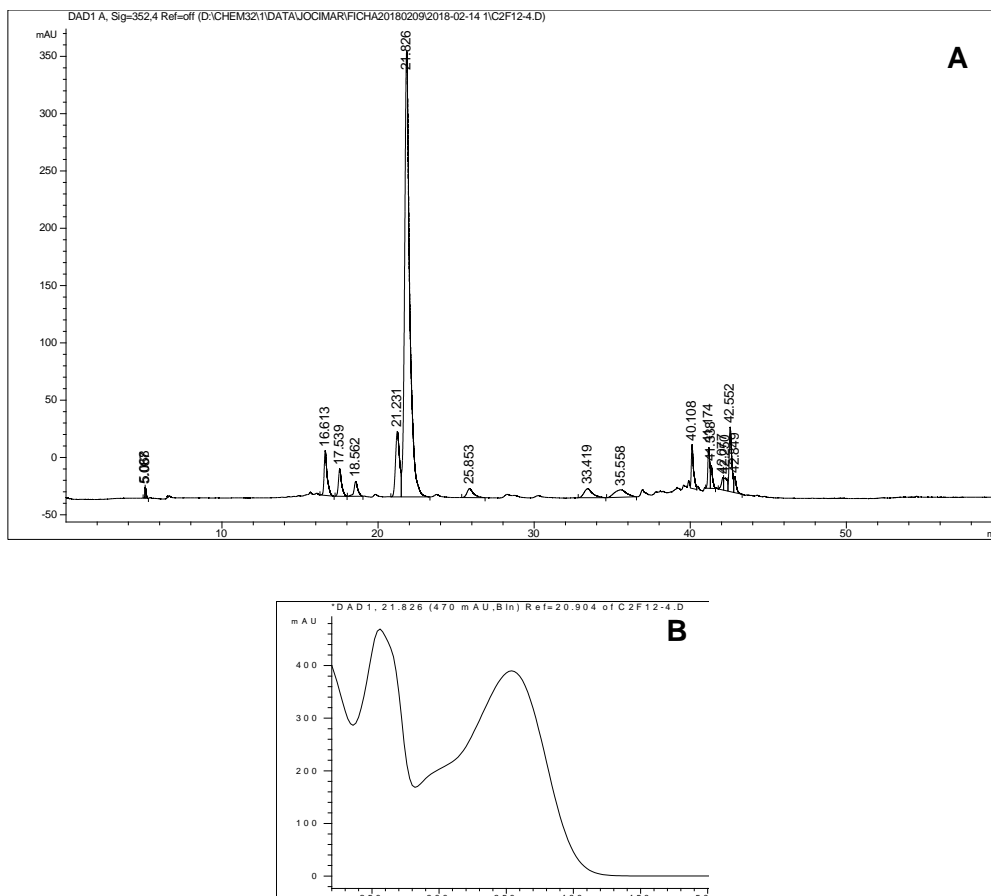


Figura II.22 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) da co-injeção do composto da subfração Ffl 12-4, $T_R=21,826$ min, de *C.floribundus* e da quercetina-3-O-glucosídeo.

Como se pode observar, as Figs. II.21 e II.22 são idênticas com relação à banda principal e bandas adjacentes, denotando a coincidência entre os tempos de retenção do flavonoide da subfração Ffl 12-4 e o da quercetina-3-O-glucosídeo. Isso é consistente, portanto, com a presença desse flavonol (Fig. II.23), conhecido como isoquercetina, em *C. floribundus*.

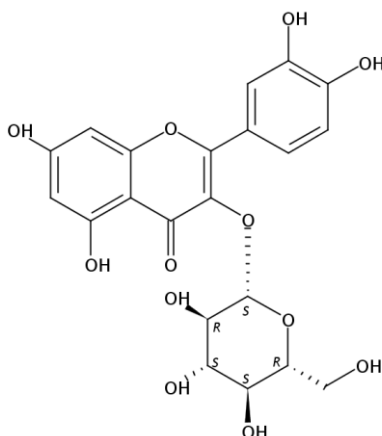


Figura II.23. Estrutura do **flavonoide 4** - quercetina-3-O-glucosídeo (isoquercetina) - isolado da fase metanólica da subfração **Ffl 12-4** de *C.floribundus*.

Esta substância já havia sido encontrada anteriormente em *Croton pedicellatus* Kunth (LOPES et al., 2012), *C. campestris* A. St.Hill (JUNIOR et al., 2014) e *C. antisiphiliticus* Mart. (REIS et al., 2014). Na revisão de VALENTOVA et al. (2014) são mencionados estudos sobre atividade antioxidante, quelante de metais pesados, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, cardioprotetora, antidiabética, antialérgica e neuroativa para a isoquercetina.

Flavonoide 5 - Subfração Ffl 16-5

A fração Ffl 16 (2,39 g) foi subfracionada por meio de coluna de Sephadex LH-20 em seis subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Ffl 16-5 teve sua estrutura elucidada. A Figura II.24 mostra seu cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE.

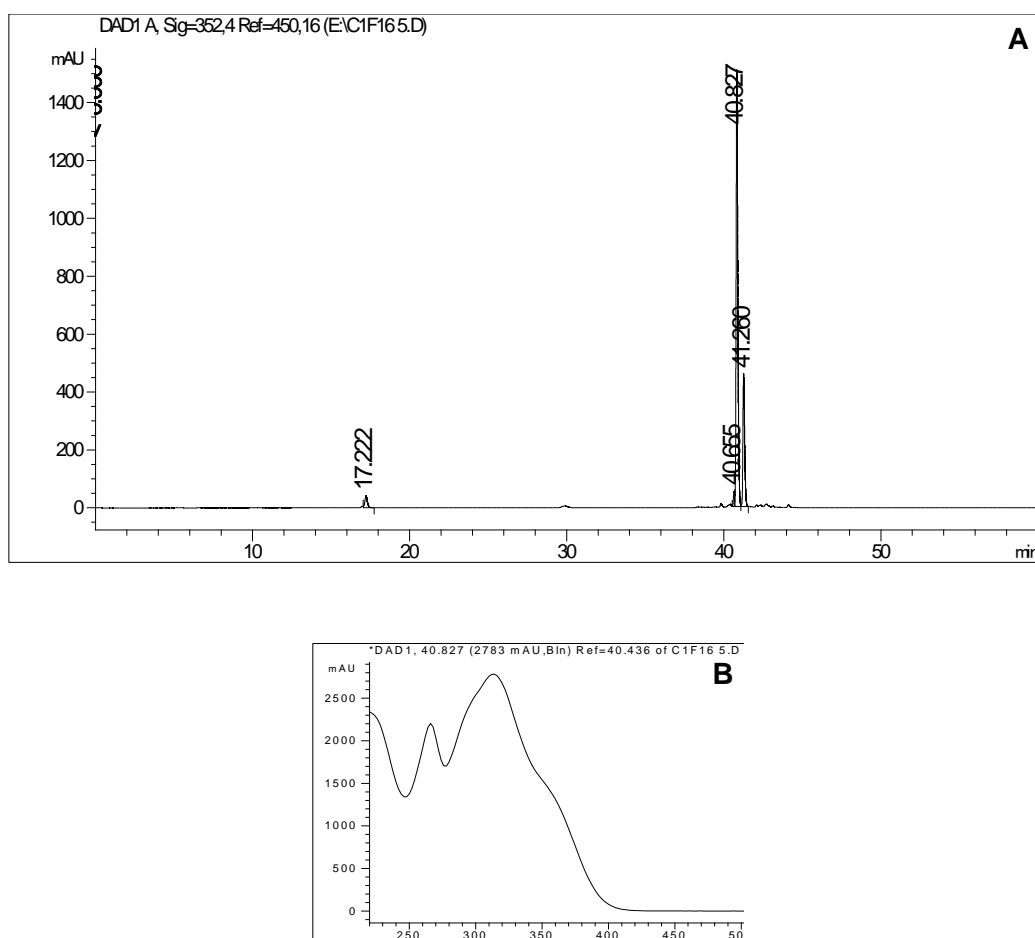


Figura II.24 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) do composto da subfração Ffl 16-5, $T_R=40,827$ min. de *C.floribundus*.

Devido à sua massa, 22,0 mg, a amostra, que apresentou um $T_R=40,827$ min., foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida à análise de RMN 1H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.25).

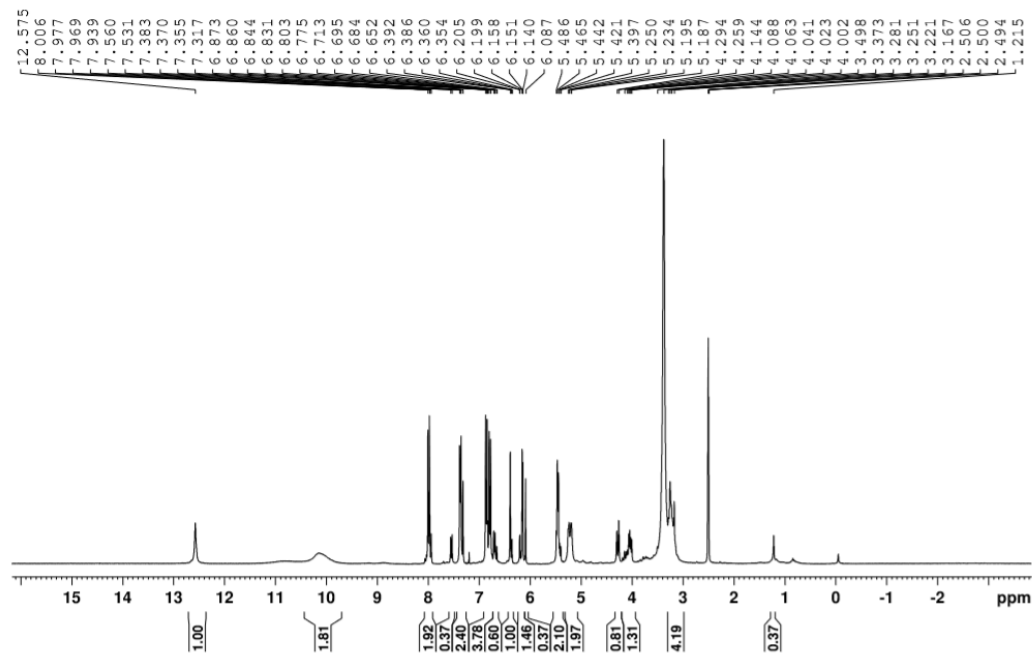


Figura II.25 – Espectro de RMN 1H da subfração **Ffl 16-5** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN 1H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol kaempferol com dois dupletos em δ 8,00 (2H, $J=8,7$ Hz) e δ 6,86 (2H, $J=8,7$ Hz) referentes aos acoplamentos dos pares de hidrogênios em orto H'-2 e H'-6, e H'-3 e H'-5 do anel B, e mais dois dupletos em δ 6,15 (1H, $J=1,8$ Hz) e δ 6,39 (1H, $J=1,8$ Hz), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7. Ainda na região aromática, a presença do grupo *p*-cumaroil foi observada por haver mais dois dupletos em δ 7,34 (1H, $J=15,9$ Hz) e δ 6,11 (1H, $J=15,9$ Hz) referentes a um acoplamento *trans* entre hidrogênios de ligação dupla, os quais foram atribuídos aos hidrogênios em C-7''' e C-8''' que sugeriram a presença de um sistema carboxílico α,β -insaturado com estereoquímica *trans*, aliados a dois dupletos em δ 7,37 (2H, $J=8,4$ Hz) e δ 6,79 (2H, $J=8,4$ Hz).

No espectro ainda são visualizados um duplete em δ 5,45 (1H, $J=6,9$ Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, e os demais sinais na região entre δ 3,28-3,16, assim como o duplete em δ 4,26 (1H, $J=10,5$ Hz) e o duplo-duplete em δ 4,03 (1H, $J= 11,9$ Hz; 6,6 Hz), confirmando a presença de um glucosídeo na substância.

Adicionalmente, um singlete em δ 12,57 sugere a presença de uma hidroxila em C-5.

Comparando-se os dados acima com aqueles da literatura (ADEROGBA et al., 2011) (Tabela II.7) pode-se sugerir que na amostra da subfração Ffl16-5 exista o flavonoide conhecido como tilirosídeo (Figura II.26).

Tabela II.7. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Ffl 16-5**, $T_R=40,827$ min, e os valores de kaempferol 3-O- β -D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo da literatura (ADEROGBA et al, 2011), conhecido como tilirosídeo.

Posição	Experimental RMN ¹ H	Literatura RMN ¹ H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,15 d (J= 1,8 Hz)	6,02 d (J=2,1 Hz)
7	---	---
8	6,39 d (J= 1,8 Hz)	6,19 d (J=2,1 Hz)
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	8,00 d (J=8,7 Hz)	7,89 d (J=9,0 Hz)
3'	6,86 d (J=8,7 Hz)	6,69 t (J=9,0 Hz)
4'	---	---
5'	6,86 d (J=8,7 Hz)	6,69 t (J=9,0 Hz)
6'	8,00 d (J= 8,7 Hz)	7,89 d (J=9,0 Hz)
1''	5,45 d (J=6,9 Hz)	5,16 d (J=7,5 Hz)
2''	3,28-3,16 m	3,40-4,30 m
3''	3,28-3,16 m	3,40-4,30 m
4''	3,28-3,16 m	3,40-4,30 m
5''	3,28-3,16 m	3,40-4,30 m
6''	4,26 d (J=10,5 Hz) 4,03 dd (J=11,9 Hz e 6,6 Hz)	3,40-4,30 m
1'''	---	---
2'''	7,37 d (J=8,4 Hz)	7,18 d (J=9,0 Hz)

Tabela II.7 (Continuação).

Posição	Experimental RMN ¹ H	Literatura RMN ¹ H
3'''	6,79 d (J= 8,4 Hz)	6,69 t (J=9,0 Hz)
4'''	---	---
5'''	6,79 d (J= 8,4 Hz)	6,69 t (J=9,0 Hz)
6'''	7,37 d (J=8,4 Hz)	7,18 d (J=9,0 Hz)
7'''	7,34 d (J=15,9 Hz)	7,32 d (J=15,9 Hz)
8'''	6,11 d (J=15,9 Hz)	5,99 d (J=15,9 Hz)
OCH ₃ -C ₃	---	---
OH-C ₅	12,57 s	---

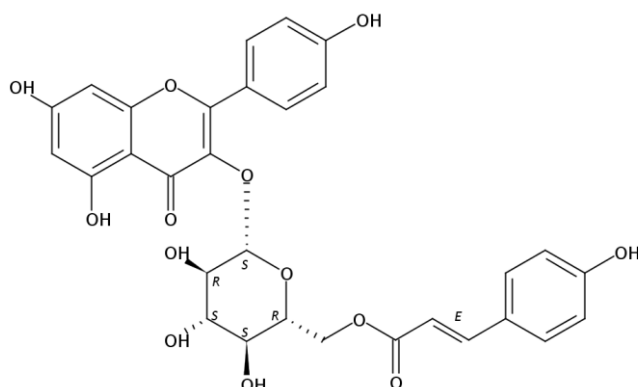


Figura II.26 – Estrutura do **flavonoide 5** da subfração **Ffl 16-5** - kaempferol 3-O-β-D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo (tilirosídeo) de *C.floribundus*.

Este composto foi encontrado anteriormente em *Croton menthodoros* (CAPASSO et al., 1998; CAPASSO et al., 2000), *C. gnaphalii* (LENCINA et al., 2001), *C. dichrous*, *C. myrianthus*, *C. erithroxylodes*, *C. splendidus* (SAVIETTO et al., 2013), *C. tonkinensis*. (GIANG et al., 2004), *C. sellowii* (PALMEIRA et al., 2006), *C. lobatus* (LAGNIKA et al., 2009), *C. caudatus* var. *tomentosus* (ZOU et al., 2010), *C. zambesicus* (ADEROGBA et al., 2011; NDHLALA et al., 2013), *Croton* cf. *pycnocephalus*, *Croton* cf. *montevidensis*, *C. hemargyreus*, *C. antisiphiliticus*, *C. grandivelum* (MATOS, 2011), *C. pedicellatus* (LOPES et al., 2012), *C. lundianus*, *C.glandulosus*, *C. campestris*, *C. triqueter* (OGASAWARA, 2012), *C. echinocarpus*, *C. vulnerarius* (ATHAYDE, 2013), *C. gratissimus* (NDHLALA et al., 2013), *C. pallidulus* var. *pallidulus* (SOARES, 2013), *C. andinus*, *C. argentinus*, *C. catamarcensis*, *C. cordobensis*, *C. curiosus*, *C. lachnostachyus*, *C. lanatus*, *C. saltensis*, *C. serratifolius* (FURLAN et al., 2015), *C. priscus* e *C. echleri* (não publicado, comunicação pessoal),

demonstrando a importância dessa substância, como marcador, em *Croton*.

Além das atividades informadas no Capítulo I, este composto apresentou moderada atividade contra *Plasmodium falciparum*, e baixa atividade contra amastigotas de *Leishmania donovani* e tripomastigotas de *Trypanosoma brucei rhodensiense* (LAGNIKA et al., 2009) e demonstrou reduzir *in vitro* os efeitos da retirada de morfina de forma dose-dependente (CAPASSO et al., 1998).

Flavonoide 6 - Subfração Ffl 13-6

A fração Ffl 13 (0,95 g) foi subfracionada por meio de coluna de Sephadex LH-20 em sete subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Ffl 13-6 teve sua estrutura elucidada. A Figura II.27 mostra seu cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE.

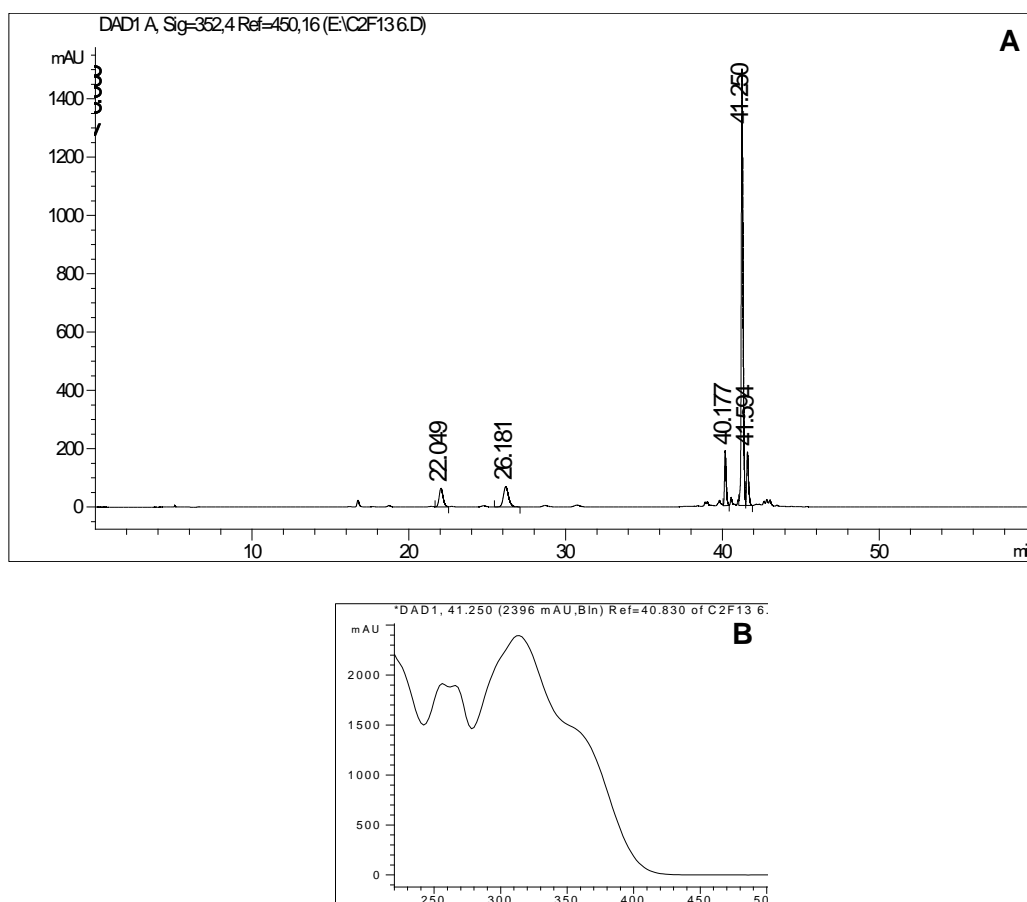


Figura II.27 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 6** correspondente à subfração **Ffl 13-6** de *C.floribundus*, com $T_R=41,250$ min.

Devido à sua massa, 9,8 mg, a amostra foi solubilizada em DMSO-d₆ e submetida a análise de RMN ¹H (item II.2.5), obtendo-se os espectros abaixo (Fig. II.28).

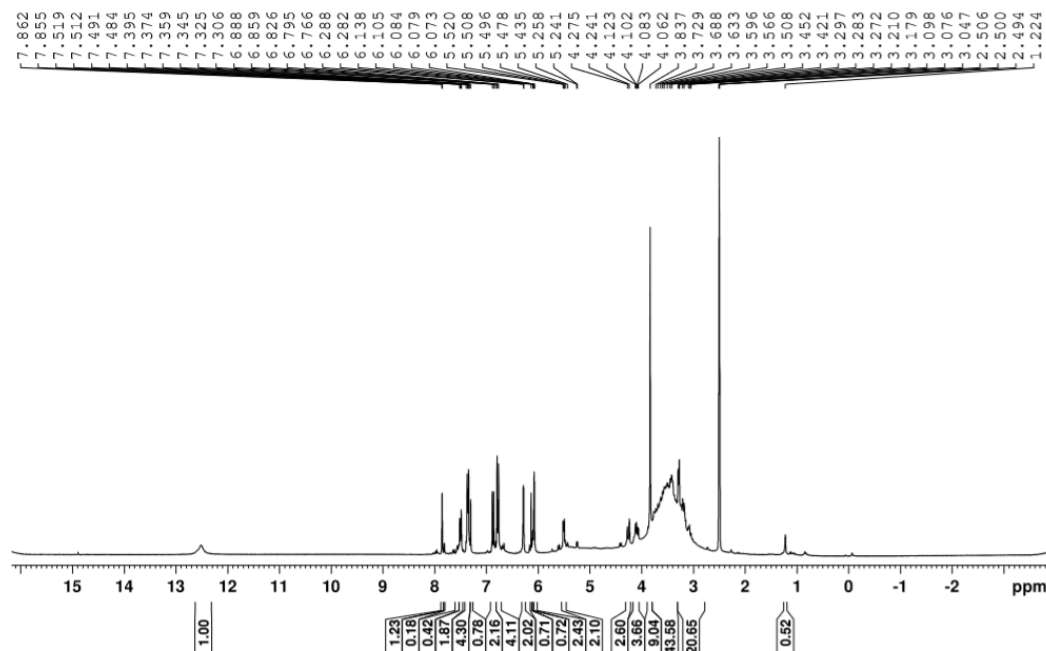


Figura II.28 – Espectro de RMN ¹H da fração **Ffl13-6** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ¹H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico de um flavonol com dois oxigênios no anel B com dois dupletos em δ 7,86 (1H, $J= 2,1\text{Hz}$) e δ 6,87 (1H, $J= 8,7\text{Hz}$) e um duplo-dupletos em δ 7,50 (1H, $J= 8,4; 2,1\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4' e mais dois singletos em δ 6,08 (1H) e δ 6,28 (1H) referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7. Foi observada a presença do grupo *p*-cumaroil na estrutura, pois na região aromática notou-se a presença de mais dois dupletos em δ 7,37 (1H, $J=15,9\text{ Hz}$) e δ 6,11 (1H, $J=15,9\text{ Hz}$) referentes a um acoplamento *trans* entre hidrogênios de ligação dupla, os quais foram atribuídos aos hidrogênios em C-7''' e C-8''' que sugeriram a presença de um sistema

carboxílico α,β -insaturado com estereoquímica *trans*, aliados a dois dupletos em δ 7,36 (2H, $J=8,7$ Hz) e δ 6,78 (2H, $J=8,7$ Hz).

No espectro ainda são visualizados um duplete em δ 5,51 (1H, $J=7,2$ Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, e os demais sinais na região entre δ 3,73 - 3,05 confirmando a presença de um glicosídeo na substância. Adicionalmente, um singlete em 3,84 (3H) sugere a presença de uma metoxila, por comparação com os dados de flavonóis glicosilados na posição 3 e metoxilados nas posições C-7, C-3' e C-4' da literatura. Pode-se, portanto, inferir a presença do grupo metoxila na posição C-3'.

Comparando-se esses dados aos do helicrisosídeo-3'-metil éter obtido na literatura (ADEROGBA et al., 2011) (Tabela II.8), pode-se sugerir a presença deste flavonoide em *Croton floribundus* (Figura II.29).

Tabela II.8. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Ffl 13-6**, $T_R=41,25$ min, e os valores de helicrisosídeo-3'-metil éter da literatura (ADEROGBA et al., 2011).

Posição	Experimental RMN ^1H	Literatura RMN ^1H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,08 d ($J= 1,8$ Hz)	6,13 d ($J=2,1$ Hz)
7	---	---
8	6,28 d ($J= 1,8$ Hz)	6,28 d ($J=2,1$ Hz)
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	7,86 d ($J= 2,1$ Hz)	7,86 d ($J=2,1$ Hz)
3'	---	---
4'	---	---
5'	6,87 d ($J= 8,7$ Hz)	6,84 d ($J=8,7$ Hz)
6'	7,50 dd ($J= 8,4$ Hz e 2,1 Hz)	7,55 dd ($J=8,4$ e 2,1 Hz)
1''	5,51 d ($J=7,2$ Hz)	5,37 d ($J= 7,8$ Hz)
2''	3,73-3,05 m	4,30-3,53 m
3''	3,73-3,05 m	4,30-3,53 m
4''	3,73-3,05 m	4,30-3,53 m
5''	3,73-3,05 m	4,30-3,53 m
6''	4,26 dl ($J=12,0$ Hz)	4,30-3,53 m
	4,09 dd ($J=12,0$ Hz e 6,3 Hz)	
1'''	---	---

Tabela II.8. (Continuação)

Posição	Experimental RMN ¹ H	Literatura RMN ¹ H
2'''	7,36 d (J=8,7 Hz)	7,28 d (J=8,7 Hz)
3'''	6,78 d (J= 8,7 Hz)	6,80 d (J=8,4 Hz)
4'''	---	---
5'''	6,78 d (J= 8,7 Hz)	6,80 d (J=8,4 Hz)
6'''	7,36 d (J=8,7 Hz)	7,28 d (J=8,7 Hz)
7'''	7,33 d (J=15,9 Hz)	7,40 d (J=15,9 Hz)
8'''	6,11 d (J=15,9 Hz)	6,09 d (J=15,9 Hz)
OCH ₃ -C ₃	3,84 s	3,90 s
OH-C ₅	12,52 s	---

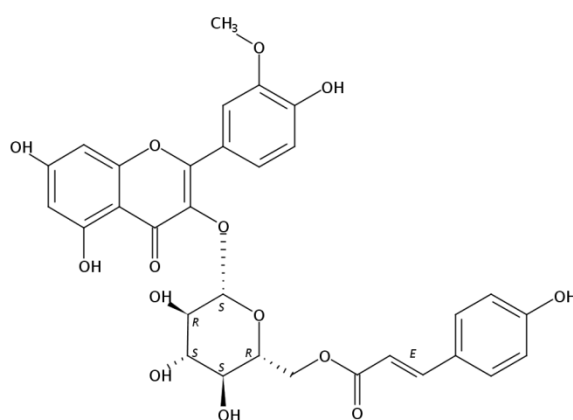


Figura II.29 – Estrutura do flavonoide 6 da subfração Ffl 13-6 - heliossido-3'-metil éter de *C. floribundus*.

Este flavonoide já havia sido encontrado em *Croton pedicellatus* (LOPES et al., 2012) e *C. zambesicus* (ADEROGBA et al., 2011; NDHLALA et al., 2013). Estudos de NDHLALA et al. (2013) e JABEEN et al. (2013) demonstraram que esse flavonoide apresentou valores muito baixos de atividade antioxidante e anticolinesterásica, assim como baixa atividade inibitória de α -glucosidase, enquanto a enzima tirosinase foi inibida de forma moderada a baixa (KARIOTI et al., 2007) por essa substância. Em contraste, apresentou alta atividade inibitória da enzima aldose redutase (MATSUMOTO et al., 2014).

Flavonoides 7 e 9 - Subfração Ffl 7-7

A fração Ffl 7 (0,76 g) foi subfracionada por meio de coluna de PVPP em sete subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que os flavonoides da subfração Ffl 17-7 tiveram suas estruturas

elucidadas. A Fig. II.30 mostra seu cromatograma e os espectros UV/vis obtidos por CLAE.

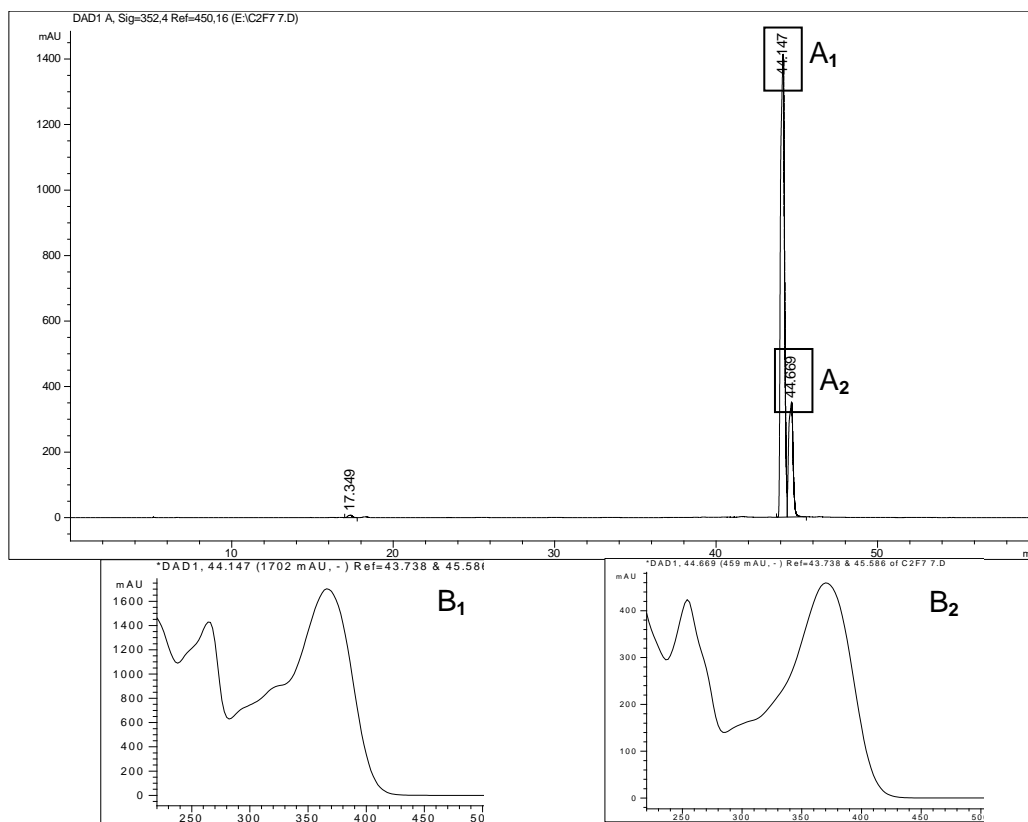


Figura II.30 – Cromatograma mostrando as bandas **A₁** e **A₂**, e espectros UV/vis (**B₁** e **B₂**) obtidos por CLAE dos **flavonoides 7** e **9** correspondentes à subfração **Ffl 17-7** de *C.floribundus*, com T_{R_s} =44,147 min. e 44,669 min, respectivamente.

Devido à sua massa, 6,6 mg, a amostra foi solubilizada em DMSO-d₆ e submetida à análise de RMN ¹H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Figs. II.31).

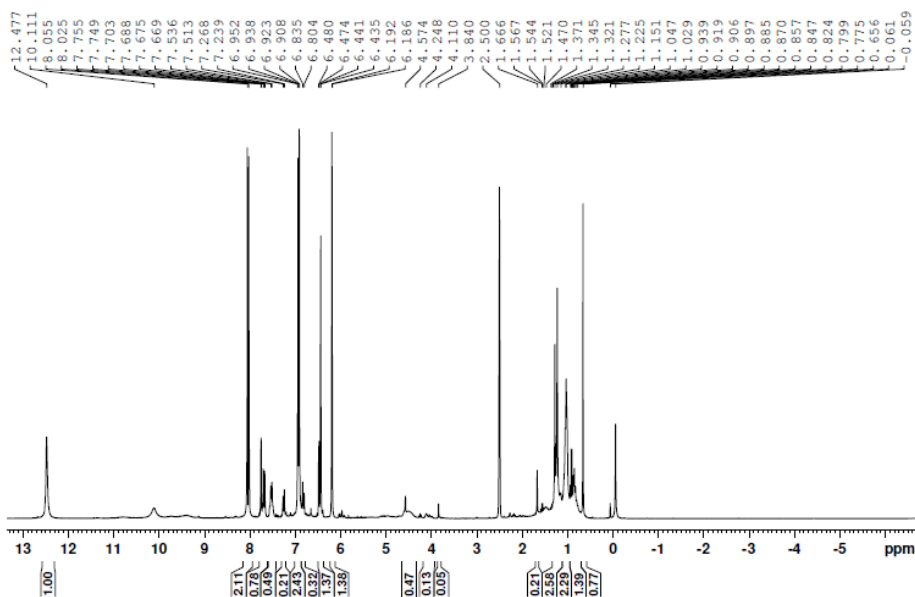


Figura II.31 – Espectro de RMN ¹H da subfração **Ffl 7-7** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ¹H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol kaempferol com dois dupletos em δ 8,04 (2H, $J=9,0\text{Hz}$) e δ 6,92 (1H, $J=9,0\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos aos pares de hidrogênios em orto H'-2 e H'-6, e H'-3 e H'-5 do anel B, e mais dois dupletos em δ 6,19 (1H, $J=1,8\text{Hz}$) e δ 6,44 (1H, $J=1,8\text{Hz}$), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7. Adicionalmente, um singleto em δ 12,68 permitiu inferir a presença de uma hidroxila fenólica no carbono C-5.

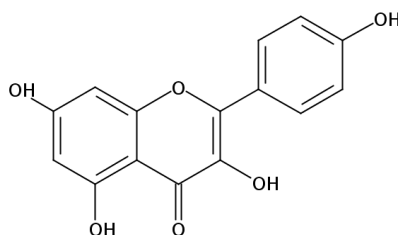
Com os dados descritos acima e comparados com a literatura (CHANG et al., 2000) (Tabela II.9) pode-se sugerir a presença do kaempferol (Fig. II.32) para a banda A₁ do cromatograma da Fig.II.30.

Tabela II.9. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Ffl 7-7**, $T_R=44,147\text{ min}$, e os valores de kaempferol da literatura (CHANG et al., 2000).

Posição	Experimental RMN ¹ H	Literatura RMN ¹ H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,19 d ($J=1,8\text{ Hz}$)	6,17 d ($J=1,6\text{ Hz}$)
7	---	---
8	6,44 d ($J=1,8\text{ Hz}$)	6,38 d ($J=1,6\text{ Hz}$)

Tabela II.9 (Continuação).

Posição	Experimental RMN ¹ H	Literatura RMN ¹ H
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	8,04 d (J= 9,0 Hz)	8,08 d (J=8,8 Hz)
3'	6,92 d (J= 9,0 Hz)	6,90 d (J=8,8 Hz)
4'	---	---
5'	6,92 d (J= 9,0 Hz)	6,90 d (J=8,8 Hz)
6'	8,04 d (J= 9,0 Hz)	8,08 d (J=8,8 Hz)
1''	---	---
2''	---	---
3''	---	---
4''	---	---
5''	---	---
6''	---	---
OH-C ₅	12,48 s	---

Figura II.32 – Estrutura do flavonoide 7 da subfração Ff11 7-7 - kaempferol - de *C. floribundus*.

Este flavonoide já havia sido anteriormente descrito para várias espécies do gênero, como em *Croton sparsiflorus* (MEHMOOD et al., 2010), *C. caudatus* var. *tomentosus* (ZOU et al., 2010), *C. pedicellatus* (LOPES et al., 2012), *C. sylvaticus* (ADEROGBA et al., 2013b), *C. muscicarpa* (BARRETO et al., 2013), *C. celtidifolius* (BISCARO et al., 2013), *C. gratissimus* (NDHLALA et al., 2013), *C. campestris* (JUNIOR et al., 2014) e *C. sphaerogynus* (SANTOS et al., 2016). Apresentou atividade anticolinesterásica *in vitro* (ADEROGBA et al., 2013b) e alta atividade inibitória da α -glucosidase (PENG et al., 2016). Demonstrou atividade anti-inflamatória em vários modelos de doenças, antioxidante por sequestro de radicais livres e radicais superóxido e por preservar a atividade de enzimas antioxidantes, e atividade anticâncer por vários modos de ação, como antimetástase/antiangiogênese, anti-proliferação, indução de apoptose, geração de espécies ativas de oxigênio e modulação de alvos moleculares como p53 (RAJENDRAN et al., 2014).

Pelo espectro de RMN ^1H visto na Fig. II.31, pode-se também notar que na sua região aromática, entre 6,5 e 8 ppm, há sinais com o padrão de substituição característico do flavonol isoramnetina com dois dupletos em δ 7,25 (1H, $J= 8,7\text{Hz}$) e δ 7,75 (1H, $J= 1,8\text{Hz}$) e um duplo-duplete em δ 7,68 (1H, $J= 2,1; 8,7\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4', e mais dois dupletos em δ 6,19 (1H, $J=1,8\text{Hz}$) e δ 6,48 (1H, $J= 1,8\text{ Hz}$), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

Adicionalmente, um singleto em δ 3,84 (3H) permitiu inferir a presença, por comparação com a literatura, de um grupo metoxila no carbono C-3'.

Ao serem comparados os dados acima com os da literatura (CAO et al., 2009) (Tabela II.10) pode-se sugerir também a presença de isoramnetina na subfração Ffl 7-7 (Fig. II.33) de *C. floribundus* para a banda A₂ do cromatograma da Fig. II.30.

Tabela II.10. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração Ffl 7-7, $T_R=44,669\text{ min}$, e os valores de isoramnetina da literatura (CAO et al., 2009).

Posição	Experimental RMN ^1H	Literatura RMN ^1H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,19 d ($J= 1,8\text{ Hz}$)	6,20 d
7	---	---
8	6,48 d ($J= 1,8\text{ Hz}$)	6,48 d
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	7,75 d ($J= 1,8\text{ Hz}$)	7,75 d
3'	---	---
4'	---	---
5'	7,25 d ($J= 8,7\text{ Hz}$)	6,94 d
6'	7,68 dd ($J= 1,8\text{ Hz e } 8,7\text{ Hz}$)	7,69 m
1''	---	---
2''	---	---
3''	---	---
4''	---	---
5''	---	---
6''	---	---
OCH ₃ -C3'	3,84 s	3,84 s

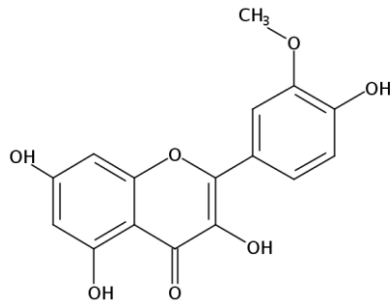
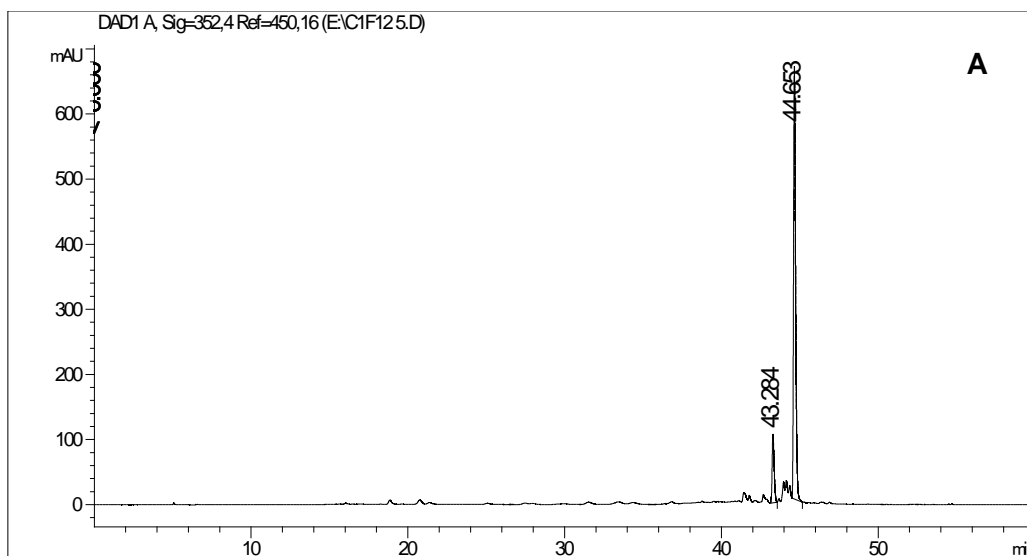


Figura II.33 – Estrutura do **flavonoide 9** da subfração **Ffl 7-7**– isoramnetina - de *C.floribundus*.

Este flavonoide foi descrito anteriormente em *Croton oblongifolius* (SUBRAMANIAN et al., 1971) e *Croton laevigatus* (ZOU et al., 2012). Demonstrou atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* ao bloquear a ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB) (YANG et al.,2013), atividade antiadipogênica em células de rato 3T3-L1 (LEE et al., 2010), e apresentou atividade anticoagulante *in vitro* e *in vivo* em camundongos (KU et al., 2013) e atenuou a formação de fibrose hepática *in vitro* e *in vivo* em camundongos (YANG et al., 2016).

Flavonoide 8 - Subfração Ffl 12-5

A fração Ffl 12 (0,95 g) foi subfracionada por meio de coluna de Sephadex LH-20 em sete subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Ffl 12-5 teve sua estrutura elucidada. A Fig.II.34 mostra seu cromatograma e o espectro UV/vis obtidos por CLAE.



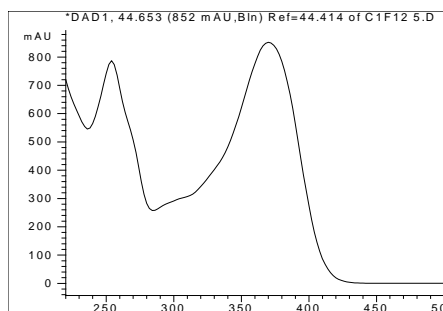


Figura II.34 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 8**, correspondente a subfração **Ff1 12-5**, com $T_R=44,653$ min, de *C.floribundus*.

Devido à sua massa, 62,3 mg, a amostra foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida à análise de RMN 1H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.35).

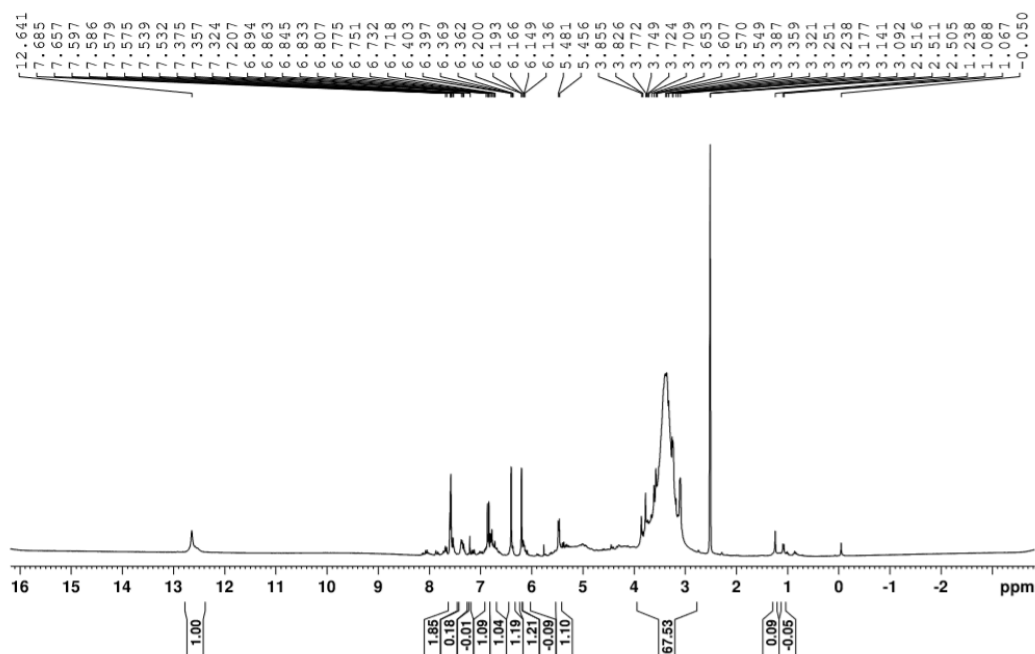


Figura II.35 – Espectro de RMN 1H da subfração **Ff12-5** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN 1H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol kaempferol com dois dupletos em δ 8,09 (2H, $J=9,0$ Hz) e δ 6,90 (2H, $J=9,0$ Hz) referentes aos acoplamentos dos pares de hidrogênios em orto H-2' e H-6', e H-3' e H-5' do anel B, e mais dois dupletos em δ 6,21 (1H, $J=1,8$ Hz) e δ 6,22 (1H, $J=1,8$ Hz), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

Adicionalmente, um singlete em δ 3,88 permitiu inferir a presença de uma metoxila no carbono C-3.

Comparando-se esses dados aos da literatura (PARK et al., 2011) (Tabela II.11) pode-se sugerir a presença do 3-O-metil-kaempferol (Fig. II.36), conhecido como isokaempferida.

Tabela II.11. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Ffl 12-5**, $T_R=44,653$ min, e os valores do 3-O-metil kaempferol da literatura, conhecido como isokaempferida (PARK et al., 2011).

Posição	Experimental RMN ^1H	Literatura RMN ^1H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,21 d (J= 1,8 Hz)	6,19 d (J= 2,0 Hz)
7	---	---
8	6,22 d (J= 1,8 Hz)	6,39 d (J= 2,0 Hz)
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	8,09 d (J= 9,0 Hz)	7,96 d (J= 9,0 Hz)
3'	6,90 d (J= 9,0 Hz)	6,91 d (J= 9,0 Hz)
4'	---	---
5'	6,90 d (J= 9,0 Hz)	6,91 d (J= 9,0 Hz)
6'	8,09 d (J= 9,0 Hz)	7,96 d (J= 9,0 Hz)
OCH ₃ _C	3,88s	3,78 s (3H)

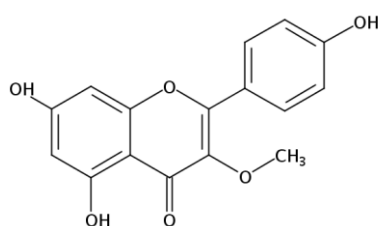


Figura II.36 – Estrutura do **flavonoide 8** da subfração **Ffl 12-5** - 3-O-metil-kaempferol (isokaempferida) - de *C.floribundus*.

Este composto foi encontrado anteriormente em *Croton insularis* (GRAIKOU et al., 2005), *C. glabellus* (GARCÍA et al., 2006), *C. echiioides* (NOVELLO et al., 2016), e *C. sphaerogynus* (SANTOS et al., 2016). Apresentou baixa atividade antioxidante (SANTOS et al., 2016). Demonstrou citotoxicidade moderada contra as linhagens de células humanas U251, tumoral leucêmica K562 e de câncer de colo HCT15

(GARCÍA et al., 2006). Apresentou também atividade anti-neuroinflamatória *in vitro* ao inibir a produção de NO em células BV2 (SONG et al., 2017).

Flavonoide 10 - Subfração Ffl 8-3

A fração Ffl 8 (0,86 g) foi subfracionada por meio de coluna de Sephadex LH-20 em seis subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Ffl 8-3 teve sua estrutura elucidada. A Fig. II.37 mostra seu cromatograma e o espectro UV/vis obtidos por CLAE.

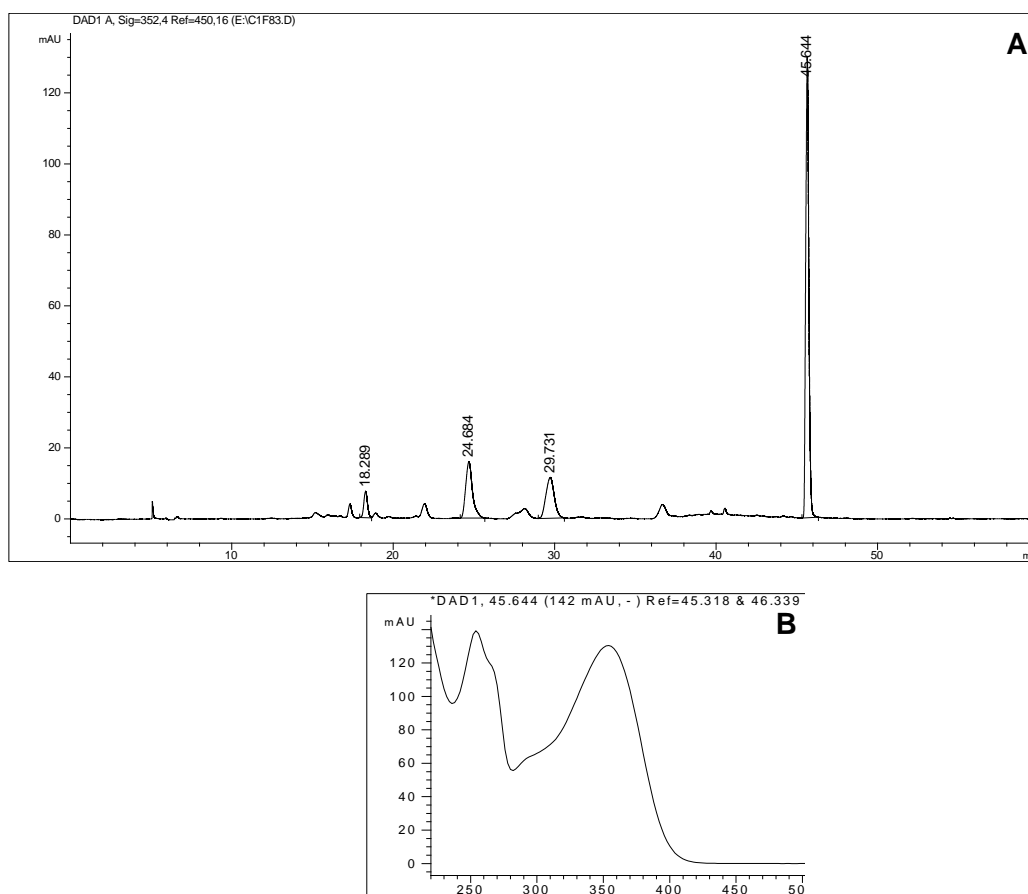


Figura II.37 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 10 correspondente à subfração Ffl 8-3, com $T_R=45,644$ min, de *C.floribundus*.

Devido à sua massa, 25,7 mg, a amostra foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida à análise de RMN 1H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.38).

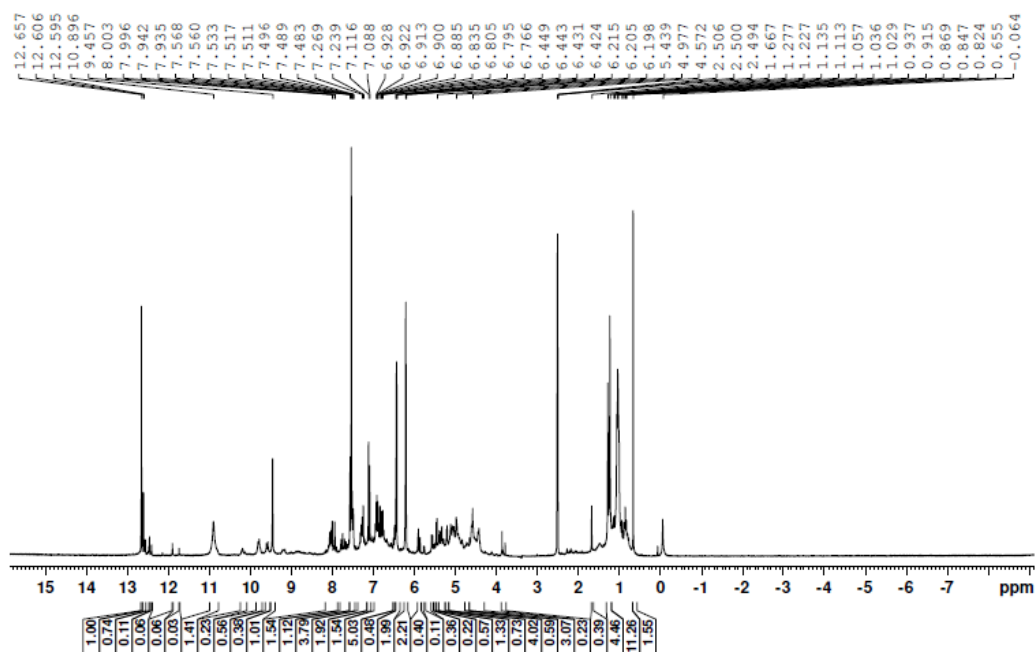


Figura II.38 – Espectro de RMN ^1H da subfração **Ffl 8-3** de *C.floribundus*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ^1H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol isoramnetina com dois dupletos em δ 7,10 (1H, $J=$ 8,4Hz) e δ 7,53 (1H, $J=$ 2,4Hz) e um duplo-dupletos em δ 7,55 (1H, $J=$ 2,4; 8,4Hz) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4' e mais dois dupletos em δ 6,20 (1H, $J=$ 2,1Hz) e δ 6,43 (1H, $J=$ 2,1 Hz), referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

Adicionalmente, dois singletos em δ 3,78 e δ 3,86 permitiram inferir a presença de duas metoxilas em C-3 e C-3', enquanto que três singletos em δ 12,66, δ 10,9 e δ 9,46 permitiram inferir a presença de três hidroxilas fenólicas nos carbonos C-5, C-7 e C-4', respectivamente.

Comparando-se esses dados aos da literatura (WANG et al., 2010) (Tabela II.12) pode-se sugerir a presença da 3,3'-dimetilquercetina (Fig. II.39), conhecida como 3-O-metil-isoramnetina.

Tabela II.12. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Ffl 8-3**, $T_R=44,669$ min, e os valores da literatura correspondentes à 3,3'-dimetilquercetina (3-O-metil-isoramnetina) (WANG et al., 2010).

Posição	Experimental RMN ^1H	Literatura RMN ^1H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,20 d (J= 2,1 Hz)	6,20 d (J= 2,0 Hz)
7	---	---
8	6,43 d (J= 2,1 Hz)	6,48 d (J= 2,0 Hz)
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	7,53 d (J= 2,4 Hz)	7,64 d (J= 2,1 Hz)
3'	---	---
4'	---	---
5'	7,10 d (J= 8,4 Hz)	6,97 d (J= 8,4 Hz)
6'	7,55 dd (J= 2,4 Hz e 8,4 Hz)	7,58 dd (J= 2,1 Hz e 8,4 Hz)
OCH ₃ - C3	3,78s	3,80s
OCH ₃ - C3'	3,86s	3,86s
OH-C ₅	12,66 s	12,68s
OH-C ₇	10,9 s	10,82s
OH-C _{4'}	9,46 s	9,88s

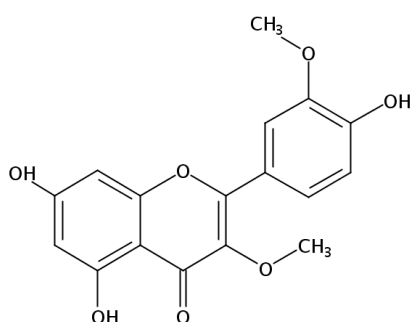


Figura II.39 – Estrutura do **flavonoide 10** da subfração **Ffl 8-3** - 3,3'-dimetilquercetina (3-O-metil-isoramnetina) - de *C.floribundus*.

Este flavonoide havia sido identificado anteriormente apenas em *Croton echinoides* (NOVELLO et al., 2016). Apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama MCF-7 com IC_{50} de 10,11 $\mu\text{g/mL}$, por indução de apoptose, inibiu *Bacillus cereus* com MIC de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e induziu danos na parede celular e membranas citoplasmáticas

(TALIB et al., 2012). Apresentou capacidade antioxidante moderada e baixa capacidade inibitória da enzima lipoxigenase (ABDEL-MAGEED et al., 2014).

II.3.2.2. *C.urucurana*

Flavonoide 11 - Subfração Fur 9/10-1

A fração Fur 9 (0,24 g) e Fur10 (0,69 g) foram reunidas devido a semelhança de seus perfis sob análise por CLAE (item II.2.3) e uma alíquota desta fração reunida (0,1731 g) foi submetida a cromatografia em papel, originando duas subfrações. A subfração Fur 9/10-1 (15,3 mg) teve o seu composto elucidado, por apresentar apenas um flavonoide, quando submetida novamente à análise por CLAE, cujo cromatograma e o espectro UV/vis são mostrados na Fig. II.40.

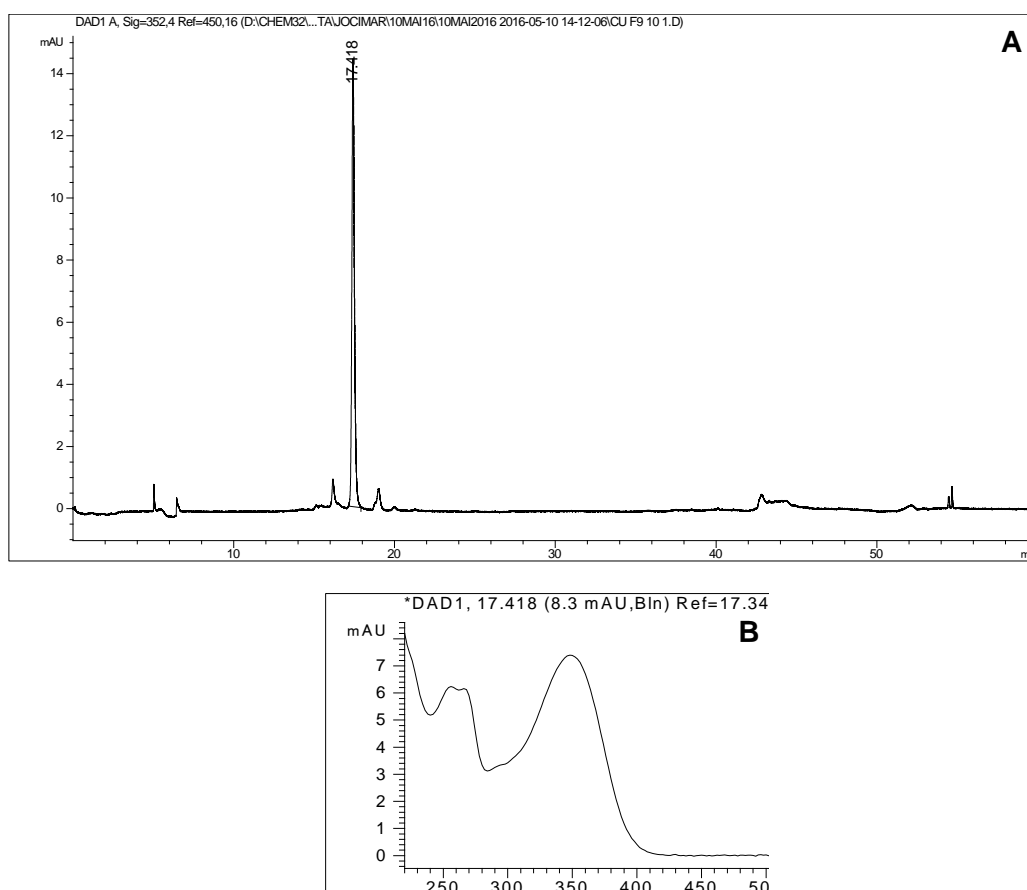


Figura II.40 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 11**, correspondente à subfração **Fur 9/10-1**, $T_R=17,418$ min de *C.urucurana*.

O tempo de retenção ($T_R=17,418$ min.) e o espectro de UV são semelhantes ao do flavonoide orientina, tendo sido realizada, portanto, uma

co-cromatografia do flavonoide em análise com uma amostra autêntica de orientina, como mostrado na Fig. II.41.

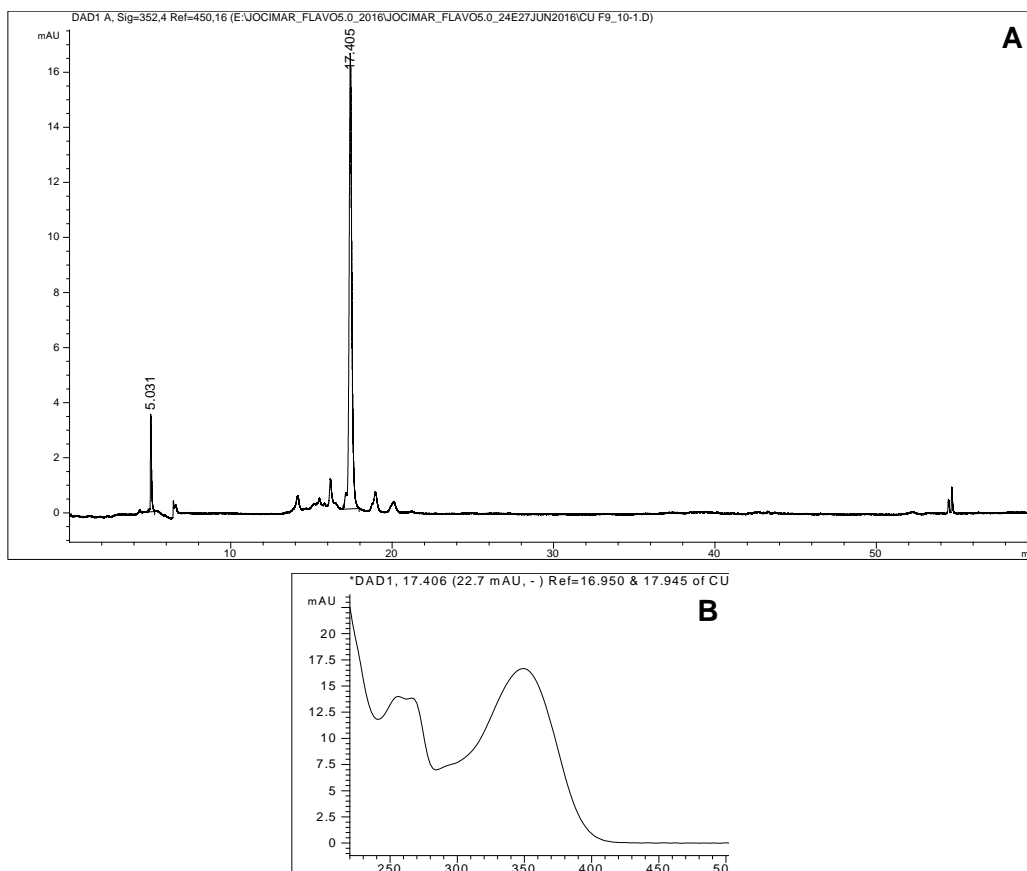


Figura II.41 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE da co-cromatografia do flavonoide da subfração **Fur 9/10-1**, $T_R=17,406$ min, de *C.urucurana* com uma amostra autêntica de orientina.

Ao se comparar os cromatogramas das Figs. II.40 e II.41 percebe-se que não apareceu nenhuma outra banda neste último cromatograma, sugerindo, realmente, que a amostra analisada corresponde ao flavonoide orientina.

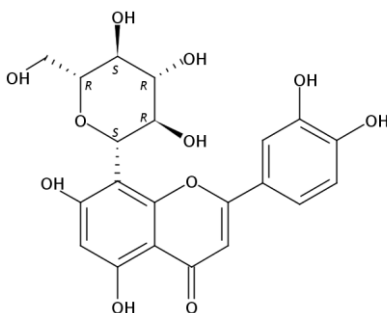


Figura II.42. – Estrutura do **flavonoide 11** da subfração **Fur 9/10-1** - orientina – de *C.urucurana*.

Orientina já havia sido encontrada anteriormente em *Croton zambesicus* (WAGNER et al., 1970), *C. antisiphiliticus*, *C. betulaster* e *Croton cf. pycnocephalus* (MATOS, 2011).

Este composto apresentou atividade anticoagulante *in vitro* e *in vivo* em camundongos (LEE & BAE, 2015) e atividade antiproliferativa e anti-inflamatória contra câncer colo-retal em ratos (KALAIYARASU & MANJU, 2017). Sua atividade anti-inflamatória agiu de forma neuroprotetora em ratos com ligação do nervo espinhal (GUO et al., 2018) e diminuiu o déficit cognitivo e o estresse oxidativo em modelo de doença de Alzheimer em camundongos (YU et al., 2015).

Flavonoide 12 - Subfração Fur 7-4

A fração Fur 7 (0,78 g) foi subfracionada por meio de coluna de PVPP em sete subfrações que foram analisadas por CLAE (item II.2.3), sendo que o flavonoide da subfração Fur 7-4 teve sua estrutura elucidada. A Fig. II.43 mostra seu cromatograma e o espectro UV/vis obtidos por CLAE.

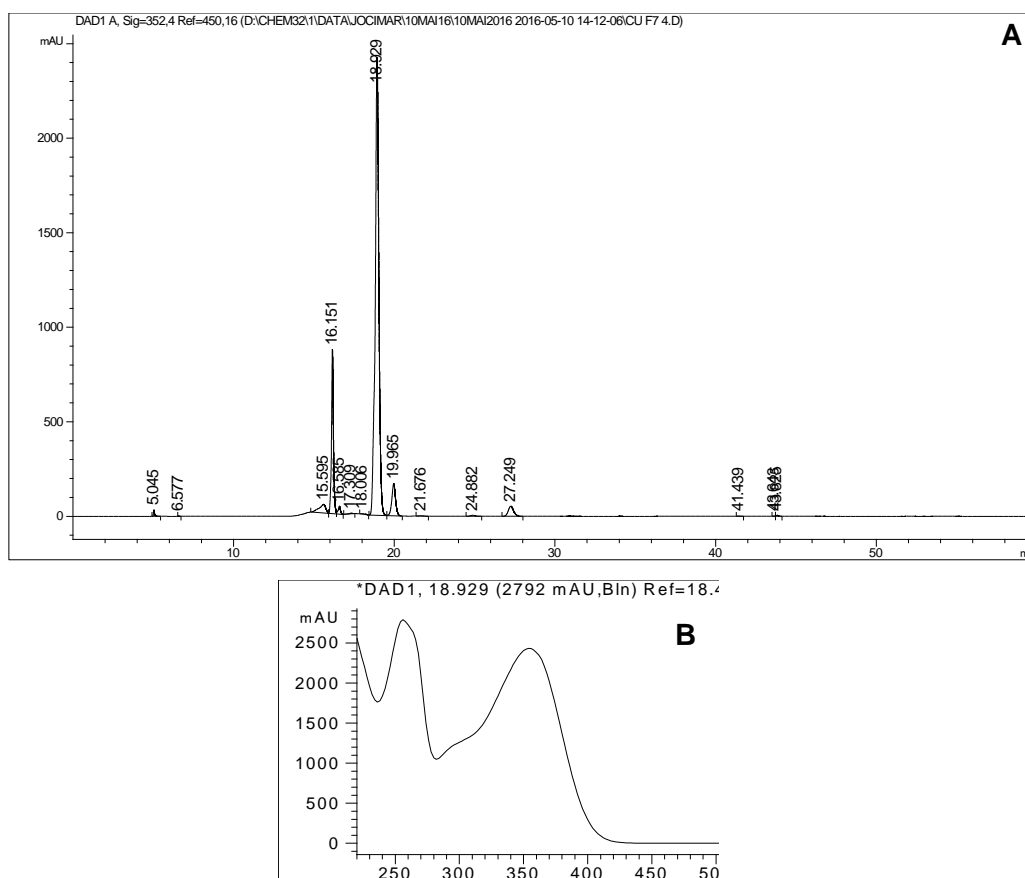


Figura II.43 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 12**, correspondente à subfração **Fur 7-4**, $T_R=18,929$ min, de *C.urucurana*.

A amostra da subfração Fur 7-4, com massa de 55,5 mg, apresentou um $T_R=18,929$ min muito semelhante ao tempo de retenção da rutina. Seu espectro de UV/vis, semelhante também à amostra em análise, levou-nos a realizar uma co-injeção da subfração Fur 7-4 com a da amostra autêntica de rutina, cujo cromatograma e espectro UV/vis, obtidos por CLAE, são mostrados na Fig. II.44.

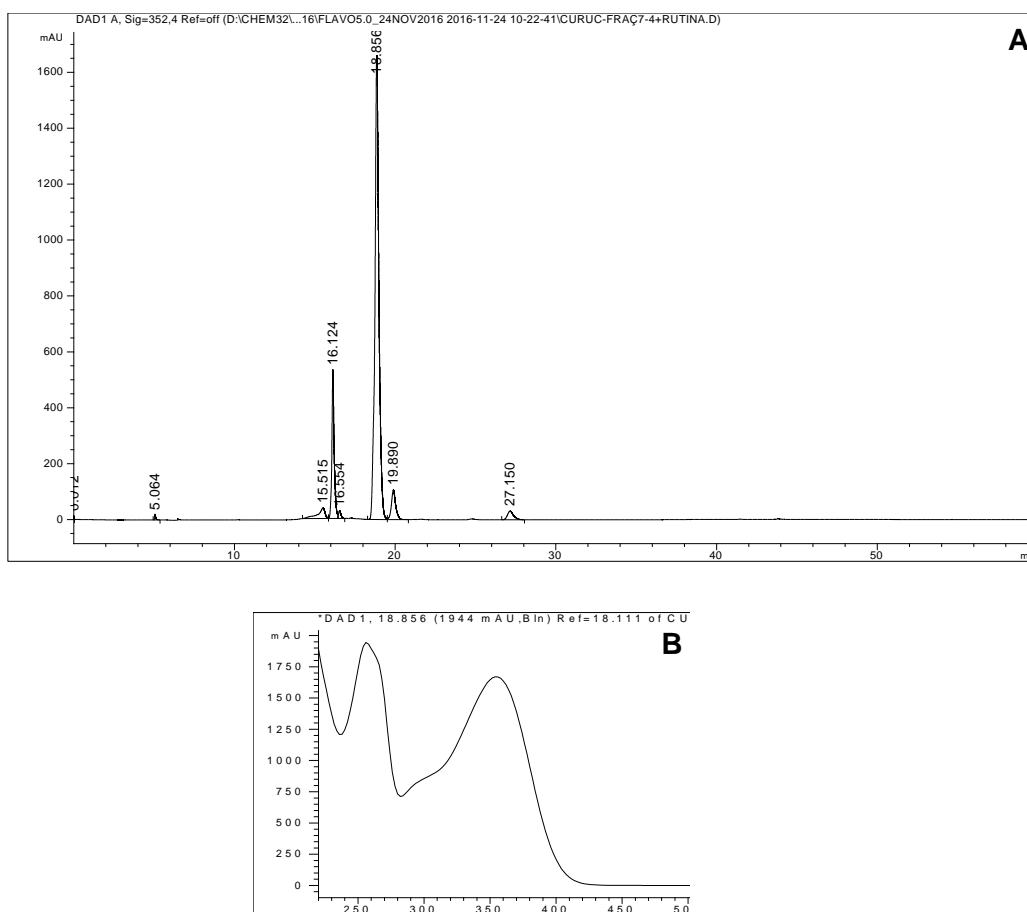


Figura II.44 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE da co-cromatografia do flavonoide da subfração **Fur 7-4**, $T_R=18,929$ min, de *C.urucurana*, com uma amostra autêntica de rutina.

Ao serem comparados os cromatogramas e espectros UV/vis das Figs. 43 e 44 nota-se que não há diferenças entre elas, sugerindo que o flavonoide da amostra em questão deve ser, realmente, a rutina.

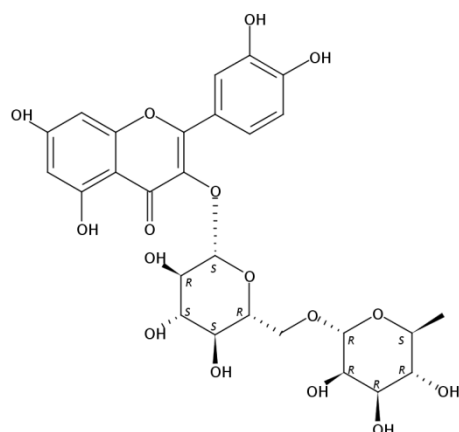


Figura II.45. Estrutura do flavonoide 12 da subfração Fur 7-4 - rutina – de *C.urucurana*.

A rutina, por ser um flavonoide bastante comum, já foi encontrada em várias espécies de *Croton*, como em *Croton menthodorus* (CAPASSO et al., 1998; CAPASSO et al., 2000), *C. caudatus* var. *tomentosus* (ZOU et al., 2010), *C. glutinosus*, *Croton* cf. *pycnocephalus*, *Croton* cf. *montevidensis* (MATOS, 2011), *C. lechleri* (ALONSO-CASTRO et al., 2012), *C. glandulosus*, *C. triqueter* (OGASAWARA, 2012), *C. pallidulus* var. *pallidulus* (SOARES, 2013), *C. campestris* (JUNIOR et al., 2014), *C. antisiphiliticus* (REIS et al., 2014), *C. andinus*, *C. argentinus*, *C. catamarcensis*, *C. cordobensis*, *C. curiosus*, *C. lachnostachyus*, *C. lanatus*, *C. saltensis*, *C. serratifolius* (FURLAN et al., 2015) e *C. sphaerogynus* (SANTOS et al., 2016). Além das atividades relatadas no Capítulo I deste trabalho, a rutina apresentou significativa atividade citoprotetora em hepatócitos de rato submetidos a estresse oxidativo induzido por tert-Butil hidroperóxido (Tert-BuOOH), similar a atividade da silimarina, testada a 60 µg/mL (KRASTEVA et al., 2015), do mesmo modo que a quercetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo. Demonstrou também reduzir *in vitro* os efeitos da retirada de morfina de forma dose-dependente (CAPASSO et al., 1998), como ocorre com o tilirosídeo.

Flavonoide 13 - Subfração Fur 6-4/5/6-2

A fração Fur 6 (2,14 g), separada inicialmente em PVPP, foi subfracionada novamente em coluna de PVPP em seis subfrações. Após análise dos perfis obtidos por CLAE, as frações Fur 6-4, Fur 6-5 e Fur 6-6 foram reunidas. Uma alíquota desta mistura (0,4202 g) foi solubilizada em

metanol e submetida a fracionamento por cromatografia em papel, obtendo-se três subfrações, tendo sido selecionada a subfração Fur 6-4/5/6-2 (13,4 mg), que teve sua estrutura elucidada. A Fig. II.46 mostra seu cromatograma e o espectro UV/vis obtidos por CLAE.

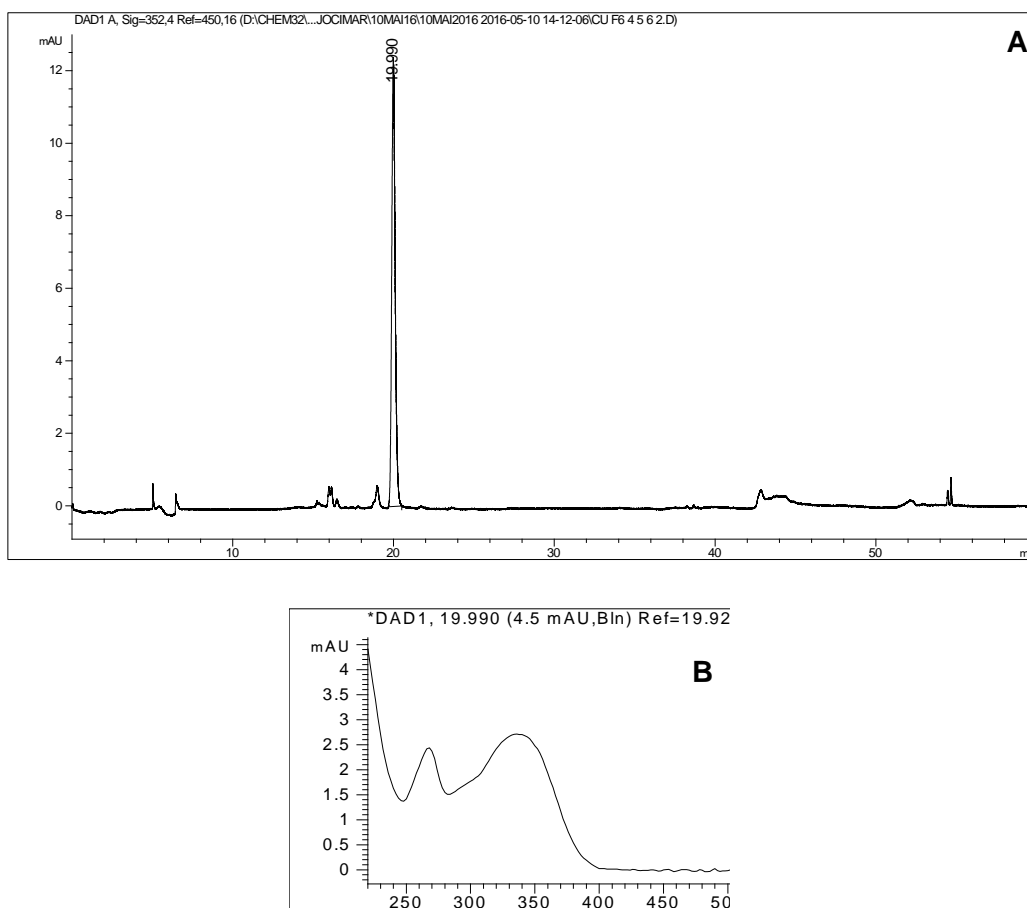


Figura II.46 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 13** da subfração **Fur 6-4/5/6-2**, $T_R=19,990$ min, de *C.urucurana*.

Comparando-se o tempo de retenção e o espectro de UV/vis observado na Fig. II.46 com os de uma amostra autêntica de vitexina, nota-se a grande semelhança entre os dois. Dessa maneira, foi realizada uma co-injeção do flavonoide em análise com uma amostra autêntica de vitexina. O cromatograma e o espectro UV/vis da co-injeção obtidos por CLAE são mostrados na Fig. II.47.

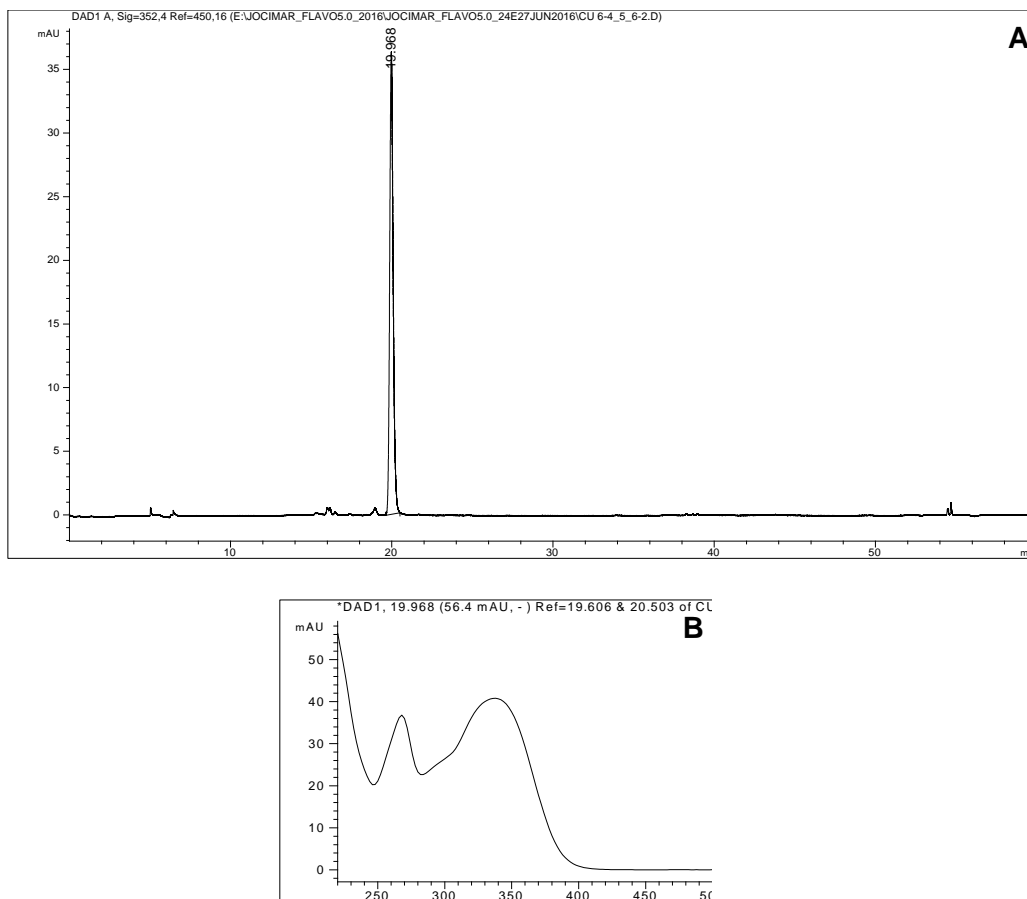


Figura II.47 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE da co-cromatografia do flavonoide da subfração **Fur 6-4/5/6-2**, $T_R=19,968$ min, de *C.urucurana*, com uma amostra autêntica de **vitexina**.

A concordância entre os tempos de retenção e os espectros UV/vis sugerem a presença da vitexina na amostra da subfração Fur 6-4/5/6-2 de *C. urucurana* (Fig. II.47).

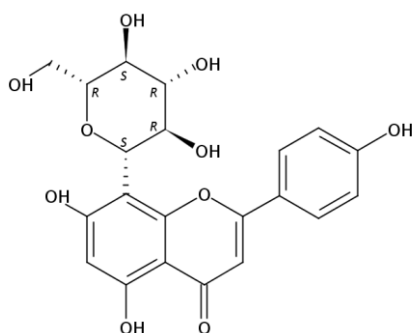


Figura II.48. Estrutura do flavonoide **13** da subfração **Fur 6-4/5/6-2** – **vitexina** - de *C.urucurana*.

Este composto foi detectado também na subfração Fur 7-1 (45,4 mg), obtida a partir da Fur 7 (0,78 g) por meio de coluna cromatográfica de PVPP, como demonstram as Figs. II.49 e II.50.

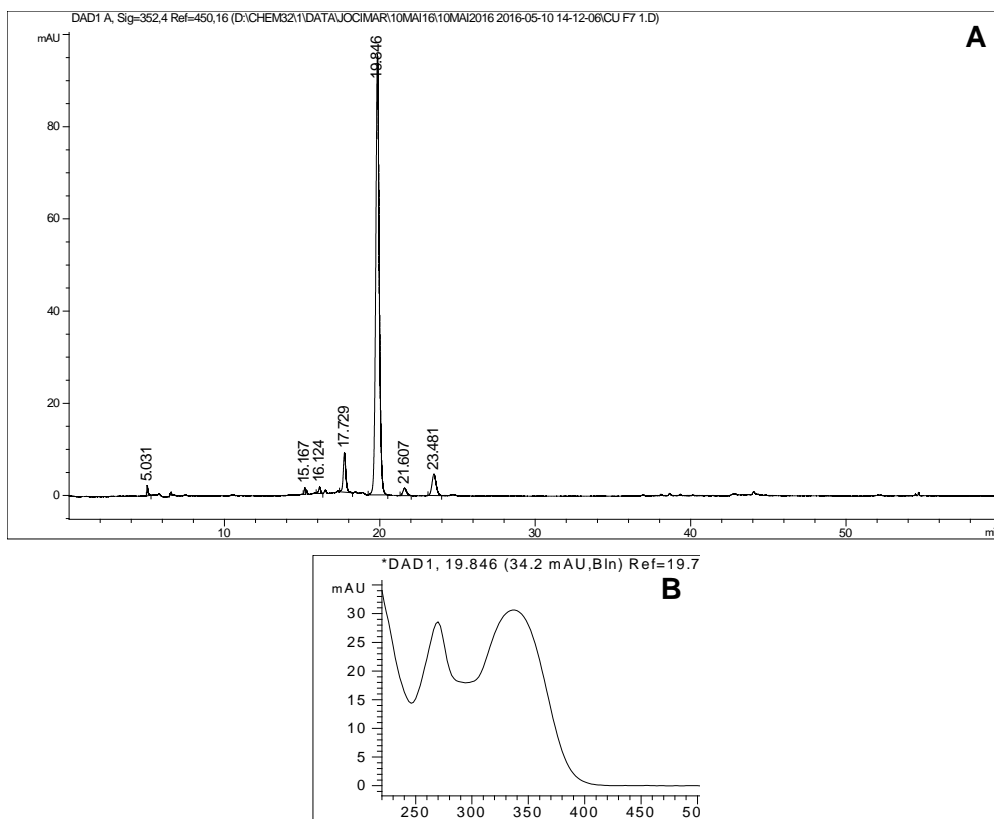


Figura II.49 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 13 da subfração Fur 7-1, TR=19,846 min, de *C.urucurana*.

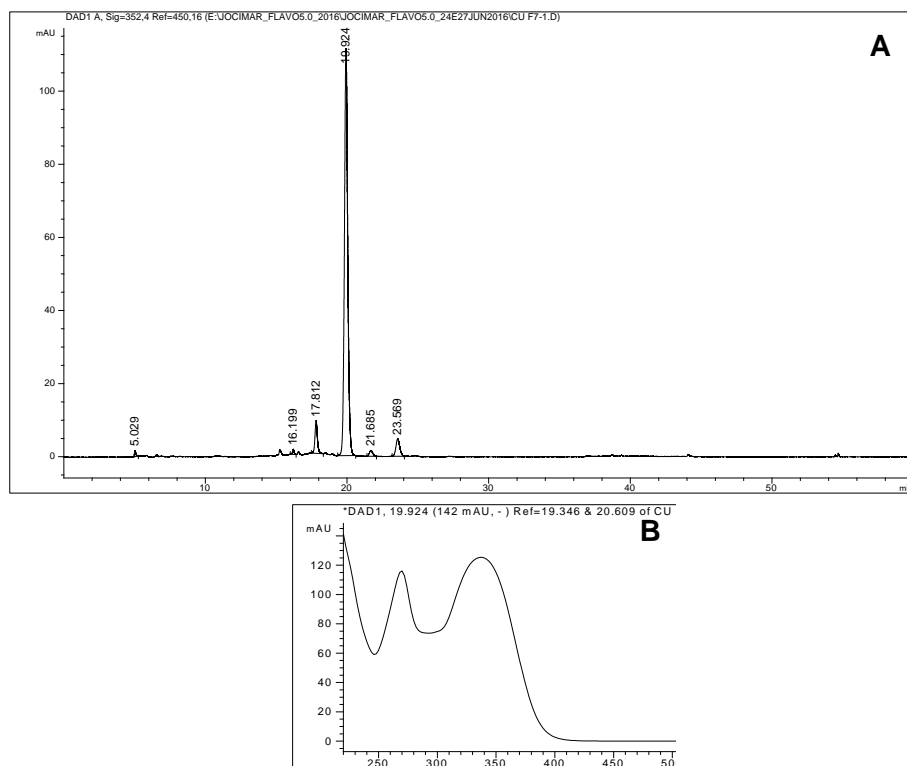


Figura II.50 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE da co-cromatografia do flavonoide da subfração Fur 7-1, TR=19,924 min, de *C.urucurana*, com uma amostra autêntica de *vitexina*.

A vitexina já havia sido encontrada em várias outras espécies de *Croton*, como em *C. zambesicus* (WAGNER et al., 1970; MOHAMED et al., 2000), *C. hoverum* (KREBS & RAMIARANTSOA, 1997), *C. splendidus* (SAVIETTO et al., 2013), *C. tonkinensis* (GIANG et al., 2004), *C. lobatus* (LAGNIKA et al., 2009), *C. betulaster*, *Croton* cf. *pycnocephalus*, *C. hemargyreus* (MATOS, 2011), *C. antisiphiliticus* (MATOS, 2011; REIS et al., 2014), *C. lechleri* (ALONSO-CASTRO et al., 2012), *C. campestris* (OGASAWARA, 2012), *C. echinocarpus*, *C. vulnerarius* (ATHAYDE, 2013) e *C. pallidulus* var. *pallidulus* (SOARES, 2013).

Além das atividades informadas no Capítulo I, a vitexina apresentou baixa atividade inibitória de α -glucosidase e alta atividade antioxidante (MOHAMED et al., 2009). Demonstrou atividade anti-inflamatória ao diminuir as concentrações de leucócitos, neutrófilos e de exudato no modelo murino de pleurisia induzida por carragenana. Também diminuiu os níveis de fator de necrose tumoral α e de interleucina-17 (REIS et al., 2014). Apresentou moderada atividade contra *Plasmodium falciparum*, e alta atividade contra amastigotas de *Leishmania donovani* e contra tripomastigotas de *Trypanosoma brucei rhodensiense*, ao contrário do tilirosídeo, que apresentou baixa atividade para estes dois últimos organismos (LAGNIKA et al., 2009).

Flavonoide 14 - Subfração Fur 9/10-2

A fração Fur 9 (0,24 g) e Fur 10 (0,69 g) foram reunidas devido a semelhança de seus perfis obtidos pela análise por CLAE (item II.2.3). Uma alíquota da fração Fur 9/10 (0,1731 g) foi submetida a cromatografia em papel, originando 2 subfrações. A subfração Fur 9/10-2 teve sua estrutura elucidada, cujos cromatograma e espectro UV/vis encontram-se na Fig. II.51.

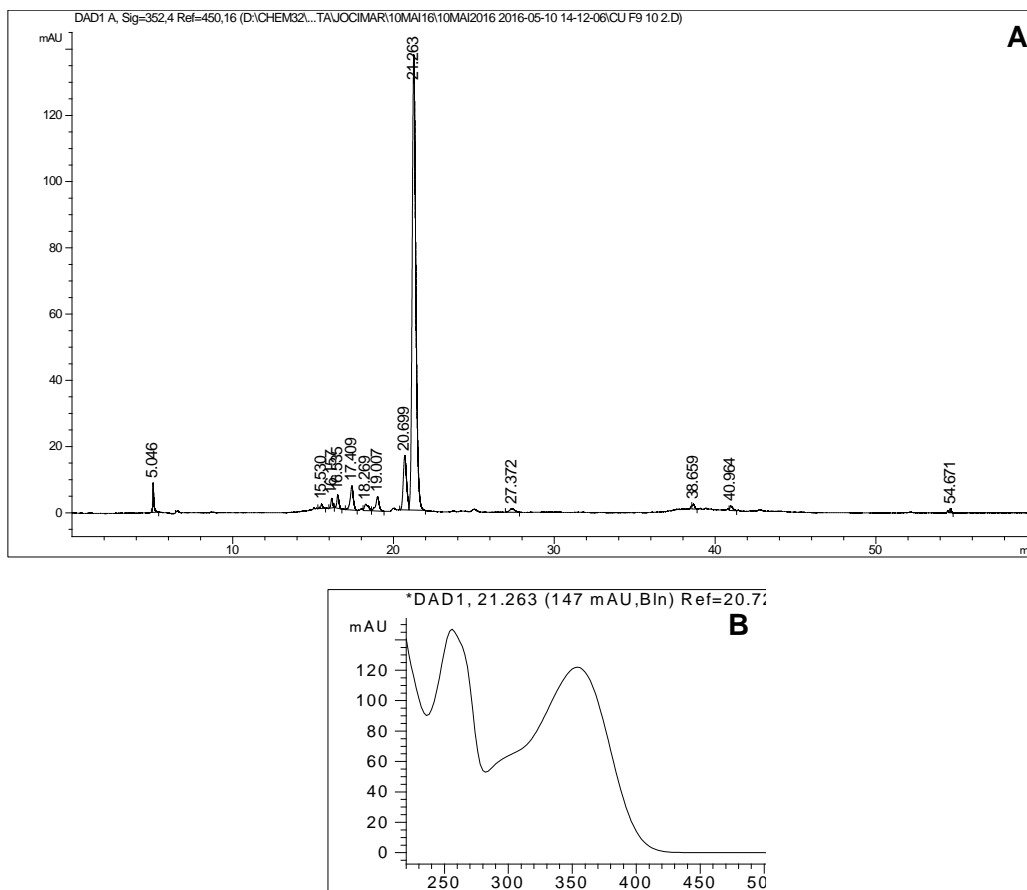


Figura 51 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 14 da subfração Fur 9/10-2, TR=21,263 min, de *C.urucurana*.

Devido à sua massa, 14,7 mg, a amostra foi solubilizada em DMSO-d₆ e submetida à análise de RMN ¹H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.52).

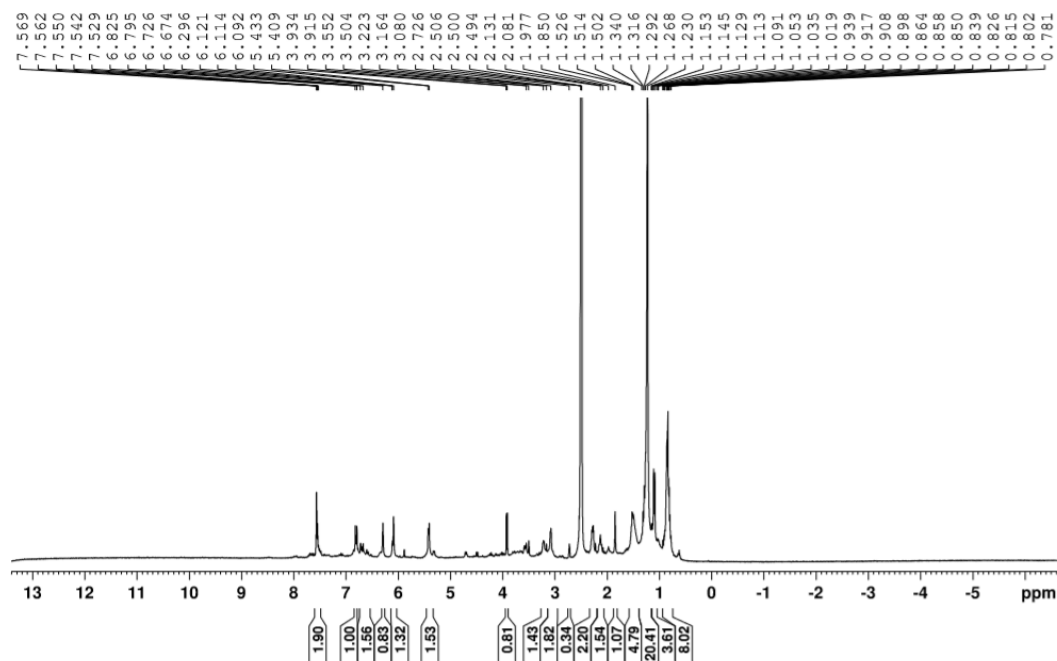


Figura II.52 – Espectro de RMN ¹H da fração **Fur 9/10-2** de *C.urucurana*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelos dados de RMN ¹H pode-se notar na região aromática do espectro sinais com o padrão de substituição característico do flavonol quercetina com dois dupletos em δ 6,81 (1H, $J= 9,0\text{Hz}$) e δ 7,54 (1H, $J= 2,4\text{Hz}$) e um duplo-dupletos em δ 7,57 (1H, $J= 9,0; 2,4\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4' e mais um dupletos em δ 6,12 (1H, $J= 2,1\text{Hz}$) referente ao H-6 e um singletos largo em δ 6,30 referente ao H-8.

No espectro ainda são visualizados um dupletos em δ 5,42 (1H, $J=7,2$ Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, e o dupletos em δ 1,10 ($J= 6,6$ Hz), atribuído ao grupo metila, e os demais sinais na região (multipletos δ 3,08, multipletos 3,22; 3,92). Dessa maneira, fica confirmando a presença de uma ramnose em C-7.

Comparando-se os dados acima com os da literatura (AWAAD et al., 2006) (Tabela II.13) pode-se sugerir na subfração Fur 9/10-2 de *C. urucurana* a presença da quercetina-7-O-ramnosídeo (Figura II.53).

Tabela II.13. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Fur 9/10-2**, $T_R=21,263$ min, e os valores de quercetina-7-O-ramnosídeo obtidos na literatura (AWAAD et al., 2006).

Posição	Experimental RMN 1H	Literatura RMN 1H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,12 d (J= 2,1 Hz)	6,2 d (J= 2,5 Hz)
7	---	---
8	6,30 sl	6,4 d (J= 2,5 Hz)
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	7,54 d (J= 2,4 Hz)	7,4 d (J= 2,1 Hz)
3'	---	---
4'	---	---
5'	6,81 d (J= 9,0 Hz)	6,80 d (J= 8,5 Hz)
6'	7,57 dd (J= 9,0 Hz e 2,4 Hz)	7,33 dd (J= 8,5 Hz e 2,1 Hz)
1''	5,42 d (J= 7,2 Hz)	5,2 d (J= 2,5 Hz)
2''	3,08 m; 3,22 m. 3.92	---
3''	3,08 m; 3,22 m. 3.92	---
4''	3,08 m; 3,22 m. 3.92	---
5''	3,08 m; 3,22 m. 3.92	---
6''	1,10 d (J= 6,6 Hz)	1,2 d (J=6,0 Hz)
OCH ₃ .C7	---	---
OH-C ₅	---	---

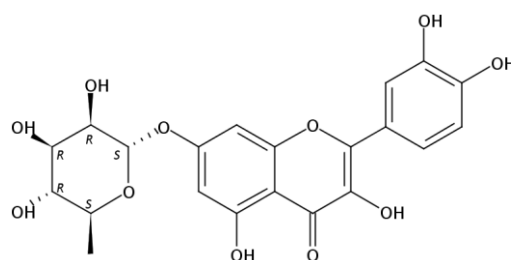


Figura II.53. Estrutura do **flavonoide 14** da subfração **Fur 9/10-2** - quercetina-7-O-ramnosídeo – de *C.urucurana*.

Este é o primeiro relato da presença deste composto em *Croton*, e mesmo em Euphorbiaceae. Estudos feitos com quercetina-7-O-ramnosídeo mostraram que esse flavonoide reduz a replicação do vírus da diarreia porcina (SONG et al., 2011) e demonstrou efeito hepatoprotetor em células de fígado humano *in vitro*, ao atenuar sua apoptose (LIANG et al., 2013),

além de induzir a inibição de formação de fibrose hepática em modelo de fibrose hepática em rato (LI et al., 2011).

Flavonoide 15 - Precipitado obtido na concentração da Fração Fur 4

A fração Fur 4 ao ser retirada da coluna de PVPP apresentou um precipitado amarelo (114,5 mg) ao ser concentrada que depois de ser separado da solução foi analisado por CLAE (item II.2.3), revelando um composto com alto grau de pureza, cujo cromatograma e espectro UV/vis encontram-se na Fig. II.54.

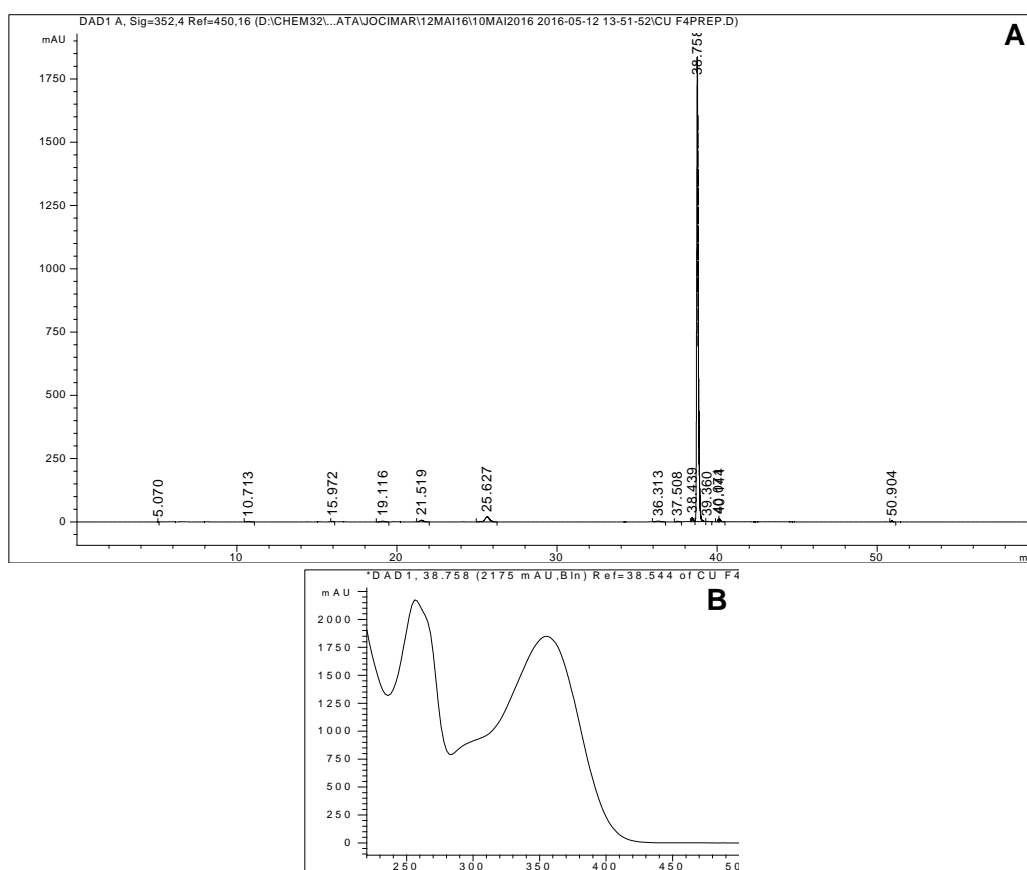


Figura II.54 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 15, $T_R=38,758$ min, obtido na concentração da fração Fur 4 de *C.urucurana*.

Devido à sua massa (114,5 mg), a amostra foi solubilizada em DMSO- d_6 e submetida à análise de RMN 1H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.55).

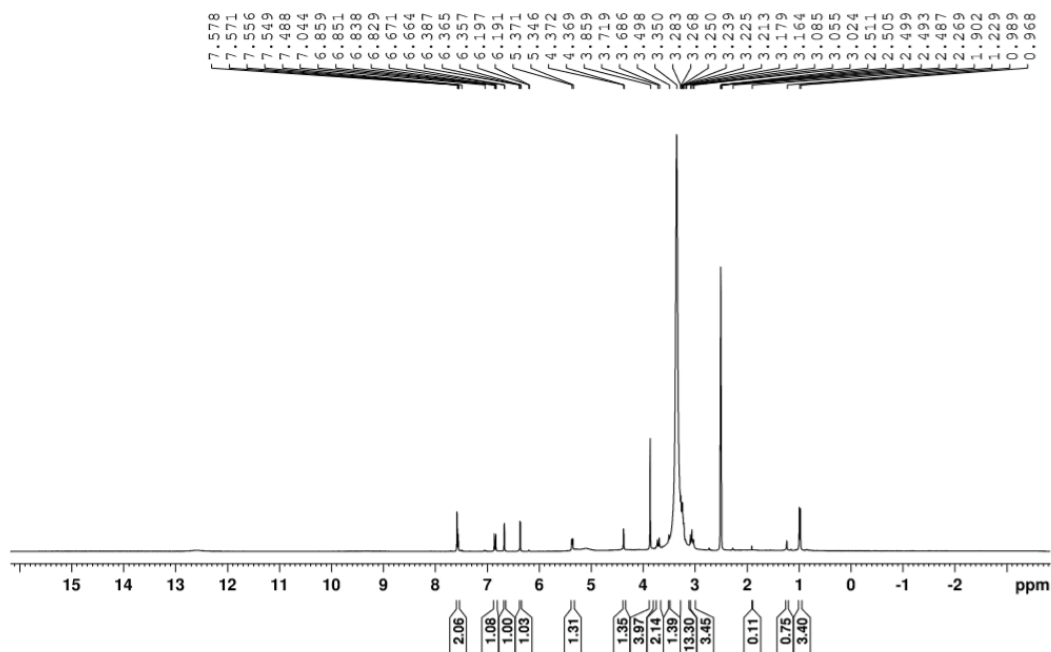


Figura II.55 – Espectro de RMN ^1H do resíduo de filtragem da fração **Fur 4** de *C.urucurana*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ^1H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol quercetina com dois dupletos em δ 7,57 (1H, $J=2,1\text{Hz}$) e δ 6,84 (1H, $J=9,0\text{Hz}$) e um duplo-duplete em δ 7,56 (1H, $J=8,4; 1,7\text{Hz}$) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4' e mais dois singletos em δ 6,36 (1H, $J=2,4\text{Hz}$) e δ 6,67 (1H, $J=2,1\text{Hz}$) referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

No espectro ainda são visualizados um duplete em δ 5,36 (1H, $J=7,5\text{Hz}$) característico de hidrogênio ligado a carbono anomérico com acoplamento *trans*-diaxial, e os demais sinais na região (duplete em δ 4,37 (1H, $J=1,0\text{Hz}$) e em δ 0,98 (1H, $J=6,3\text{Hz}$) e um multiplete entre δ 3,0-3,72 ppm) confirmam a presença de uma ramnose na substância.

Adicionalmente, um singleto em δ 3,86 sugere a presença de uma metoxila no carbono C-7, enquanto um singleto em δ 12,7 sugere a presença de uma hidroxila em C-5.

Comparando-se os dados apresentados acima com aqueles da literatura (KIM et al., 2004) (Tabela II.14) pode-se sugerir a presença da ramnetina-3-O-ramnosídeo (Fig. II.56), conhecida como ramnitrina.

Tabela II.14. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto obtido da concentração da fração **Fur 4**, $T_R=38,758$ min, e os valores de ramnetina-3-O-ramnosídeo (ramnitrina) obtidos da literatura (KIM et al., 2004).

Posição	Experimental RMN ^1H	Literatura RMN ^1H
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	---	---
6	6,36 d (J= 2,4 Hz)	6,33 d (J= 2,3 Hz)
7	---	---
8	6,67 d (J= 2,1 Hz)	6,57 d (J= 2,3 Hz)
9	---	---
10	---	---
1'	---	---
2'	7,57 d (J= 2,1 Hz)	7,35 d (J= 1,9 Hz)
3'	---	---
4'	---	---
5'	6,84 d (J= 9,0 Hz)	6,90 d (J= 8,4 Hz)
6'	7,56 dd (J= 9,0 Hz e 2,1 Hz)	7,32 dd (J= 8,4 Hz e 1,9 Hz)
1''	5,36 d (J= 7,5 Hz)	5,36 d (J= 1,7 Hz)
2''	4,37 d (J=1 Hz)	4,21 dd (J=3,2 Hz e 1,7 Hz)
3''	3,0 – 3,72 m	3,74 dd (J=9,5 Hz e 3,2 Hz)
4''	3,0 – 3,72 m	3,33 t (J=9,5 Hz)
5''	3,0 – 3,72 m	3,43 dq (J=9,5 Hz e 6,2 Hz)
6''	0,98 d (J= 6,3 Hz)	0,94 d (J=6,2 Hz)
OCH ₃ .C7	3,86 s (3 H'5)	---
OH-C ₅	12,70 s	---

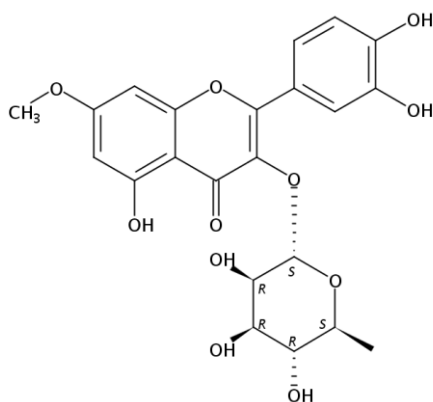


Figura II.56 Estrutura do **flavonoide 15**, correspondente ao resíduo de filtração da fração **Fu 4** - ramnetina-3-O-ramnosídeo (ramnitrina) – de *C.urucurana*.

Esta é a primeira detecção deste composto em *Croton*, tendo sido encontrado anteriormente em Euphorbiaceae, na espécie *Euphorbia hypericifolia* (RIZK et al., 1977).

Estudos de KIM et al. (2004) mostraram que a ramnitrina inibe moderadamente a proliferação de linhagens de células de tumor humano cultivadas, tais como: A549; SK-OV-3 (ovário), SK-MEL-2 (melanoma de pele), XF498 (sistema nervoso central) e HCT-15 (colon). Apresenta também atividade antioxidante mediana, com IC50 de 4,8 μM em DPPH e IC50 de inibição de peroxidação lipídica de 135,1 μM (TUNG et al., 2011).

Flavonoide 5* - Subfração Fur 11/12-1

As frações Fur 11 (0,91 g) e Fur12 (2,98 g) foram reunidas devido a semelhança de seus perfis quando analisados por CLAE (item II.2.3). Uma alíquota desta fração reunida (0,2015 g) foi submetida a cromatografia em papel, originando a subfração Fur 11/12-1 (17 mg), que teve sua estrutura elucidada. A Fig. II.57 mostra seu cromatograma e espectro UV/vis.

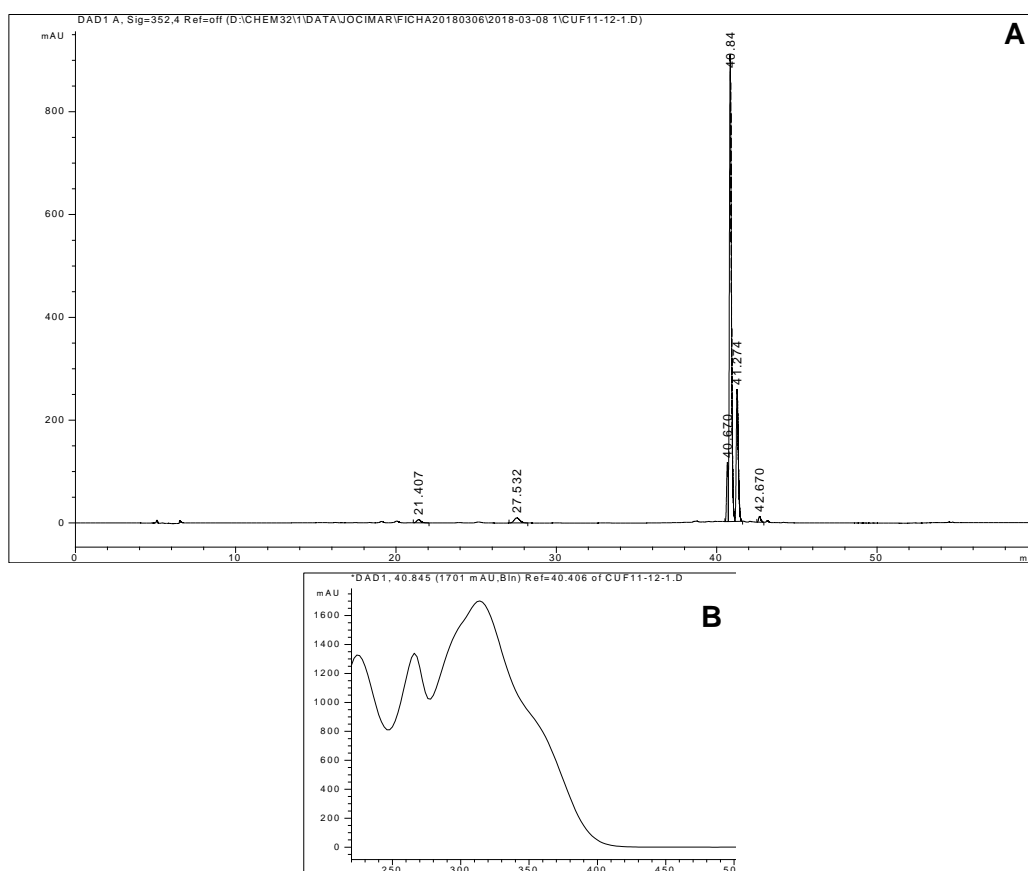


Figura II.57 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do flavonoide 5, $T_R=40,845$ min, subfração Fur 11/12-1 de *C.urucurana*.

Comparando-se o T_R e o espectro UV/vis do tilirosídeo com os mesmos parâmetros da amostra da subfração Fur 11/12-1 verificou-se que são muito semelhantes. Realizou-se, então, uma co-injeção da amostra em análise com uma amostra autêntica de tilirosídeo. O cromatograma e seu espectro UV/vis, obtidos por CLAE são mostrados na Fig. II.58.

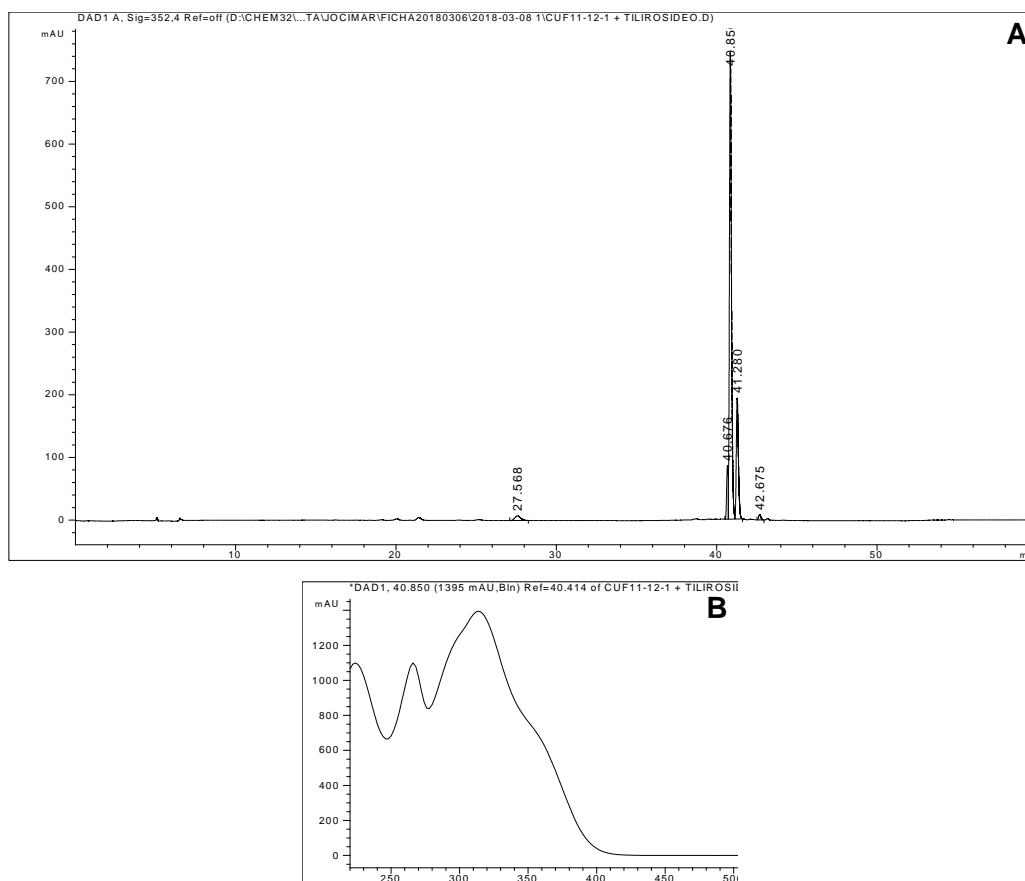


Figura II.58 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE da co-cromatografia do flavonoide da subfração **Fur 11/12-1**, $T_R=40,850$ min, de *C.urucurana*, com uma amostra autêntica de **tilirosídeo**.

Comparando-se as Figs II.57 e II.58 pode-se notar que não há diferenças entre elas, sugerindo, realmente, que o flavonoide da subfração Fur11/12-1 corresponde ao tilirosídeo (*encontrado anteriormente como flavonoide 5 de *C.floribundus*) (Fig II.59).

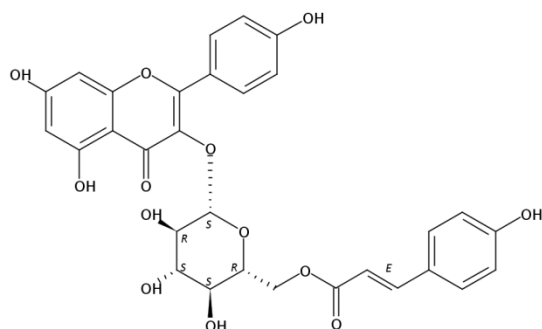
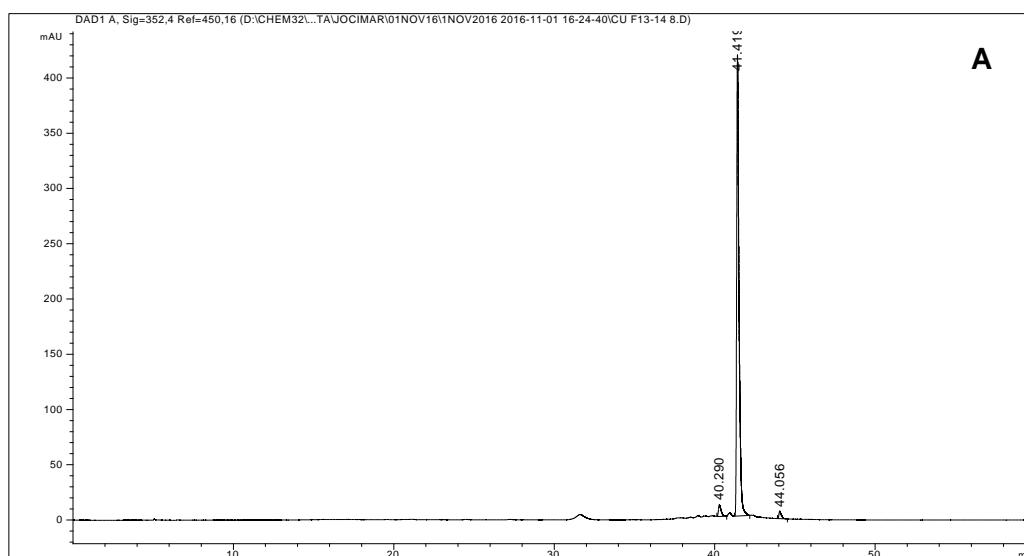


Figura II.59 – Estrutura do **flavonoide 5** da subfração **Fur 11/12-1**- campferol 3-O-β-D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo (tilirosídeo) de *C.urucurana*.

Já foi mencionado anteriormente uma lista de espécies nas quais foi detectado esse flavonoide, demonstrando que o tilirosídeo é muito comum no gênero.

Flavonoide 16 - Subfração Fur 13/14-8

As frações Fur 13 (0,24 g) e Fur14 (0,69 g) foram reunidas devido à semelhança de seus perfis obtidos por CLAE (item II.2.3). A fração Fur 13/14 foi, então, solubilizada em metanol e filtrada em papel de filtro, obtendo-se a massa de 0,2761 g. Esta foi subfracionada por meio de coluna cromatográfica de Sephadex LH-20, originando 11 subfrações, das quais o composto da subfração Fur 13/14-8 teve sua estrutura elucidada. O cromatograma e espectro UV desse composto encontra-se na Fig. II.60.



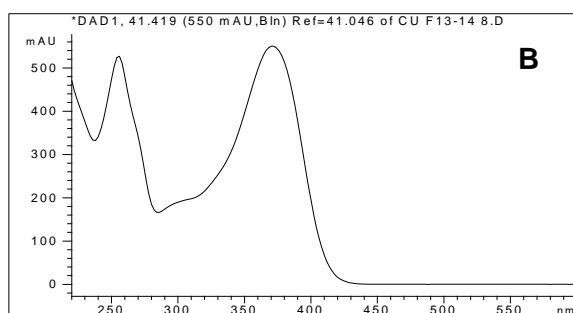


Figura II.60 – Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) obtidos por CLAE do **flavonoide 16**, TR=41,419 min, subfração **Fur 13/14-8** de *C.urucurana*.

Devido à sua massa, 24,0 mg, a amostra foi solubilizada em DMSO-d₆ e submetida à análise de RMN ¹H (item II.2.5), obtendo-se o espectro abaixo (Fig. II.61).

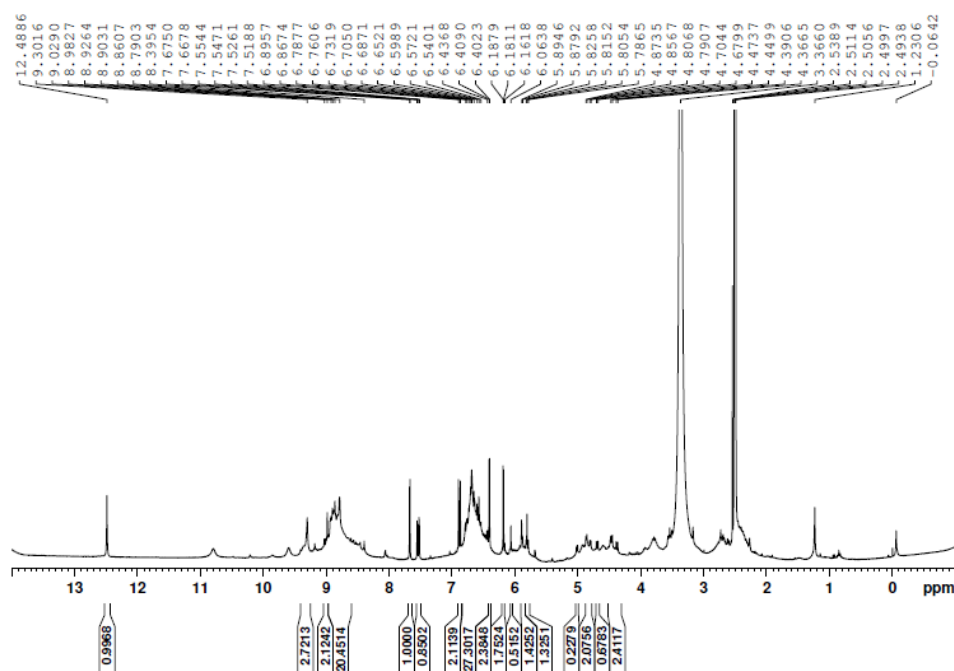


Figura II.61 – Espectro de RMN ¹H da subfração **Fur13/14-8** de *C.urucurana*. As ampliações deste espectro são mostradas no Anexo 1.

Pelo espectro de RMN ¹H pode-se notar na região aromática do espectro, entre 6,5 e 8 ppm, sinais com o padrão de substituição característico do flavonol quercetina com dois dupletos em δ 7,67 (1H, $J=2,1$ Hz) e δ 6,88 (1H, $J=8,5$ Hz) e um duplo-dupletos em δ 7,54 (1H, $J=2,1$; 8,5 Hz) referentes aos acoplamentos dos hidrogênios do anel B di-substituído nas posições C-3' e C-4' e mais dois singletos em δ 6,18 (1H,

$J= 2,0\text{Hz}$) e $\delta 6,28$ (1H, $J= 2,0\text{Hz}$) referentes ao acoplamento meta dos hidrogênios do anel A di-substituído nas posições C-5 e C-7.

Adicionalmente, um singleto em $\delta 12,49$ permite inferir a presença de uma hidroxila no carbono C-5.

Comparando-se os dados acima com aqueles da literatura (CHANG et al., 2000) (Tabela II.15) pode-se sugerir que o flavonoide da subfração Fur 13/14-8 seria a quercetina (Figura II.62).

Tabela II.15. Comparação entre os valores obtidos experimentalmente para o composto da subfração **Fur 13/14-8**, $T_R=41,419$ min, e os valores de quercetina da literatura (CHANG et al., 2000).

Posição	Experimental RMN ^1H	Literatura RMN ^1H
2	----	----
3	----	----
4	----	----
5	----	----
6	6,18 d ($J= 2,0$ Hz)	6,18 d ($J= 2,0$ Hz)
7	----	----
8	6,40 d ($J= 2,0$ Hz)	6,39 d ($J= 2,0$ Hz)
9	----	----
10	----	----
1'	----	----
2'	7,67 d ($J= 2,1$ Hz)	7,74 d ($J= 2,0$ Hz)
3'	----	----
4'	----	----
5'	6,88 d ($J= 8,5$ Hz)	6,88 d ($J= 8,5$ Hz)
6'	7,54 dd ($J= 2,1$ Hz e 8,5 Hz)	7,63 dd ($J= 8,4$ Hz e 2,0 Hz)
1''	----	----
2''	----	----
3''	----	----
4''	----	----
5''	----	----
6''	----	----
OCH ₃ .C7	----	----
OH-C ₅	12,49 s	----

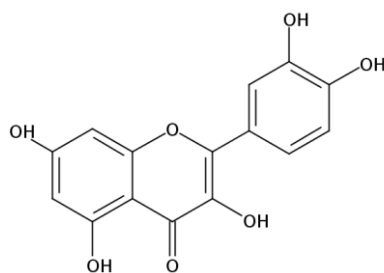


Figura II.62 – Estrutura do flavonoide 16 da subfração Fur 13/14-8 – quercetina - de *C.urucurana*.

A quercetina é um dos flavonóis mais comuns entre as angiospermas e em *Croton* já foi encontrada em *C. oblongifolius* (SUBRAMANIAN et al., 1971), *C. glabellus* (CORREA & BERNAL, 1992), *C. steenkampianus* (ADELEKAN et al., 2008), *C. klozchianus* (GOVINDARAJAN et al., 2008), *C. menyharthii* (ADEROGBA et al., 2013), *C. sylvaticus* (ADEROGBA et al., 2013b), *C. celtidifolius* (BISCARO et al., 2013), *C. pallidulus* var. *pallidulus* (SOARES, 2013), *C. campestris* (JUNIOR et al., 2014) e *C. sphaerogynus* (SANTOS et al., 2016). Foi detectada também no mel da flor de *C. heliotropiifolius* (SOUSA et al., 2016).

Além das atividades já mencionadas no Capítulo I, a quercetina apresentou atividade anticolinesterásica *in vitro* (ADEROGBA et al., 2013b), alta capacidade antioxidante e alta capacidade inibitória da enzima lipoxigenase (ABDEL-MAGEED et al., 2014).

II.4.Considerações Finais

Os compostos identificados neste trabalho se revelaram flavonóis, tanto na forma de agliconas, como quercetina, kaempferol e isoramnetina, quanto nas suas formas glicosídicas, mais comuns nos tecidos vegetais. Os flavonoides identificados se mostraram não apenas hidroxilados, mas também metoxilados, o que é consistente com os dados levantados no quadro 1 (ver Introdução) e com a hipótese de MATOS (2011) da prevalência de flavonóis e flavonas, com ênfase em compostos altamente hidroxilados e metoxilados em *Croton*. Pode ser citado aqui *C. caudatus* var. *tomentosus*, uma espécie nativa da China, utilizada na medicina tradicional chinesa, cujos flavonoides são na maioria flavonas altamente

metoxiladas como a tangeretina, nobiletina e sinensetina (ZOU et al., 2010), com cinco a seis metoxilas nas suas moléculas.

O estudo dos flavonoides em *Croton*, geralmente não é o principal foco dos pesquisadores, pois os principais constituintes do gênero são os diterpenos do tipo clerodano, labdano, kaurano e traquilobano, entre outros; nos *Croton* do Novo Mundo é comum também a presença de alcaloides (SALATINO et al., 2007). Dessa maneira, muitas vezes a extração de substâncias fenólicas, e conseqüentemente a dos flavonoides, não é bem sucedida pelo uso inadequado do solvente de extração.

Aparentemente, flavonas não são os principais flavonoides de *Croton*. Das 63 espécies encontradas na literatura (ver Quadro I, Introdução), cujos flavonoides foram identificados, apenas *C. caudatus* var. *tomentosus* (ZOU et al., 2010) e *C. erithroxylodes* (SAVIETTO et al., 2013) apresentaram flavonas, na forma de aglicona ou glicosilada. Entretanto, encontram-se várias espécies, inclusive as estudadas neste trabalho, que apresentaram - C-glicosídeos de apigenina (vitexina) e/ou de luteolina (orientina), assim como os seus isômeros.

Em termos de flavonoides acilados, foram detectados o tilirosídeo em ambas as espécies aqui estudadas, podendo ser considerado um marcador para o gênero, uma vez que é o flavonoide mais encontrado em *Croton* (ver Quadro 1, Introdução) e o helicrisosídeo-3'-metil éter em *C. floribundus*. Este último também havia sido identificado, como comentado anteriormente, em *C. zambesicus* (ADEROGBA et al., 2011, NDHLALA et al., 2013) e em *Croton pedicellatus* (LOPES et al., 2012). Outro flavonoide acilado, encontrado em *Croton laevigatus* (Quadro 1- ZOU et al., 2012), é a isoramnetina-3-O-(6"-O-cafeoil)-galactosídeo. Isso demonstra o potencial dessas espécies como fonte de possíveis novos flavonoides acilados. Este último, isolado de um outro gênero (*Conyza filaginoides*), foi analisado quanto a sua atividade antiamebíase e anti-giardíase, sem sucesso (CALZADA et al., 2001).

Em *C. floribundus* foram detectados três flavonoides triglicosilados, kaempferol-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (mauritanina), quercetina-3-O-(2,6-di-ramnosil)-galactosídeo (alcesefolisídeo) e isoramnetina-3-O-(2,6-diramnosil)-galactosídeo, que apresentaram os mesmos resíduos de

açúcares, variando apenas o núcleo aglicônico. Dentre eles, apenas o primeiro foi detectado anteriormente em *Croton*, na espécie *C. laevigatus* (ZOU et al., 2012), enquanto os outros dois se mostraram inéditos no gênero, ou mesmo na família, embora em Euphorbiaceae já tenha sido detectada a presença de triglicosídeos de quercetina, kaempferol e isoramnetina em outras espécies de *Croton* (FURLAN et al, 2015, SANTOS et al., 2016). Nesses trabalhos, entretanto, só foi detectada a triglicosilação, sem que as estruturas e posições dos açúcares fossem determinadas. Portanto, não se sabe ao certo se os glicosídeos identificados aqui são ou não inéditos.

Em *C.urucurana*, foi detectada a ramnitrina pela primeira vez no gênero, embora tenha sido encontrada na família Euphorbiaceae na espécie *Euphorbia hypericifolia* (RIZK et al, 1997), e a quercetina-7-O-ramnosídeo, aparentemente o primeiro flavonol 7-O-glicosilado do gênero.

Nota-se pela observação dos flavonoides identificados neste trabalho que kaempferol e isoramnetina em suas formas aglicônicas foram encontrados de *C.floribundus*, enquanto a quercetina foi detectada em *C.urucurana*. Os flavonoides C-glicosilados vitexina e orientina só foram detectados em *C.urucurana*, bem como a ramnitrina (ramnetina-3-O-ramnosídeo), a quercetina-7-O-ramnosídeo e a rutina. Em *C. floribundus*, além das agliconas mencionadas, foram identificados a 3-O-metil-isoramnetina, 3-O-metil-kaempferol (isokaempferida), helicrisosídeo-3'-metil éter (um flavonoide acilado de isoramnetina), quercetina-3-O-glucosídeo, os glicosídeos tri-glicosilados de quercetina, kaempferol e isoramnetina, além do tilirosídeo. Este foi o único flavonoide encontrado nas duas espécies. Os mais comuns agentes glicosilantes de flavonoides são a glicose e a ramnose. Estes também foram os açúcares principais dos glicosídeos das espécies estudadas. Apenas os flavonoides tri-glicosilados tiveram um resíduo de galactose ao lado de dois de ramnose.

Observando-se a filogenia de *Croton* (ver Introdução, Fig. II.1) nota-se que *C. floribundus* pertence a seção *Lasiogyne*, enquanto *C. urucurana* está na seção *Cyclostigma*, subgênero *Adenophylli*. Devido ao grande número de espécies, *Croton* (702-712 espécies apenas no Novo Mundo) não possui ainda uma circunscrição precisa de suas espécies. A seção

Cyclostigma é caracterizada por espécies com muito látex, tendo como a única sinapomorfia morfológica do grupo, a presença de raios de xilema secundário contendo laticíferos. Enquanto as espécies dessa seção têm por habitat florestas que vão de secas a úmidas da América Central e México até florestas tropicais e subtropicais da América do Sul, do nível do mar até 3000 m, as espécies da seção *Lasiogyne* são largamente distribuídas nos trópicos e subtropicais do Novo Mundo, ocorrendo apenas em florestas secas e capoeiras, do nível o mar até altitudes que chegam a 1000 m (VAN EE et al., 2011).

Baseando-se na filogenia proposta por VAN EE et al. (2011), que utilizaram marcadores os moleculares ITS, *trnL-F*, *EMP2765* e *rps3*, pode-se notar que as duas espécies estudadas neste trabalho são filogeneticamente distantes uma da outra. Talvez isso explique as diferenças entre os flavonoides encontrados nas duas espécies. Como já mencionado, apenas o tilirosídeo foi encontrado tanto em *C. floribundus* quanto em *C. urucurana*. Apenas esta última espécie apresentou C-glicosídeos, enquanto a primeira mostrou a presença de tri-glicosídeos.

II.5. Referências Bibliográficas

- ABDEL-MAGEED, W.M., BAYOUMI, S.A.L.H., SALAMA, A.A.R., SALEM-BEKHIT, M.M., ABD-ALRAHMAN, S.H., SAYED, H.M. (2014) Antioxidant lipoxigenase inhibitors from the leaf extracts of *Simmondsia chinensis*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7: 3521-3528.
- ADELEKAN, A.M., PROZESKY, E.A., HUSSEIN, A.A., UREÑA, L.D., VAN ROOYEN, P.H., LILES, D.C., MEYER, J.J.M., RODRÍGUEZ, B. (2008) Bioactive Diterpenes and other constituents of *Croton steenhampianus*. Journal of Natural Products, 71: 1919-1922.
- ADEROGBA, M.A., MCGAW, L.J., BEZABIH, M., ABEGAZ, B.M. (2011). Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. Natural Product Research, 25 (13): 1224-1233.
- ADEROGBA, M.A., NDHLALA, A.R., VAN STADEN, J. (2013). Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. South African Journal of Botany, 87: 48-51.

- ADEROGBA, M.A., NDHLALA, A.R., STADEN, J.V. (2013b). Acetylcholinesterase inhibitors from *Croton sylvaticus* ethyl acetate leaf extract and their mutagenic effects. *Natural Product Communications*, 8 (6): 795-798.
- ADEROGBA, M.A., NDHLALA, A.R., RENGASAMY, K.R.R., VAN STADEN, J. (2013c). Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*, 18: 12633-12644.
- ALONSO-CASTRO, A.J., ORTIZ-SÁNCHEZ, E., DOMÍNGUEZ, F., LÓPEZ-TOLEDO, G., CHÁVEZ, M., ORTIZ-TELLO, A.J., GARCÍA-CARRANCA, A. (2012) Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 140: 438-442.
- APG III (2009). An Update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121.
- APG IV. (2016). An Update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181: 1-20.
- ATHAYDE, N.R. (2013) Perfil químico e atividades biológicas de *Croton echinocarpus* Baill. e *Croton vulnerarius* Mull. Arg. Dissertação de Mestrado, São Paulo, USP.
- AWAAD, A.S., MAITLAND, D.J., SOLIMAN, G.A. (2006) Hepatoprotective activity of *Schouwia thebica* webb. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 4624-4268.
- BARBOSA, P.R., FASCIO, M., MARTINS, D., GUEDES, M.L.S., ROQUE, N.F. (2003) Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 307-308.
- BARBOSA, P.S., ABREU, A.S., BATISTA, E.F., GUILHON, G.M.S.P., MÜLLER, A.H., ARRUDA, M.S.P., SANTOS, L.S., ARRUDA, A.C., SECCO, R.S. (2007) Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 887-890.
- BARRETO, M.B., GOMES, C.L., FREITAS, J.V.B., PINTO, F.C.L., SILVEIRA, E.R., GRAMOSA, N.V. (2013) Flavonoides e terpenóides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, 36 (5): 675-679.
- BARTH, E.F., DILELI, P., BIAVATTI, D.C., SILVA, Y.L., GARNÉS, F.L.S., ROMAGNOLO, M.B., TAKEMURA, O.S., LAVERDE JR., A. (2011) Atividades anticolinesterásicas e citotóxicas de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- BISCARO, F., PARISOTTO, E.B., ZANETTE, V.C., GÜNTHER, T.M.F., FERREIRA, E.A., GRIS, E.F., CORREIA, J.F.G., PICH, C.T., MATTIVI, F., WILHELM FILHO, D., PEDROSA, R.C. (2013). Anticancer activity of flavonol and flavan-3-ol rich extracts from *Croton celtidifolius* latex. *Pharmacological Biology*. 56 (6): 737-743

- BOMFIM-PATRICIO, M.C., SALATINO, A., MARTINS, A.B., WURDACK, J.J., SALATINO, M.L.F. (2001). Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya* (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29:711-726.
- CAI, Y., EVANS, F.J., ROBERTS, M.F., PHILLIPSON, J.D., ZENK, M.K., GLEBAS, Y.Y. (1991) Polyphenolics compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 30 (6): 2033-2040.
- CALZADA, F., CEDILLO-RIVERA, R., MATA, R. (2001). Antiprotozoal activity of the constituents of *Conyza filaginoides*. *Journal of Natural Products*, 64: 671-673.
- CAO, X., WEI, Y., ITO, Y. (2009). Preparative isolation of isorhamnetin from *Stigma maydis* using high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32: 273-280.
- CAPASSO, A., PIACENTE, S., CUMANDÀ, J., TOMMASI, N., RAGUCCI, M., PIZZA, C. (1998) Flavonol glycosides from *Croton menthodorus* reduce in vitro morphine withdrawal. *Pharmaceutical Biology*, 36 (5): 310-314.
- CAPASSO, A., PIACENTE, S., TOMMASI, N., RAGUCCI, M., PIZZA, C. (2000) Constituents of *Croton menthodorus* and their effects on electrically induced contractions of the guinea-pig isolated ileum. *Phytotherapy Research*, 14: 156-159.
- CARUZO, M.B.R. (2005). Estudo taxonômico e biogeográfico do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado, 143p.
- CHANG, Y.-C., CHANG, F.-R., WU, W.-C. (2000) The Constituents of *Lindera glauca*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 47: 373-380.
- COELHO, P.L.C., FREITAS, S.R.V.-B., PITANGA, B.P.S., SILVA, V.D.A., OLIVEIRA, M.N., GRANGEIRO, M.S., SOUZA, C.S., EL-BACHÁ, R.S., COSTA, M.F.D., BARBOSA, P.R., NASCIMENTO, I.L.O., COSTA, S.L. (2016) Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26: 34-43.
- CORDEIRO, K.W., FELIPE, J.L., MALANGE, K.F., PRADO, P.R., FIGUEIREDO, P.O., GARCEZ, F.R., FREITAS, K.C., GARCEZ, W.S., TOFFOLI-KADRI, M.C. (2016) Anti-inflammatory and aninociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 128-135.
- CORREA, J., BERNAL, H., (1992) Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. Santafe de Bogota', Colombia, T. VII: 314–322.
- CORREA-HERNÁNDEZ, S.X., PUEBLA-IBÁÑEZ, P., CALLE, R.C., MARTIN-CALVO, M.L., BARRIO, L.S.R., PABON, M.F.G. (2008) Perfil vasodilatador de

compuestos flavonoides y fenilbutanoides aislados de *Croton schiedeanus* Schlecht. Revista de la Facultad de Medicina, 56 (4): 291-301.

- DEWICK, P.L. (2009). Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3ed. John Wiley and Sons. 539p.
- ESMERALDINO, L.E., SOUZA, A.M., SAMPAIO, S.V. (2005). 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. 12: 570-576.
- FERREIRA, M.M.M., OLIVEIRA, A.H.C., SANTOS, N.S. (2008). Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. Revista Agro@ambiente On-line, 2: 57-60.
- FERREYRA, M.L.F, RIUS, S.P., CASATI, P. (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science, 3: 1-15.
- FURLAN, C.M., SANTOS, K.P., SEDANO-PARTIDA, M.D., MOTTA, L.B., SANTOS, D.Y.A.C., SALATINO, M.L.F., NEGRI, G., BERRY, P.E., VAN EE, B.W., SALATINO, A. (2015) Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). Brazilian Journal of Botany, 38 (4): 693-702.
- GARCIA, L., GUARIN, D.L., TOBAR, M.C. (1986). Obtencion de ayanina de las hojas de *Croton glabellus*. Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêutica, 15 (1): 95-98.
- GARCIA, A., RAMÍREZ-APAN, T., COGORDAN, J.A., DELGADO, G. (2006). Absolute configuration assignments by experimental and theoretical approaches of *ent*-labdane- and *cis-ent*-clerodane-type diterpenes isolated from *Croton glabellus*. Canadian Journal of Chemistry, 84: 1593-1602.
- GHASEMZADEH, A., GHASEMZADEH, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 6697-6703.
- GIANG, P.M., LEE, J.J., SON, P.T. (2004) Flavonoid glucosides from the leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae. Journal of Chemistry, 42 (1): 125-128.
- GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R., DÍAZ, B.K., AGUILAR, M.I., DIEGO, N., LOTINA-HENNSSEN, B. (2006) Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as Water-Splitting Enzyme Inhibitor on Thylakoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (4): 1217-1221.
- GOVINDARAJAN, R., VIJAYAKUMAR, M., RAO, C.V., PUSHPANGADAN, R.P., ASARE-ANANE, H., PERSUAD, S., JONES, P., HOUGHTON, P.J. (2008) Antidiabetic activity of *Croton klozchianus* in rats and direct stimulation of

- insulin secretion *in-vitro*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60: 371-376.
- GRAIKOU, K., ALIGIANNIS, N., CHINO, I., SKALTSOUNIS, A.-L., TILLEQUIN, F., LITAUDON, M. (2005) Chemical constituents from *Croton insularis*. Helvetica Chimica Acta, 88: 2654-2660.
- GUERRERO, M.F., PUEBLA, P., CARRÓN, R., MARTÍN, M.L., SAN ROMÁN, L. (2002) Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 54: 1373-1378.
- GUO, D., HU, X., ZHANG, H., LU, C., CUI, G., LUO, X. (2018) Orientin and neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. International Immunology, 58: 72-79.
- GUPTA, D., BLEAKLEY, B., GUPTA, R.K. (2008) Dragon's Blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. Journal of Ethnopharmacology, 115: 361-380.
- GURGEL, L.A., SILVA, R.M., SANTOS, F.A., MARTINS, D.T.O., MATTOS, P.O., RAO, V.S.N. (2001) Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's Blood from *Croton urucurana*. Phytotherapy Research, 15: 319-322.
- GURGEL, L.A., SIDRIM, J.J.C., MARTINS, D.T., CECHINEL FILHO, V., RAO, V.S. (2005) *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. Journal of Ethnopharmacology, 97: 409-412.
- HAVSTEEN, B.H. (2002). The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics. 96: 67-202.
- HORT, M.A., STRALIOTTO, M.R., DUZ, M.S., NETTO, P.M., SOUZA, C.B., SCHULZ, T., HORST, H., PIZZOLATTI, M.G., BEM, A.F., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. (2012) Cardioprotective effects of a proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill: Focus on atherosclerosis. Food and Chemical Toxicology, 50: 3769–3775.
- JABEEN, B., RIAZ, N., SALEEM, M., NAVEED, M.A., ASHRAF, M., ALAM, U., RAFIQ, H.M., TAREEN, R.B., JABBAR, A. (2013) Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing α -glucosidase inhibitory activity. Phytochemistry, 96: 443-448.
- JUNIOR, F.E.B., OLIVEIRA, D.R., BOLIGON, A.A., ATHAYDE, M.L., KAMDEM, J.P., MACEDO, G.E., SILVA, G.F., MENEZES, I.R.A., COSTA, J.G.M., COUTINHO, H.D.M., KERNTOPF, M.R., POSSER, T. (2014) Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. Journal of Ethnopharmacology, 153: 469-477.
- KALEIYARASU, T., MANJU, V. (2017) Orientin, a C-glycosyl flavone, suppresses colonic cell proliferation and mitigates NF- κ B mediated inflammatory response

in 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96: 1523-1266.

- KANEGAE, J.M. (2007) Óleos voláteis e flavonoides de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae). *Pesquisa em Biologia*. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- KARIOTI, A., PROTAPAPPA, A., MEGOULAS, N., SKAL TSA, H. (2007) Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 15: 2708-2714.
- KIM, Y.-K., KIM, Y.S., CHOI, S.U., RYU, S.Y. (2004) Isolation of Flavonol Rhamnosides from *Loranthus tanakae* and Cytotoxic Effect of Them on Human Tumor Cell Lines. *Archives of Pharmacal Research*, 27: 44-47.
- KIM, T.H. (2016) A novel α -glucosidase inhibitory constituent from *Uncaria gambir*. *Journal of Natural Products*, 70: 811-815.
- KOSTOVA I., IOSSIFOVA T., ROSTAN J., KRAUS W., VOGLER B., AND NAVAS H. (1999) Chemical and biological studies on *C. panamensis* (Dragon's blood). *Pharmacol. Pharm. Lett.* 9: 34-36.
- KRASTEVA, I., BRATKOV, V., BUCAR, F., KUNERT, O., KOLLROSER, M., KONDEVA-BURDINA, M., IONKOVA, I. (2015) Flavoalkaloids and flavonoids from *Astragalus monspessulanus*. *Journal of Natural Products*, 11: 2565-2571.
- KREBS, H.C., RAMIARANTSOA, H. (1997) Clerodane diterpenes of *Croton hovorum*. *Phytochemistry*, 45 (2): 379-381.
- KU, S.-K., KIM, T.H., BAE, J.-S. (2013) Anticoagulant activities of persicarin and isorhamnetin. *Vascular Pharmacology*, 58: 272-279.
- LAGNIKA, L., WENIGER, B., VONTHRON-SENECHEAU, C., SANNI, A. (2009) Antiprotozoal activities of compounds isolated from *Croton lobatus* L. *African Journal of Infectious Diseases*, 3 (1): 1-5.
- LEE, J., LEE, J., JUNG, E., HWANG, W., KIM, Y.-S., PARK, D. (2010) Isorhamnetin-induced anti-adipogenesis is mediated by stabilization of β -catenin protein. *Life sciences*, 86: 416-423.
- LEE, W., BAE, J.-S. (2015) Antithrombotic and antiplatelet activities of orientin *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Functional Foods*, 17: 388-398.
- LENCINA, C., PIRES, V.S., GOSMANN, G., TAKETA, A.T.C., SCHENKEL, E.P. (2001) Tilirosídeo em *Croton gnaphalli* Baill. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11 (2): 89-93.
- LI, P., YANG, C., WANG, Y., PENG, W. (2011). Anti-hepatic fibrosis effect of quercetin-7- β -D-rhamnose. *Zhongyaocai*, 3: 424-428.
- LIANG, S., SU, W.-W., WANG, Y.-G., PENG, W., NIE, Y.-C., LI, P.-B. (2013). Effect of quercetin 7-rhamnoside on glycochenodeoxycholic acid-induced L-02

human normal liver cell apoptosis. International Journal of Molecular Medicine, 32:323-330.

- LIN, Y.-L., LU, C.-K., HUANG, Y.-J., CHEN, H.-J. (2011) Antioxidative Caffeoylquinic acids and flavonoids from *Hemerocallis fulva* flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 8789-8795.
- LIMA, L.R. (2006). Estudos Taxonomicos em *Croton* seção Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). Tese de doutorado. IB-USP.
- LOPES, E.L., NETO, M.A., SILVEIRA, E.R., PESSOA, O.D.L., BRAZ-FILHO, R. (2012) Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. Quimica Nova, 35 (11): 2169-2172.
- MA, J., JONES, S.H., MARSHALL, R., WU, X., HECHT, S.M. (2005) DNA topoisomerase I inhibitors from *Rinorea anguifera*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15: 813-816.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. (1970) The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York, 354p.
- MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., ARRUDA, A.C., PAMPLONA, S.G.S.R., VANDELINDE, F.A., LAPA, A.J., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N.F., CÔLUS, I.M.S., FARIAS, R.A.F., COSTA, A.M.L., RAO, V.S.N. (2000) Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. Journal of Ethnopharmacology, 70: 41-55.
- MARKHAM, K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London.
- MATOS, L.M.M. (2011) Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 123p.
- MATSUMOTO, T., NAKAMURA, S., FUJIMOTO, K., OHTA, T., OGAWA, K., YOSHIKAWA, M., MATSUDA, H. (2014) Structure of constituents isolated from the flower buds of *Cananga odorata* and their inhibitory effects on aldose reductase. Journal of Natural Products, 68: 709-716.
- MEDINA, J.M., PEIXOTO, J.L.B., SILVA, A.A., HARAGUSHI, S.K., FALAVIGNA, D.L.N., ZAMUNER, M.L.M., SARRAGIOTTO, M.H., VIDOTTI, G.J. (2009) Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. Revista Brasileira de Farmacologia. 19(1B): 207-211.
- MEHMOOD, R., MALIK, A. (2010) Isolation and Characterization of Crotoparsamide, a new cyclic nonapeptide from *Croton sparsiflorus*. Natural Product Communications, 5 (12): 1885-1888.
- MOHAMED, I.E., EL NUR, E.B.E., CHOUDHARY, M.I., KHAN, S.N. (2009) Bioactive natural products from two sudanese medicinal plants *Diospyros*

mespiliformis and *Croton zambesicus*. Records of Natural Products, 3 (4): 198-203.

- MOTTA, L.B., FURLAN, C.M., SALATINO, A., SALATINO, M.L.F. (2009) Flavonoids and the taxonomy of *Camarea* (Malpighiaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 37: 201-205.
- MWINE, J.T., VAN DAMME, P. (2011) Why do Euphobiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphobiaceae family and its medicinal features. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 652-662.
- NARDI, G.M., FELIPPI, R., DALBÓ, S., SIQUEIRA-JUNIOR, J.M., ARRUDA, D.C., DELLE MONACHE, F., TIMBOLA, A.K., PIZZOLATTI, M.G., CKLESS, K., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. (2003) Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. Phytomedicine, 10: 176-184.
- NDHLALA, A.R., ADEROGBA, M.A., NCUBE, B., VAN STADEN, J. (2013) Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. Molecules, 18: 1916-1932.
- NISHIBE, S., TAKENAKA, T., FUJIKAWA, T., YASUKAWA, K., TAKIDO, M., MORIMITSU, Y., HIROTA, A., KAWAMURA, T., NORO, Y. (1996) Bioactive phenolic compounds from *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*. Natural Medicines (Tokyo), 50: 378-383.
- NOVOA, B.E., CÉSPEDES, A.C., GARCIA, L.C., OLARTE, J.E. (1985) Quercetrina: Un flavonoide con actividad hipotensora obtenido de *Croton glabellus*. Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêutica ,4,7
- NOVELLO, C.R., MARQUES, L.C., PIRES, M.R., KUTSCHENCO, A.P., NAKAMURA, C.V., NOCCHI, S., SARRAGIOTTO, M.H., MELLO, J.C.P. (2016) Bioactive indole alkaloids from *Croton echioides*, Journal of the Brazilian Chemical Society, 27 (12): 2203-2209.
- OGASAWARA, D.C. (2012) Constituintes químicos e atividades antioxidantes e antiproliferativa de extratos de *Astraea Klotzsch* e *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 90p.
- PALMEIRA JUNIOR, S.F., ALVES, V.L., MOURA, F.S., VIEIRA, L.F.A., CONSERVA, L.M., LEMOS, R.P.L. (2006) Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 16 (3): 397-402.
- PALMEIRA JR, F.S., CONSERVA, L.M., SILVEIRA, E.R. (2005) Two Clerodane Diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 16 (6B): 1420-1424.
- PARK, C.H., KIM, K.H., LEE, I.K., LEE, S.Y., CHOI, S.U., LEE, J.H., LEE, K.R. (2011). Phenolic Constituents of *Acorus gramineus*. Archives of Pharmacal Research, 34: 1289-1296.

- PENG, X., ZHANG, G., LIAO, Y., GONG, D. (2016) Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase. *Food chemistry*, 190: 207-215.
- PERES, M.T.L.P., MONACHE, F.D., CRUZ, A.B., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. (1997) Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 56: 223-226.
- PERES, M.T.L.P., MONACHE, F.D., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., BEIRITH, A., CALIXTO, J.B., YUNES, R.A. (1998) Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. *Phytotherapy research*, 12: 209-211.
- PHILLIPSON, D.J. (1995) A Matter of some sensitivity. *Phytochemistry*, 38 (6): 1319-1343.
- PUEBLA, P., LÓPEZ, J.L., GUERRERO, M., CARRÓN, R., MARTIN, M.L., ROMÁN, L.S., FELICIANO, A.S. (2003). Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeana*. *Phytochemistry*, 62: 551-555.
- QUINTYNE-WALCOTT, S., MAXWELL, A.R., REYNOLDS, W.F. (2007) Crotogossamide, a Cyclic Nonapeptide from the Latex of *Croton gossypifolius*. *Journal of Natural Products*, 70 (8): 1374-1376.
- RAJENDRAN, P., RENGARAJAN, T., NANDAKUMAR, N., PALANISWANI, R., NISHIGAKI, Y., NISHIGAKI, I. (2014). Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84: 103-112.
- RAO, V.S., GURGEL, L.A., LIMA-JUNIOR, R.C.P., MARTINS, D.T.O., CECHINEL-FILHO, V., SANTOS, F.A. (2007) Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 357-360.
- RASTRELLI, L., SATURNINO, P., SCETTINO, O., DINI, A. (1995) Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2020-2024.
- REIS, G.O., VICENTE, C., CARVALHO, F.K., HELLER, M., MICKE, G.A., PIZZOLATTI, M.G., FRÖDE, T.S. (2014) *Croton antisyphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. *Inflammopharmacology*, 22: 115-126.
- RIZK, A.M., RIMPLER, H., ISMAIL, S.I. (1977) Flavonoids and ellagic acid from *Euphorbia hypericifolia* L. (= *E. indica* Lam.). *Fitoterapia*, 48: 99-100.
- SALATINO, A., SALATINO, M.L.F., NEGRI, G. (2007) Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18: 11-33.

- SANTOS, K.P., SEDANO-PARTIDA, M.D., MOTTA, L.B., CORDEIRO, I., FURLAN, C.M. (2016) Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. Brazilian Journal of Botany, 39 (4): 1021-1030.
- SANTOS, P.M.L., SCHRIPSEMA, J. KUSTER, R.M. (2005). Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 15(4): 321-325.
- SAVIETTO, J.P. (2011) Análise fitoquímica e atividade antiproliferativa de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 111p.
- SAVIETTO, J.P., FURLAN, C.M., MOTTA, L.B., SALATINO, M.L.F., CARVALHO, J.E., RUIZ, A.L.T.G., SALATINO, A., SANTOS, D.Y.A.C. (2013). Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23 (4): 662-667.
- SIMIONATTO, E., CANDIDO, A.C.S., POPPI, N.R., PERES, M.T.L.P., OGUMA, P.M., SANTOS, E.C., MATOS, M.F.C., HESS, S.C., BONANI, V.F.L., CARVALHO, J.E., DIRAIMO, D.L.. (2009) Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* (Baillion) (Euphorbiaceae). Journal of Essential Oil-Bearing Plants. 12: 250-261.
- SOARES, S.A. (2013) Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Croton pallidulus* var. *pallidulus*. Dissertação de mestrado. São Paulo, USP.
- SONG, J.H., SHIM, J.K., CHOI, H.J. (2011). Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. Virology Journal, 8: 460.
- SONG, J.-T., HAN, Y., WANG, X.-L., SHEN, T., LOU, H.-X., WANG, X.-N. (2015) Diterpenoids from the twigs and leaves of *Croton caudatus* var. *tomentosus*. Fitoterapia, 107: 54-59.
- SONG, Y., PAN, L., LI, W., SI, Y., ZHOU, D., ZHENG, C. HAO, X., JIA, X., JIA, Y., SHI, M., LI, N., HOU, Y. (2017). Natural neuro-inflammatory inhibitors from *Caragana turfanensis*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 27: 4765-4769.
- SOUSA, J.M., SOUZA, E.L., MARQUES, G., MEIRELES, B., CORDEIRO, A.T.M., GULLÓN, B., PINTADO, M.M., MAGNANI, M. (2016). Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. Food Research International, 84: 61-68.
- SOUZA, A.H., SILVA JUNIOR, J.N., GUEDES, M.L.S., BRAZ-FILHO, R., COSTA-LOTUFO, L.V., ARAÚJO, A.J., SILVEIRA, E.R., LIMA, M.A.S. (2015) New Terpenoids from *Croton limae* (Euphorbiaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society, 26 (8): 1565-1572.

- SUBRAMANIAN, S.S., NAGARAJAN, S., SULOCHANA, N. (1971) Flavonoids of some Euphorbiaceae plants. *Phytochemistry*, 10: 2548-2549.
- TAKESHIGE, Y., KAWAKAMI, S., MATSUNAMI, K., OTSUKA, H., LHIEOCHAIPHANT, D., LHIEOCHAIPHANT, S. (2012) Oblongionosides A-F, megastigmane glycosides from the leaves of *Croton oblongifolius* Roxburgh. *Phytochemistry*, 80: 132-136.
- TALIB, W.H., ZARGA, M.H.A., MAHASNEH, A.M. (2012) Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*. 17: 3291-3303.
- TSACHEVA, I., ROSTAN, J., IOSSIFOVA, T., VOGLER, B., ODJAKOVA, M., NAVAS, H., KOSTOVA, I., KOJOUHAROVA, M., KRAUS, W. (2004) Complement Inhibiting Properties of Dragon's Blood from *Croton draco*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 59 (7-8): 528-532.
- TUNG, Y.T., CHANG, W.C., CHEN, P.S., CHANG, T.C., CHANG, S.T. (2011) Ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Acacia confusa* flowers and buds. *Journal of Separation Science*, 34: 844-851.
- UCHOA, P.K.S., SILVA JR, J.N., SILVEIRA, E.R., LIMA, M.A.S., BRAZ-FILHO, R., COSTA-LOTUFO, L.V., ARAUJO, A.J., MORAES, M.O., PESSOA, C.O. (2013) Trychylbane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* Spreng. *Química Nova*, 36 (6): 778-782.
- VALENTOVÁ, K., VRBA, J., BANCIROVA, M., ULRICHOVÁ, J., KREN, V. (2014) Isoquercetrin: pharmacology, toxicology and metabolism. *Food and chemical toxicology*, 68: 267-282.
- VAN EE, B.W., RIINA, R., BERRY, P.E. (2011) A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 60: 791-823.
- YANG, J.H., KIM, S.C., SHIN, B.Y., JIN, S.H., JO, M.J., JEGAL, K.H., KIM, Y.W., LEE, J.R., KU, S.K., CHO, I.J., KI, S.H. (2013). O-methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF- κ B activation. *Food and Chemical Technology*, 59: 362-372.
- YANG, J.H., KIM, S.C., KIM, K.M., JANG, C.H., CHO, S.S., KIM, S.J., KU, S.K., KI, S.H. (2016). Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress. *European Journal of Pharmacology*, 783: 92-102.
- YASUKAWA, K., SEKINE, H., TAKIDO, M. (1989) Two flavonol glycosides from *Lysimachia fortunei*. *Phytochemistry*, 28: 2215-2216.
- YU, L., WANG, S., CHEN, X., YANG, H., LI, X., XU, Y., ZHU, X. (2015) Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A β ₁₋₄₂-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 121: 104-109.

- WAGNER, H., HÖRHAMMER, L., KIRALY, I.C. (1970) Flavon-C-glykoside in *Croton zambezicus*. *Phytochemistry*, 9 : 897.
- WANG, J., GAO, H., ZHAO, J., WANG, Q., ZHOU, L., HAN, J., YU, Z., YANG, F. (2010) Preparative separation of Phenolic compounds from *Halimodendron halodendron* by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Molecules*, 15: 5998-6007.
- ZOU, G.-A., SU, Z.-H., ZHANG, H.-W., WANG, Y., YANG, J.-S., ZOU, Z.-M. (2010) Flavonoids from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules*, 15: 1097-1102.
- ZOU, G.A., AISA, H.A., SHANG, H.W., YANG, J.S., ZOU, Z.M., SHAKHIDOYATOV, K.M. (2012) Flavonoids from *Croton laevigatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48 (4): 687-688.

Capítulo III – Acilação Enzimática de Flavonoides

Resumo

Os flavonoides, embora possuam várias atividades biológicas, podem apresentar baixa estabilidade e biodisponibilidade, o que limitaria seu uso para fins medicinais. Com a acilação, as substâncias tendem a aumentar sua lipossolubilidade, promovendo maior estabilidade, o que resulta numa melhoria em suas atividades biológicas.

Com a detecção de flavonoides acilados nos extratos metanólicos de *C. urucurana* e *C. floribundus*, pensou-se em verificar o potencial dos extratos proteicos de suas folhas jovens, utilizando-os como sistema enzimático para promover a acilação de flavonoides glicosilados utilizados como substratos de reação.

Folhas jovens colhidas e mantidas em N₂ líquido foram trituradas e extraídas com tampão de extração. O extrato proteico concentrado teve seu teor de proteínas determinado. Como agente acilante foi utilizado o composto comercial *p*-cumaroil-CoA, além de uma mistura de ácido *p*-cumárico, Coenzima A e ATP, com a premissa da produção de *p*-cumaroil-CoA pela atividade de *p*-cumarato CoA ligase presente nos extratos proteicos. Os seguintes substratos foram utilizados: quercetina-3-*O*-glucosídeo, kaempferol-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-galactosídeo e quercetina-7-*O*-glucosídeo, diferindo na posição e tipo de açúcar ligado ao flavonoide.

O extrato proteico de *C. urucurana* foi capaz de acilar os flavonoides monoglicosilados na posição 3 (kaempferol-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-glucosídeo e quercetina-3-*O*-galactosídeo), porém não na posição 7 (quercetina-7-*O*-glucosídeo). Isso sugere que as aciltransferases dessas espécies são regiosseletivas. A acilação ocorreu tanto com o *p*-cumaroil-CoA comercial quanto com a uma mistura de ácido *p*-cumárico, Coenzima A e ATP como agentes acilantes. Entretanto, o extrato de *C. floribundus* foi capaz de acilar somente kaempferol-3-*O*-glucosídeo, mas não a quercetina-3-*O*-glucosídeo.

Esses dados demonstram que os extratos das espécies de *Croton* podem ser usados como sistemas enzimáticos para a acilação de flavonoides, aumentando sua estabilidade e biodisponibilidade, e contribuindo para potenciais atividades biológicas de interesse medicinal.

Abstract

Many flavonoids have biologic activity, but their stability and bioavailability may be low, a fact that limits their use medicinally. Acylation increases liposolubility and thus their stability and bioavailability.

Because acylated flavonoids were detected in extracts of *Croton floribundus* and *C. urucurana* it was hypothesized that their leaf protein extracts could be used enzymatic systems for acylation of glycosylated flavonoids to be used as reaction substrates.

Young leaves of both species were collected and maintained in liquid N₂ with extraction buffer. The protein extract was concentrated and its content of proteins determined. Reaction solutions were prepared containing commercial *p*-coumaroyl-CoA and a mix of *p*-coumaric acid plus Coenzyme A and ATP, with the assumption that this mix could yield *p*-coumaroyl-CoA by means of the activity of *p*-coumarate-CoA ligase present in the protein extracts. The following flavonoids were added as substrates to the reaction solution: quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-7-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-galactoside and quercetagenin-7-*O*-glucoside. The list of flavonoids was planned to evaluate the influence of distinct aglycones, sugars and positions of attachment.

The enzymatic extract of *C. urucurana* was effective at acylating flavonols glycosylated at the 3-position (kaempferol-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-galactoside), but not at the 7-position (quercetagenin-7-*O*-glucoside). This suggests that acyltransferases of *C. urucurana* is regioselective. Acylation was obtained with either *p*-coumaroyl-CoA or a mix of *p*-coumaric acid, Coenzyme A and ATP as acylating agents. On its turn, the enzymatic extract of *C. floribundus* acylated only kaempferol-3-*O*-glucoside.

The results indicate that protein extracts of *Croton* species have distinct acylating capabilities. The results suggest that enzymatic extracts of *Croton* may be considered for *in vitro* acylation of flavonoids, aiming at obtaining compounds with higher medicinal potentialities.

III.1.Introdução

III.1.1.Flavonoides acilados

A grande variedade estrutural dos flavonoides, que permite diversas atividades biológicas de interesse medicinal (como antibacteriana, anti-inflamatória, anticâncer, antioxidante, cicatrizante de ferimentos, anti-hipertensiva, entre outras), não é devida apenas a variedade de seus núcleos e do nível de hidroxilação das moléculas, mas também das diversas modificações moleculares possíveis. A mais comum é a adição de açúcares (ex: glicosilação) nos grupos hidroxilas ou diretamente nos núcleos, originando os flavonoides O- e C-glicosilados, respectivamente. Outras modificações possíveis são a metilação (adição de grupos metila) ou a isoprenilação (adição de grupos hidrofóbicos) nos grupos hidroxila ou no núcleo flavonoídico, a metilenação (adição de um grupo metileno em grupos orto-hidroxila), a dimerização, a formação de bissulfatos, e por fim, a acilação, isto é, a adição de grupos acila alifáticos ou aromáticos aos grupos hidroxilas dos açúcares de flavonoides glicosilados (MARKHAM, 1982; HAVSTEEN, 2002; DEWICK, 2009; VISKUPICOVÁ et al., 2009; WANG et al., 2010).

Entre os exemplos de flavonoides com essa modificação, destaca-se o tilirosídeo (kaempferol 3-O-β-D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo), encontrado em várias espécies de *Croton*, da família Euphorbiaceae (MATOS, 2011), a tricina-7-O-β-(6''-metoxicinâmico)-glucosídeo, encontrado em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2007), e o helicrisosídeo-3'-metil éter (isoramnetina-3-O-β-D-6''-cumaroil-glucopiranosídeo), encontrado em *Croton zambesicus* e *Croton pedicellatus* (ADEROGBA et al., 2011, LOPES et al., 2013, NDHLALA et al, 2013).

A acilação, em termos gerais, consiste na ligação de resíduos acila em grupos nucleofílicos (OH- ou NH-) de moléculas aceptoras, por meio de uma ligação éster. No caso específico de flavonoides, os grupos acila de uma molécula doadora-CoA são ligados por meio de reação de esterificação ou transesterificação aos açúcares dos glicosídeos, normalmente ocorrendo nos

últimos estágios da biossíntese de flavonoides (MARKHAM, 1982; VISKUPICOVÁ et al., 2009; YU et al., 2009).

Nas espécies vegetais, a acilação está envolvida no metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, assimilação de enxofre, catabolismo de clorofila e biossíntese dos reguladores de crescimento, auxina e etileno. A adição de um grupo acila aumenta a lipossolubilidade e a estabilidade dos compostos, e protege moléculas da degradação enzimática. O grupo acila também pode servir de sinal transmembrana para o acúmulo dos compostos modificados no vacúolo das células, onde funcionam como reserva de metabólitos para a resistência contra doenças ou outras respostas de defesa (YU et al, 2009).

No caso específico de flavonoides, a acilação com ácidos carboxílicos aromáticos melhorou a termoestabilidade e a resistência à luz de certos compostos, que por sua vez participam na proteção contra a luz UV e captura de radicais. A acilação alifática de antocianinas aumenta a sua hidrossolubilidade, estabilizando esses compostos. Estão envolvidos nas interações planta-inseto, nas quais atuam como fitoalexinas, estimulantes de oviposição, na atração de polinizadores e inibidores do apetite de insetos (VISKUPICOVÁ et al., 2009, BONTPART et al., 2015).

Em alguns casos, a acilação é um pré-requisito para o acúmulo de flavonoides, como no caso de antocianinas e da apigenina-7-O-(6-O-malonilglucosídeo) (ZHAO & DIXON, 2010), embora nas células vegetais, as agliconas, que normalmente apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, são glicosiladas para aumentar sua hidrofiliabilidade e permitir seu armazenamento nos vacúolos (MARKHAM, 1982, CHEBIL et al., 2006, CHEBIL et al., 2007).

Uma vez que grupos hidroxílicos e cetônicos, bem como as ligações insaturadas presentes nas estruturas dos flavonoides os tornam sensíveis à degradação, o uso medicinal desses compostos pode ser limitado, embora altamente desejado, devido às suas várias atividades biológicas. Esse fato limita a estabilidade e a solubilidade desses compostos nas fases aquosas e lipídicas durante os processamentos e armazenamentos (MELLOU et al., 2005; CHEBIL et al., 2006; CHEBIL et al., 2007; VISKUPICOVÁ et al., 2009; QIAO et al., 2014). Outro fator que pode limitar o uso de flavonoides é a questão de sua biodisponibilidade: embora os flavonoides glicosilados sejam mais solúveis em

meio aquoso, a forma mais comum nas espécies vegetais, ela apresenta menor biodisponibilidade, pois a substância perde os resíduos de açúcar ao chegar no intestino grosso. Isso permite a absorção da aglicona, porém não do glicosídeo (CARLO et al., 1999; VISKUPICOVÁ et al., 2008; CROZIER et al., 2010; THILAKARANTHNA & RUPASINGHE, 2013).

A acilação de flavonoides, ao aumentar a lipossolubilidade do composto, pode incrementar sua estabilidade e sua disponibilidade, melhorando suas atividades biológicas originais, como relatado por VISKUPICOVÁ et al. (2009) e ARAUJO et al. (2017). Esses autores demonstram que flavonoides acilados em geral apresentaram melhoria de atividade antioxidante, antiangiogênica, anticâncer e anti-inflamatória em comparação à suas formas não-aciladas.

III.1.2. Métodos de acilação

A acilação de flavonoides pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos (VISKUPICOVÁ et al., 2009; ARAUJO et al., 2007).

A desvantagem da acilação química está na necessidade de condições severas, que possam degradar os flavonoides utilizados como substrato. Nesse caso, serão necessárias várias etapas de proteção e desproteção dos grupos hidroxila fenólicos responsáveis por sua atividade antioxidante, o que aumenta a complexidade total do processo. Outro fator é a formação de produtos indesejáveis devido à falta de regioseletividade da reação nessas condições (MOZHAEV et al., 1998; CHEBIL et al., 2006; VISKUPICOVÁ et al., 2009; WANG et al., 2010; ARAUJO et al., 2017).

Uma opção para evitar esses problemas é a acilação enzimática (MOZHAEV et al., 1998; KONTOGIANNI et al., 2001, 2003; ISHIHARA & NAKAJIMA, 2003; CHEBIL et al., 2006; MELLOU et al., 2006; WANG et al., 2010; KUMAR et al., 2016; ARAUJO et al., 2017), na qual são utilizadas enzimas, que agem como biocatalisadores para acilar os compostos de interesse, processo esse chamado de biotransformação (POLLIER et al., 2011; NAKAJIMA et al., 2000)

A vantagem da acilação enzimática em relação à acilação química é a regioseletividade obtida. Dessa maneira, a acilação ocorre em posições específicas da molécula, como nos açúcares dos flavonoides glicosilados, além

de condições mais amenas de reação, que previne a degradação dos substratos (WANG et al., 2010).

STEVENSON et al. (2006) verificaram que a preferência na acilação de flavonoides de extratos de mirtilo (blueberry), usando como agentes acilantes, os ácidos palmítico, cinâmico e fenilpropionico e a enzima lipase B de *Candida antartica* (Novozym 435) como biocatalisador, foi por flavonoides glucosilados com um grupo hidroxila alifático primário no açúcar. Isso demonstrou a regioseletividade da acilação enzimática.

Embora os primeiros estudos de acilação enzimática utilizassem a subtilisina de *Bacillus licheniformis* (ÇALIS et al., 1995), uma protease, atualmente a lipase B de *Candida antartica*, uma carboxil-esterase pertencente a classe das serina hidrolases, é a mais largamente utilizada. Em condições normais, as lipases catalisam a hidrólise de ligações éster, enquanto sob condições específicas, realizam a reação inversa, levando à esterificação. Esse fato permite o uso de lipases para a biocatálise de reações de modificação molecular, incluindo a acilação, por apresentar alta enantiosseletividade e regioseletividade, aceitação de vários substratos, tolerância a meios não-aquosos e resistência a inativação térmica (WANG et al., 2010; ARAUJO et al., 2017). Sob condições adequadas, essa enzima apresentou alto rendimento na acilação da rutina e narigenina com éster metílico de ácido palmítico (PASSICOS et al., 2004).

Além das lipases, as esterases e as proteases, outras enzimas hidrolíticas, podem ser utilizadas para essa reação, não somente pelo seu baixo custo, grande disponibilidade, químio-, regio- e enantiosseletividade, mas também por suas condições brandas de reação e a não necessidade de cofatores (STEVENSON et al., 2006; VISKUPICOVÁ et al., 2009; WANG et al., 2010).

Nas plantas, a reação de acilação é realizada por enzimas chamadas de aciltransferases, que utilizam moléculas doadoras de grupo acil “energéticas”. Elas são divididas em duas famílias principais: BAHD-transferases, que utilizam tioésteres da acil-CoA como moléculas doadoras, e SCPL (Serine CarboxylPeptidase-like) – transferase, que utiliza ésteres da 1-O-β-glucose (BONTPART et al., 2005).

Essas enzimas estão envolvidas na biossíntese de uma gama de produtos naturais incluindo ésteres voláteis, antocianinas modificadas e fitoalexinas (FERRER et al., 2008).

Embora tenham sido relatados casos em que a acilação de antocianinas foi realizada por enzimas do tipo SCPL-transferases, a maioria dos estudos relata enzimas do tipo BAHD-transferase como as responsáveis pela acilação de flavonoides nas plantas (BONTPART et al., 2015).

Essas aciltransferases formam uma superfamília de proteínas, conhecida como BAHD, devido às quatro primeiras enzimas identificadas da família [Benzil álcool O-aciltransferase (BEAT) de *Clarkia breweri*; Antocianina O-hidroxicinamoil-transferase (AHCT) de *Gentiana triflora*; Antronilato N-hidroxicinamoil/benzoil-transferase (HCBT) de *Dianthus caryophyllus*; e Deacetilvindolina 4-O-acetil-transferase (DAT) de *Catharanthus roseus*]. A maioria das enzimas identificadas se divide em duas subfamílias funcionais: álcool transferases, que formam ésteres voláteis de acetato (acetate esters), e antocianidinas/flavonoide aciltransferases, que modificam polifenóis, e são, principalmente, as maloniltransferases e as hidroxicinamoiltransferases (D'AURIA, 2006; YU et al., 2009 ; BONTPART et al., 2015).

Embora as aciltransferases precisem de quantidades estequiométricas de ATP para realizar as reações (KONTOGIANNI et al., 2001), elas parecem apresentar especificidade do tipo acil-CoA. As aciltransferases caracterizadas até o momento são divididas em aciltransferases aromáticas, que transferem grupos *p*-cumaroil, e aciltransferases alifáticas, que transferem grupos malonil. Apresentam também especificidade da posição da glucose no flavonoide e da posição da hidroxila no açúcar (BONTPART et al., 2015).

De acordo com NAKAJIMA et al. (2000), a utilização de extratos proteicos de células de cultura de *Ipomoea batatas* para a acilação de isoquercetrina e crisantemina com ácido cafeico para formar isoquercetrina 6''-O-cafeato e crisantemina 6''-O-cafeato, representa o uso de sistemas enzimáticos como alternativa às enzimas purificadas.

Enquanto enzimas purificadas realizam uma reação específica em um substrato específico, nos sistemas enzimáticos, a presença de várias enzimas permite a realização de reações em série para a obtenção de um ou vários produtos desejados (LOPEZ-GALLEGO & SCHMIDT-DANNETT, 2010). Isso

permite o uso de substratos como o ácido *p*-cumárico e a Coenzima A, que seriam convertidos pela enzima *p*-cumaroil-CoA ligase, presente no extrato enzimático, em *p*-cumaroil-CoA. Esta seria a molécula doadora do grupo acila para a reação de acilação pela aciltransferase presente.

III.1.3. *Croton*

Um indicador de espécies vegetais que podem ser usadas na obtenção de sistemas enzimáticos para acilação de flavonoides é a presença de flavonoides acilados em sua composição química. Um exemplo é o tilirosídeo (kaempferol 3-O-β-D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo), um derivado acilado do kaempferol, em que um resíduo de glicose está ligado à posição 3 do anel C, que por sua vez é ligado a um grupo *p*-cumaroil.

O tilirosídeo é encontrado em várias espécies de *Croton*, tais como, *Croton gnaphalii* (LENCINA et al., 2001) *C. tonkinensis* (GIANG et al., 2004), *C. sellowii* (PALMEIRA et al., 2006), *C. lobatus* (LAGNIKA et al., 2009), *C. caudatus* var. *tomentosus* (ZOU et al., 2010), *C. zambesicus* (ADEROGBA et al., 2011, NDHLALA et al., 2013), *Croton* cf. *pycnocephalus*, *Croton* cf. *montevidensis*, *C. hemargyreus*, *C. antisiphiliticus*, *C. grandivelum* (MATOS, 2011), *C. pedicellatus* (LOPES et al., 2012), *C. lundianus*, *C. glandulosus*, *C. campestris*, *C. triqueter* (OGASAWARA, 2012), *C. echinocarpus*, *C. vulnerarius* (ATHAYDE, 2013), *C. gratissimus* (NDHLALA et al., 2013), *C. dichrous*, *C. myrianthus*, *C. erithroxylodes*, *C. splendidus* (SAVIETTO et al., 2013), *C. pallidulus* var. *pallidulus* (SOARES, 2013), *C. andinus*, *C. argentinus*, *C. catamarcensis*, *C. cordobensis*, *C. curiosus*, *C. lachnostachyus*, *C. lanatus*, *C. saltensis*, *C. serratifolius* (FURLAN et al., 2015), como já citado no Capítulo II deste trabalho..

No capítulo anterior foi detectada a presença do tilirosídeo em *C.ururucana* e *C.floribundus*, o que abriu a possibilidade de investigar a utilização do extrato enzimático de folhas dessas espécies na busca de atividades enzimáticas para acilação de flavonoides de interesse.

III.2. Materiais e Métodos

III.2.1. Material botânico

Folhas das espécies de *Croton urucurana* Baill. e *Croton floribundus* Spreng. foram coletadas no Campus USP-SP nas coordenadas 23°56' sul e 46°74' oeste para a primeira e 23°55' sul e 46°74' oeste para a última, sendo o material mantido desde a coleta em N₂ líquido até a realização da extração.

As exsicatas das partes aéreas das espécies estudadas foram depositadas no Herbário SPF do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob os vouchers Oliani 1 - *Croton urucurana* e Oliani 2 - *Croton floribundus*. As identificações dos materiais foram feitas pela Dra Lucimar Barbosa da Motta, por meio de exsicatas depositadas no Herbário SPF.

III.2.2. Extração de Proteínas Totais

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com CESARINO et al. (2013), com algumas modificações. Para a extração de proteínas totais, folhas jovens das duas espécies foram trituradas em N₂ líquido e cerca de 1 g dos materiais foram transferidos para dois tubos Falcon de 50 mL pré-resfriados, nos quais foram adicionados, sob gelo, 6 mL de tampão de extração [tampão Tris-HCl (Tris Base: J.T.Baker® / HCl Synth®) pH 7.5 – 1M; DTT (Synth®) 100 mM, inibidor de protease cOmplete tablets; Mini EDTA-Free, EASY Pack Roche® 1%; polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma®) e água para completar 12 mL]. A mistura foi agitada em vórtex e incubada em gelo por 1 hora, invertendo os tubos a cada 10 minutos para prevenir a sedimentação do material. Após esse período, o material foi centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo os sobrenadantes transferidos para microtubos de 2 mL, e uma nova centrifugação a 4°C em 20.000 x g foi realizada para a remoção de material particulado remanescente.

Os sobrenadantes foram reunidos em tubo de concentração (colunas Vivaspin 6MWCO PES 10 kDa - GE- Healthcare) e centrifugados em 8.000 x g

até volume de 500 μ L. Os extratos obtidos foram mantidos em gelo (CESARINO et al., 2013).

A dosagem de proteínas totais dos extratos enzimáticos foi realizada pela reação com reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad®).

Após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro de placa BioTek® modelo Synergy H1 a 595 nm. A curva de calibração foi feita com diferentes concentrações de BSA (bovin serum albumin – Sigma/Aldrich®) e a concentração proteica das amostras foi calculada pela planilha eletrônica Microsoft® Excel.

III.2.3. Síntese combinatória com substrato por acilação enzimática

Uma mistura de reação contendo 100 mM do tampão Tris-HCl (Tris Base: J.T.Baker®/ HCl Synth®) pH 7,0; 1 mM DTT; 100 mM do agente acilante [*p*-cumaroil-CoA (TransMIT®) ou ácido *p*-cumárico (Sigma®) + CoEnzima A (Sigma®) + adenosina trifosfato (ATP) (Sigma®)] e 100 mM do substrato (kaempferol-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-glucosídeo, quercetina-3-*O*-galactosídeo e quercetina-7-*O*-glucosídeo) foi preparada em um microtubo de 1,5 mL. Ao final, foram acrescentados 10 μ g de proteínas totais, num volume final de reação de 100 μ L. Esse procedimento foi feito em triplicata. Alíquotas do extrato de proteínas totais, fervidas (100°C) por 10 minutos, foram utilizadas como controle negativo. As reações foram incubadas em termobloco Locus® a 30°C, “overnight”, sem agitação.

A reação foi encerrada ao ferver as amostras por 5 minutos. Foram, então, centrifugadas em centrifugador de mesa MiniSpin Interprise® para eliminação das proteínas desnaturadas. O sobrenadante foi transferido para um microtubo, e o solvente aquoso foi eliminado por meio de concentrador à vácuo Labconco® modelo Centrivap.

As amostras foram dissolvidas em 30 μ L de DMSO e enviadas para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

III.2.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Agilent 1200/1260, usando coluna Eclipse Plus C18 (4.6 x 150mm, 3.5 μ m). Como fase móvel, foi utilizada uma solução aquosa de ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), empregando-se o gradiente a seguir: 12% de B em A nos primeiros cinco minutos; elevação para 20% entre 5-8 min, mantendo isocrático por 20 minutos; 50% de B em A entre 28-38 min; 65% de B em A entre 38-48min, e 100% de B entre 48-50 min, mantendo isocrático por 5 min; redução para 12% de B em A entre 55-60 min. O fluxo foi de 0,4 mL/min, temperatura da coluna constante em 40°C, e a detecção realizada em 352 nm.

O sucesso da reação de acilação é verificado pela presença de uma Banda I ao redor de 310-320 nm no espectro UV/vis, característica de flavonóis glicosilados com grupo *p*-cumaroil, devido ao efeito hipsocrômico dos ácidos cinâmicos, enquanto que normalmente flavonoides glicosilados na posição 3 apresentam Banda I ao redor de 330-360 nm (MARKHAM, 1982; NEGRI et al., 2013). Tal banda estava ausente no controle negativo.

Nos casos em que o espectro UV/vis obtido em CLAE não permitiu uma avaliação segura devido à baixa abundância das bandas detectadas, as amostras foram submetidas à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS). Um total de 3 μ L de cada amostra foi injetado em um UPLC Acquity acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo TQD (Micromass-Waters, Manchester, England). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Waters Acquity C18-BEH (2.1 x 50 mm, 1,7 μ m) e gradiente de eluição variando inicialmente de 88% de água milli-Q com 0,1% de ácido fórmico (Solvente A) com 12% de acetonitrila (solvente B), para 100% do solvente B em 8 min, permanecendo nesse nível por 0,5 min, e retornando a condição inicial de 8,5 a 12 min. Foi utilizado um fluxo de 0,2 mL/min e temperatura da coluna de 30°C. O modo de íon negativo na ionização por eletrospray foi usado nas seguintes condições: capilar 3.0 kV e cone 30 V, temperatura da fonte de íons foi de 135°C e a temperatura de dessolvatação, de 300°C. O espectro MS/MS dos picos detectados foi obtido por dissociação induzida por colisão (CID) com energia de colisão de 35 V.

Devido o caráter ácido dos compostos fenólicos, foi utilizado o modo de ionização de íon negativo. O espectro MS/MS resultante foi analisado e comparado com o padrão calculado para os compostos esperados.

III.3. Resultados e Discussão

III.3.1. Seleção de fase de coleta

Foi escolhida *C. urucurana* para a avaliação de flavonoides acilados em folhas jovens e maduras, como descrito no item II.2.4 do capítulo II, a fim de serem realizados os ensaios de atividade enzimática. Essa comparação (Fig. III.1-2) mostrou que a folhas jovens e maduras dessa espécie apresentam perfis flavonoídicos semelhantes, como também o de flavonoides acilados. Visto que estes compostos podem ter se acumulado em folhas maduras ao longo do desenvolvimento e mesmo após um possível turnover das enzimas responsáveis, optou-se por utilizar folhas jovens para os ensaios subsequentes, a fim de garantir a presença de enzimas que estariam ativamente produzindo os flavonoides acilados.

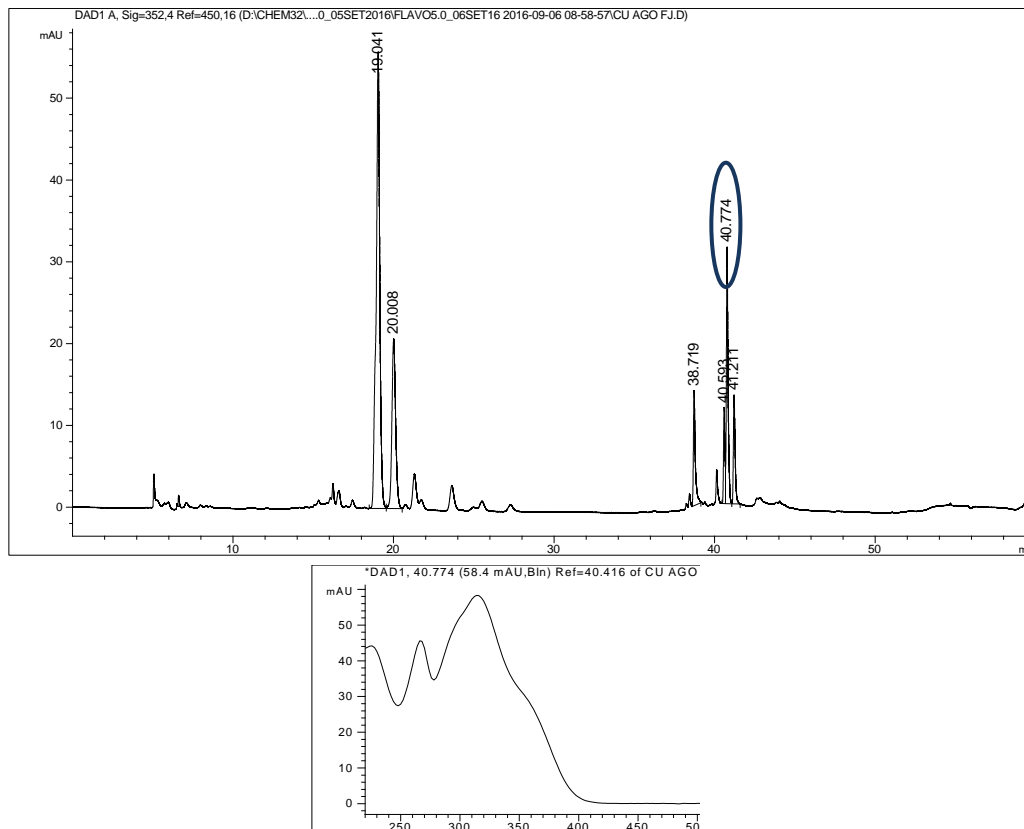


Fig III.1 – Cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE do extrato metanólico de folhas jovens de *C. urucurana*. A banda do composto acilado está em destaque.

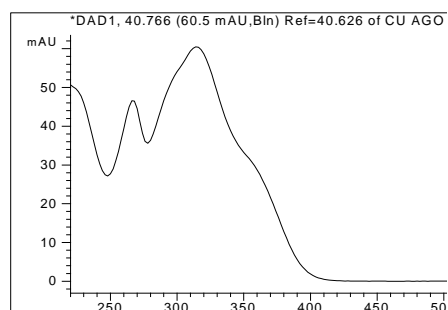
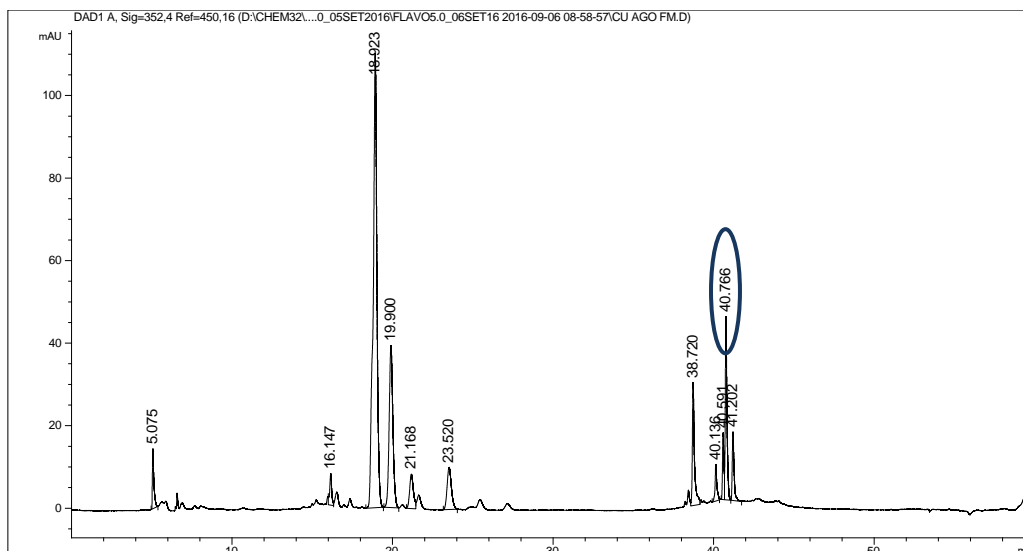


Fig III.2 – Cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE do extrato metanólico de folhas maduras de *C. urucurana*. A banda do composto acilado está em destaque.

III.3.2. Rendimento de extração enzimática

Com o intuito de identificar uma potencial atividade enzimática de acilação de flavonoides nos extratos proteicos de *C. urucurana* e *C. floribundus*, inicialmente foram extraídas proteínas totais de folhas jovens das duas espécies, sob diferentes condições. As concentrações obtidas pelo método de Bradford (ver Materiais e Métodos) foram relatadas na Tabela III.1.

Tabela III.1. Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em extratos de folhas jovens de *C.urucurana* e *C.floribundus*.

Massa fresca inicial	Volume de tampão de extração (mL)	Condições		Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	
		Coluna PD-10	Tubo concentrador	<i>C.floribundus</i>	<i>C.urucurana</i>
500 mg	5	–	--	0,058653	0,117059
500 mg	10	+	–	–	0,049000
500 mg	10	–	+	0,007410	0,535000
500 mg	10	+	+	0,050024	0,120024

Considerando-se os resultados mostrados na Tabela III.1, nota-se que mesmo após várias tentativas de otimização do protocolo de extração, o extrato de proteínas totais de *C. floribundus* apresentou concentração menor que o de *C. urucurana*, mesmo com o uso de tubo concentrador. Devido a esses resultados, foram concentrados esforços iniciais nos ensaios com extratos proteicos de *C. urucurana*.

III.3.3. Ensaio de atividade de aciltransferase em extratos de *Croton urucurana*

Como o objetivo do ensaio era verificar a capacidade de acilação de flavonoides no extrato proteico obtido, utilizou-se um tampão de extração que continha PVPP, que teve como finalidade quelar compostos fenólicos endógenos, evitando conclusões equivocadas ao final do ensaio.

Os dois flavonoides acilados encontrados neste trabalho, kaempferol 3-O- β -D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo (tilirosídeo) e helicrisosídeo-3'-metil éter, diferem entre si pela presença de uma metoxila e uma hidroxila no anel B no segundo composto, enquanto que o tilirosídeo só apresenta uma hidroxila no anel B. Devido a esse fato, os substratos utilizados nos ensaios enzimáticos foram flavonoides com uma ou duas hidroxilas no anel B, kaempferol-3-O-glucosídeo e quercetina-3-O-glucosídeo, respectivamente.

O objetivo era verificar não apenas a ocorrência de reação, mas também verificar a versatilidade da aciltransferase em relação à variação estrutural da aglicona, neste caso em número de hidroxilas.

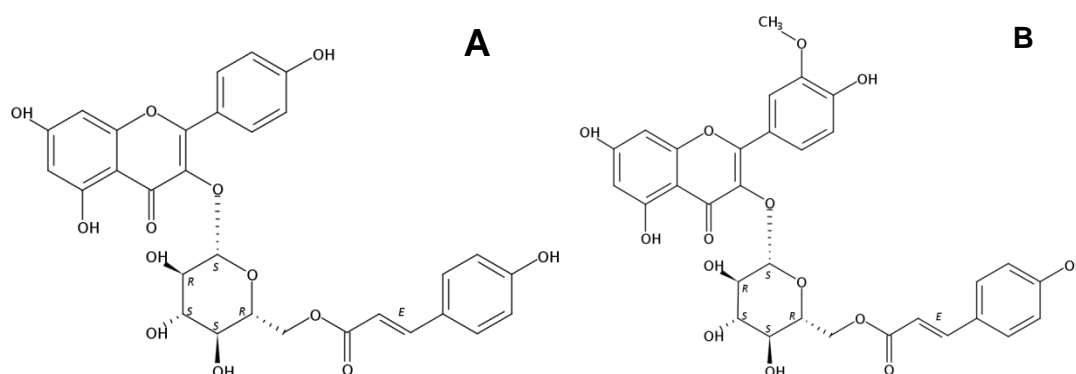


Figura III.3. Estruturas dos flavonoides acilados: tilirosídeo (A) e helicrisosídeo-3'-metil éter (B) encontrados em *C. urucurana* (A) e *C. floribundus* (A e B).

Com a finalidade de se detectar compostos fenólicos endógenos que poderiam agir como possíveis contaminantes das reações de acilação, foi realizada uma cromatografia por CLAE do extrato proteico das folhas jovens de *C. urucurana*. A Fig. III.4 demonstra a ausência de qualquer composto fenólico.

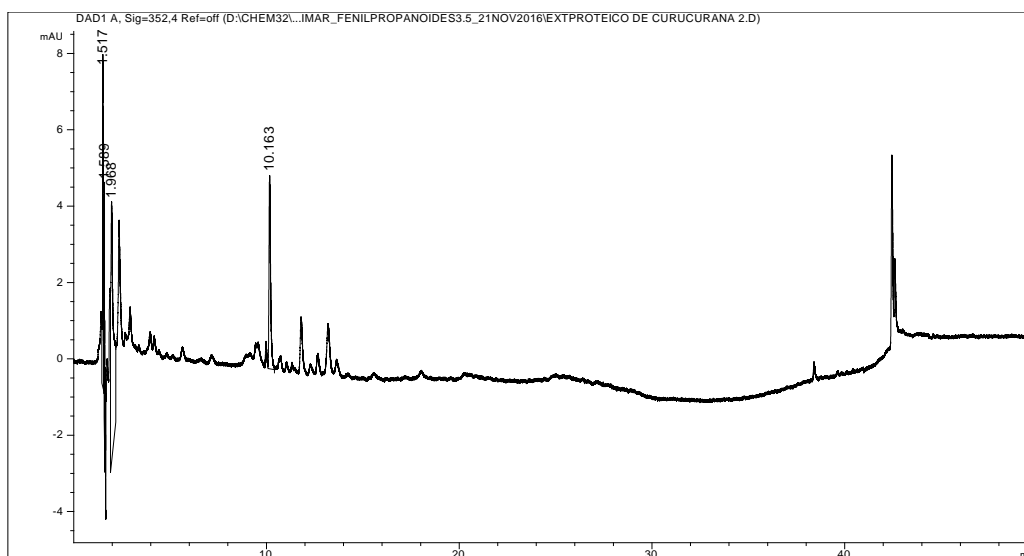


Figura III.4. Cromatograma obtido por CLAE do extrato proteico de *C. urucurana*.

Inicialmente, os ensaios foram realizados com o agente acilante *p*-cumaroil-CoA. Utilizando-se uma quantidade total de proteínas de 28 µg por reação, foi detectada uma banda com $T_R=29,25$ min nos cromatogramas obtidos por CLAE (Fig. III.5) nas duas triplicatas da reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e com $T_R=28,23$ min nas três triplicatas de reação com quercetina-3-O-glucosídeo (Fig. III.6), que não estavam presentes nos controles negativos.

A identificação da banda como sendo de um composto acilado foi baseada no espectro UV/vis em CLAE, que apresentou a banda I ao redor de 315 nm, característica de flavonóis glicosilados com grupo *p*-cumaroil. Esse dado contrasta com o espectro UV/vis de flavonoides glicosilados na posição 3 com banda ao redor de 350-360 nm (MARKHAM, 1982; NEGRI et al., 2013). O composto acilado resultante de kaempferol-3-O-glucosídeo, usado como substrato, pode ser comparado com o tempo de retenção do padrão de tiliosídeo (Fig. III.7) nas mesmas condições de CLAE.

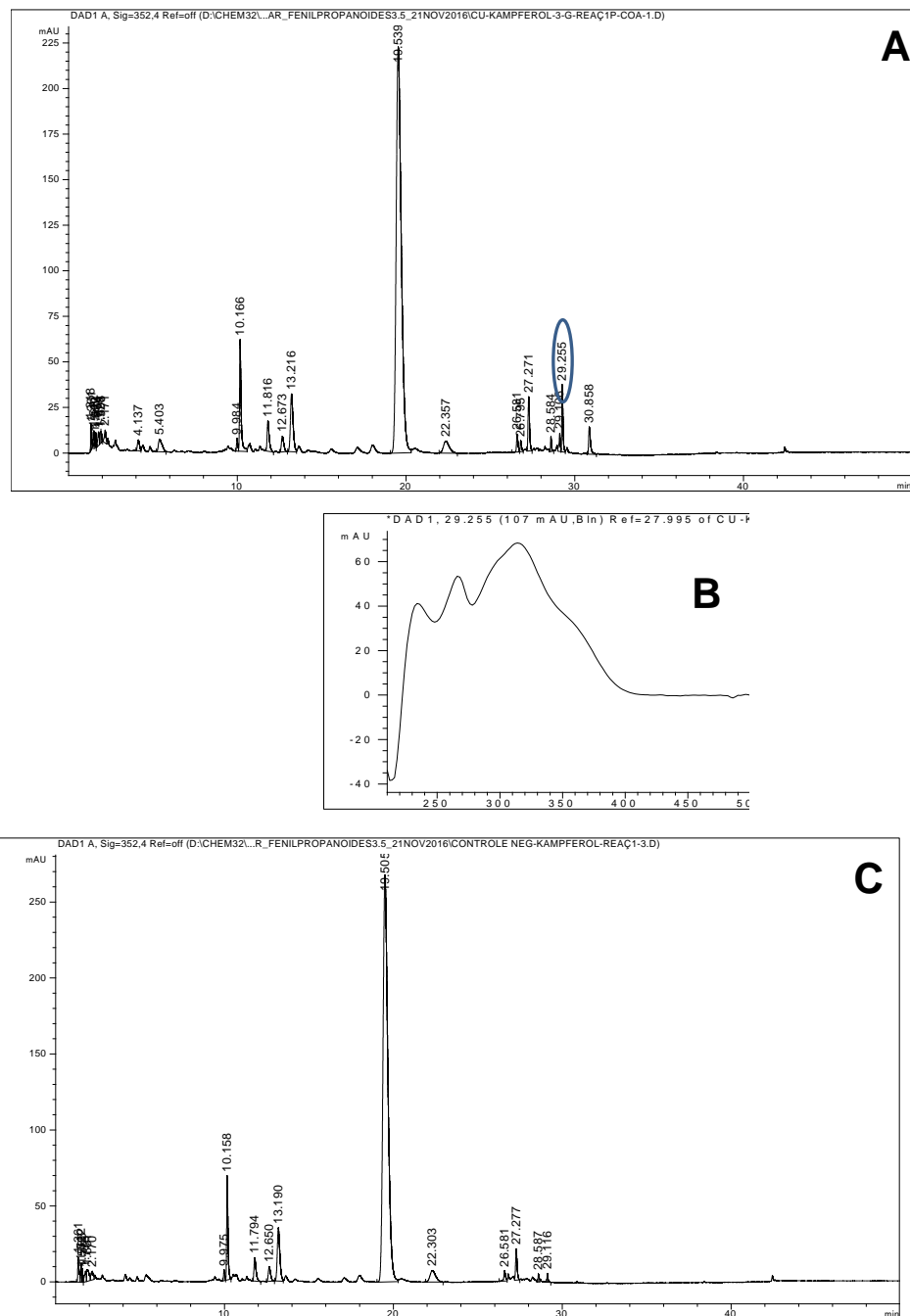


Figura III.5. – (A, B) Cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE do composto acilado (em destaque; TR=29,255 min), produto da reação enzimática do extrato proteico de *C.urucurana*, utilizando kaempferol-3-O-glucosídeo como substrato; (C) Cromatograma obtido por CLAE do controle negativo, mostrando a banda correspondente ao substrato, kaempferol-3-O-glucosídeo (TR=19,508 min).

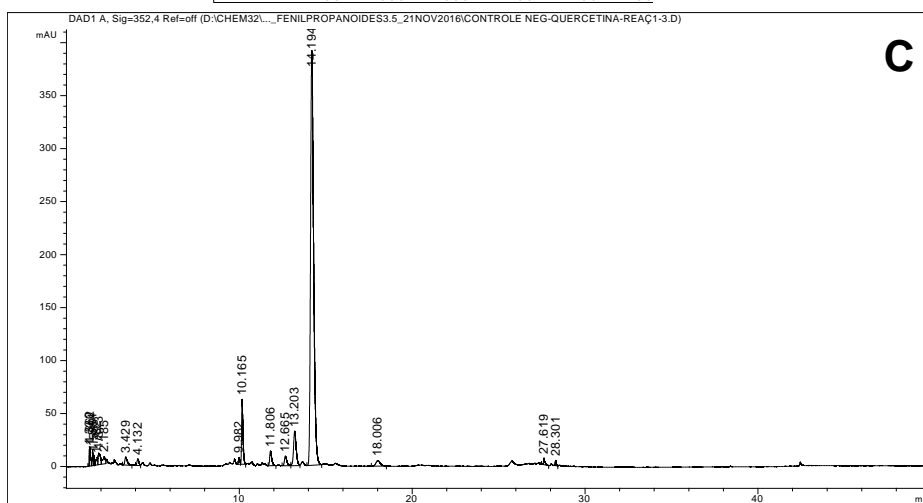
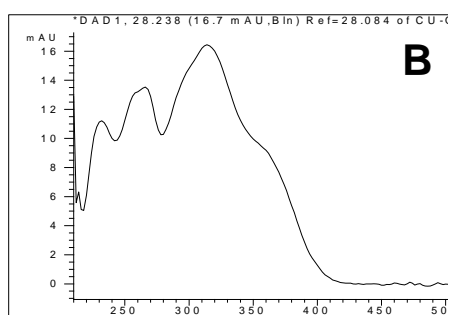
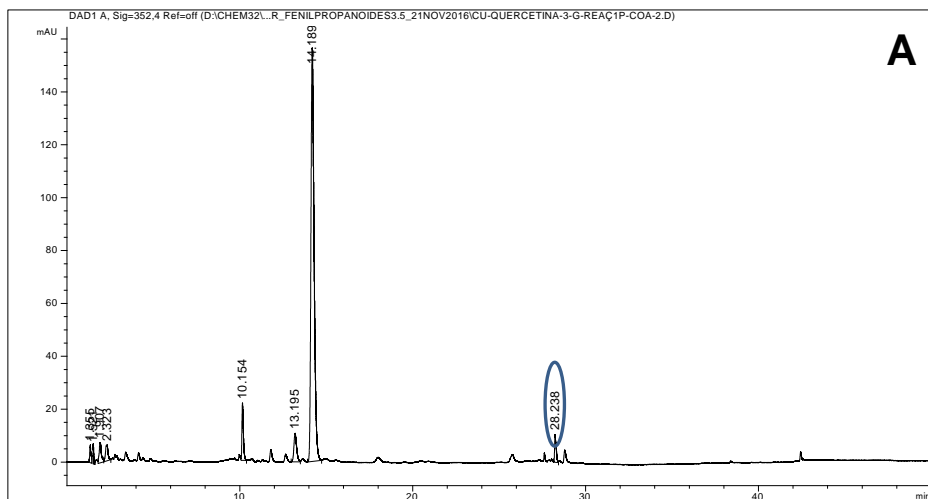


Figura III.6. – (A, B) Cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE do composto acilado (em destaque; TR=28,238 min), produto da reação enzimática do extrato proteico de *C.urucurana*, utilizando quercetina-3-O-glucosídeo como substrato; (C) Cromatograma obtido por CLAE do controle negativo, mostrando a banda correspondente ao substrato, quercetina-3-O-glucosídeo (TR=14,192 min).

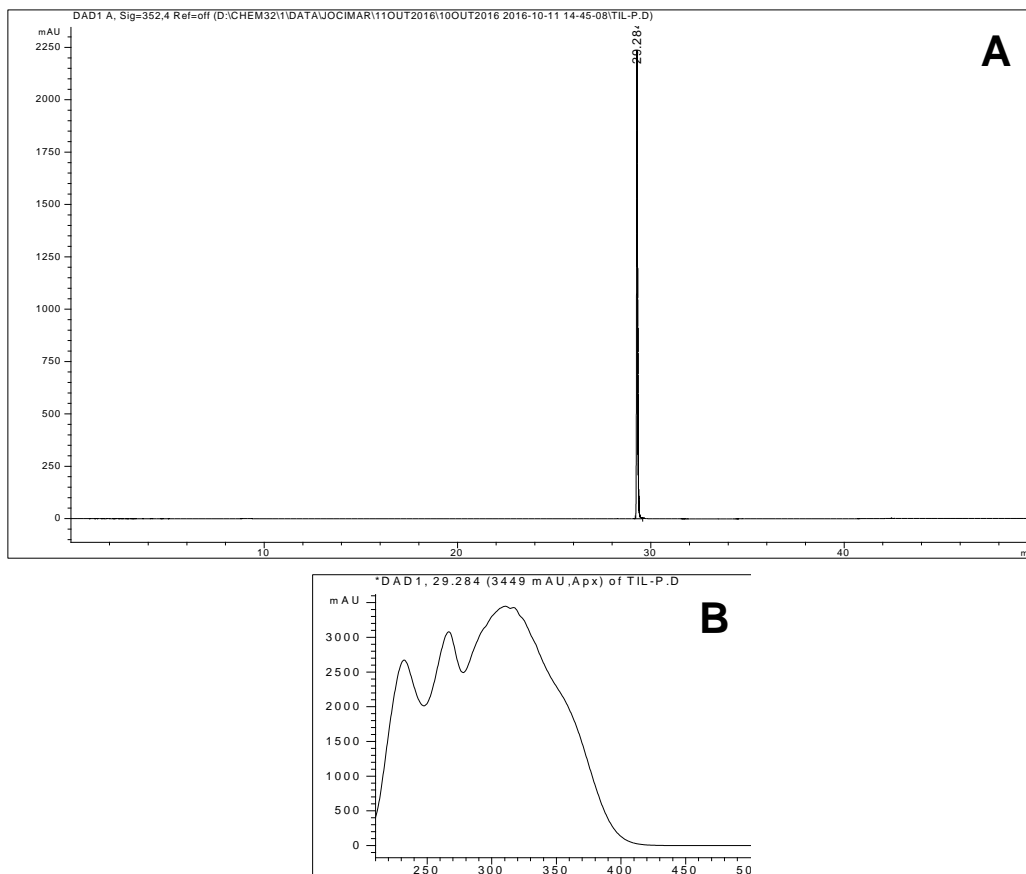


Figura III.7 - Cromatograma (A) e espectro UV/vis (B) do padrão de tilirosídeo ($T_R=29,284$ min), nas condições cromatográficas utilizadas para a reação enzimática.

Por meio desses resultados verificou-se a capacidade de acilação do extrato proteico de folhas jovens de *C.urucurana*, tanto com o kaempferol-3-O-glucosídeo quanto com a quercetina-3-O-glucosídeo, formando o tilirosídeo (Fig. III.5) e o provável flavonoide helicrisosídeo (quercetina 3-O- β -D-6''-O-cumaroil glucopiranosídeo, Fig. III.6), respectivamente. Isso é compatível com a detecção do tilirosídeo, isto é, a atividade de acilação de kaempferol-3-O-glucosídeo em extratos proteicos de folhas de *C. urucurana* é compatível com a detecção de tilirosídeo em extratos metanólicos de folhas da mesma espécie. O mesmo pode-se dizer da formação do helicrisosídeo, uma vez que outros derivados acilados foram detectados por CLAE em *C. urucurana*, mas em quantidades muito pequenas para serem isolados e um deles apresentava um espectro semelhante ao de uma aglicona com dois oxigênios no anel B (Banda II) e Banda I muito parecida com a dos derivados acilados.

Este resultado indica que para as aciltransferases envolvidas não há diferença em relação ao número de hidroxilas presentes no anel B do substrato flavonoídico.

Os compostos tilirosídeo e helicrisosídeo 3'-metil éter, descritos no Capítulo II, apresentam como grupo glicosilante, além do resíduo de açúcar, o ácido *p*-cumárico. Isso indica a alta probabilidade da aciltransferase envolvida ser uma BAHD-transferase aromática, o que nos levou a escolher como agente acilante *p*-cumaroil-CoA, um reagente comercial, para o primeiro ensaio de acilação. Porém, este é um composto caro, que precisa ser importado e com longo período de espera para entrega. Partindo da premissa de que o extrato proteico deveria conter também a *p*-cumarato CoA ligase, o ensaio foi repetido com uma mistura de ácido *p*-cumárico + CoA + ATP, a fim de se verificar a capacidade do extrato de, primeiramente, sintetizar o *p*-cumaroil-CoA, que seria posteriormente utilizado na reação pela BAHD-transferase.

Utilizando uma quantidade total de proteínas de 28 µg por reação foi detectada nos cromatogramas obtidos por CLAE (Fig. III.8) uma banda não presente nos controles negativos, ao redor de 29,26 min para duas triplicatas da reação com kaempferol-3-*O*-glucosídeo e ao redor de 28,23 min para três triplicatas de reação com quercetina-3-*O*-glucosídeo (Fig. III.9). Este resultado indica a capacidade do extrato proteico de *C. urucurana* em realizar, inicialmente, a reação para obtenção do *p*-cumaroil CoA (por meio de *p*-cumarato CoA ligase) e posteriormente a reação proporcionada pela aciltransferase, formando os flavonoides acilados. Essa reação combinada apresenta menor custo e maior facilidade de compra, o que pode facilitar a realização de futuros estudos.

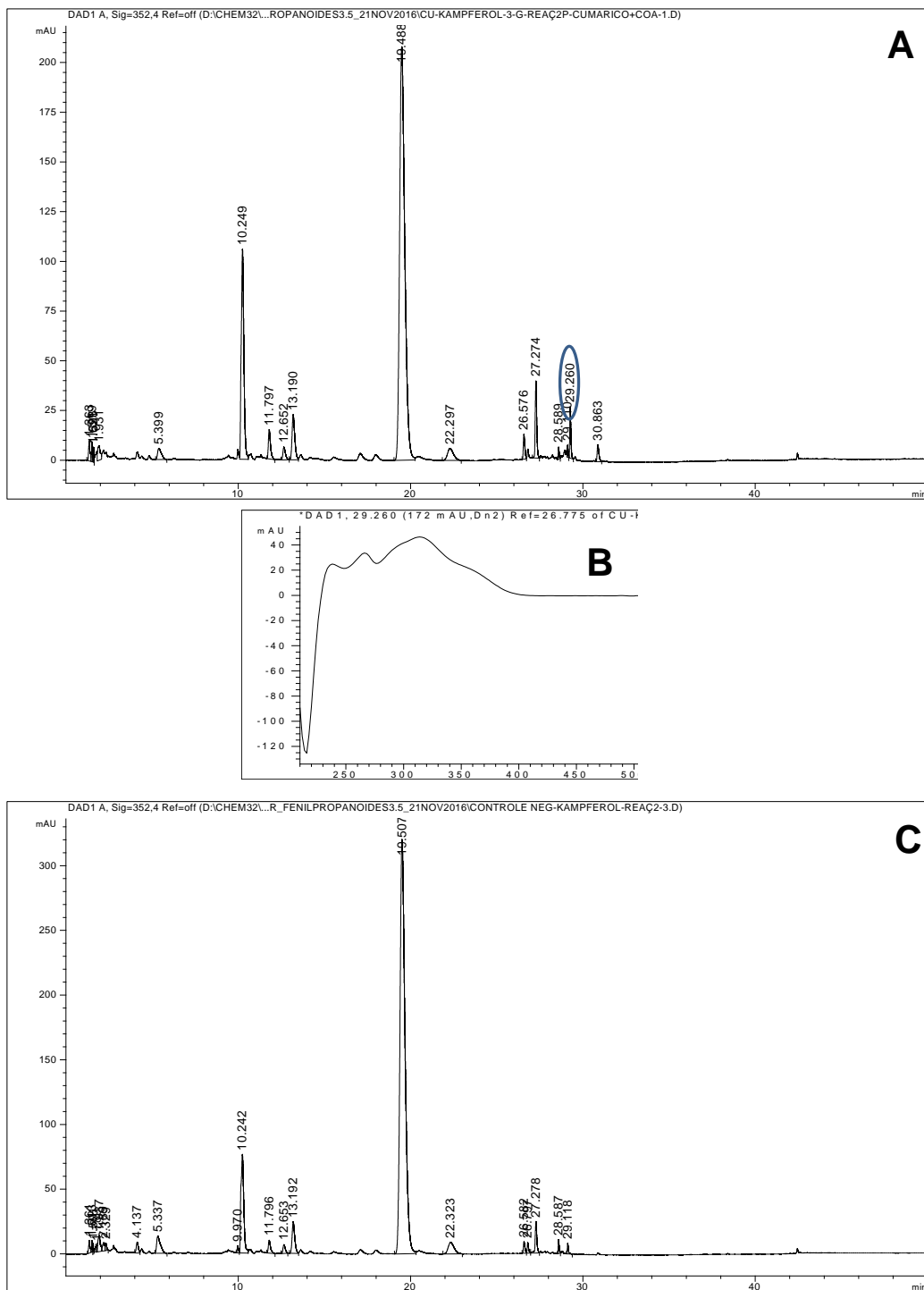


Figura III.8. (A, B) Cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE do composto acilado (em destaque; TR=29,260 min), produto da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C.urucurana*, utilizando como substrato, kaempferol-3-O-glucosídeo e como acilante, ácido *p*-cumárico + CoA; (C) Cromatograma obtido por CLAE do controle negativo, mostrando a banda correspondente ao kaempferol-3-O-glucosídeo (TR=19,507 min).

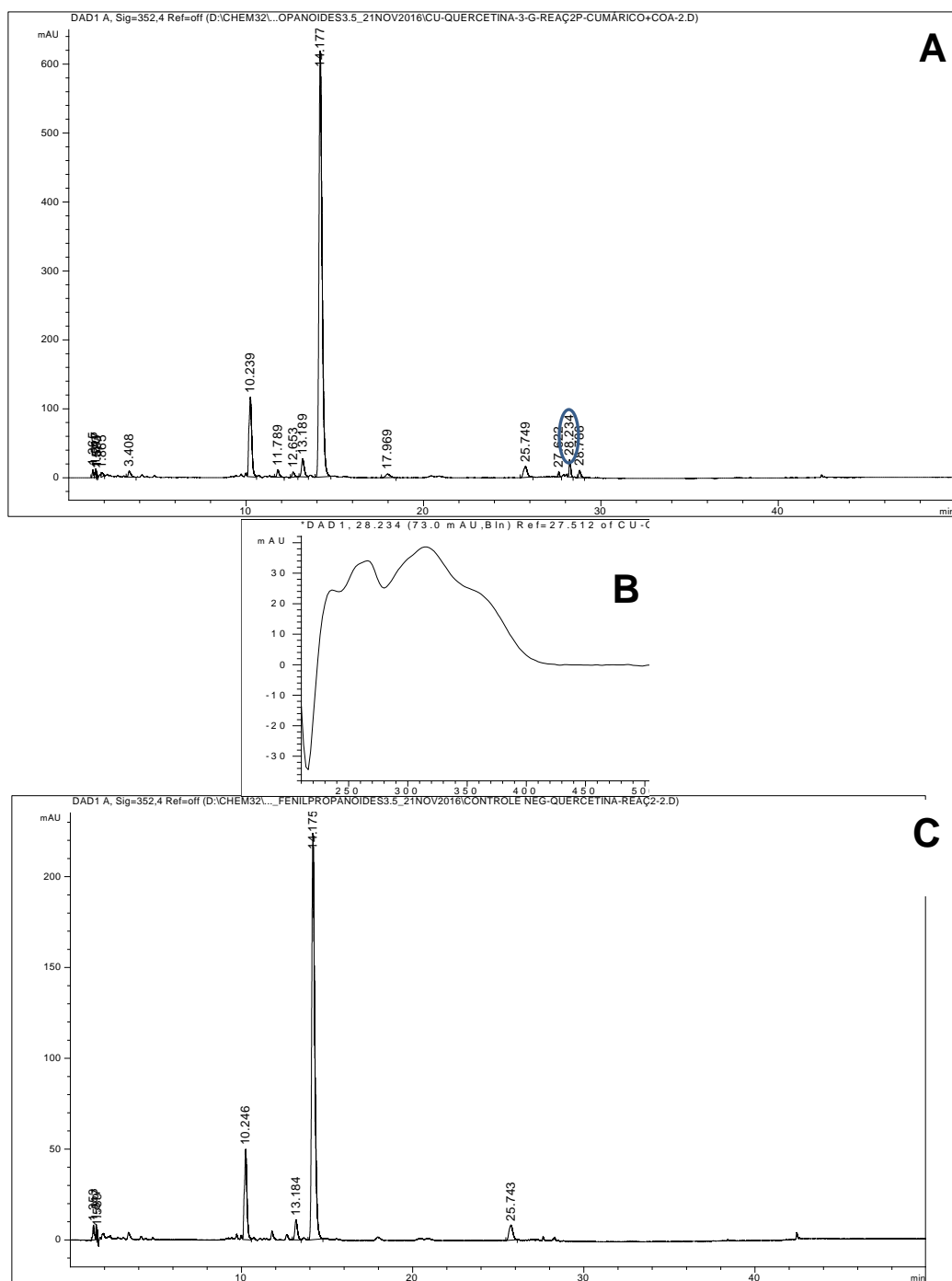


Figura III.9. - (A, B) Cromatograma e espectro UV/vis obtidos por CLAE do composto acilado (em destaque; TR=28,234 min), produto da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C.urucurana*, utilizando como substrato, quercetina-3-O-glucosídeo e como acilante, ácido *p*-cumárico + CoA; (C) Cromatograma obtido por CLAE do controle negativo, mostrando a banda correspondente à quercetina-3-O-glucosídeo (TR=14,175 min).

A fim de se verificar a influência da variação do resíduo de açúcar, bem como de sua posição de ligação ao flavonoide, na acilação dos substratos, foi feito um novo ensaio com o extrato proteico de *C.urucurana*, utilizando *p*-cumaroil-CoA como agente acilante e os seguintes substratos: kaempferol-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo (como controles positivos), quercetina-

3-*O*-galactosídeo (tendo galactose como resíduo de açúcar) e quercetagina-7-*O*-glucosídeo (com glucose ligada na posição 7 do núcleo aglicônico).

O sucesso da acilação, nesse experimento, foi avaliado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS). A identidade dos potenciais produtos formados foi verificada pela comparação com o tempo de retenção e o padrão de fragmentação projetado para o produto esperado, em comparação ao padrão de fragmentação do substrato.

No caso da reação com o kaempferol-3-*O*-glucosídeo (m/z 447), esperava-se o aparecimento de uma banda com tempo de retenção (T_R) maior que aquele do substrato e m/z de 593, referente à produção do tilirosídeo pela acilação com ácido *p*-cumárico (m/z 164) e perda de uma molécula de água (m/z 18). De fato, observou-se um pico com $T_R=2,98$ min e m/z de 593 nas reações com o extrato proteico de folhas jovens de *C. urucurana* (Fig. III.10), pico este não encontrado nas reações do controle negativo (extrato proteico fervido).

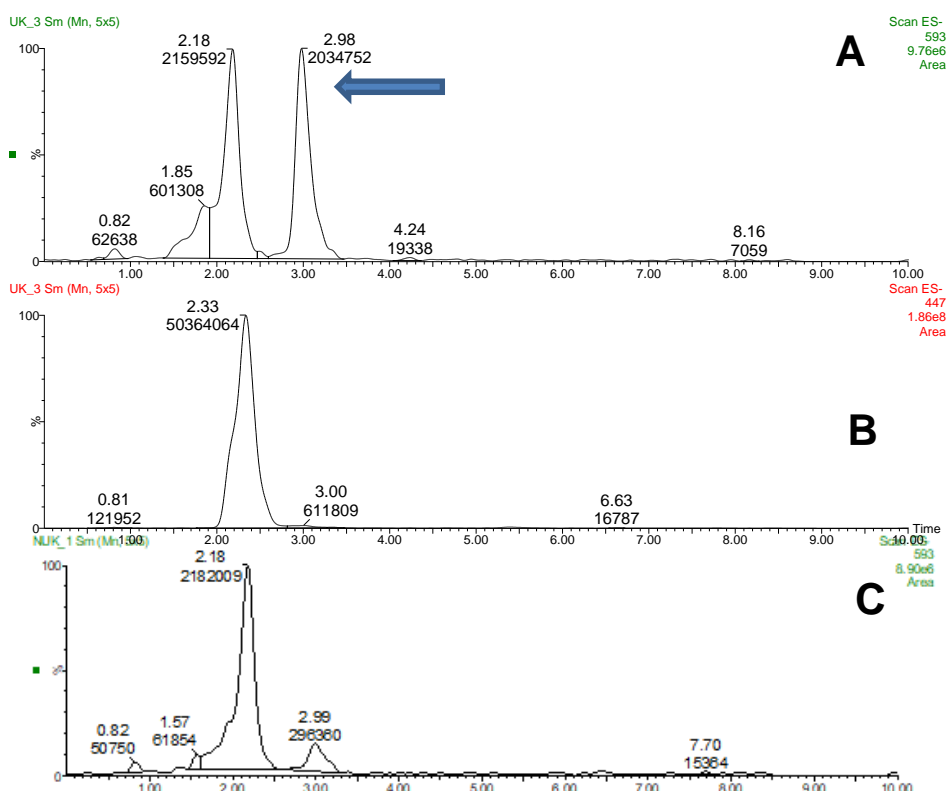


Figura III.10. - (A) Cromatograma por UPLC-MS do composto acilado (m/z 593) ($T_R=2,98$ min), produto da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C.urucurana*, utilizando como substrato kaempferol-3-*O*-glucosídeo e como acilante, *p*-cumaroil CoA; (B) Cromatograma obtido por UPLC-MS do substrato kaempferol-3-*O*-glucosídeo (m/z 447) ($T_R=2,33$ min); (C) Cromatograma obtido por UPLC-MS do controle negativo, mostrando a banda correspondente ao kaempferol-3-*O*-glucosídeo ($T_R=2,18$ min). A flecha indica o pico correspondente ao produto de acilação.

Ao ser analisada por espectrometria de massas MS/MS, a banda do provável produto apresentou os mesmos íons de fragmentação do substrato, kaempferol-3-O-glucosídeo (m/z 446; 284; 151), além do íon molecular do produto esperado, tilirosídeo (m/z 593) (Fig. III.11).

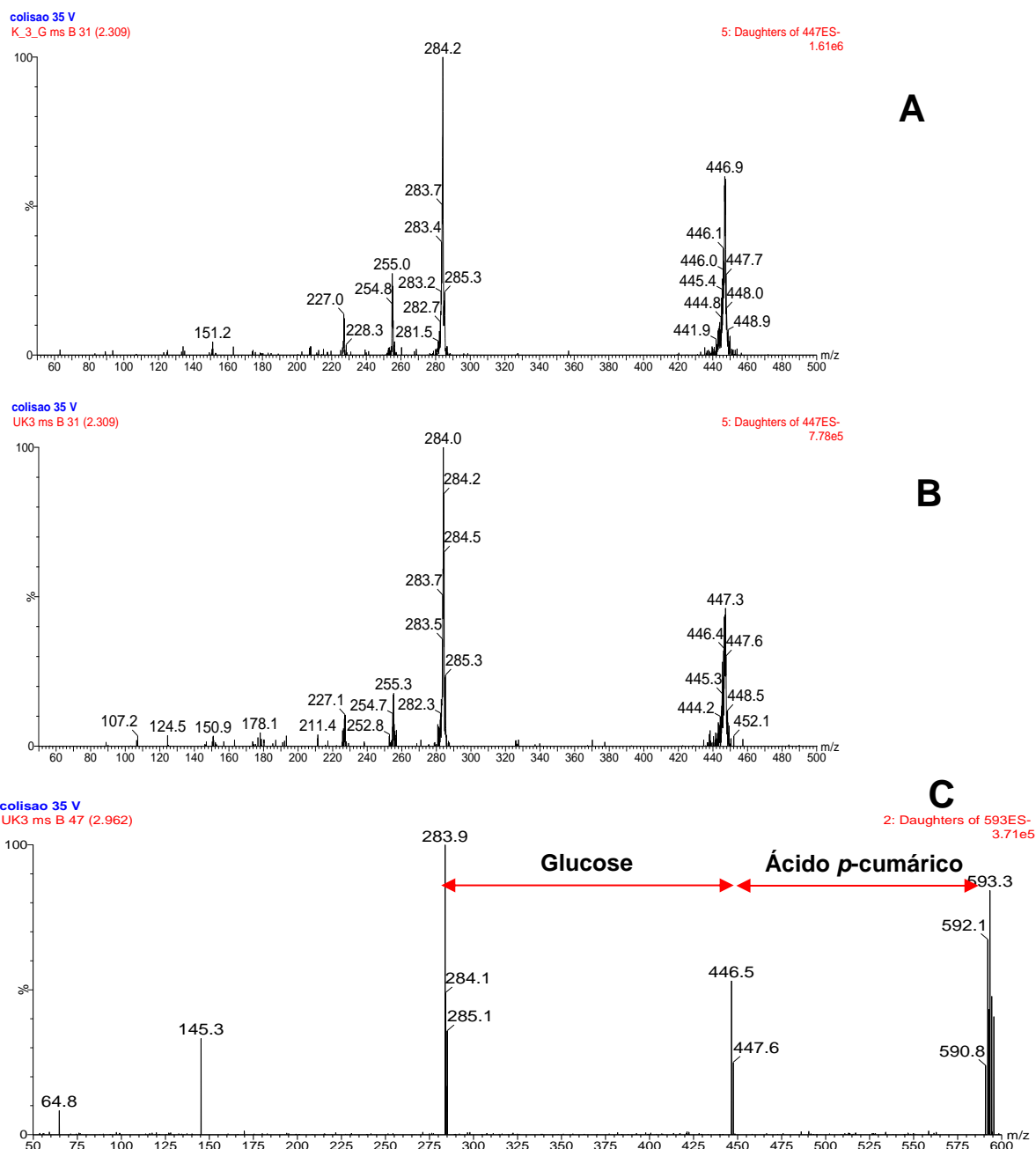


Figura III.11 – Espectros de massas da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C. urucurana*, tendo como substrato, kaempferol-3-O-glucosídeo e como acilante, *p*-cumaroil-CoA. (A) Espectro de massas do padrão; (B) Espectro de massas da banda de substrato na solução de reação; (C) Espectro de massas do produto obtido, apresentando também os fragmentos do substrato.

Na reação enzimática com a quercetina-3-O-glucosídeo (m/z 463), o produto esperado deveria ter m/z 609, devido à acilação com o ácido *p*-cumárico (m/z 164) e perda de uma molécula de água (m/z 18), além de um tempo de retenção (T_R) maior do que aquele do substrato. Esse resultado foi observado, detectando-se um pico com $T_R=2,75$ min nas reações com o extrato proteico de folhas jovens de *C. urucurana* (Fig.III.12-13). O mesmo não aconteceu com o controle negativo.

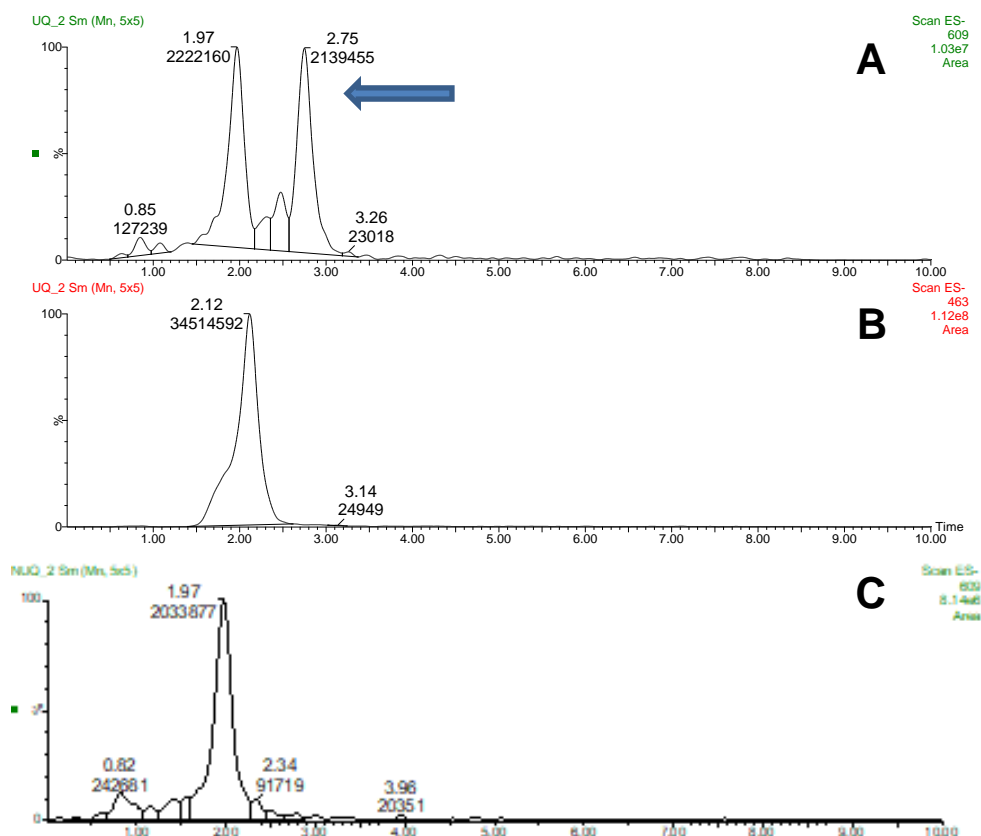


Figura III.12. - (A) Cromatograma por UPLC-MS do composto acilado (m/z 609) ($T_R=2,75$ min), produto da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C.urucurana*, utilizando como substrato, quercetina-3-O-glucosídeo e como acilante, *p*-cumaroil CoA; (B) Cromatograma por UPLC-MS correspondente à quercetina-3-O-glucosídeo (m/z 463). (C) Cromatograma obtido por UPLC-MS do controle negativo, mostrando a banda correspondente à quercetina-3-O-glucosídeo ($T_R=1,97$ min); A flecha indica o pico correspondente ao produto de acilação.

Os íons de fragmentação do padrão quercetina-3-O-glucosídeo (m/z 463; 300; 179), além do íon molecular do produto esperado (m/z 609) foram detectados ao se analisar a banda do provável produto por espectrometria de massas MS/MS (Fig. III.13).

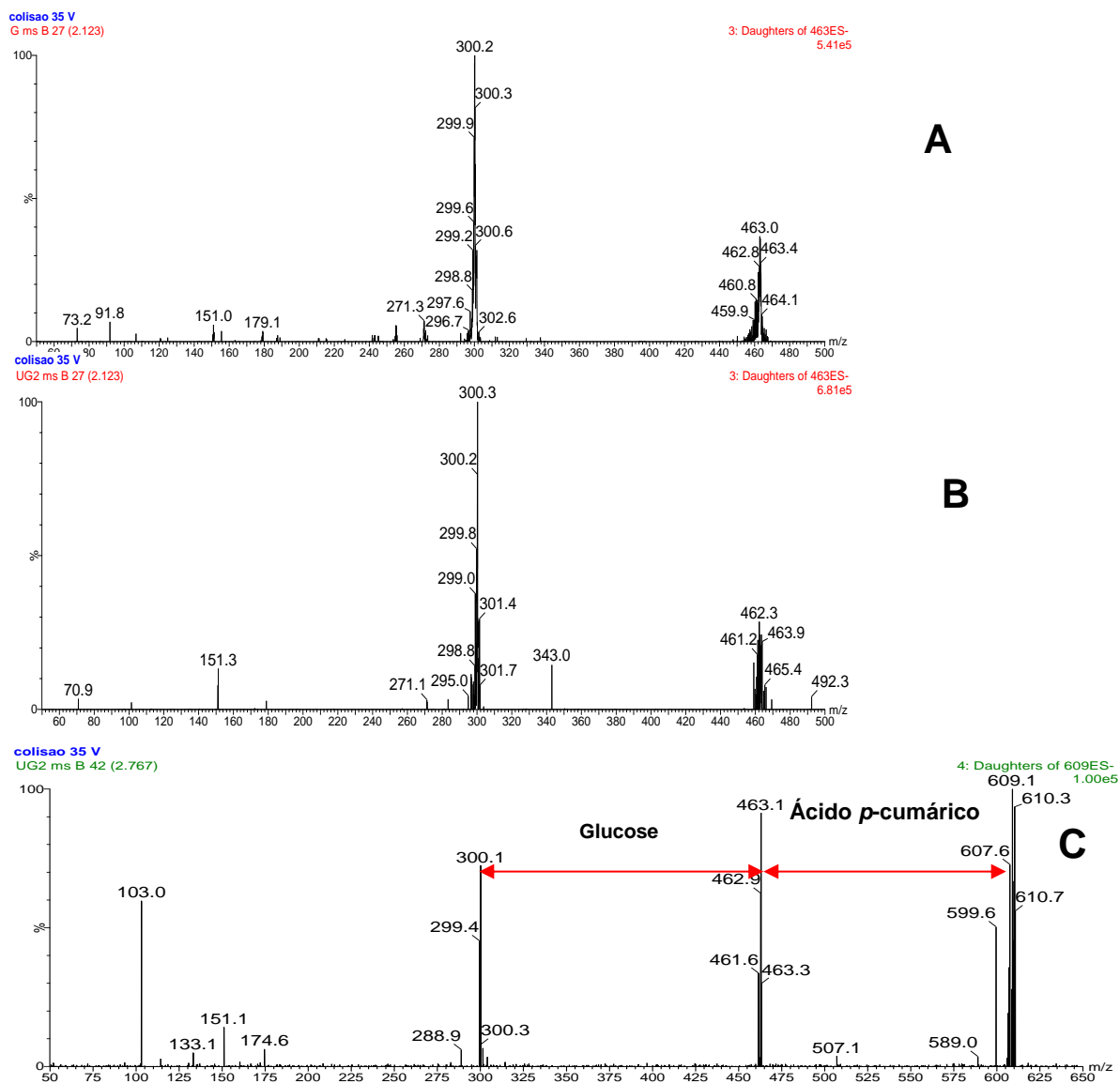


Figura III.13 – Espectros de massas da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C. urucurana*, tendo como substrato, quercetina-3-O-glucosídeo e como acilante, *p*-cumaroil-CoA. (A) Espectro de massas do padrão; (B) Espectro de massas da banda de substrato na solução de reação; (C) Espectro de massas do produto obtido, apresentando também os fragmentos do substrato.

Com a quercetina-3-O-galactosídeo (m/z 463) como substrato, após a acilação com ácido *p*-cumárico (m/z 164) e perda de uma molécula de água

(m/z 18), o produto esperado deveria apresentar uma banda com m/z 609 e tempo de tempo de retenção (T_R) maior que aquele do substrato. Foi constatado o aparecimento de uma banda com $T_R=2,77$ min e m/z de 609 nas reações com o extrato proteico de folhas jovens de *C. urucurana* (Fig. III.14). O mesmo não aconteceu com o controle negativo.

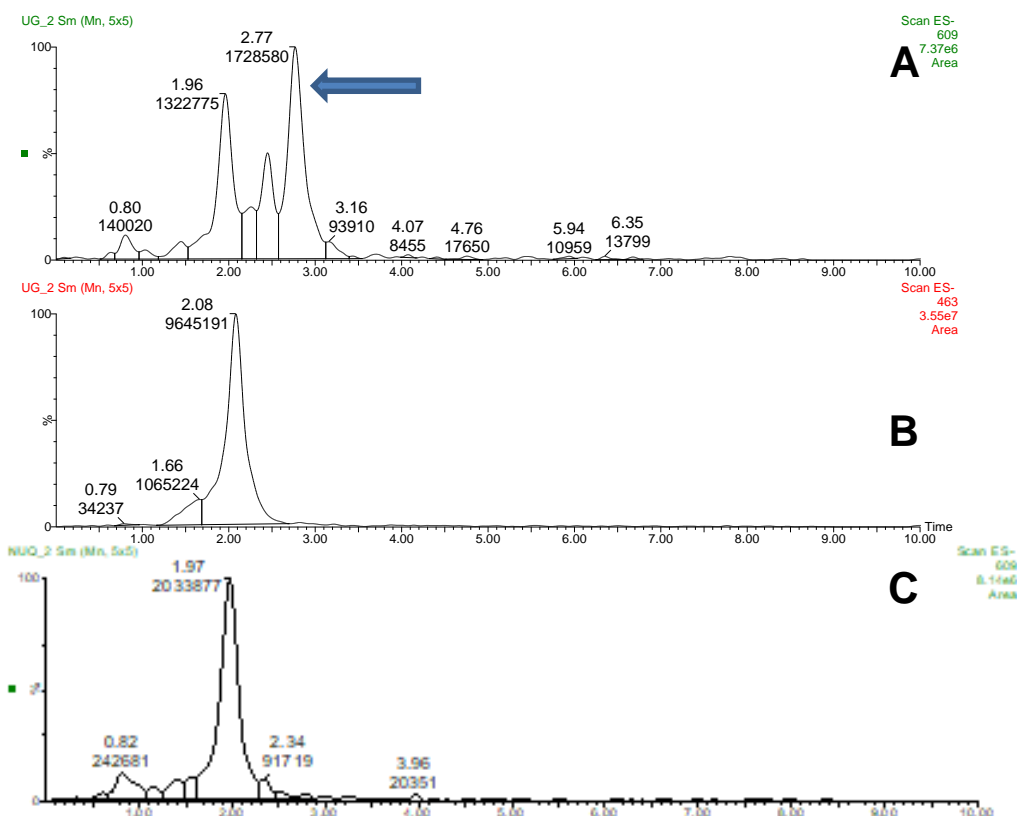


Figura III.14. - (A) Cromatograma por UPLC-MS do composto acilado (m/z 609) ($T_R=2,77$ min), produto da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C.urucurana*, utilizando como substrato quercetina-3-O-galactosídeo e como agente acilante, *p*-cumaroil CoA; (B) Cromatograma por UPLC-MS correspondente à quercetina-3-O-galactosídeo; (C) Cromatograma obtido por UPLC-MS do controle negativo, mostrando a banda correspondente à quercetina-3-O-galactosídeo (m/z 463) ($T_R=1,97$ min); A flecha indica o pico correspondente ao produto de acilação.

A análise do espectro de massas MS/MS da banda do provável produto apresentou o íon molecular desse composto (m/z 609) e os íons da fragmentação do padrão quercetina-3-O-galactosídeo (m/z 463; 300; 151). (Fig. III.15).

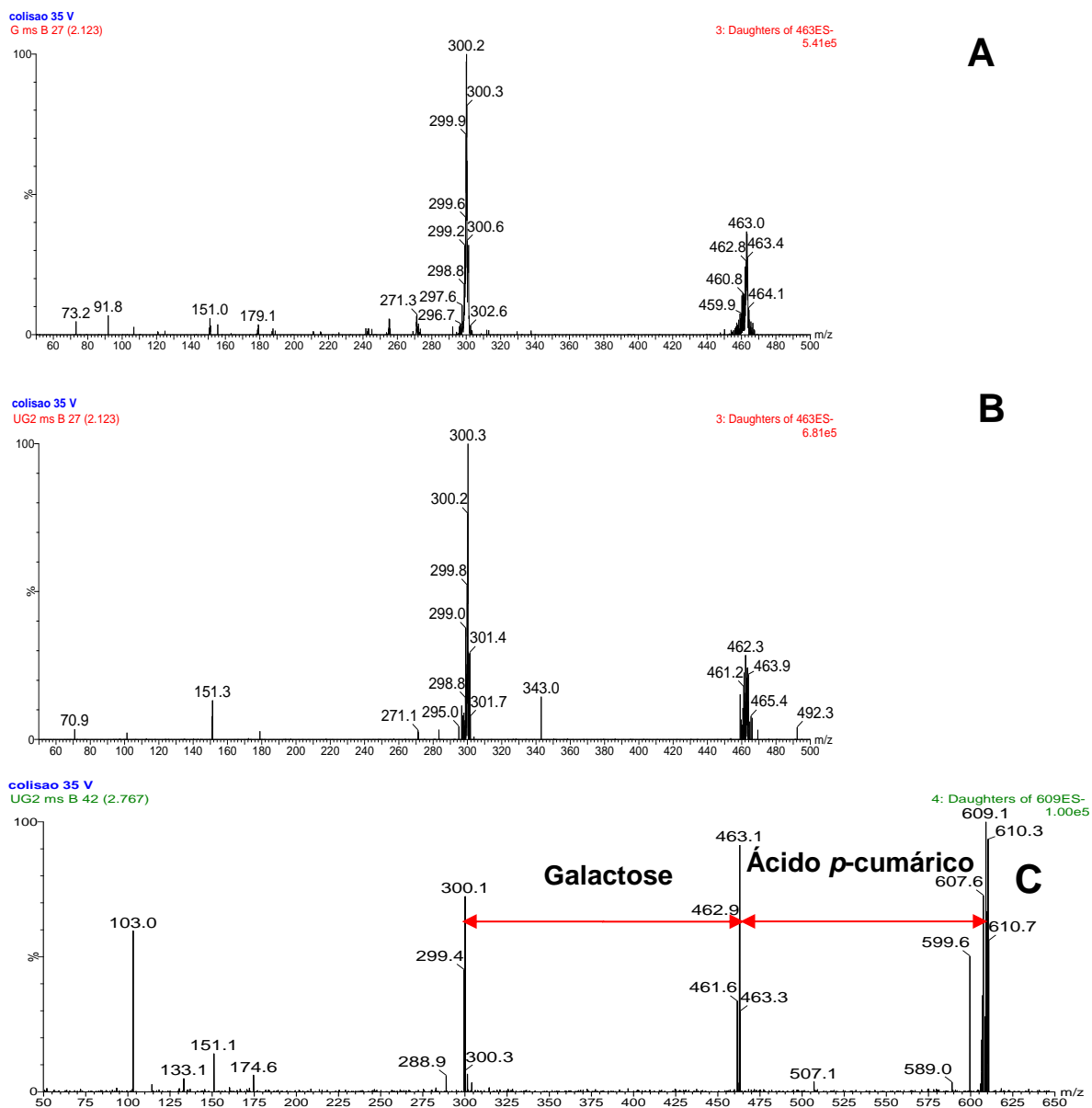


Figura III.15. - Espectros de massas da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C. urucurana*, tendo como substrato, quercetina-3-O-galactosídeo e como acilante, *p*-cumaroil-CoA. (A) Espectro de massas do padrão; (B) Espectro de massas da banda do substrato na solução de reação; (C) Espectro de massas do produto obtido, apresentando também os fragmentos do substrato.

No caso da quercetina-7-O-glucosídeo, não foi detectada evidência de reação (Fig III.16).

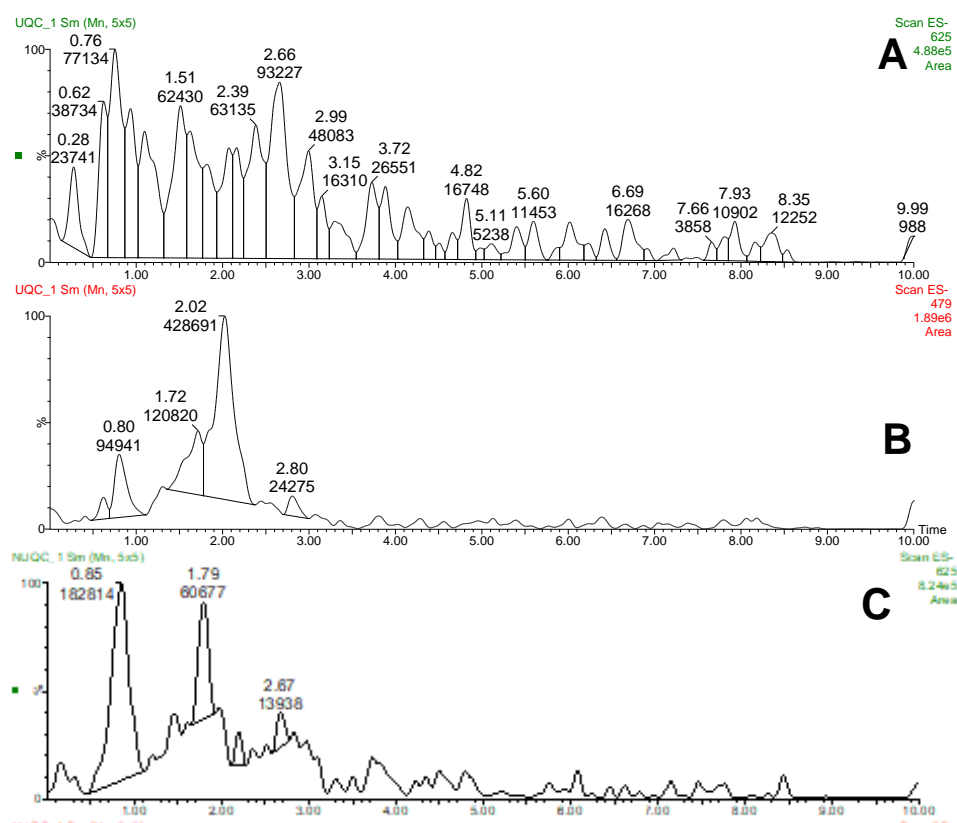


Figura III.16. - (A) Cromatograma por UPLC-MS da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C. urucurana*, utilizando como substrato, quercetagetina-7-O-glucosídeo e como acilante, *p*-cumaroil CoA. Não há evidência do produto de reação esperado; (B) Cromatogramas por UPLC-MS correspondente à quercetagetina-7-O-glucosídeo. (C) Cromatograma obtido por UPLC-MS do controle negativo, mostrando a banda correspondente à quercetagetina-7-O-glucosídeo ($T_R=2,02$ min)

Os dados acima são uma indicação de que as aciltransferases do extrato proteico de folhas de *C.urucurana* envolvidas na reação de acilação são versáteis em relação ao resíduo de açúcar ligado ao flavonoide, catalisando a reação tanto com glucose quanto com galactose. A acilação da galactose é compatível com a detecção do kaempferol-3-O-(6''-*p*-cumaroil)-galactopiranosídeo em *C. pedicellatus* (LOPES et al., 2012) e da isoramnetina-3-O-(6''-*O-E*-cafeoil)- β -D-galactopiranosídeo em *C. laevigatus* (ZOU et al., 2012). Isso indica a presença no gênero de aciltransferases que acilam outros resíduos de açúcar, além da glucose, existente nos já mencionados tilirosídeo (*C. urucurana* e *C. floribundus*) e helicrisosídeo-3'-metil éter (*C. floribundus*). Os flavonoides acilados de *Croton* (Ver Capítulo II – Introdução) indicam a provável predominância de BAHD-transferases aromáticas. Isso pode ser comprovado pela detecção de isoramnetina-3-O-(6''-*O-E*-cafeoil)- β -D-

galactopiranosídeo, uma vez que o ácido cafeico é também um fenilpropanoide, a mesma classe de substâncias fenólicas do ácido *p*-cumárico.

A mesma flexibilidade não foi observada quanto à posição do açúcar na molécula do flavonoide, sugerindo significativa regiosseletividade, pela acilação do resíduo de açúcar somente quando ele se encontra na posição 3 do núcleo aglicônico, mas não quando ele está na posição 7. Esse fato é condizente com a estrutura dos compostos acilados encontrados em *Croton* (ADEROGBA et al., 2011; LOPES et al., 2012; ZOU et al., 2012; NDHLALA et al., 2013) e similar aos resultados de NAKAJIMA et al. (2000), nos quais a quercetina-3-O-glucosídeo (isoquercetrina), a cianidina-3-O-glucosídeo e a pelargonidina-3-O-glucosídeo foram acilados com ácido cafeico na posição C-6'' (álcool primário da glucose) pelo extrato enzimático de células cultivadas de batata doce (*Ipomoea batatas*), resultando cafeoato de 6''-O-isoquercetrina, cafeoato de 6''-O-crisantemina e cafeoato de 6''-O-calistefina.

Em contraste, a lipase B de *Candida antarctica*, com sua preferência por hidroxilas primárias em substâncias alifáticas ligadas a resíduos de açúcar (STEVENSON et al., 2006), mostrou uma regiosseletividade não dependente da posição do açúcar. Isso foi demonstrado por MELLOU et al. (2006) ao acilar, com ácidos graxos insaturados, o resíduo de glucose da rutinose, ligada na posição 3 da rutina, e alternativamente, o resíduo de açúcar ligado na posição 7 da naringina.

III.3.4. Ensaio de atividade de aciltransferase em extratos de *Croton floribundus*

As mesmas condições (extração, substratos e acilantes) descritas para *C. urucurana* foram utilizadas para os ensaios de atividade enzimática utilizando o extrato proteico de *C. floribundus*.

Foi realizada uma cromatografia por CLAE do extrato proteico de *C. floribundus* para a detecção de possíveis compostos fenólicos endógenos que poderiam agir como contaminantes (Fig. III.17). Assim como reportado para *C. urucurana*, esses possíveis contaminantes também não foram detectados no extrato de *C. floribundus*.

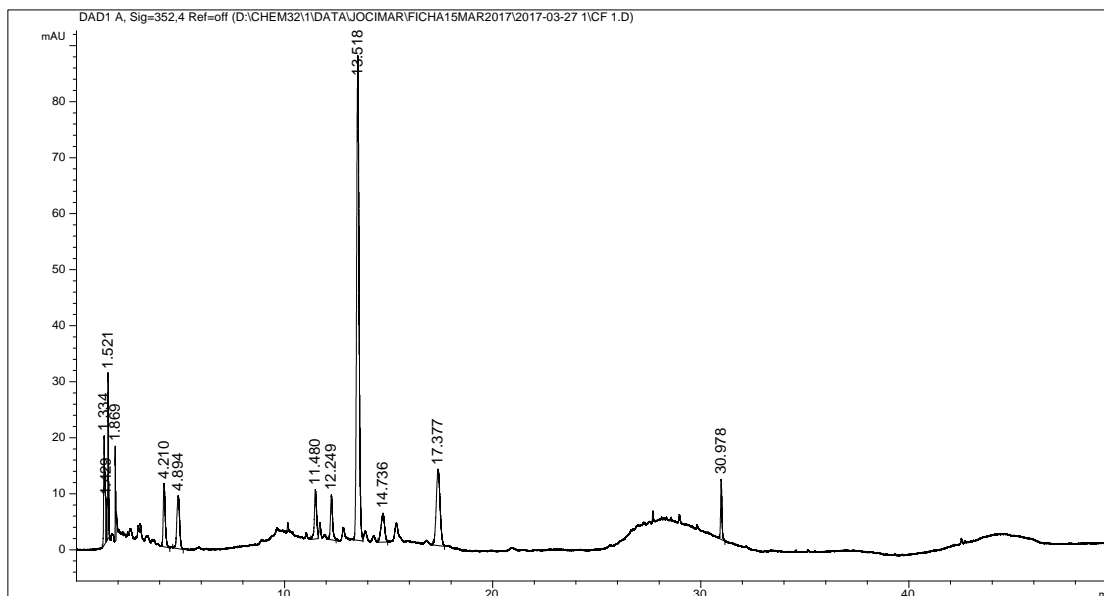
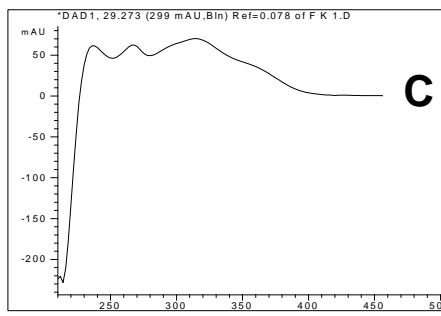
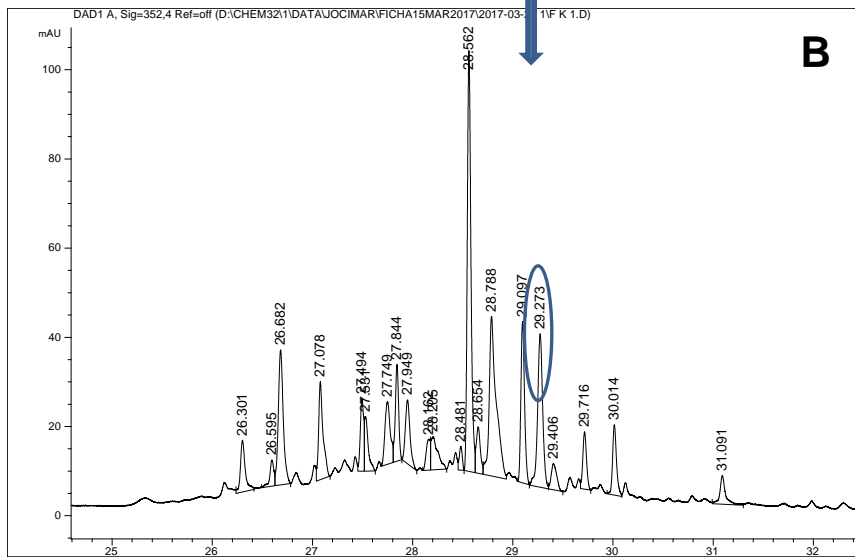
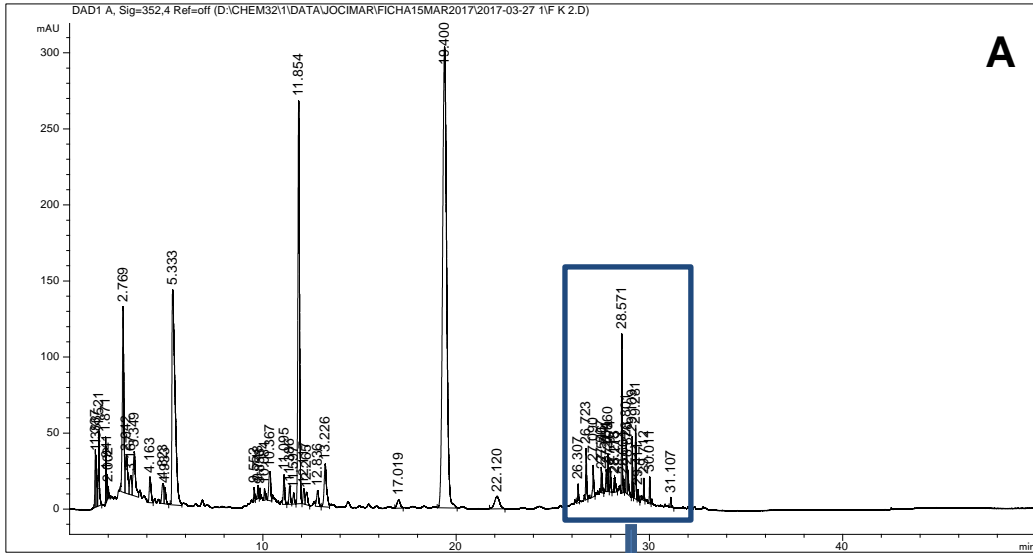


Figura III.17. Cromatograma obtido por CLAE do extrato proteico de *C. floribundus*

Com uma quantidade total de proteínas de 18 µg e agente acilante *p*-cumaroil-CoA, foi detectada a possível formação de composto acilado pela presença de uma banda com $T_R=29,273$, cujo espectro UV/vis apresentou uma banda I ao redor de 315 nm, na reação com kaempferol-3-O-glucosídeo como substrato (Fig. III.18). No entanto, não ocorreu acilação quando foi utilizada a quercetina-3-O-glucosídeo (Fig. III.19). Esse resultado contrasta com a detecção de helicrisosídeo-3'-metil éter, isolado de *C. floribundus* (ver Capítulo II). O que se esperava é que houvesse aciltransferases no extrato proteico da espécie que pudessem acilar flavonoides com dois oxigênios no anel B da aglicona.



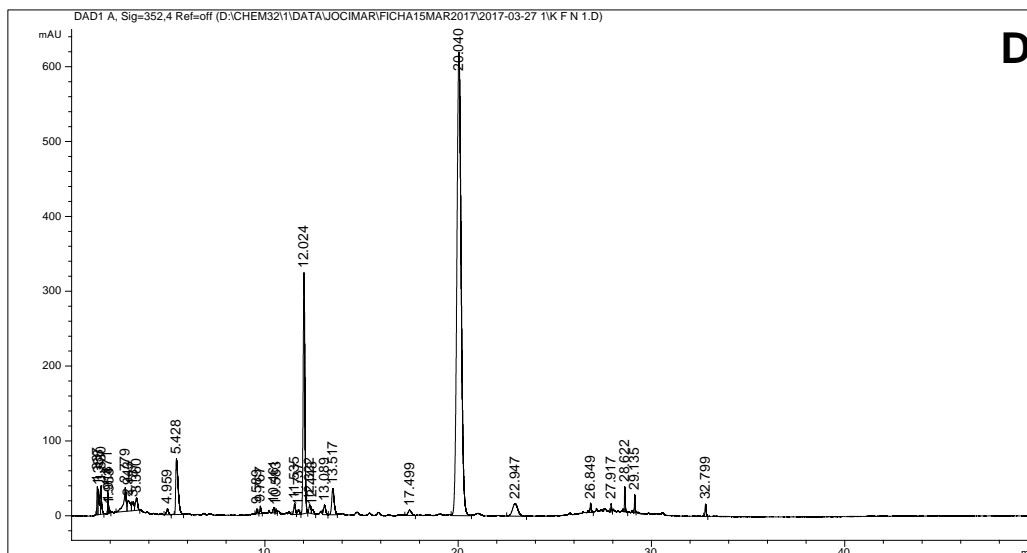
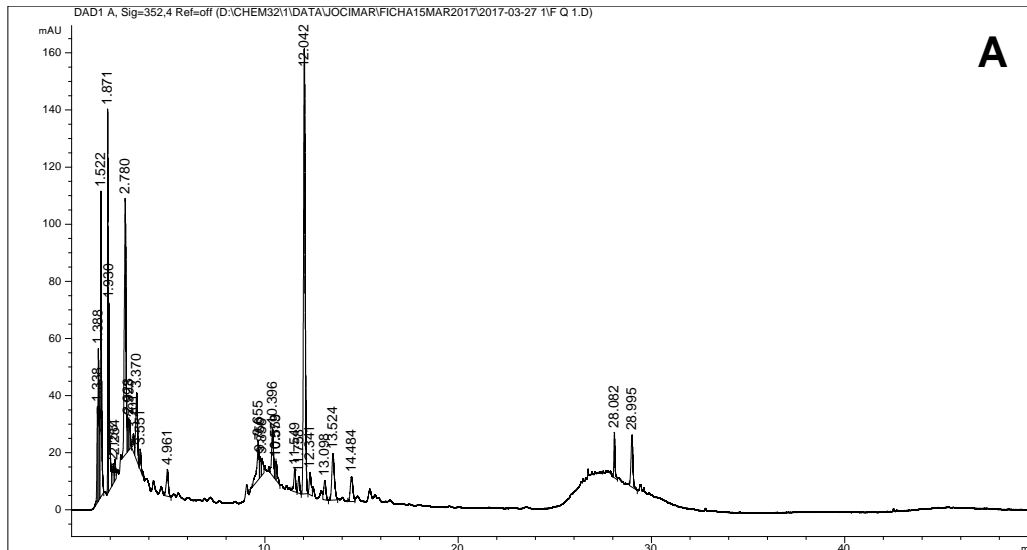


Figura III.18. - (A) Cromatograma obtido por CLAE do composto acilado, produto da reação enzimática do extrato proteico de folhas de *C. floribundus*, utilizando como substrato kaempferol-3-O-glucosídeo; (B) Ampliação da área de interesse (em destaque; TR=29,273 min); (C) espectro UV/vis obtido por CLAE do composto acilado; (D) Cromatograma obtido por CLAE do controle negativo, mostrando a banda correspondente ao kaempferol-3-O-glucosídeo (TR=20,040 min).



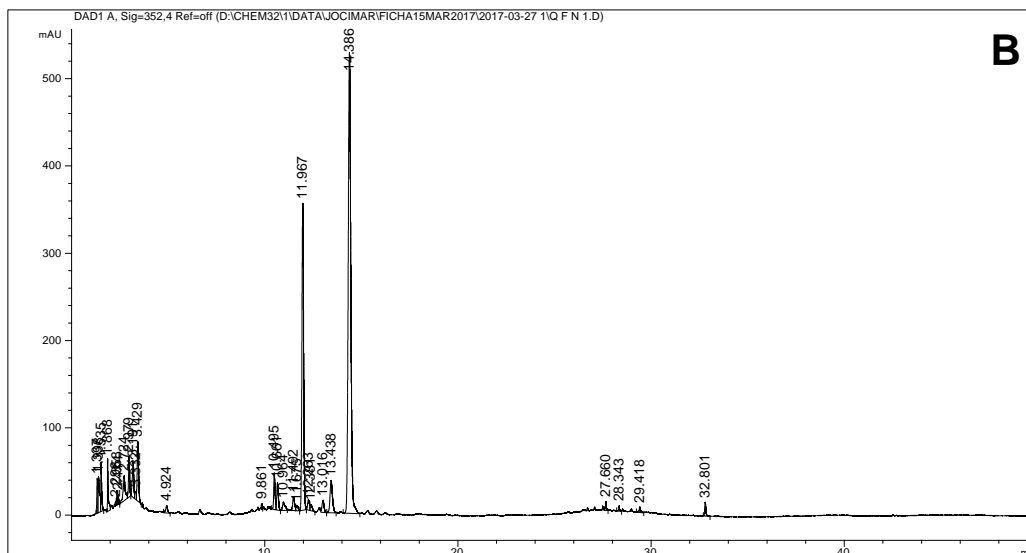


Figura III.19. - Cromatogramas obtidos por CLAE das reações enzimáticas do extrato proteico de folhas de *C.floribundus* utilizando quercetina-3-O-glucosídeo como substrato e *p*-cumaroil-CoA como agente acilante. (A) Reação sem presença de composto acilado; (B) Controle negativo.

Existem algumas possíveis explicações para este resultado: 1) a baixa concentração de proteínas totais do extrato utilizado, resultando em uma consequente baixa concentração (e atividade) das aciltransferases responsáveis pela reação, deixando possíveis produtos, indetectáveis; 2) especificidade da enzima por certos substratos. Nota-se que houve acilação do kaempferol-3-O-glucosídeo (com uma hidroxila no anel B), e não da quercetina-3-O-glucosídeo (com duas hidroxilas no anel B), apesar de ter sido identificada na espécie o helicrisosídeo-3'-metil éter (ver Capítulo II), que nada mais é do que a isoramnetina acilada. Entretanto, a isoramnetina apresenta em 3' (anel B) uma metila, substituindo o hidrogênio da hidroxila, sendo, portanto, diferente da quercetina; 3) a fase de desenvolvimento das folhas. Talvez as aciltransferases que acilam glucosídeos de quercetina em *C. floribundus* atuariam nas folhas maduras e não nas jovens, das quais foram feitos extratos proteicos. O isolamento de flavonoides deste trabalho, no qual foi detectado o helicrisosídeo-3'-metil éter partiu de folhas maduras em *C.floribundus*.

Uma vez que houve muitas dificuldades na extração de proteínas totais de folhas de *C.floribundus*, com reações enzimáticas que deixaram a desejar, as amostras dos ensaios realizados não foram submetidas à análise por UPLC-MS.

III.4. Considerações Finais

Os extratos proteicos de *C. urucurana* e *C. floribundus* apresentaram atividade de aciltransferases, uma vez que houve acilação de flavonoides mono-glicosilados na posição 3, como o kaempferol-3-O-glucosídeo, a quercetina-3-O-glucosídeo, e a quercetina-3-O-galactosídeo. Porém, não houve nenhuma reação de acilação para o flavonoide mono-glicosilado na posição 7 como a quercetina-7-O-glucosídeo, o que pode indicar que as aciltransferases das espécies estudadas são regiosseletivas para a posição de implantação do açúcar.

O extrato de *C. urucurana*, com um bom rendimento na extração proteica, acilou substratos mono-glicosilados na posição 3 do núcleo aglicônico, usando como agentes acilantes tanto o *p*-cumaroil-CoA, um reagente comercial, quanto a combinação de ácido *p*-cumárico + Coenzima A + ATP. Os experimentos demonstraram que o extrato proteico possui, além das aciltransferases, a enzima *p*-cumarato CoA ligase. A vantagem dessa segunda opção é a de diminuir o custo, quando comparado a do *p*-cumaroil-CoA.

O extrato proteico de *C. floribundus* apresentou menor rendimento de extração o que potencialmente prejudicou uma avaliação mais conclusiva sobre as potenciais atividades das aciltransferases nesse extrato, uma vez que só foi observada atividade de acilação para o kaempferol-3-O-glucosídeo. Mais estudos deverão ser feitos com extratos proteicos de folhas dessa espécie para que se possa sanar possíveis falhas no experimento.

III.5. Referências Bibliográficas

- ADEROGBA, M.A., MCGAW, L.J., BEZABIH, M., ABEGAZ, B.M. (2011) Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. *Natural Product Research*, 25 (13): 1224-1233.
- ARAUJO, M.E.M.B., FRANCO, Y.E.M., MESSIAS, M.C.F., LONGATO, G.B., PAMPHILE, J.A., CARVALHO, P.O. (2017) Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits. *Planta Medica*, 83: 7-22.
- ATHAYDE, N.R. (2013) Perfil químico e atividades biológicas de *Croton echinocarpus* Baill. e *Croton vulnerarius* Mull. Arg. Dissertação de Mestrado, São Paulo, USP.

- BONTPART, T., CHEYNIER, V., AGEORGES, A., TERRIER, N. (2015) BAHD or SPCL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytologist*, 208: 695-707.
- BRADFORD, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- ÇALIS, I., OZIPEK, M., ERTAN, M., RUEDI, P. (1995) Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid glycosides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20: 55-59.
- CARLO, G.D., MASCOLO, N., IZZO, A.A., CAPASSO, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65: 337-353.
- CESARINO, I., VANHOLME, R., GOEMINNE, G., VANHOLME, B., BOERJAN, W. (2013) Shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase (HCT) Activity Assays in *Populus nigra*. *Bio-Protocol*. 3 (22).
- CHEBIL, L., HUMEAU, C., FALCIMAIGNE, A., ENGASSER, J.-M., GHOUL, M. (2006) Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. 41: 2237-2251.
- CHEBIL, L., HUMEAU, C., ANTHONI, J., DEHEZ, F., ENGASSER, J.-M., GHOUL, M. (2007) Solubility of flavonoids in organic solvents. *Journal of chemical and engineering data*. 52:1552-1556.
- CROZIER, A., DEL RIO, D., CLIFFORD, M.N. (2010) Bioavailability of dietary flavonoid and phenolic compounds, *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 446-467.
- D'AURIA, J.C.D. (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 331-340.
- DEWICK, P.L. (2009) *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 3ed. John Wiley and Sons. 539p.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M., NEGRI, G., SALATINO, A., de CARVALHO, J.E., LAJOLO, F.M. (2007) Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, 68: 1165-71.
- FERRER, J.-L., AUSTIN, M.B., STEWART Jr., C., NOEL, J.P. (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 356-370.
- FURLAN, C.M., SANTOS, K.P., SEDANO-PARTIDA, M.D., MOTTA, L.B., SANTOS, D.Y.A.C., SALATINO, M.L.F., NEGRI, G., BERRY, P.E., VAN EE, B.W., SALATINO, A. (2015) Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 38 (4): 693-702.
- GIANG, P.M., LEE, J.J., SON, P.T. (2004) Flavonoid glucosides from the leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae. *Journal of Chemistry*, 42 (1): 125-128.

- HAVSTEEN, B.H. (2002) The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96: 67-202.
- ISHIHARA, K., NAKAJIMA, N. (2003) Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoids glucosides and interpretation of their functions. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 23: 411-417.
- KONTOGIANNI, A., SKOURIDOU, V., SERETI, V., STAMATIS, H., KOLISIS, F.N. (2001) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 103: 655-660.
- KONTOGIANNI, A., SKOURIDOU, V., SERETI, V., STAMATIS, H., KOLISIS, F.N. (2003) Lipase-catalysed esterification of rutin and narigenin with fatty acids of medium carbon chain. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 21: 59-62.
- KUMAR, V., JAHAN, F., MAHAJAN, R.V. SAXENA, R.K. (2016) Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant. *Bioresource technology*, 218: 1246-1248.
- LAGNIKA, L., WENIGER, B., VONTHRON-SENECHEAU, C., SANNI, A. (2009) Antiprotozoal activities of compounds isolated from *Croton lobatus* L. *African Journal of Infectious Diseases*, 3 (1): 1-5.
- LENCINA, C., PIRES, V.S., GOSMANN, G., TAKETA, A.T.C., SCHENKEL, E.P. (2001) Tilirosideo em *Croton gnaphalli* Baill. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11 (2): 89-93.
- LOPES, E.L., NETO, M.A., SILVEIRA, E.R., PESSOA, O.D.L., BRAZ-FILHO, R. (2012). Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. *Quimica Nova*, 35 (11): 2169-2172.
- LOPEZ-GALLEGO, F., SCHMIDT-DANNERT, C. (2010) Multi-enzymatic synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14: 174-183.
- MARKHAM, K.R. (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London.
- MATOS, L.M.M. Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 2011. 123p.
- MELLOU, F., LAZARI, D., SKAL TSA, H., TSELEPIS, A.D., KOLISIS, F.N., STAMATIS, H. (2005) Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. 116: 295-304.
- MELLOU, F., LOUTRARI, H., STAMATIS, H., ROUSSOS, C., KOLISIS, F.N. (2006) Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry*. 41:2029-2034.
- MOZHEAV, V.V., BUDDE, C.L., RICH, J.O., USYATINSKY, A.Y., MICHELS, P.C., KHMELMITSKY, Y.L., CLARK, D.S., DORDICK, J.S. (1998) Regioselective

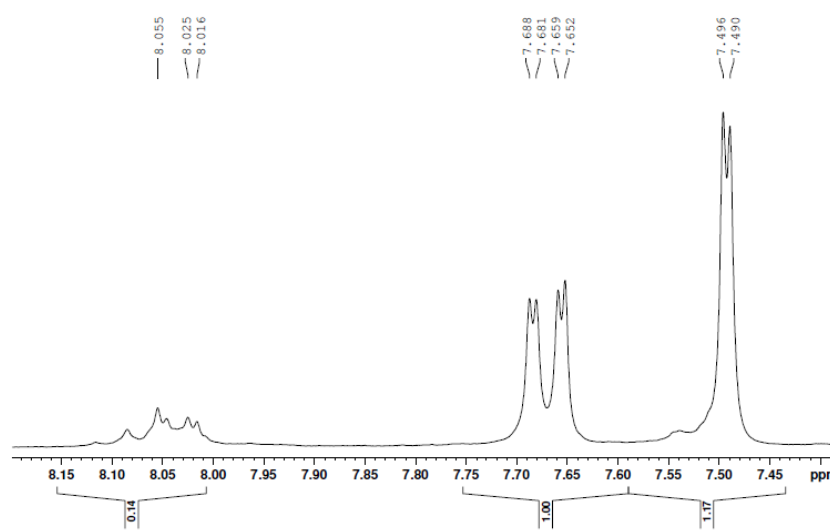
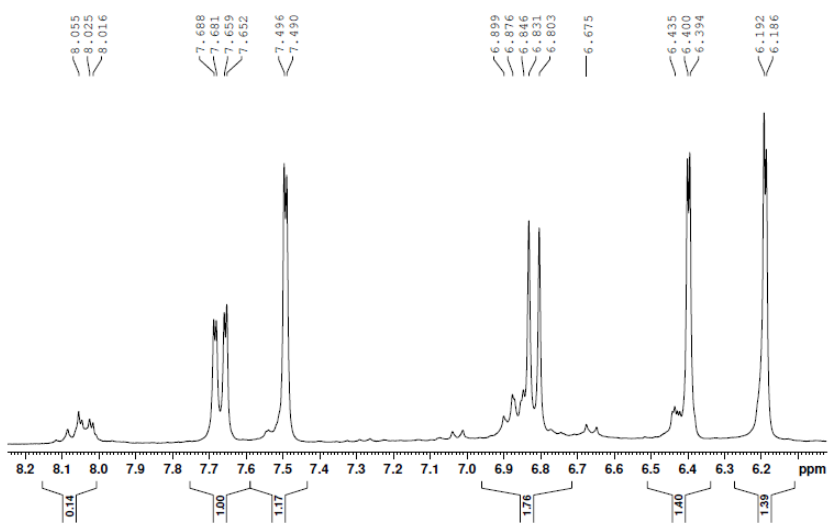
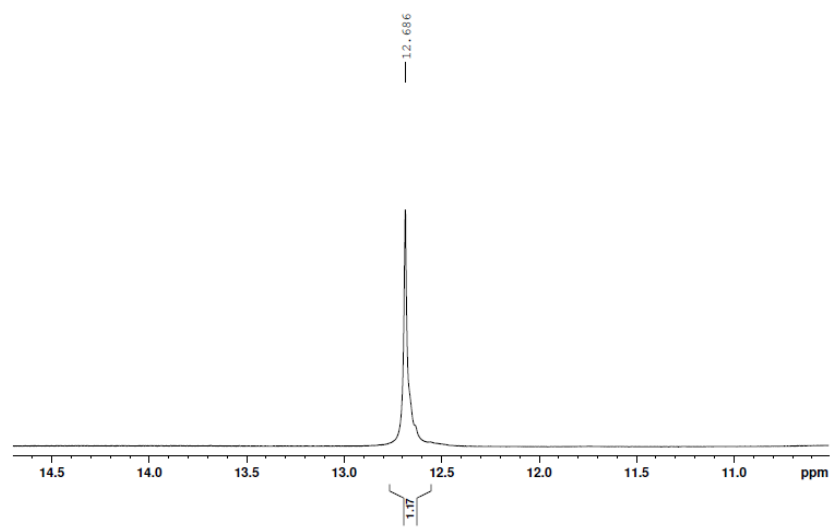
enzymatic acylation as a tool for producing solution-phase combinational libraries. *Tetrahedron*. 54: 3971-3982.

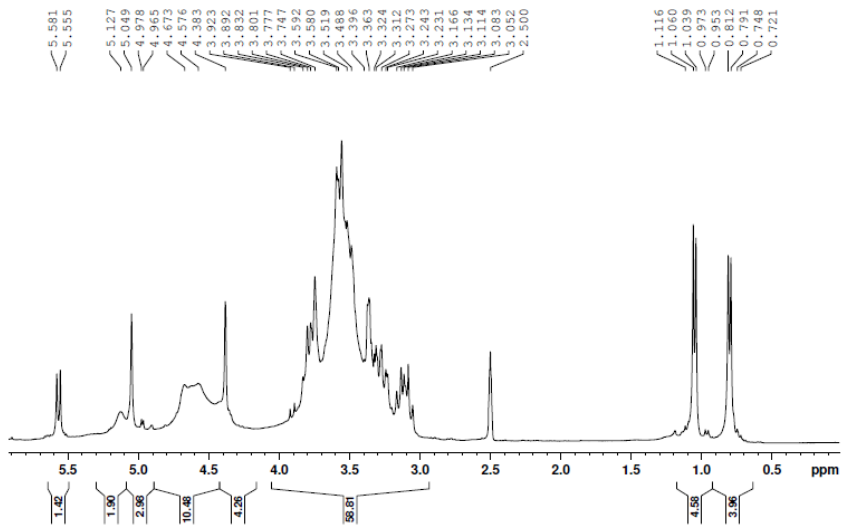
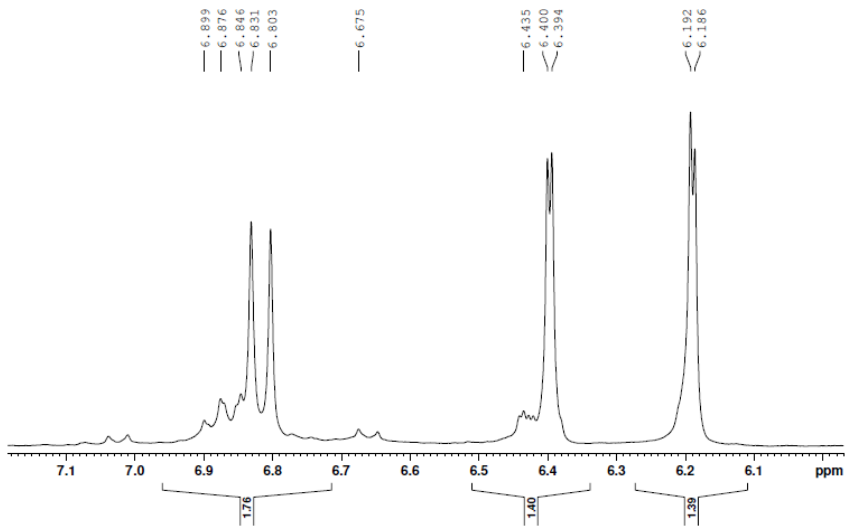
- NAKAJIMA, N., ISHIHARA, K., HAMADA, H., KAWABE, S.-I., FURUKA, T. (2000) Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90 (3): 347-349.
- NDHLALA, A.R., ADEROGBA, M.A., NCUBE, B., VAN STADEN, J. (2013) Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. *Molecules*, 18: 1916-1932.
- NEGRI, G., SANTI, D., TABACH, R. (2013) Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15: 217-224.
- OGASAWARA, D.C. (2012) Constituintes químicos e atividades antioxidante e antiproliferativa de extratos de *Astraea Klotzsch* e *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. 90p.
- PASSICOS, E., SANTARELLI, X., COULON, D. (2004) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antartica* lipase under reduced pressure. *Biotechnology Letters*, 26: 1073-1076.
- PALMEIRA JUNIOR, S.F., ALVES, V.L., MOURA, F.S., VIEIRA, L.F.A., CONSERVA, L.M., LEMOS, R.P.L. (2006). Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (3): 397-402.
- POLLIER, J., MOSES, T., GOOSSENS, A. (2011) Combinatorial biosynthesis in plants: A (p)review on its potential and future exploitation. *Natural Products Reports*. 28: 1897-1916.
- QIAO, L., SUN, Y., CHEN, R., FU, Y., ZHANG, W., LI, X., CHEN, J., SHEN, Y., YE, X. (2014) Sonochemical effects on 14 flavonoids common in Citrus: relation to stability. *PLOS One*, 9: e87766.
- SOARES, S.A. (2013). Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Croton pallidulus* var. *pallidulus*. Dissertação de mestrado. São Paulo, USP.
- SAVIETTO, J.P., FURLAN, C.M., MOTTA, L.B., SALATINO, M.L.F., CARVALHO, J.E., RUIZ, A.L.T.G., SALATINO, A., SANTOS, D.Y.A.C. (2013). Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23 (4): 662-667.
- STEVENSON, D.E., WIBISONO, R., JENSEN, D.J., STANLEY, R.A., COONEY, J.M. (2006) Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antartica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme and Microbial technology*, 39: 1236-1241.
- THILAKARANTHNA, S.H., RUPASINGHE, H.P.V. (2013) Flavonoid Bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5:3367-3387.

- VISKUPICOVÁ, J., ONDREJOVIC, M., STURDIK, E. (2008) Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47: 151-162
- VISKUPICOVA, J., ONDREJOVIC, M., STURDIK, E. (2009) The potential and practical applications of acylated flavonoids. *Pharmazie*. 64(6): 355-360.
- WANG, A., ZHANG, F., HUANG, L., YIN, X., LI, H., WANG, Q., ZENG, Z., XIE, T. (2010) New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(10):847-856.
- YU, X.-H., GOU, J.-Y., LIU, C.-J. (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression. *Plant Molecular Biology*, 70: 421-442.
- ZHAO, J., DIXON, R.A. (2010) The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Sciences*, 15: 72-80.
- ZOU, G.-A., SU, Z.-H., ZHANG, H.-W., WANG, Y., YANG, J.-S., ZOU, Z.-M. (2010) Flavonoids from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules*, 15: 1097-1102.
- ZOU, G.A., AISA, H.A., SHANG, H.W., YANG, J.S., ZOU, Z.M., SHAKHIDOYATOV, K.M. (2012) Flavonoids from *Croton laevigatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48 (4): 687-688.

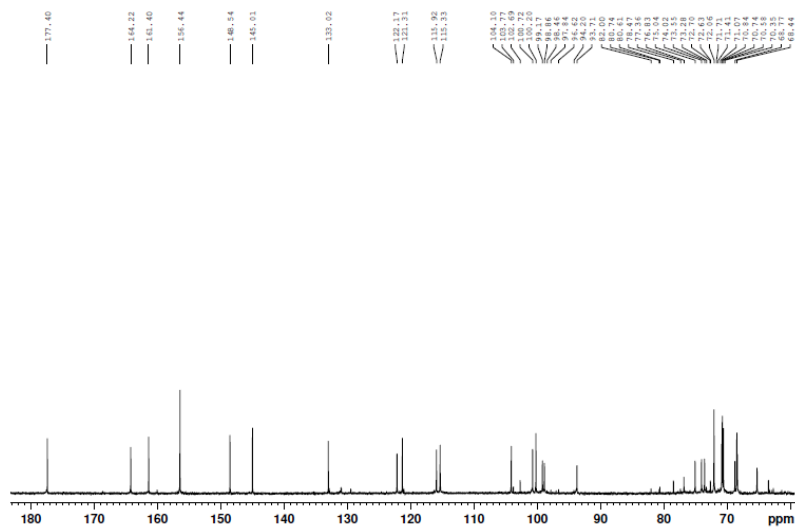
ANEXO 1

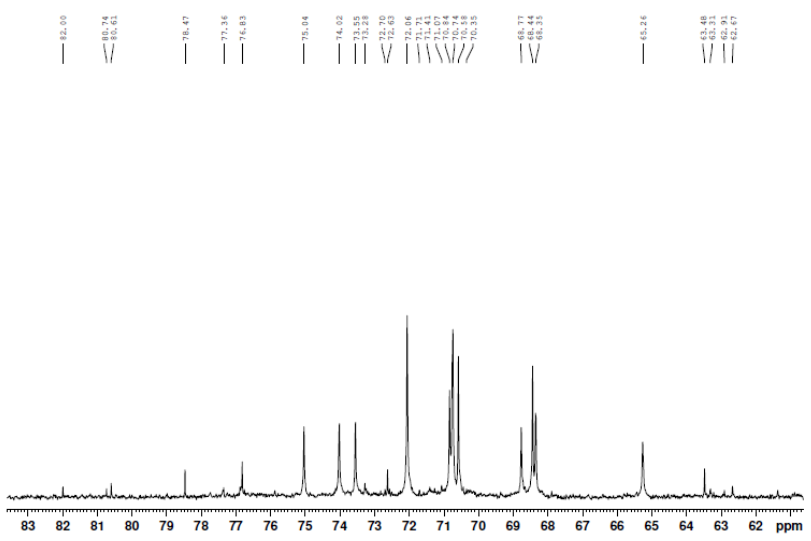
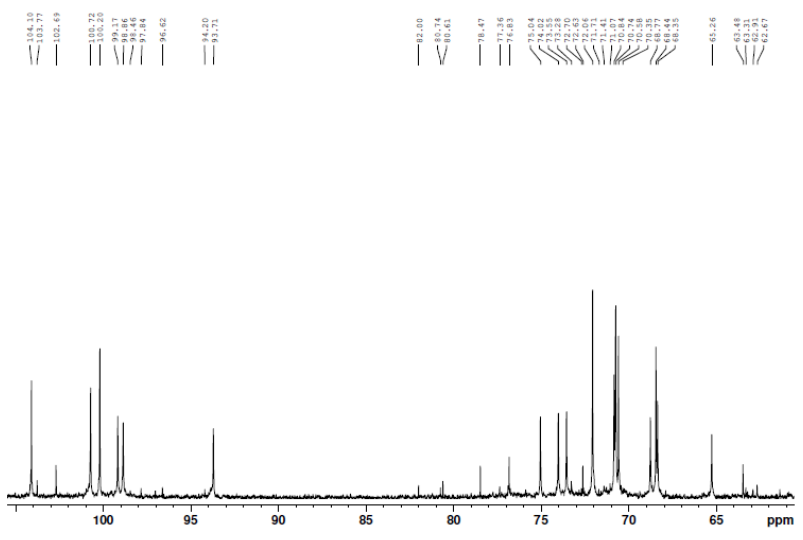
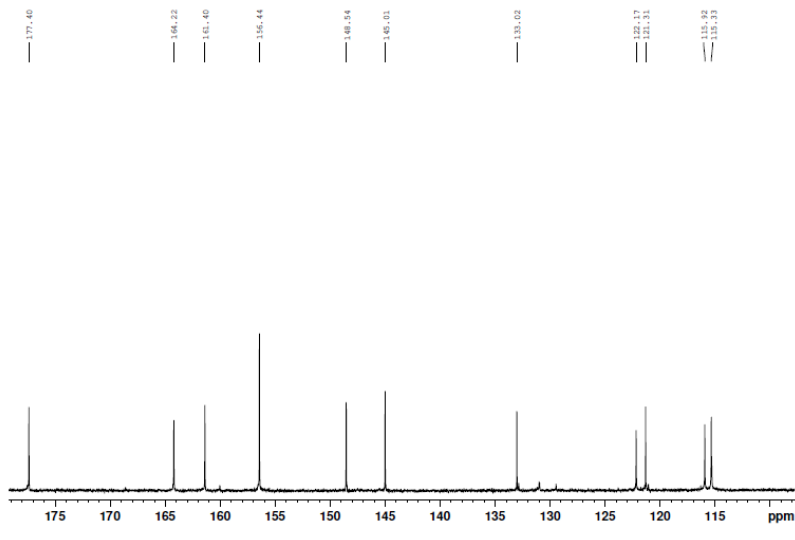
1. Amplificações do espectro de RMN ^1H da subfração **Ff10-2** de *C.floribundus*.

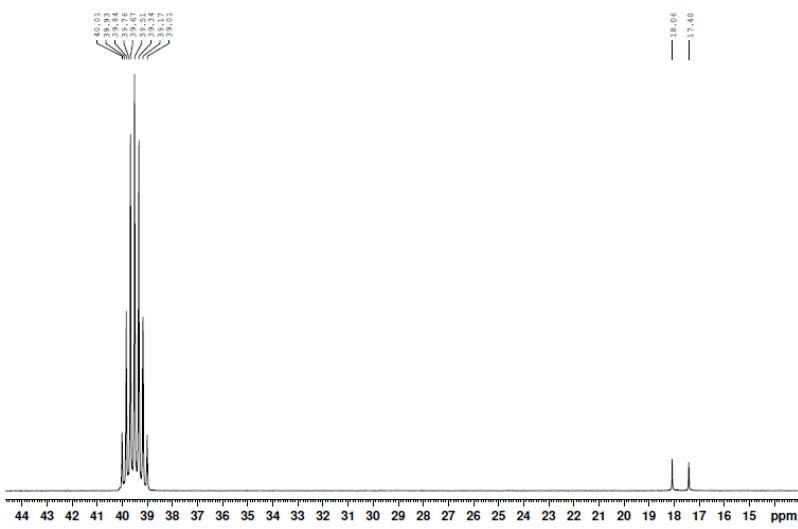
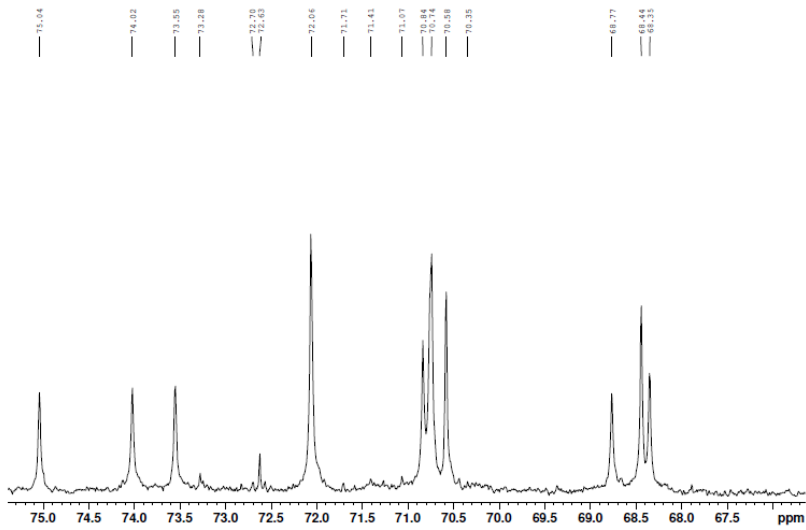




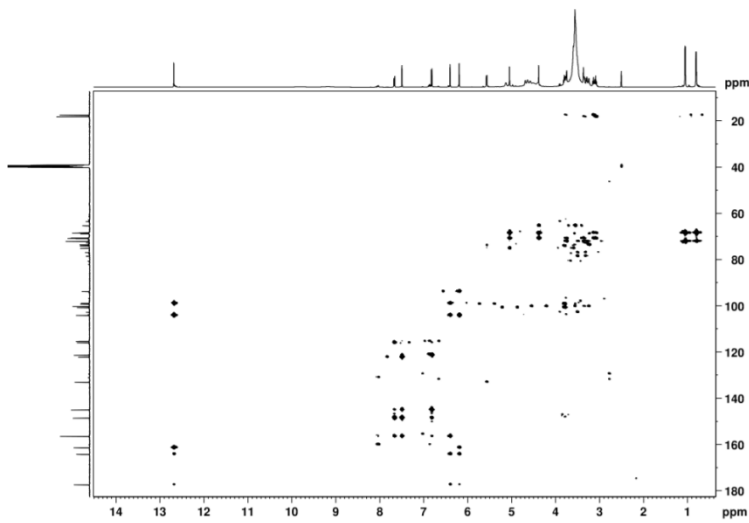
2. Amplificações do espectro de RMN ¹³C da subfração **Ff110-2** de *C. floribundus*.

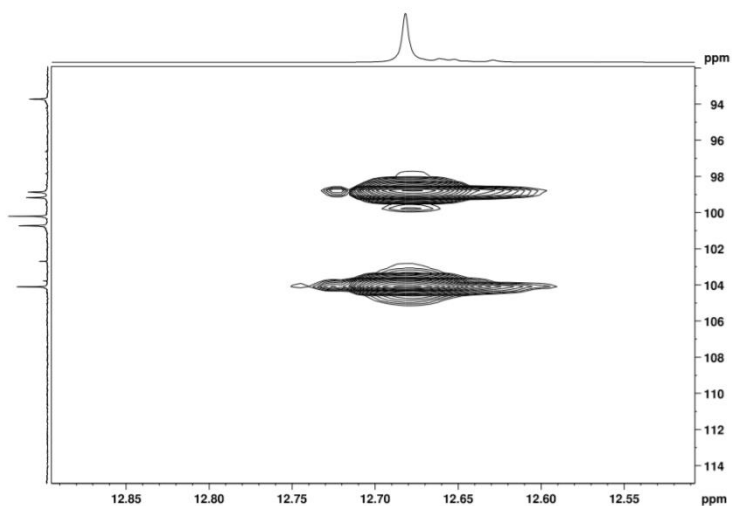
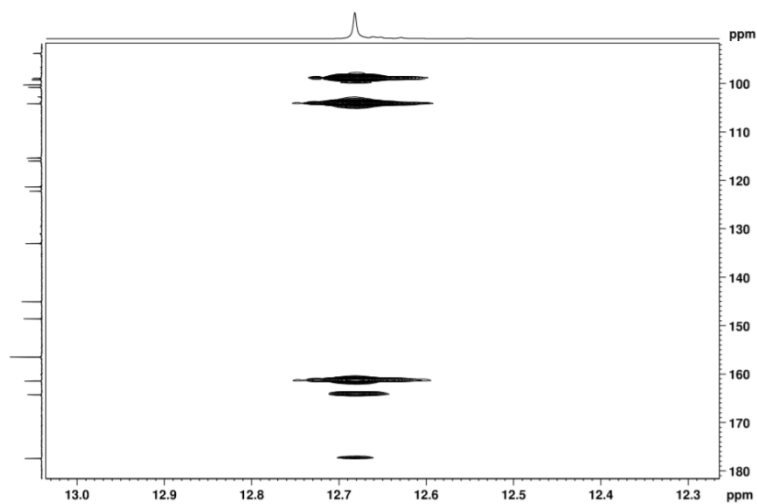
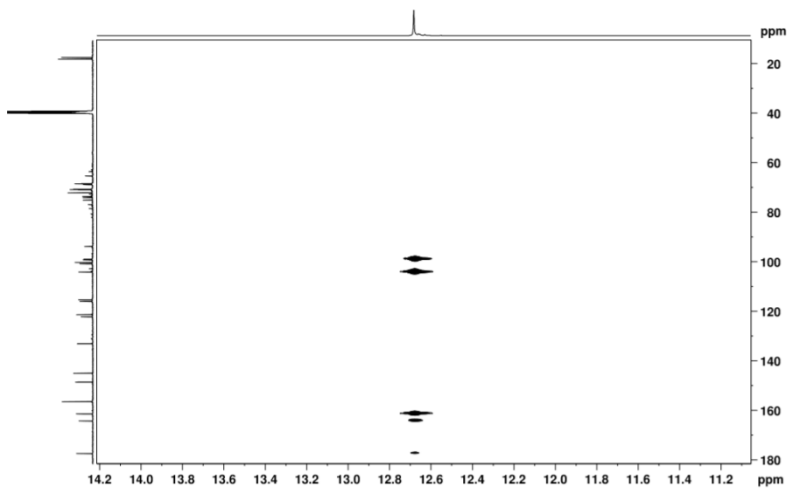


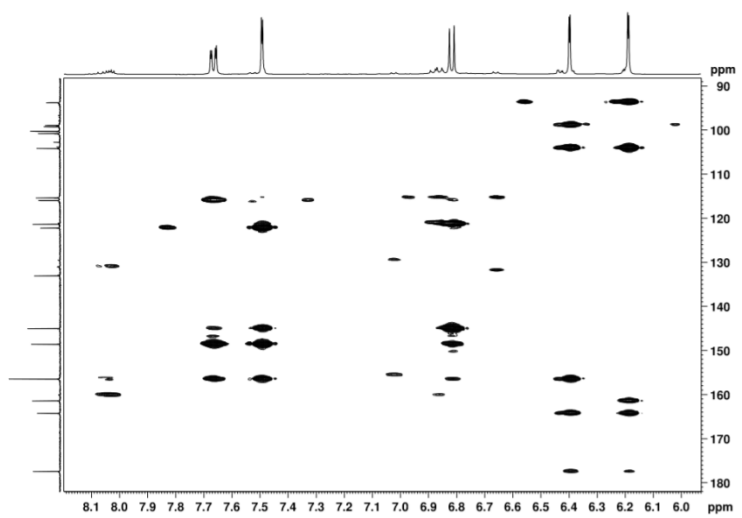
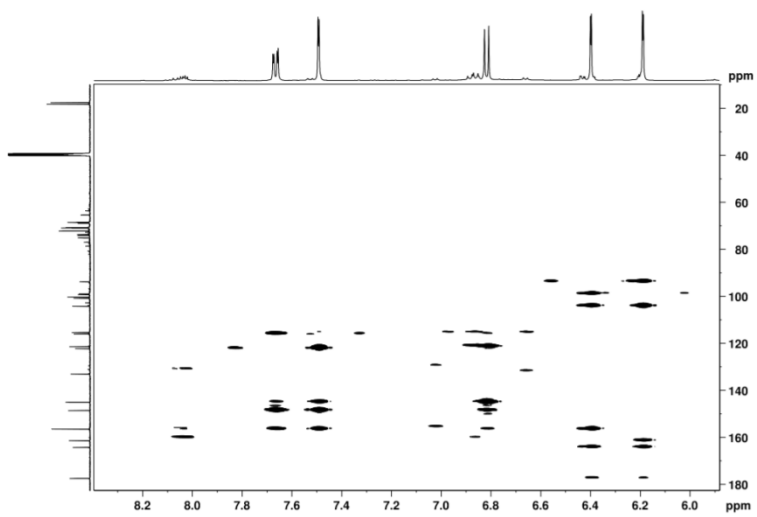
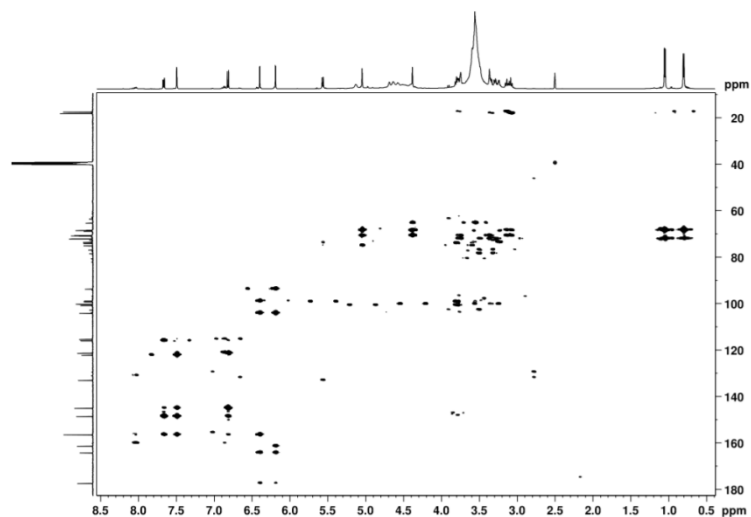


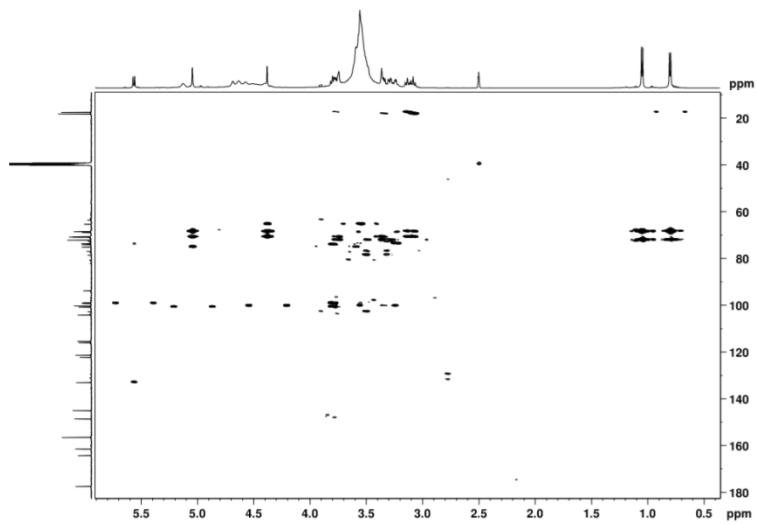
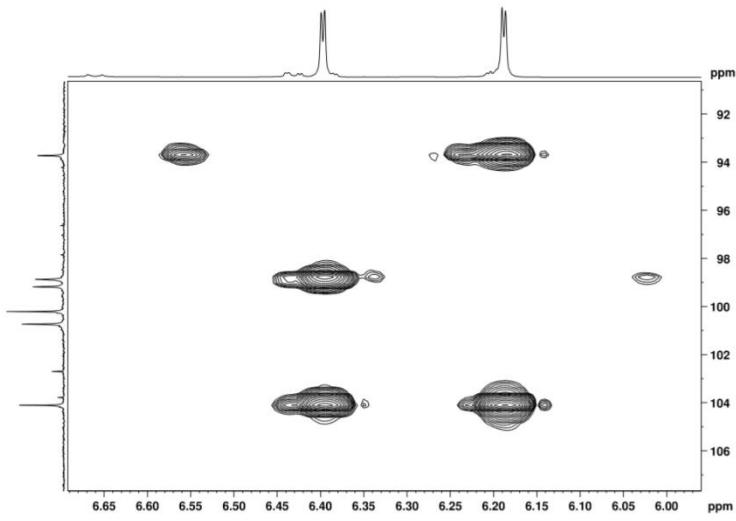
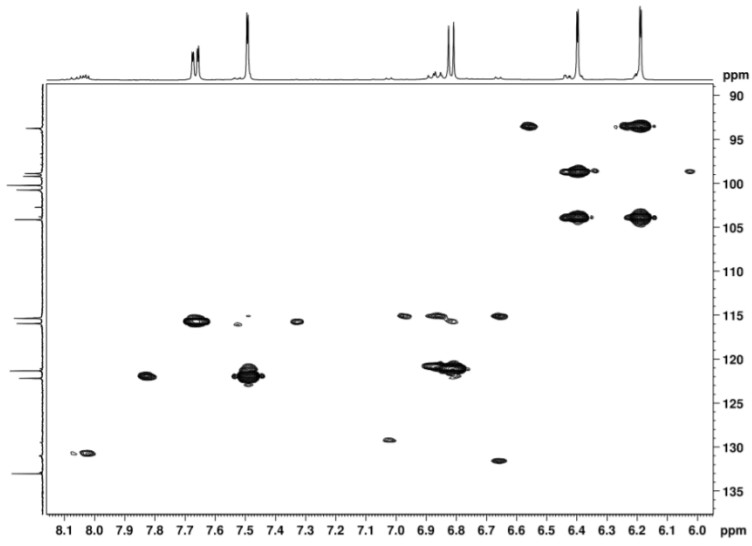


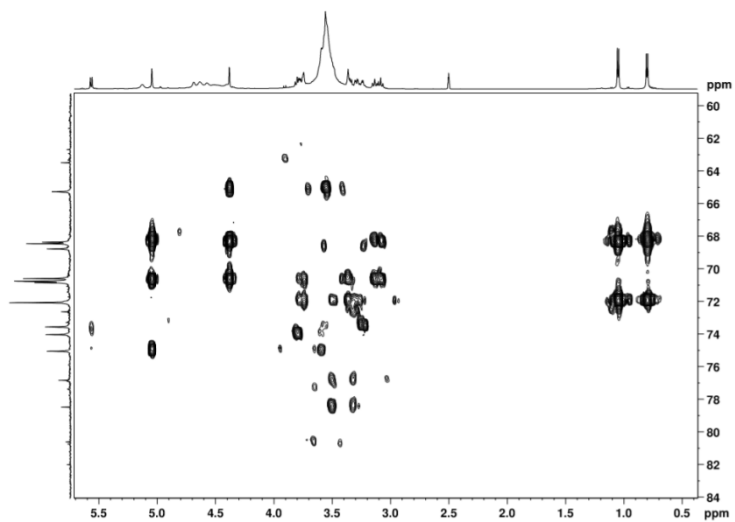
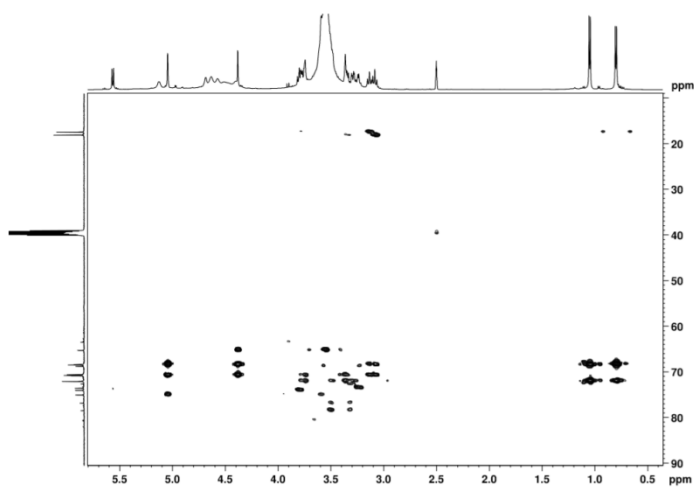
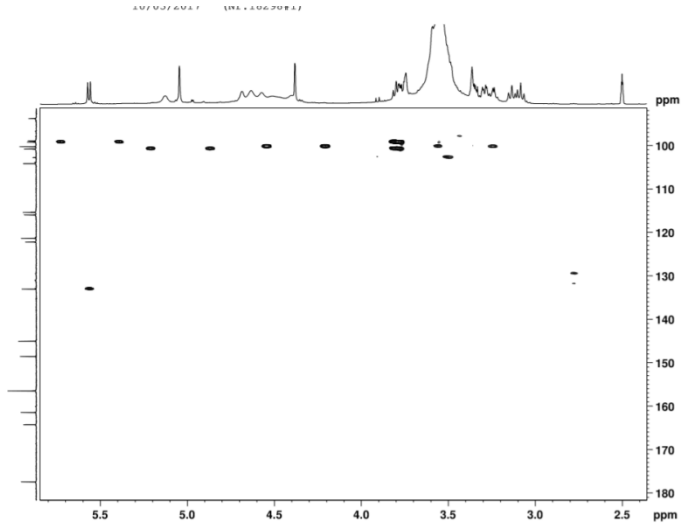
3. Ampliações do espectro de RMN HMBC da fração **Ff110-2** de *C.floribundus*.

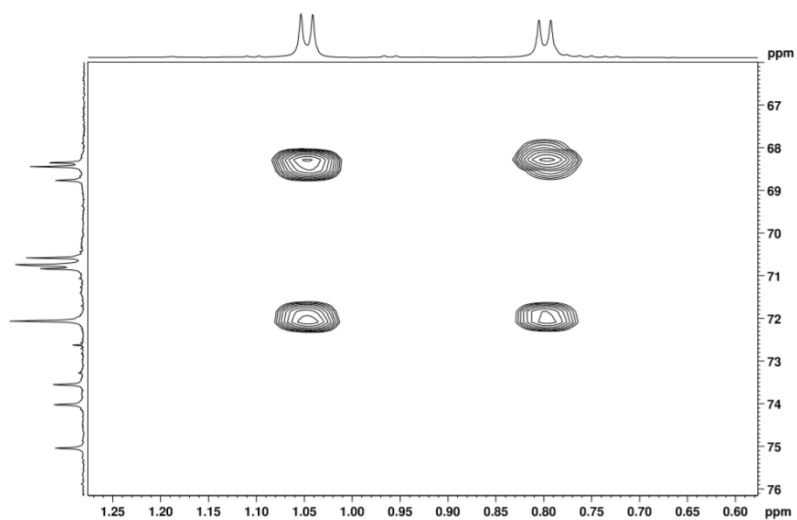
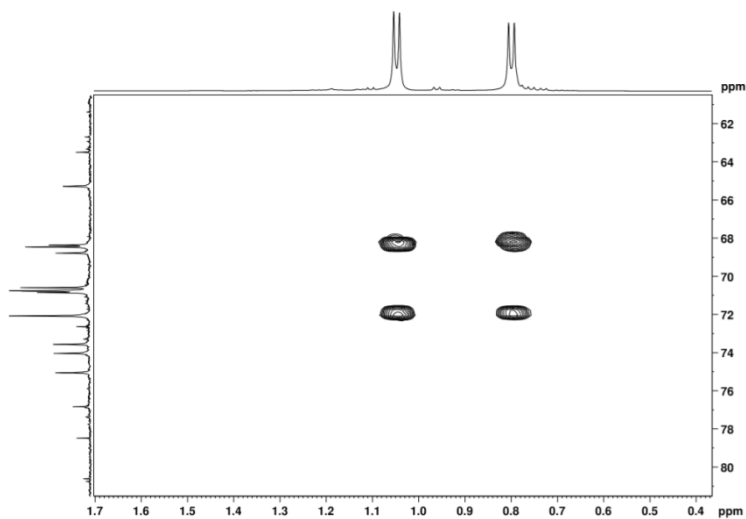
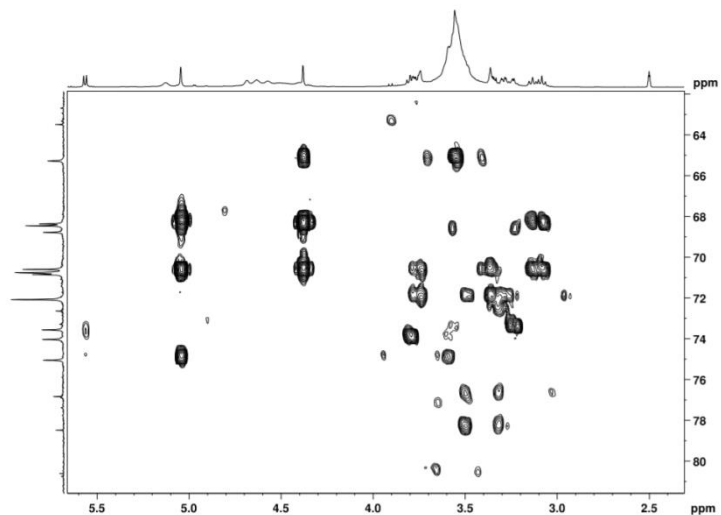




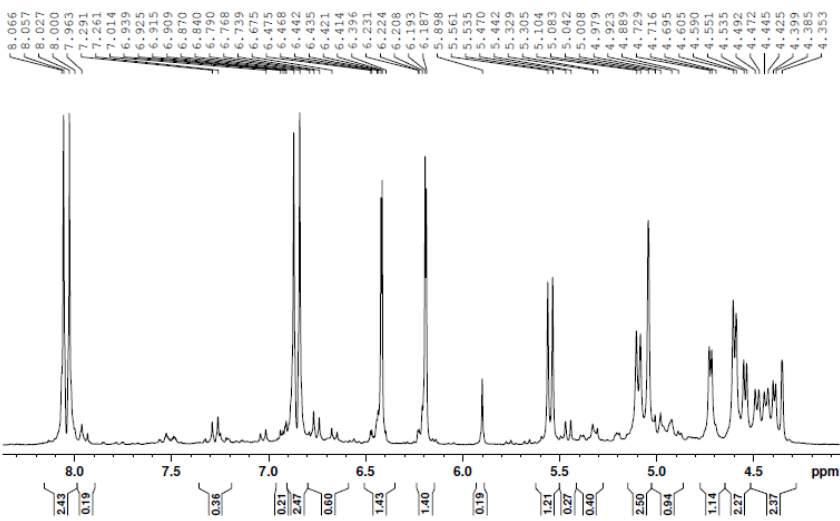
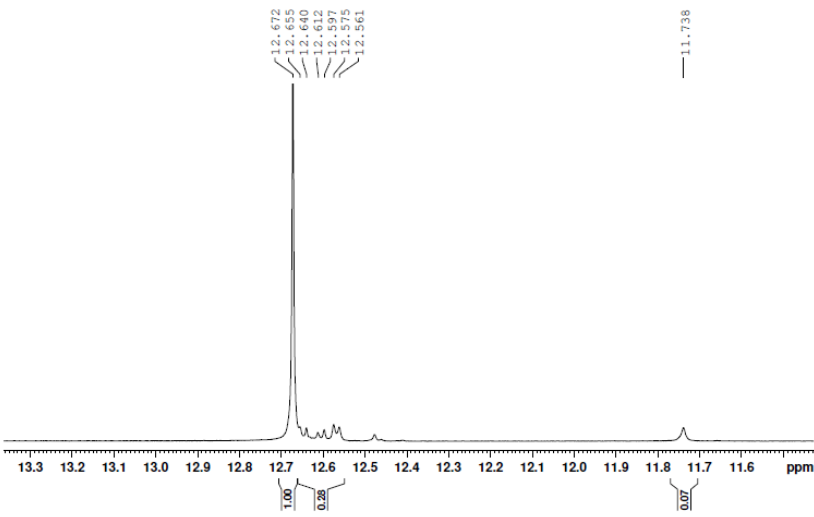
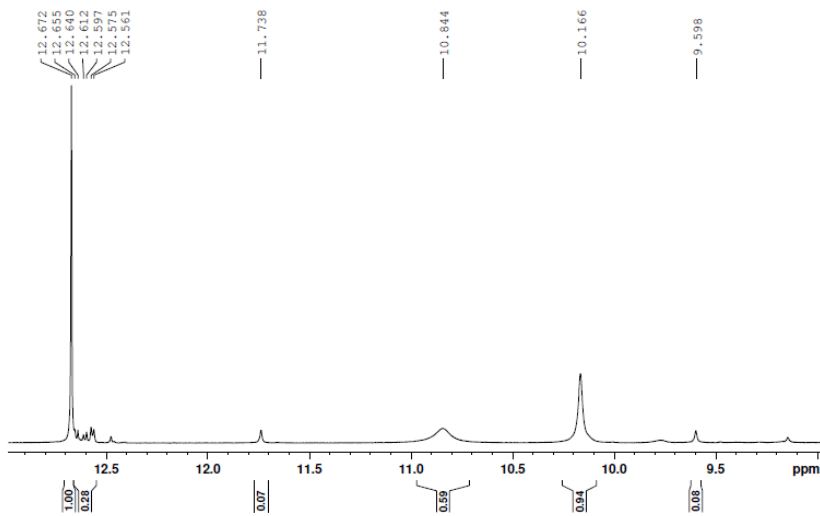


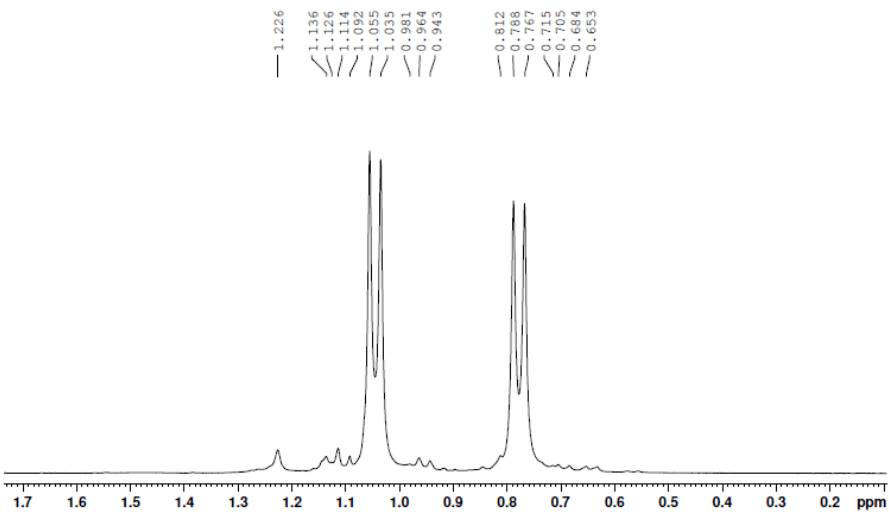
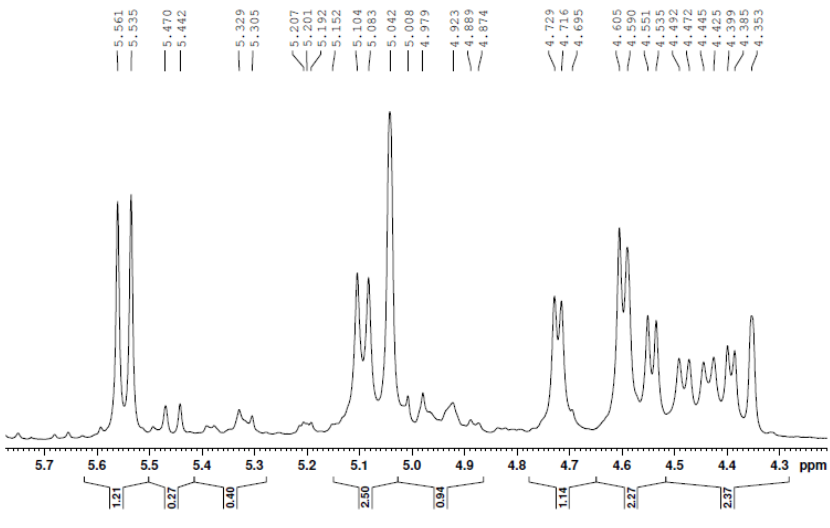
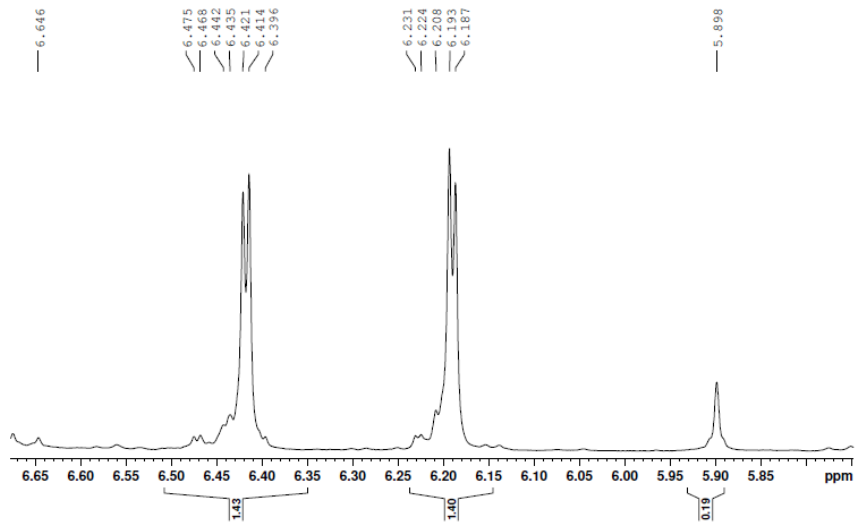




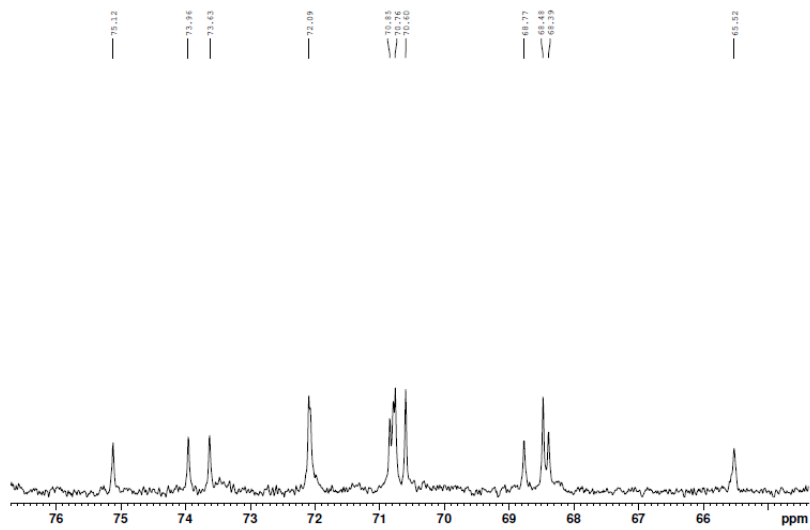
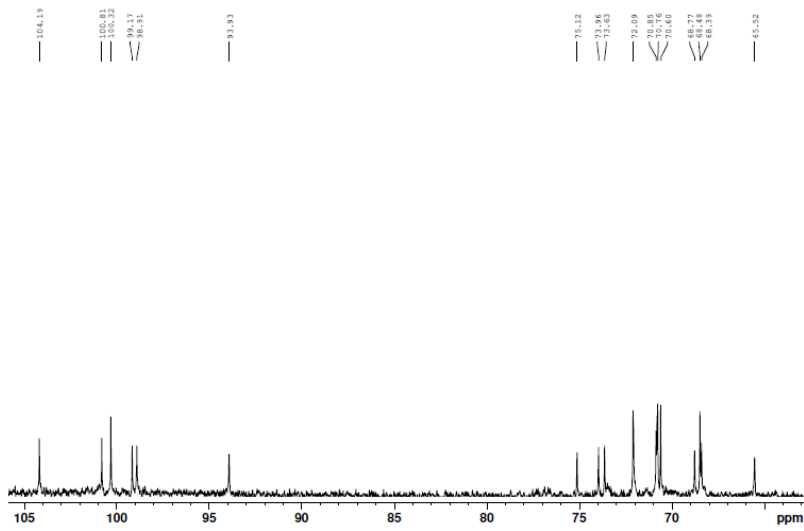
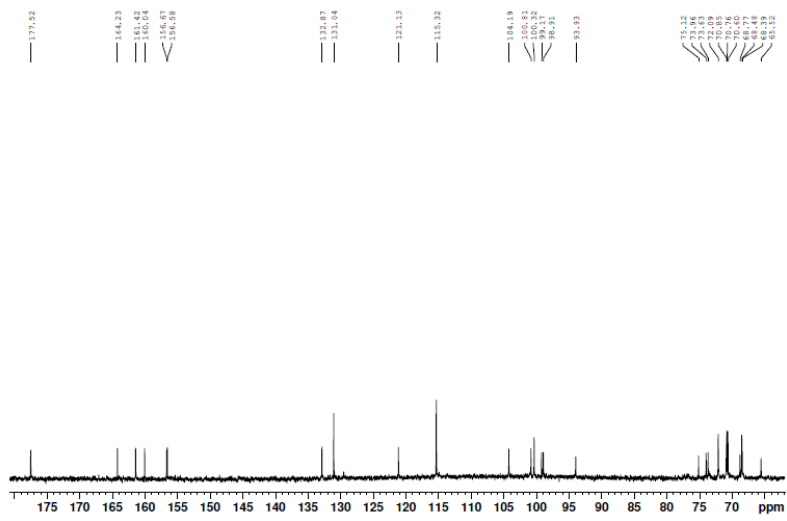


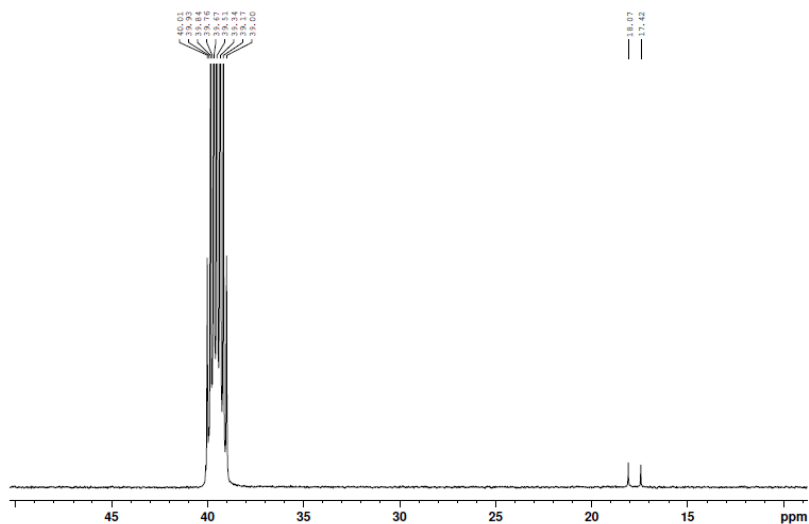
4. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração **F18-2** de *C. floribundus*.



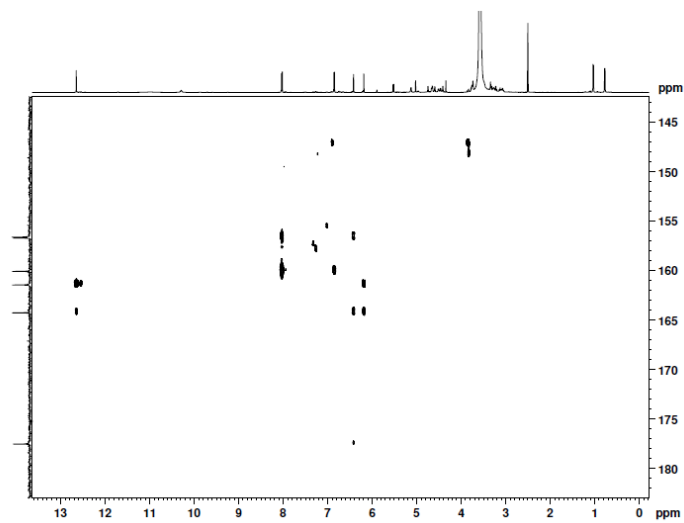
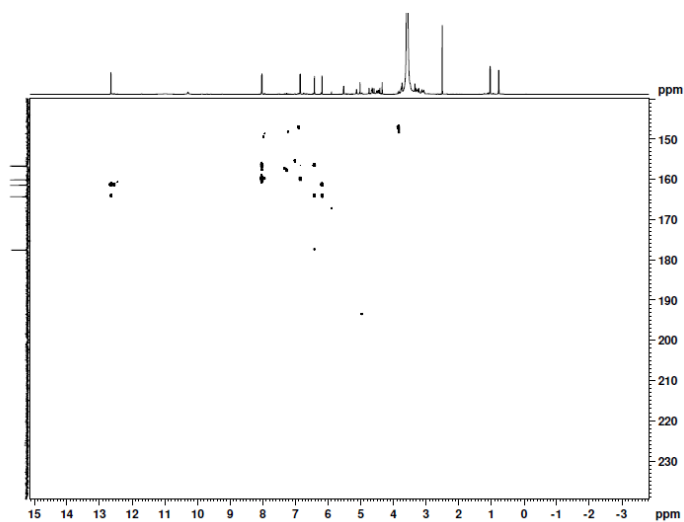


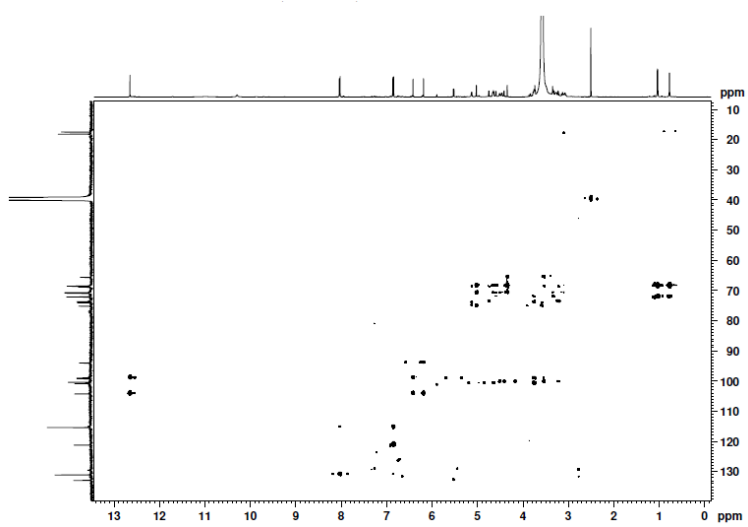
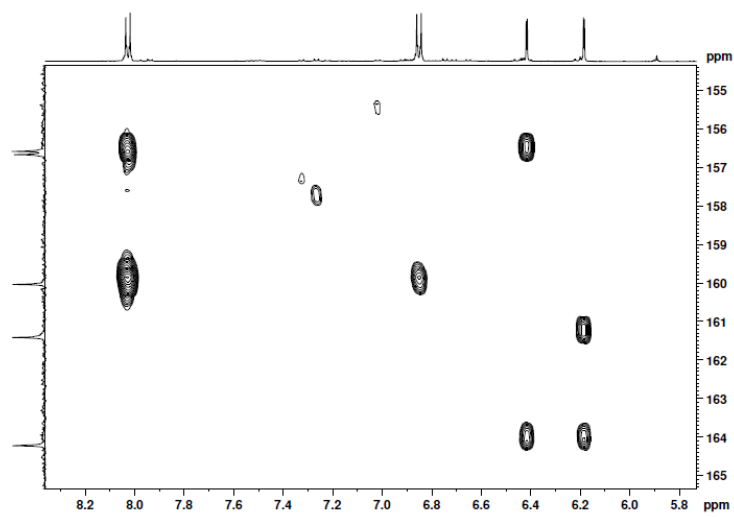
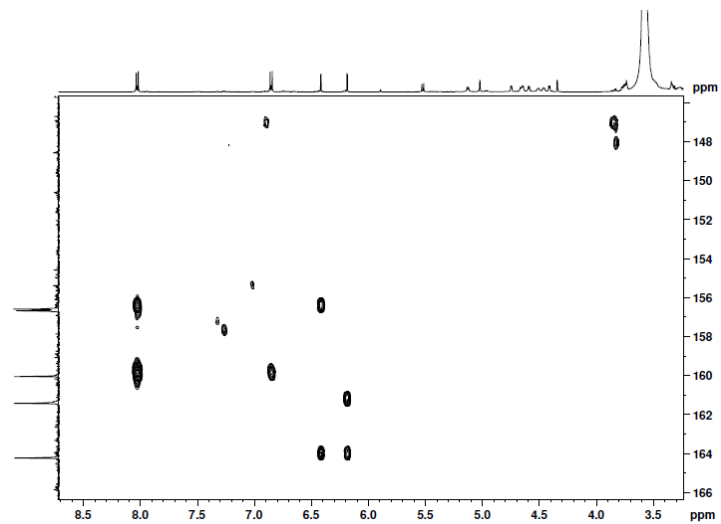
5. Ampliação do espectro de RMN ^{13}C da fração Ff18-2 de *C. floribundus*.

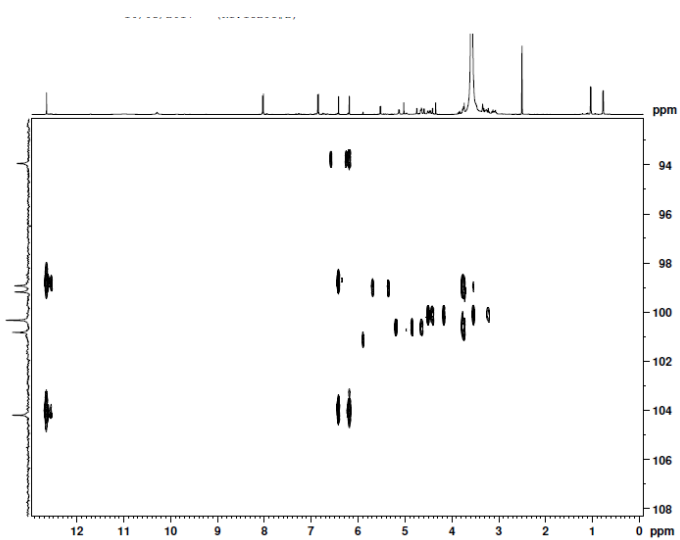
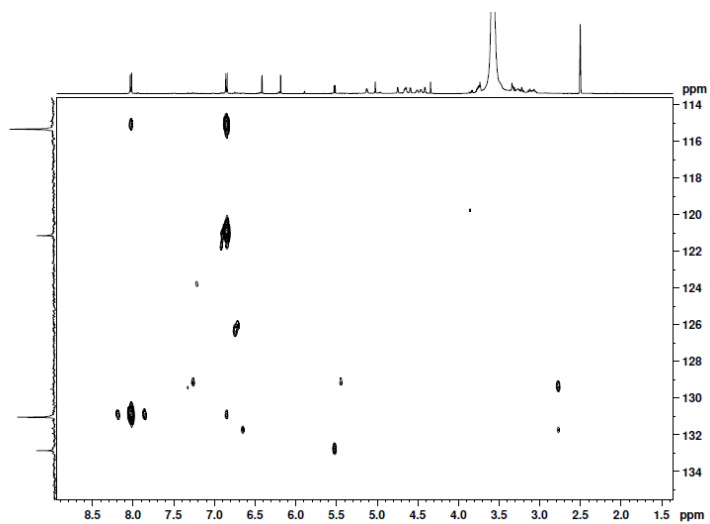
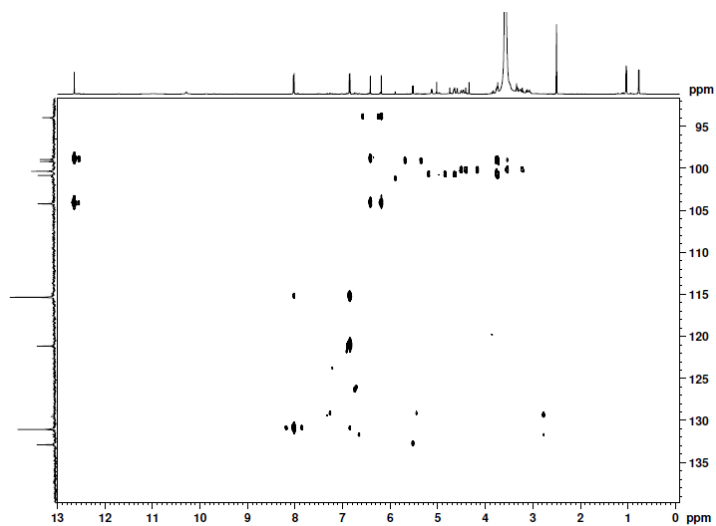


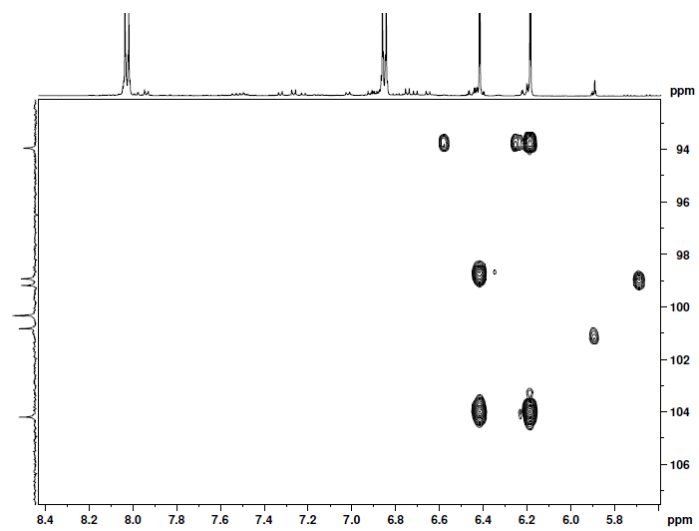
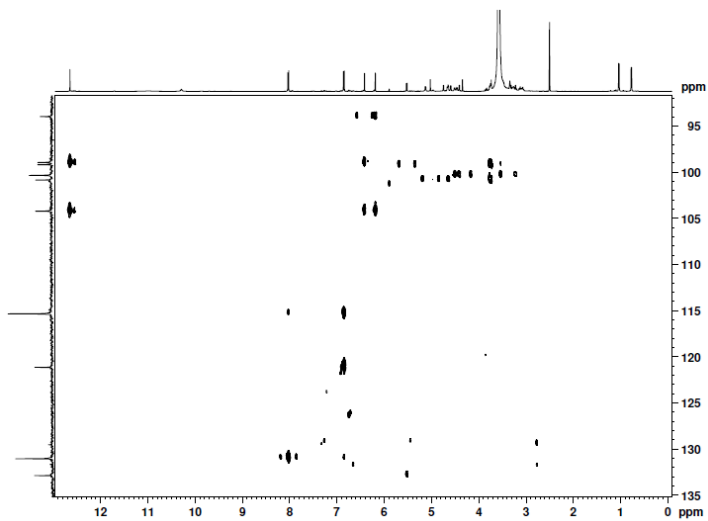
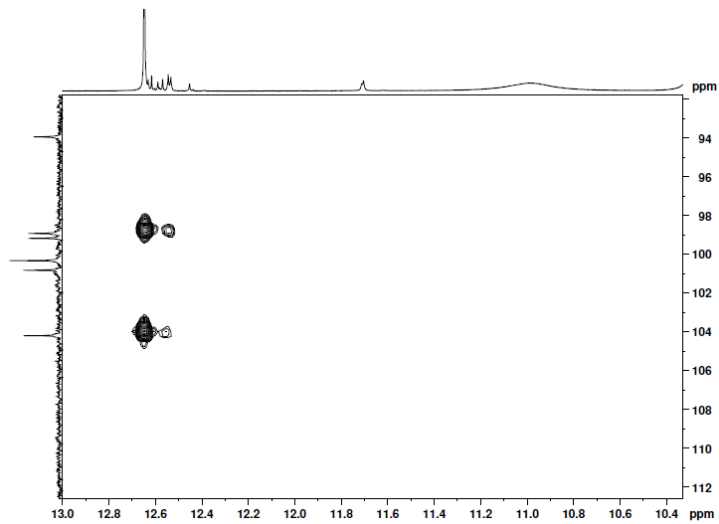


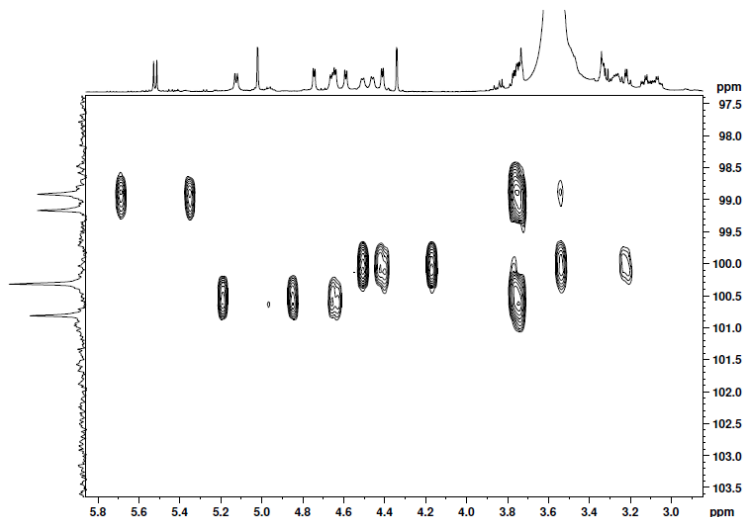
6. Ampliação do espectro de RMN HMBC da fração **Ff18-2** de *C. floribundus*.



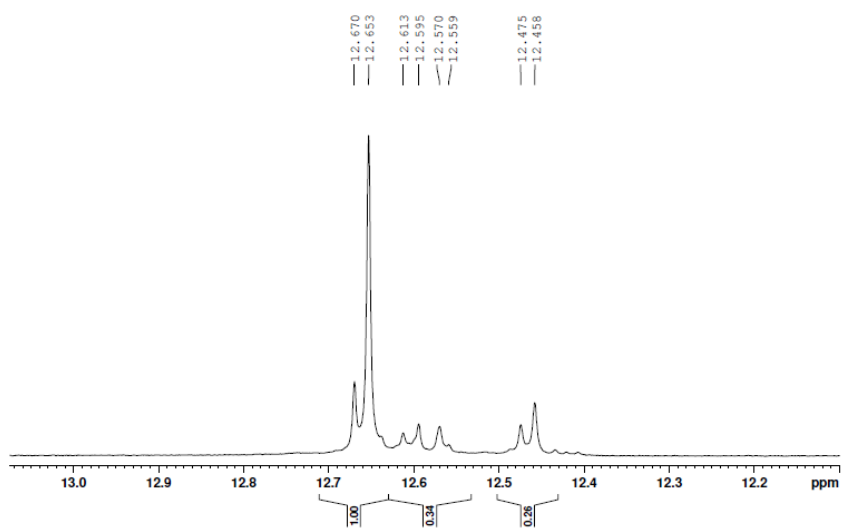
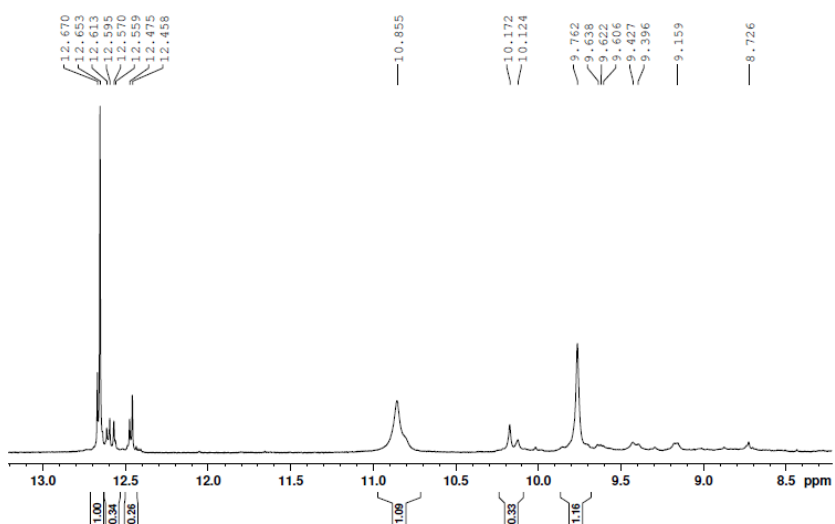


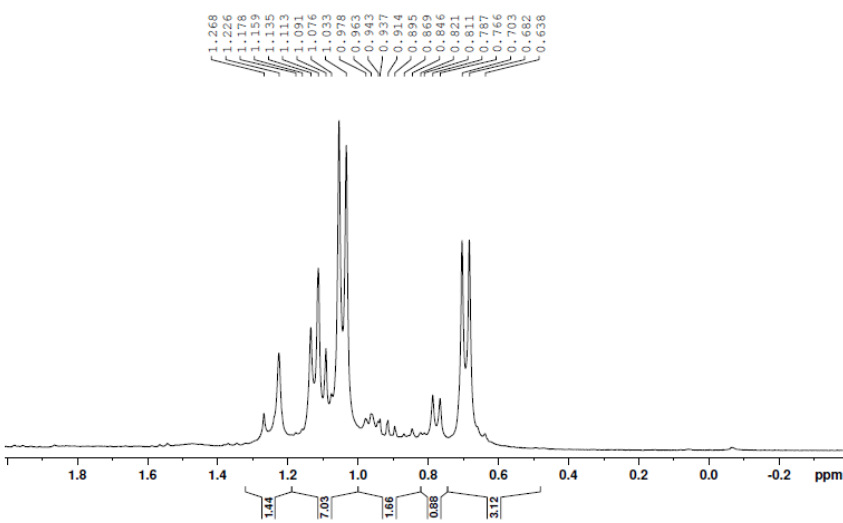
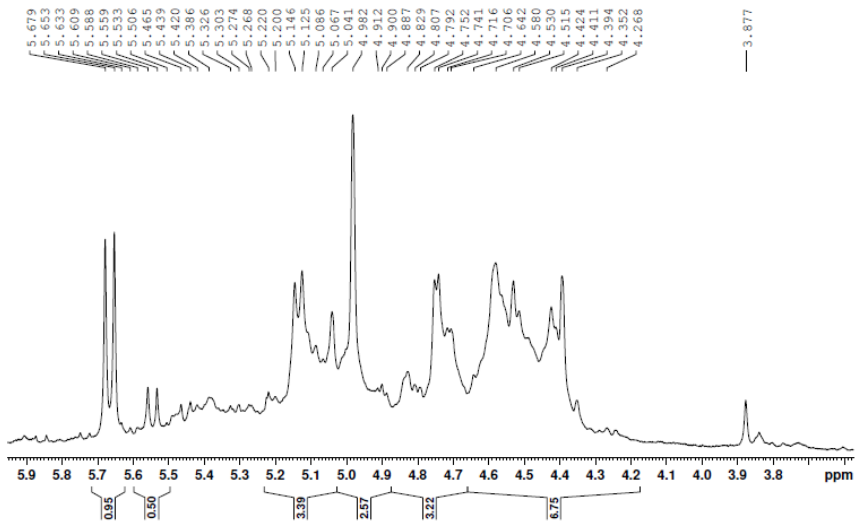
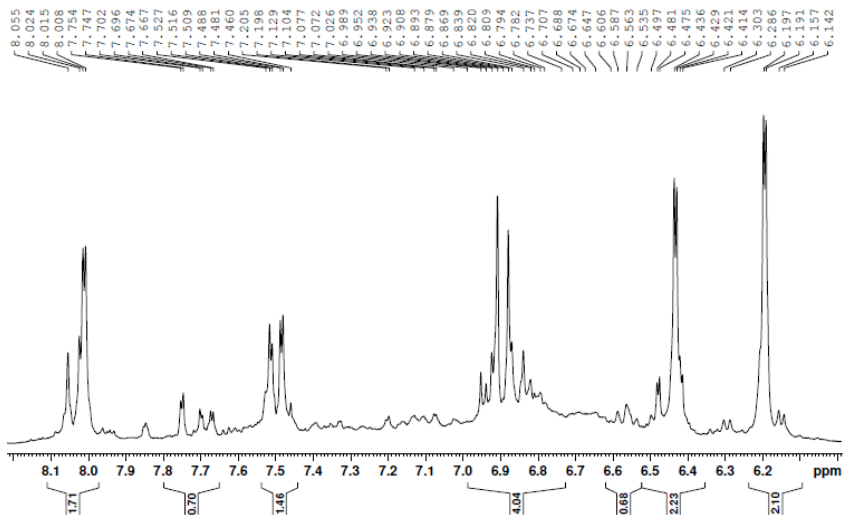




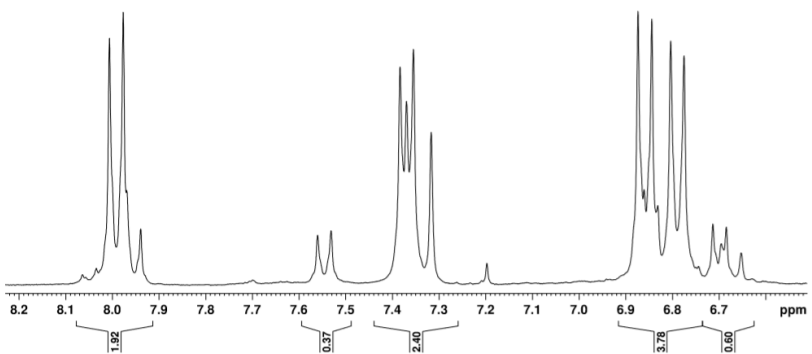
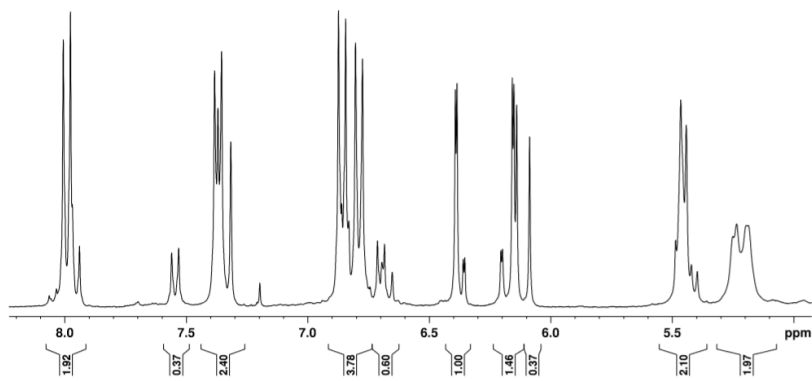
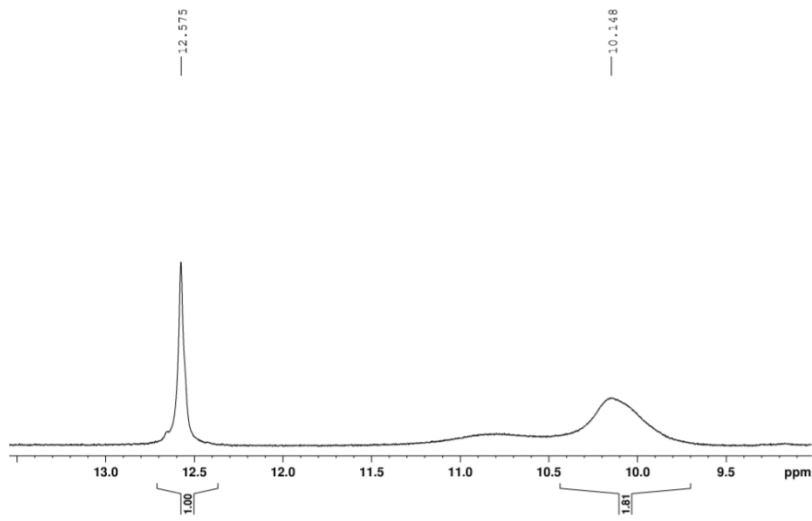


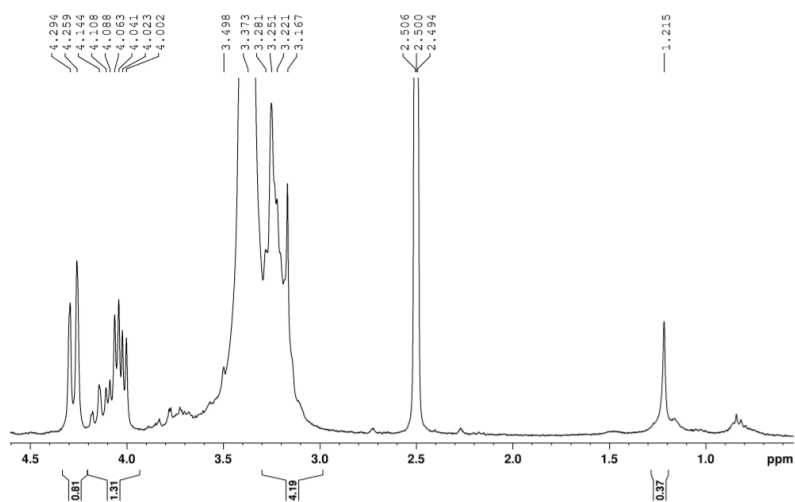
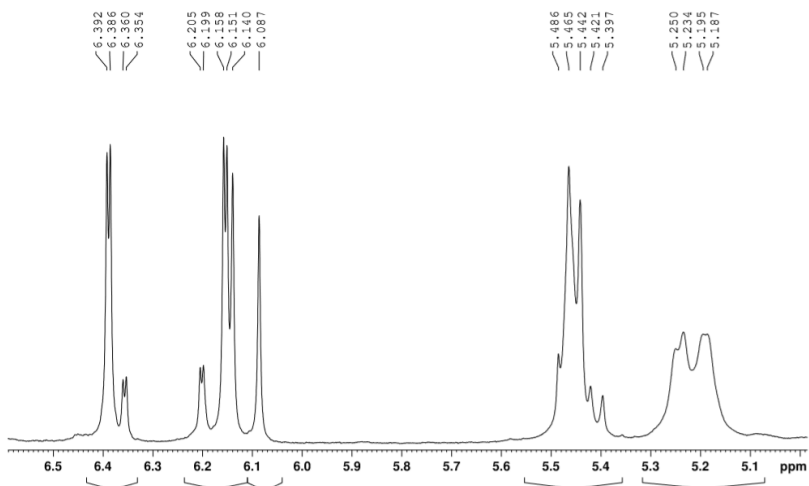
7. Ampliações do espectro de RMN ^1H da fração **Ff17-2** de *C.floribundus*.



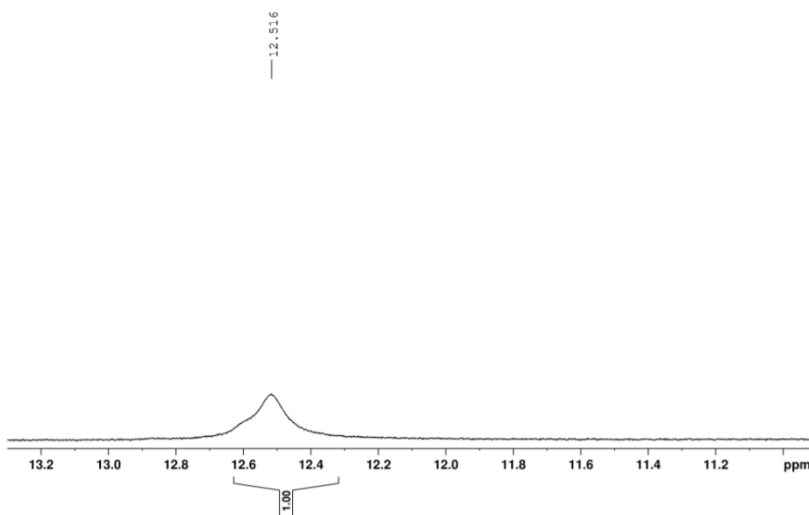


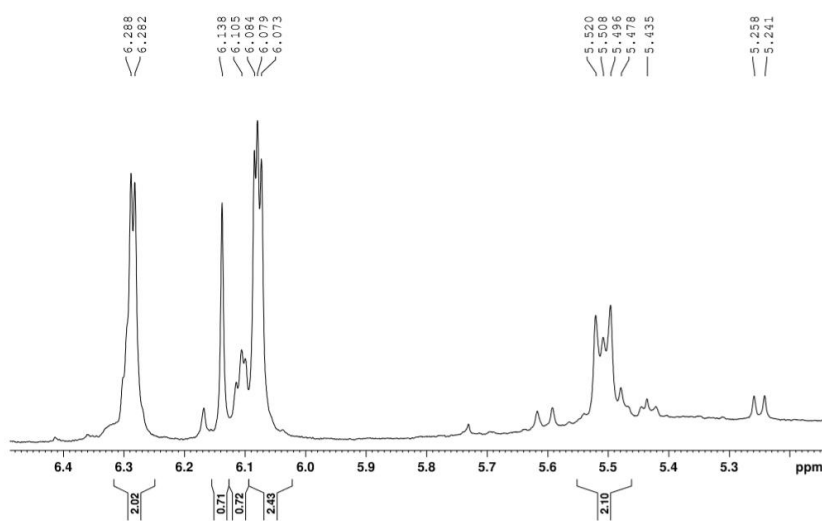
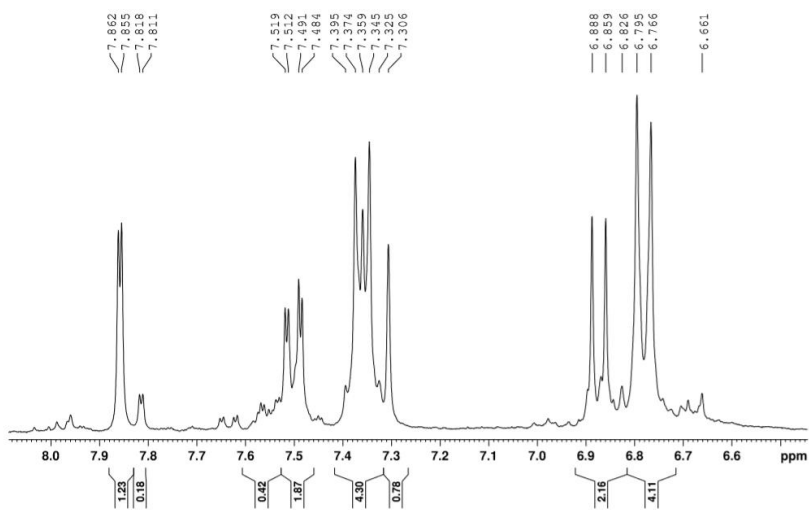
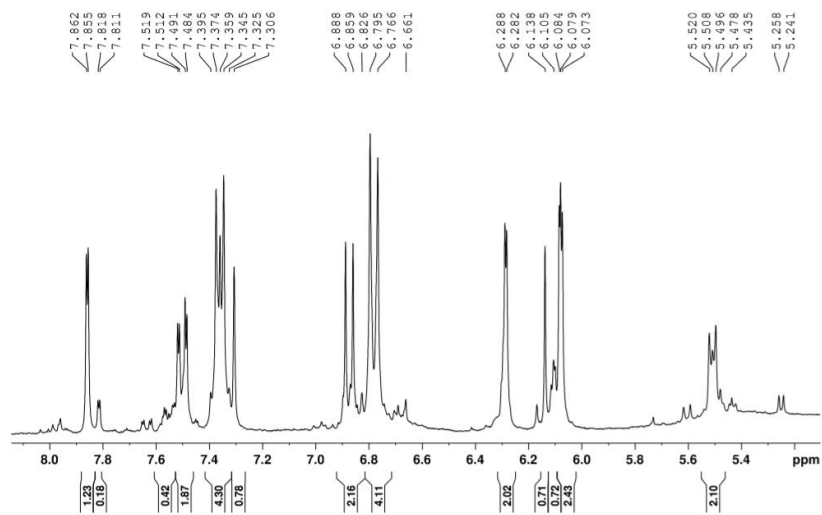
8. Ampliação do espectro de RMN ^1H da fração **Ff16-5** de *C.floribundus*.

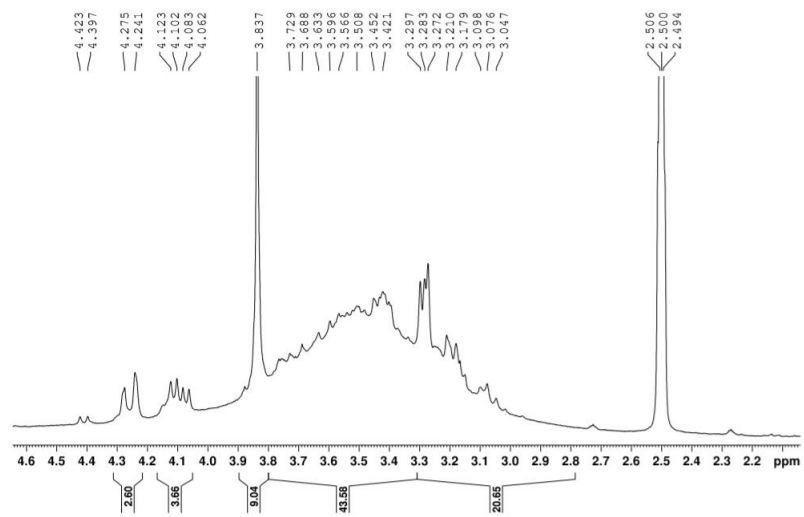
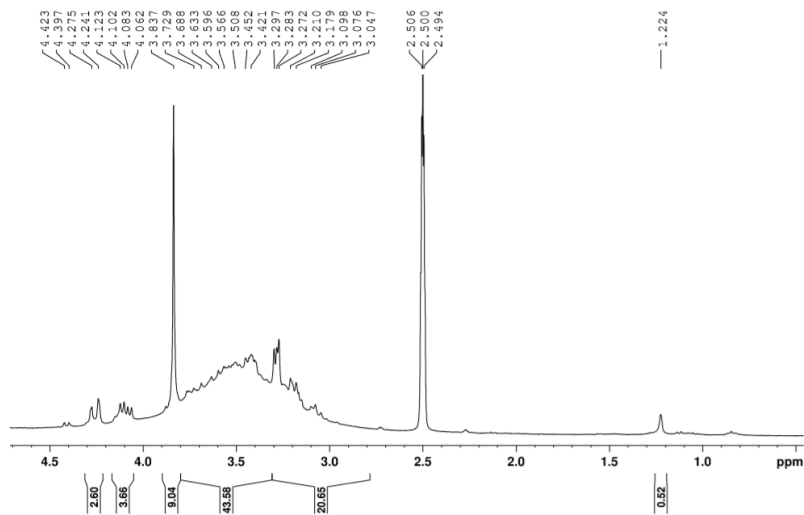




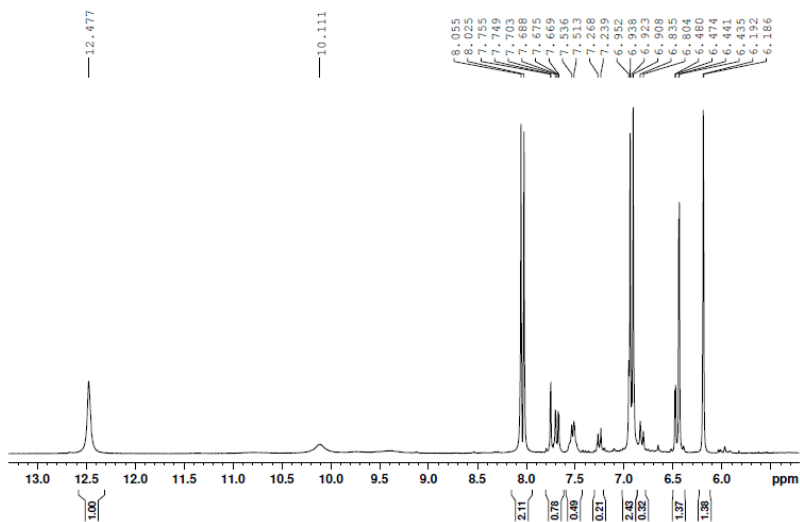
9. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração Ff13-6 de *C.floribundus*.

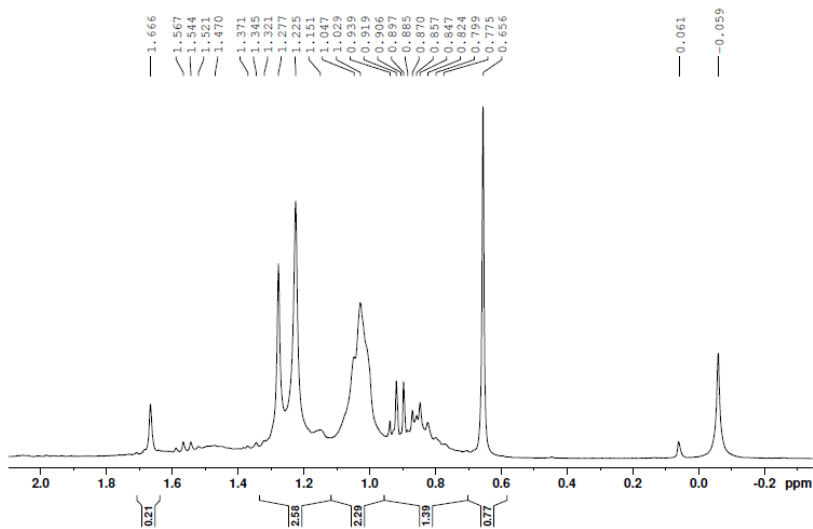
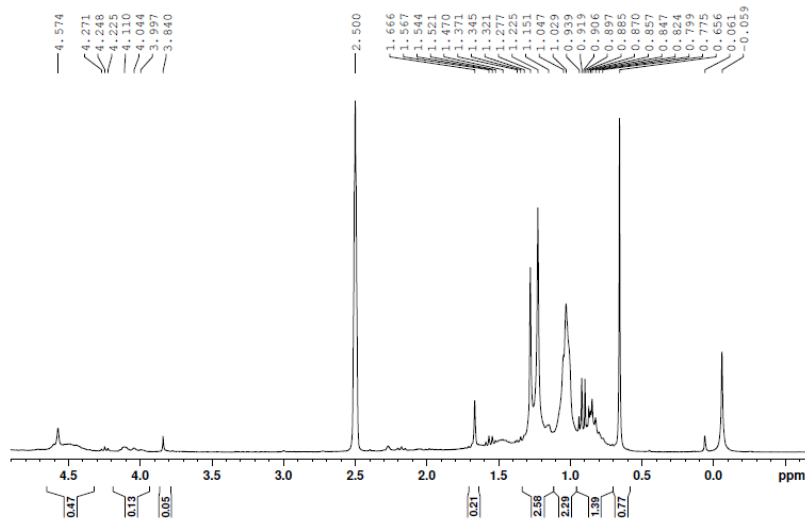
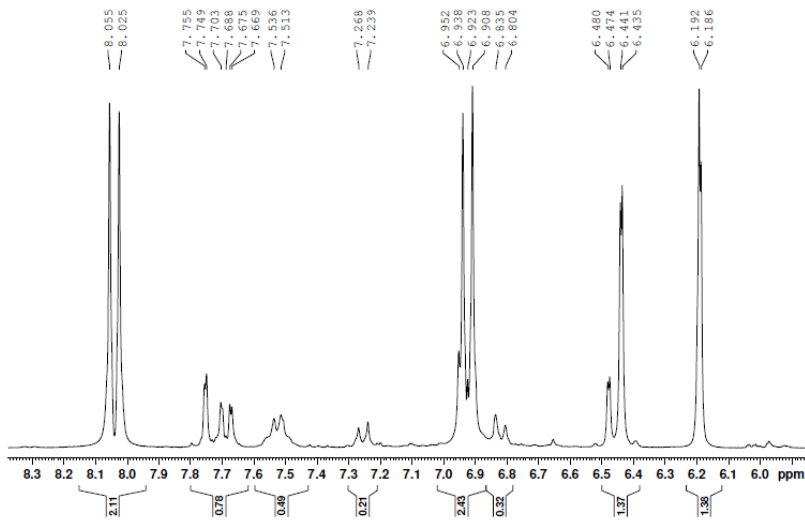




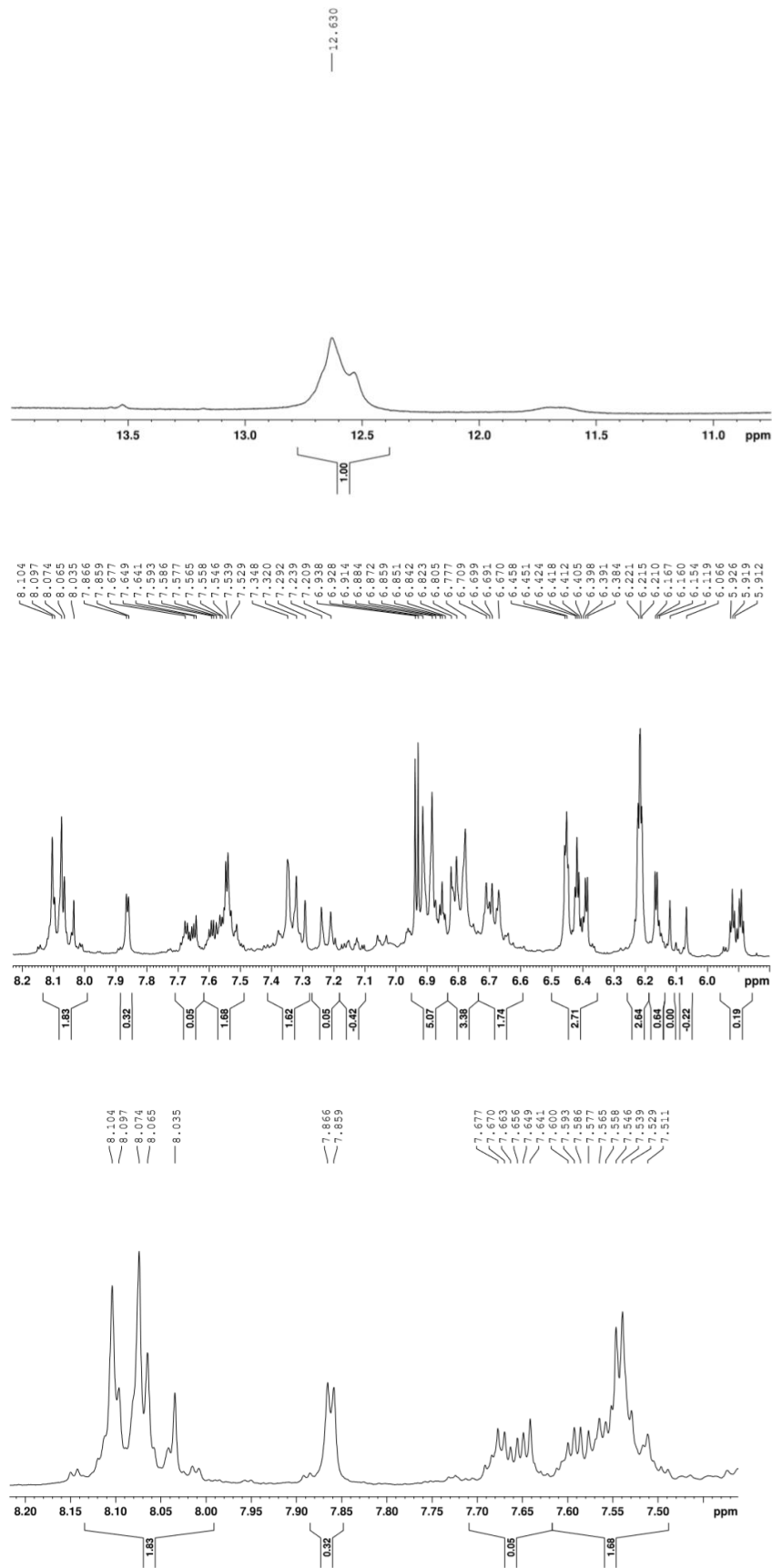


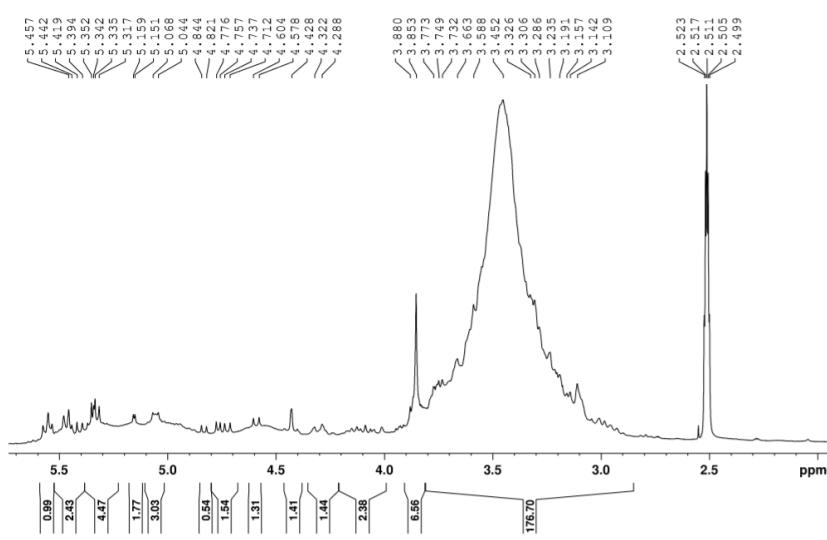
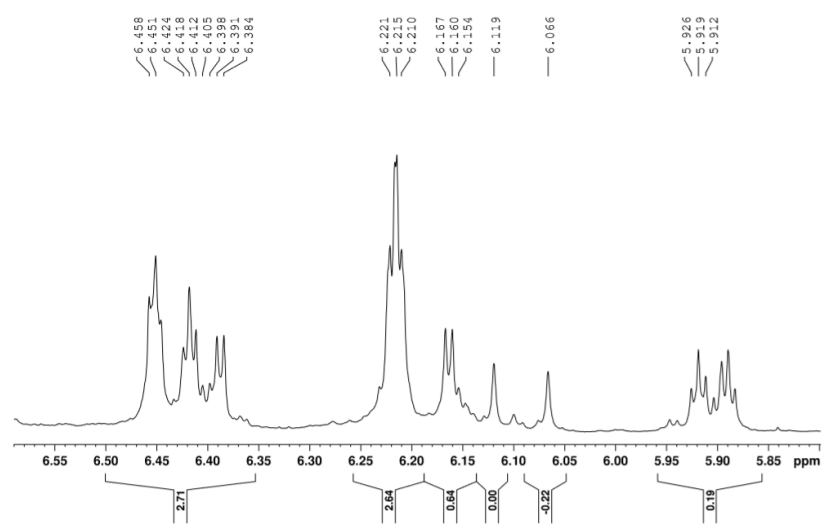
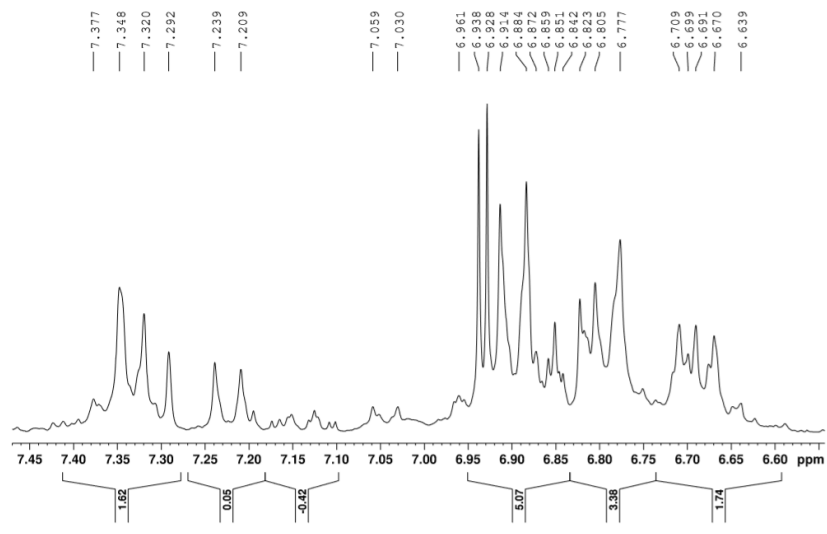
10. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração Ff17-7 de *C.floribundus*.

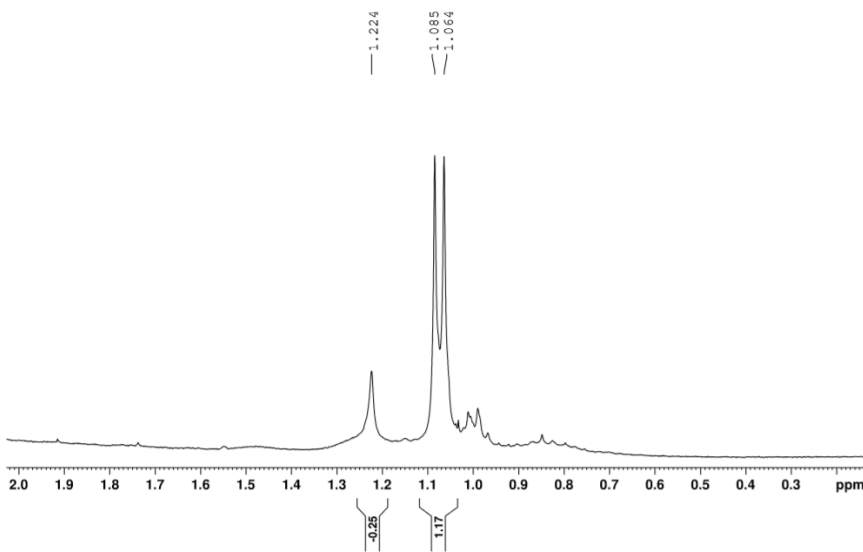
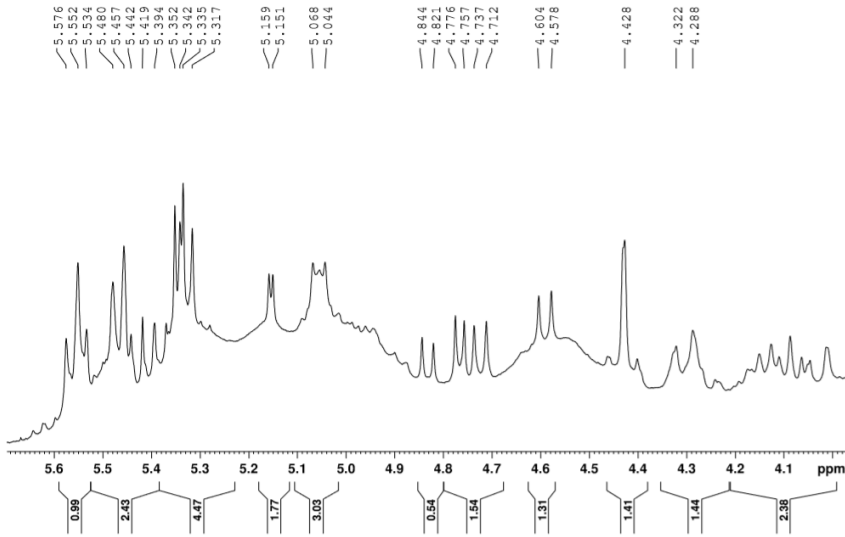
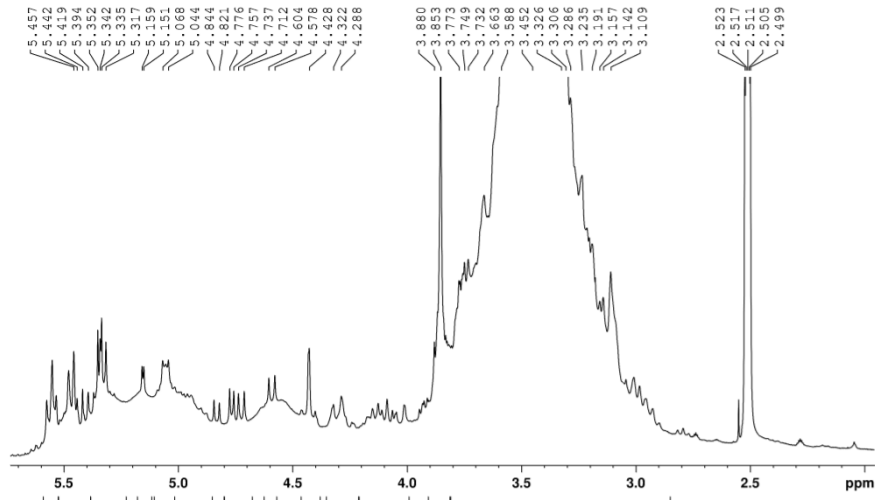




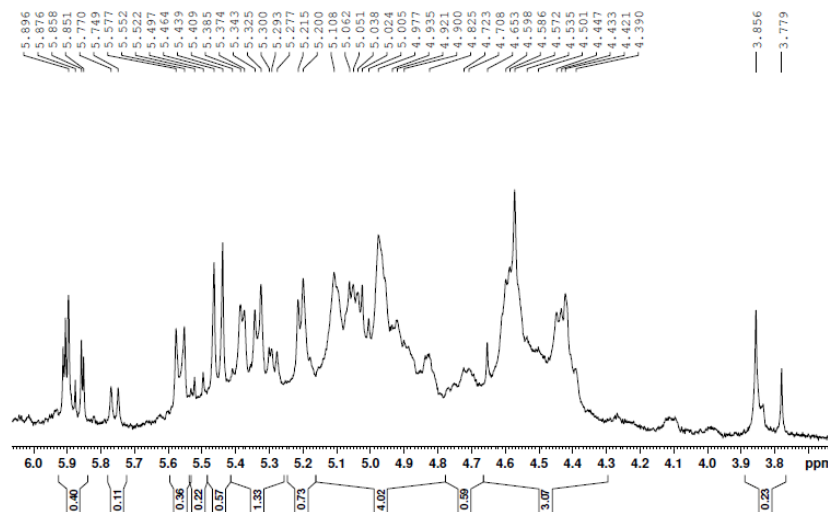
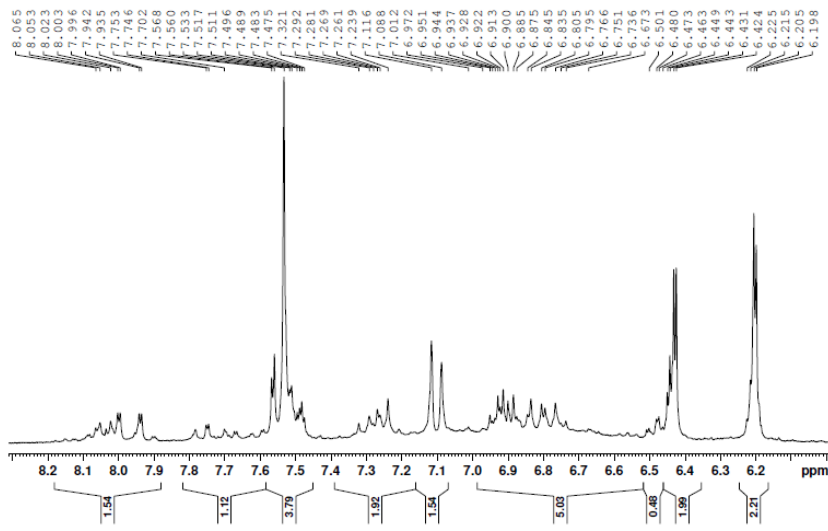
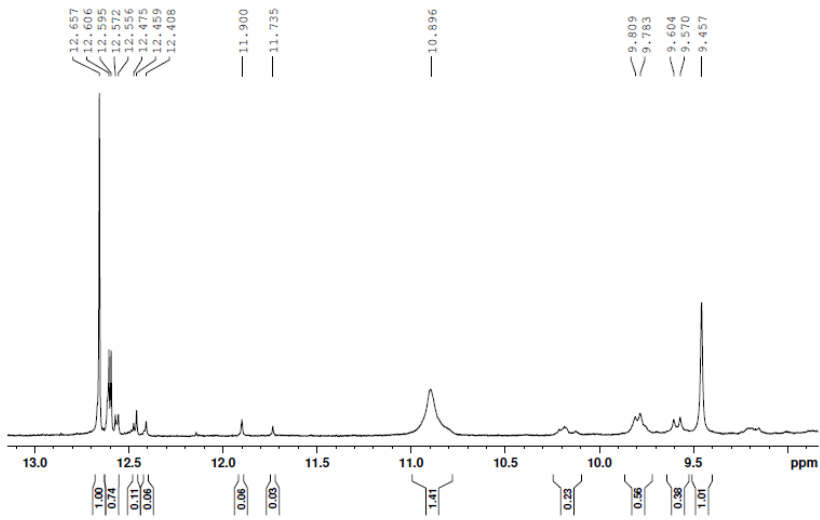
11. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração Ff112-5 de *C.floribundus*.

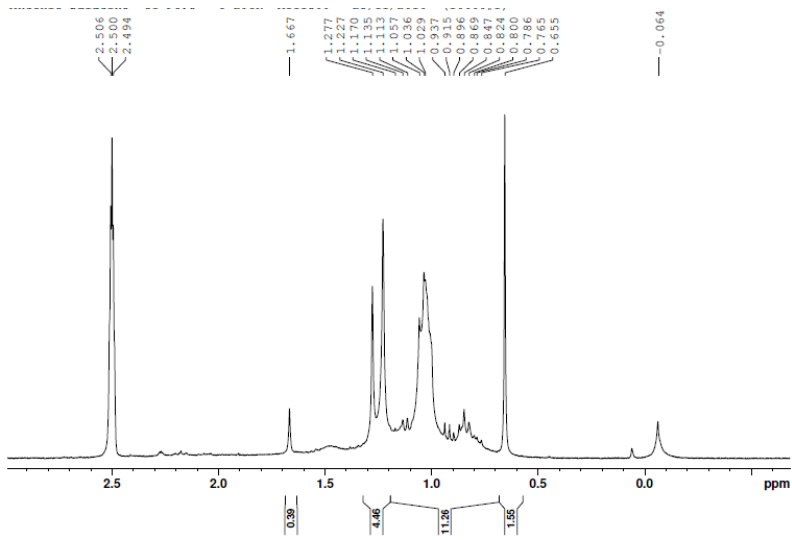




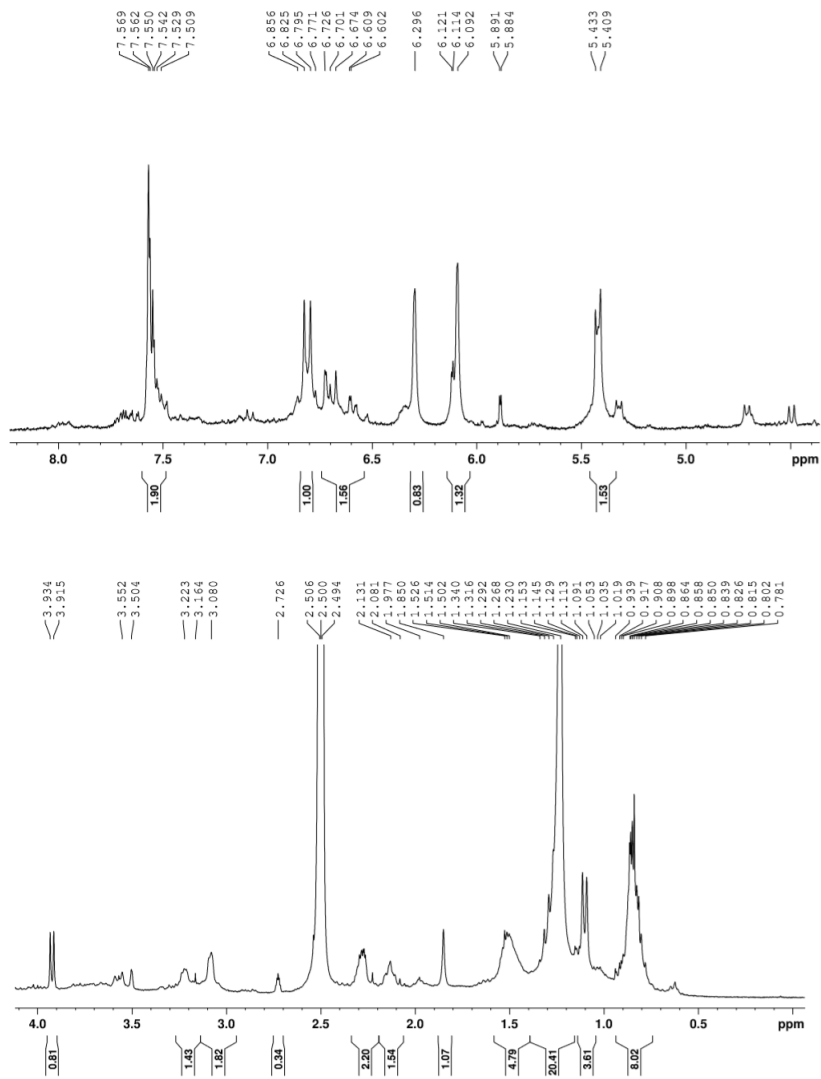


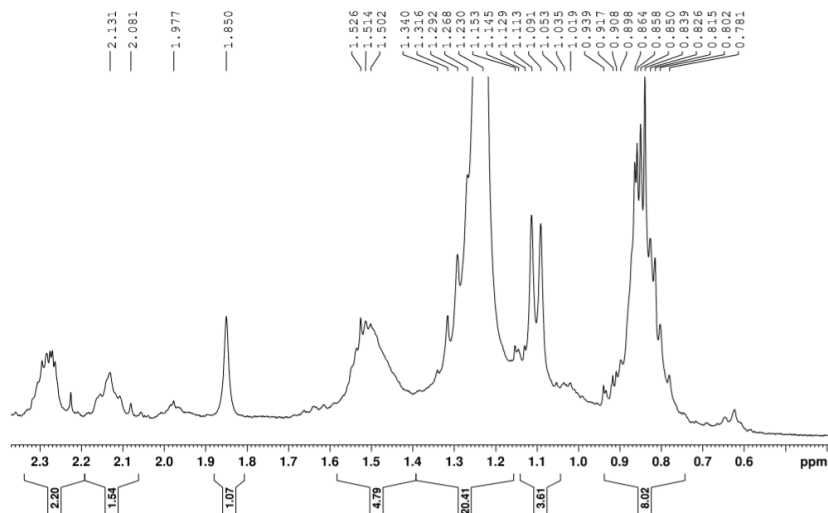
12. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração **F18-3** de *C.floribundus*.



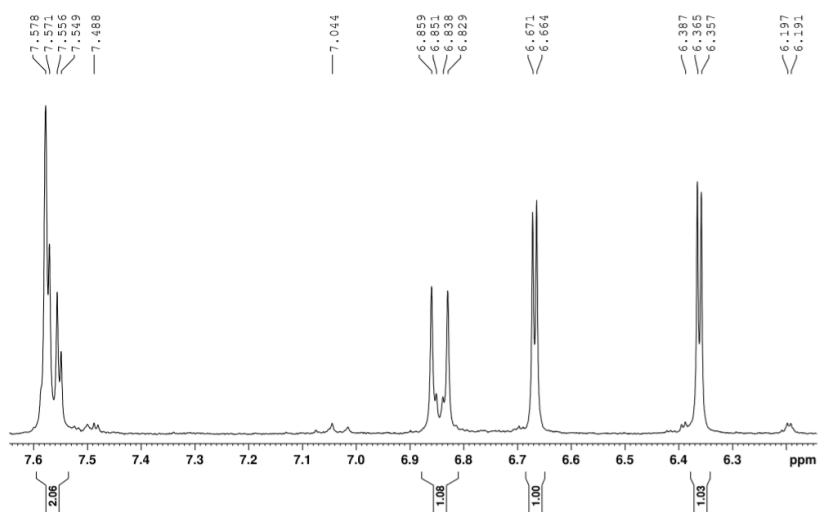
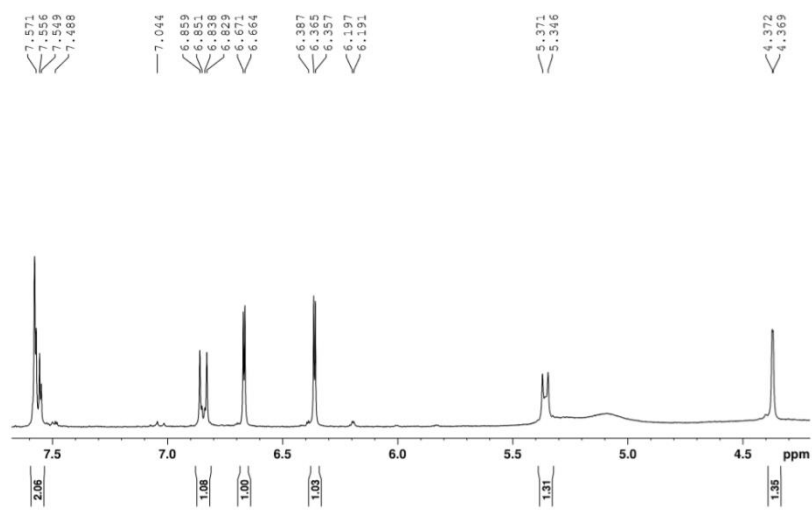


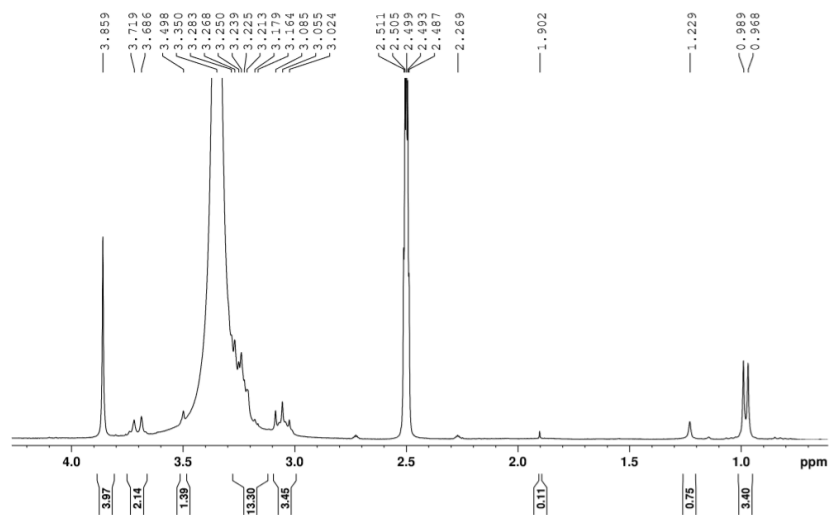
13. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração Fur9/10-2 de *C.urucurana*.



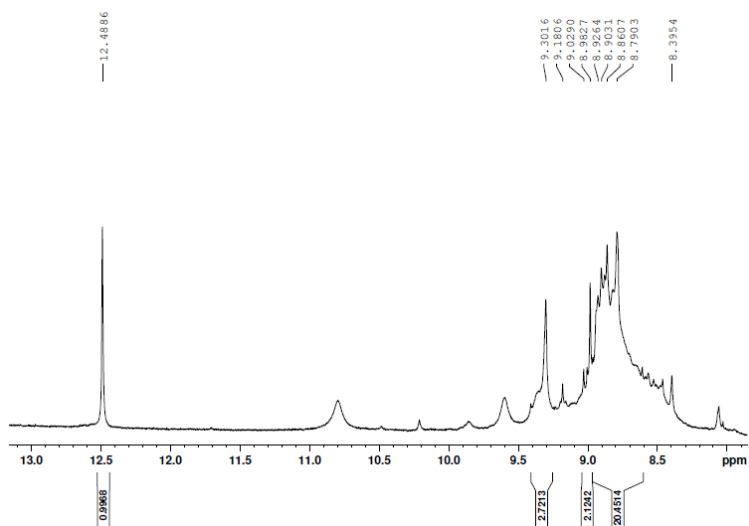


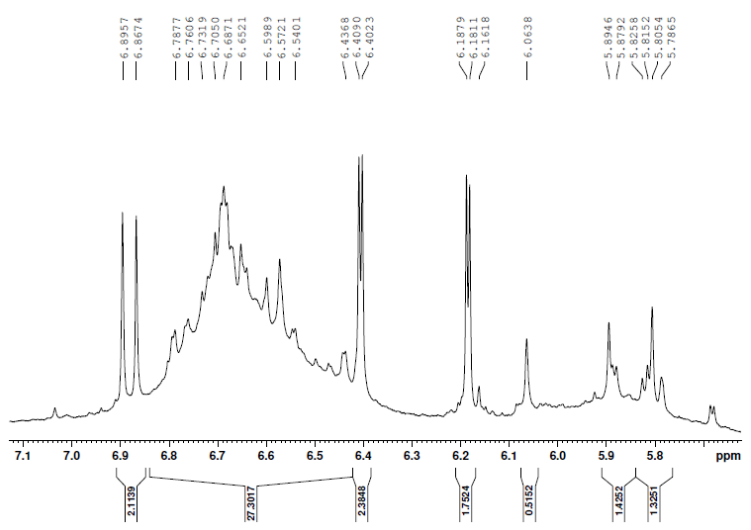
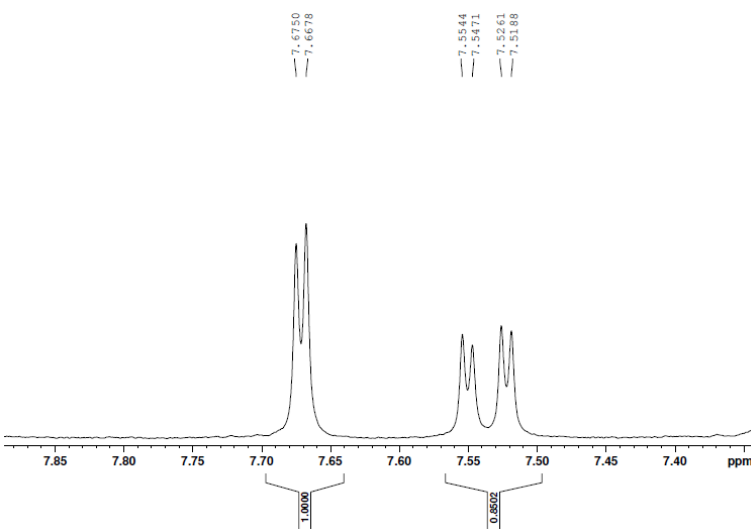
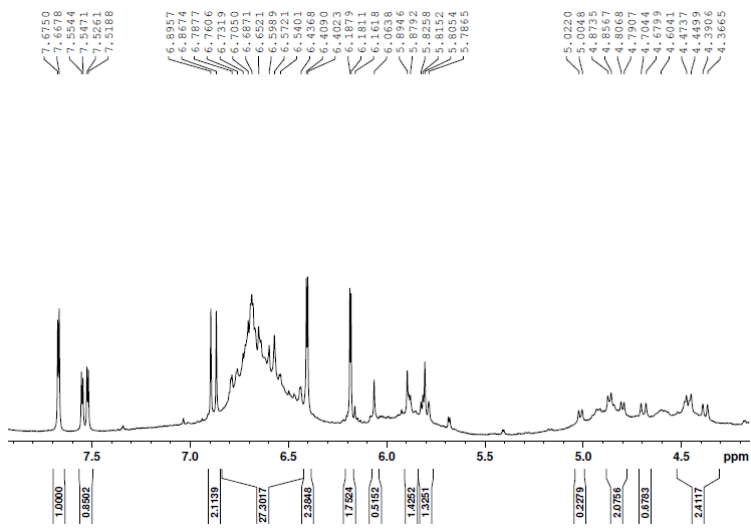
14. Ampliação do espectro de RMN ¹H do precipitado de filtragem da fração Fur4 de *C.urucurana*.

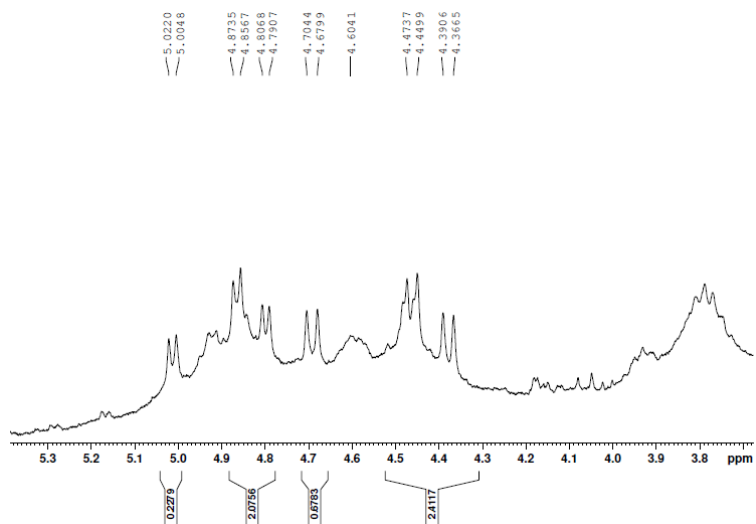




15. Ampliação do espectro de RMN ¹H da fração **Fur13/14-8** de *C.urucurana*.

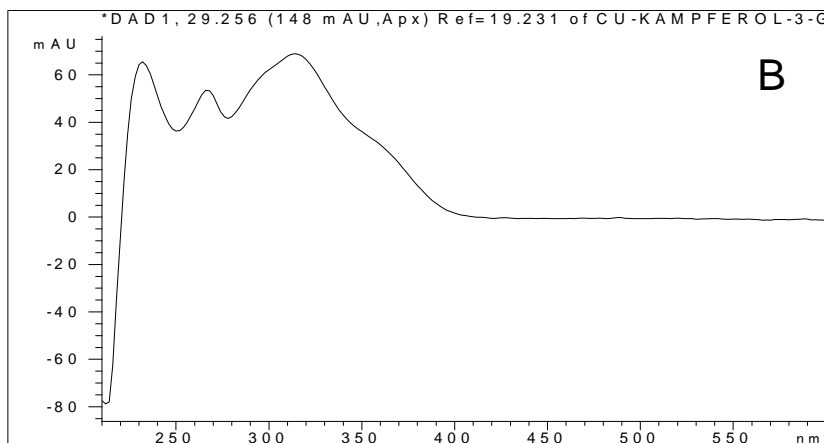
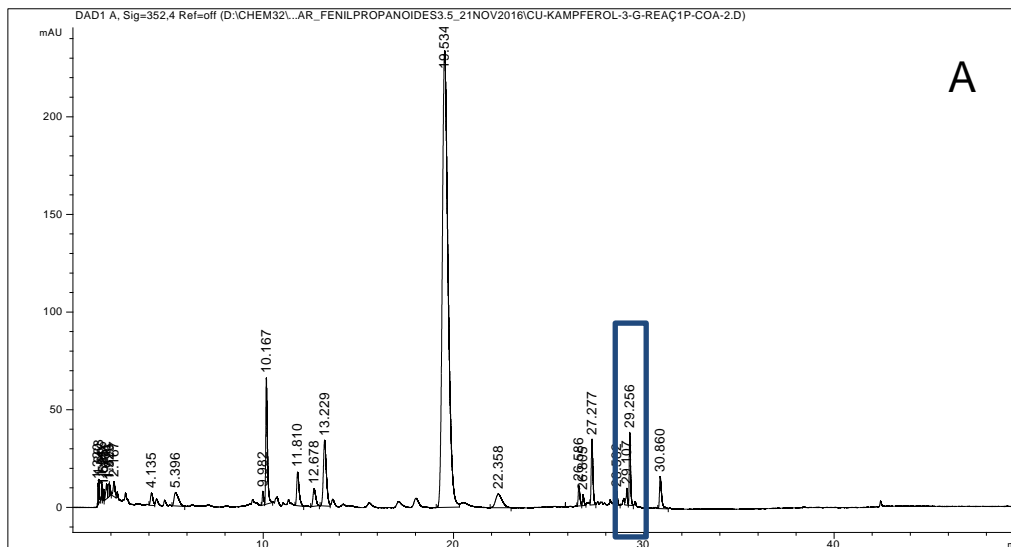




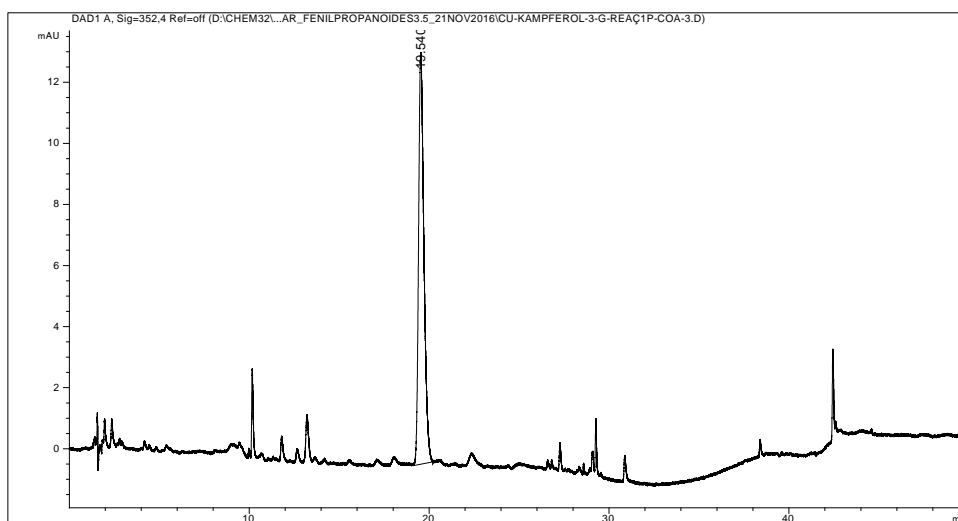


Anexo 2

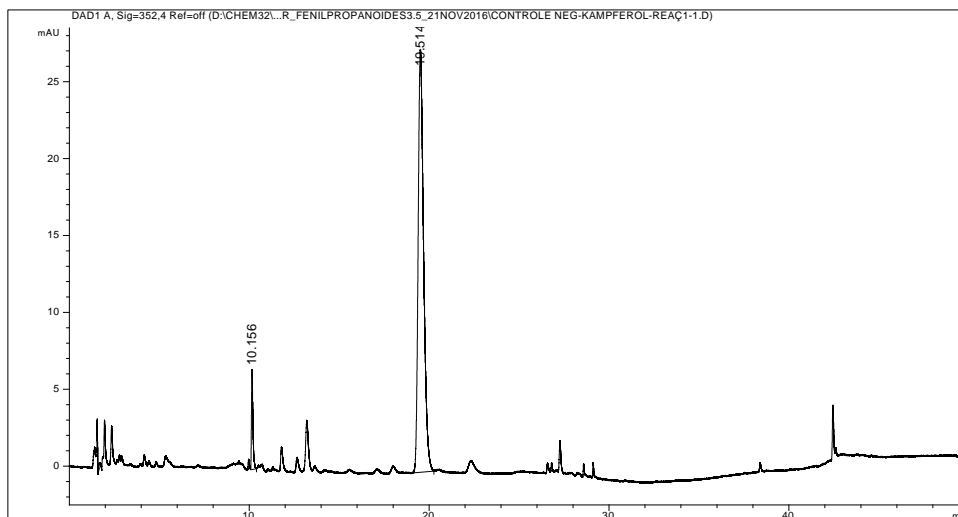
Replicatas de reações enzimáticas



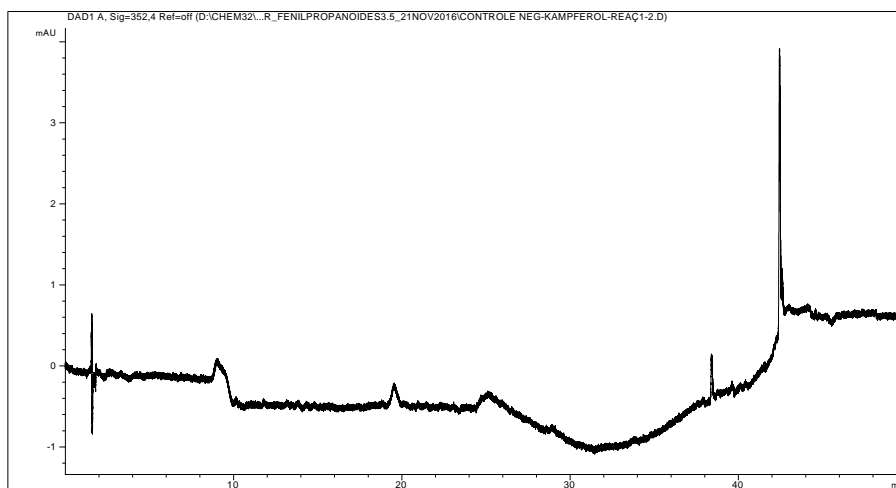
1. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático- Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – (A) Reação com presença de composto acilado em 29,256 min; (B) Espectro (UV/visível) do composto acilado.



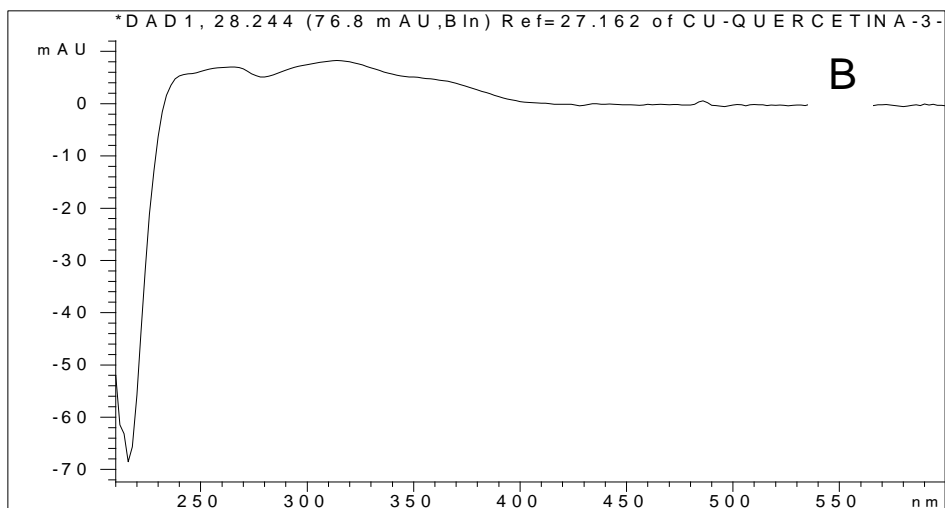
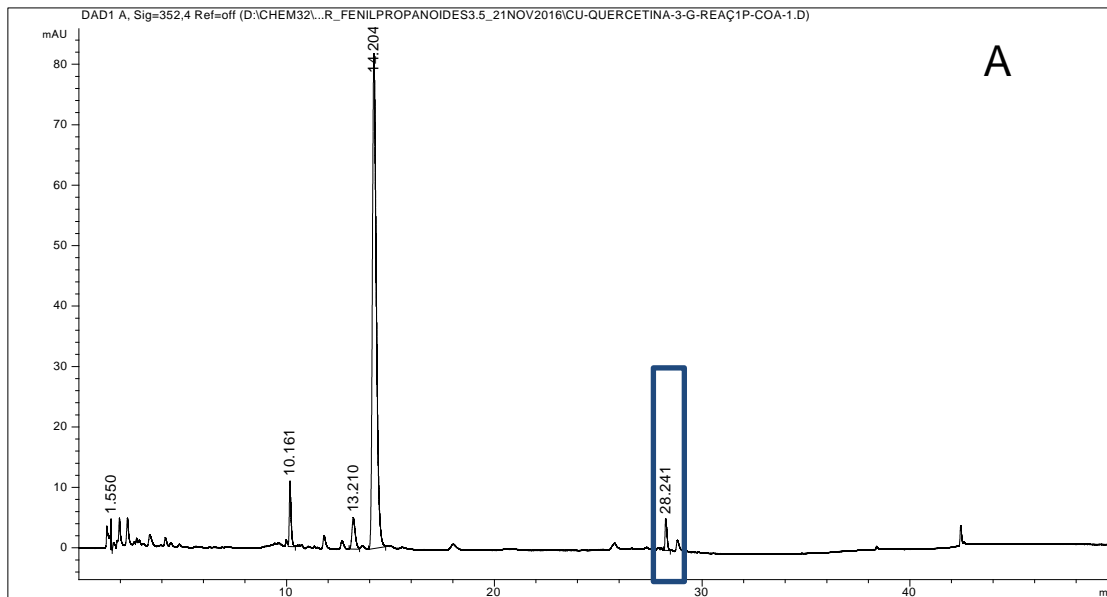
2. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – Sem reação.



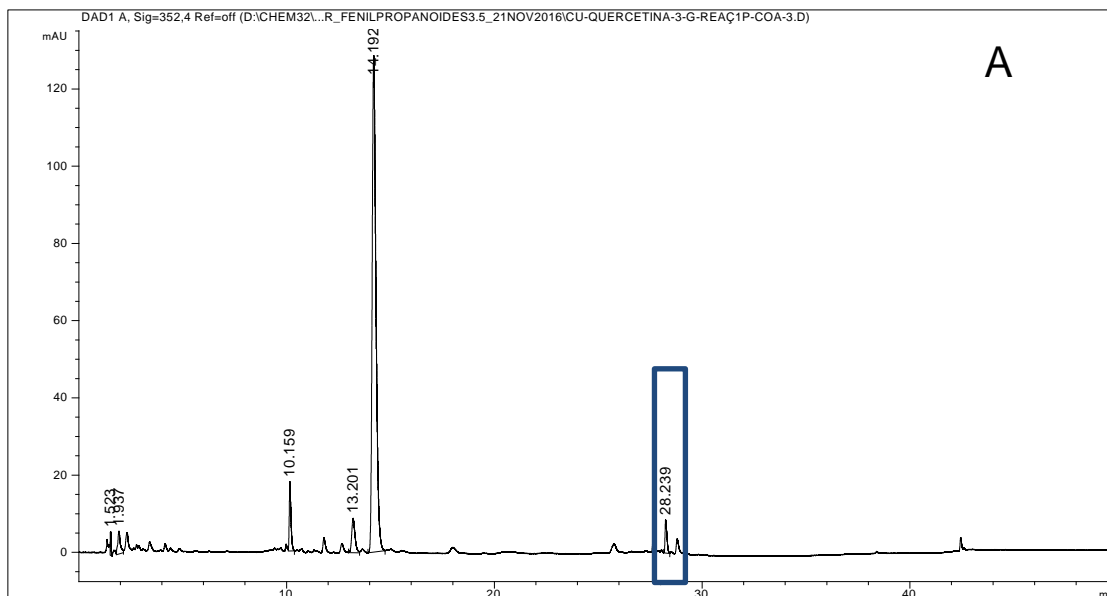
3. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – Controle negativo, sem a presença do composto acilado.



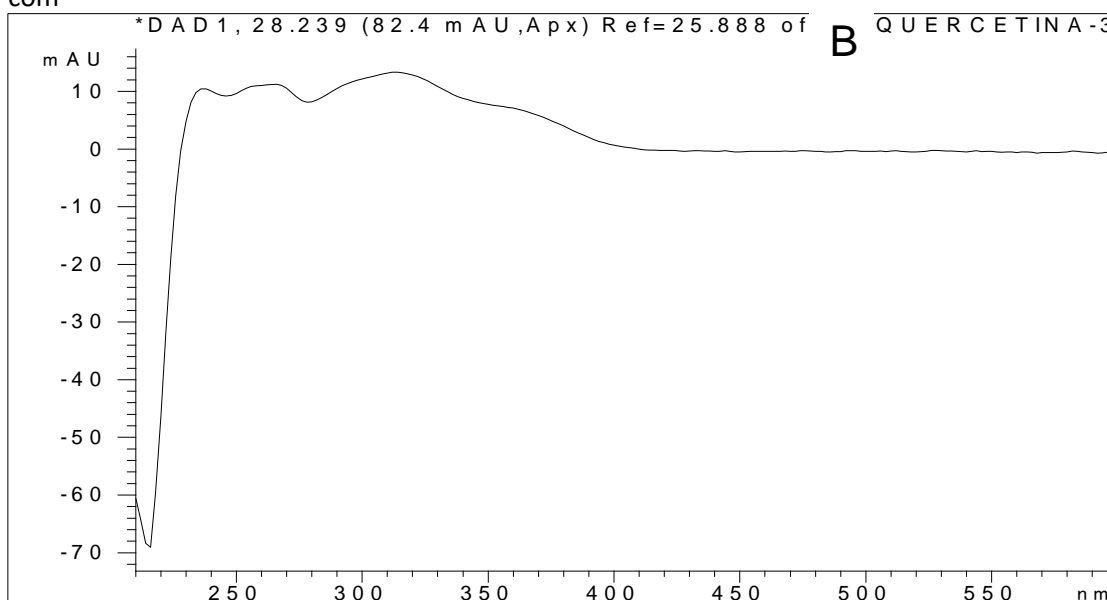
4. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – Controle negativo, sem a presença do composto acilado



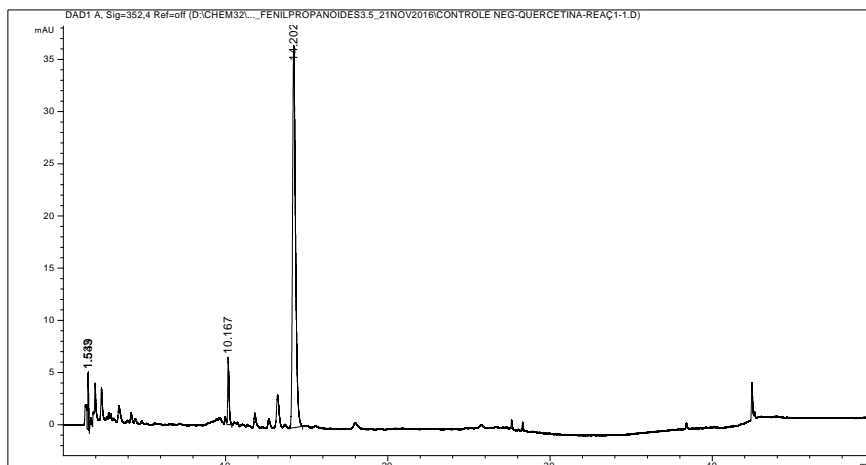
5. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com presença de composto acilado em 28,244 min; (B) Espectro (UV/visível) do composto acilado



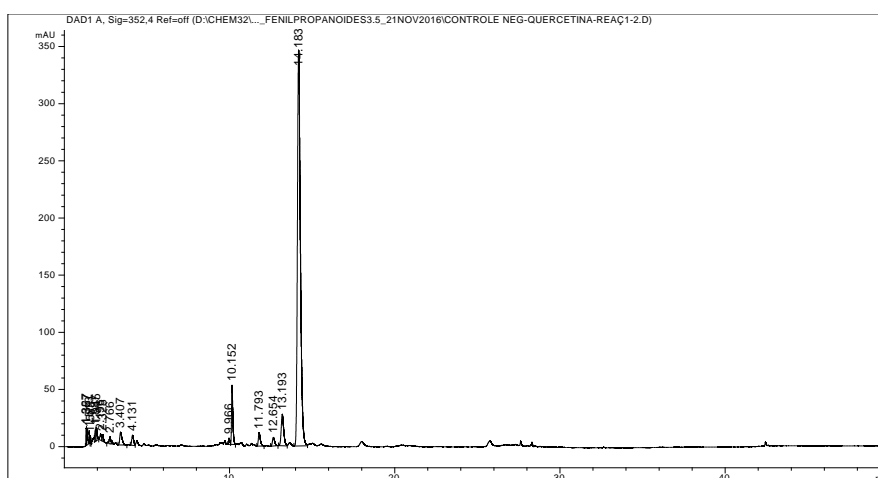
com



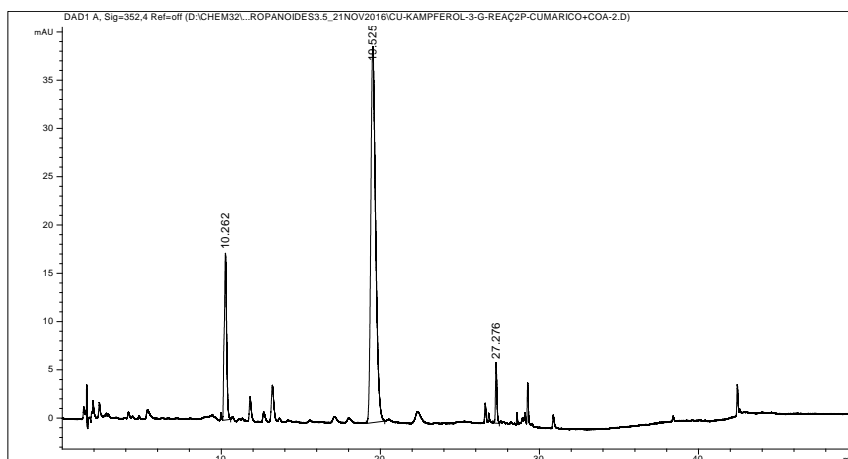
6. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com presença de composto acilado em 28,239 min; (B) Espectro (UV/visível) do composto acilado.



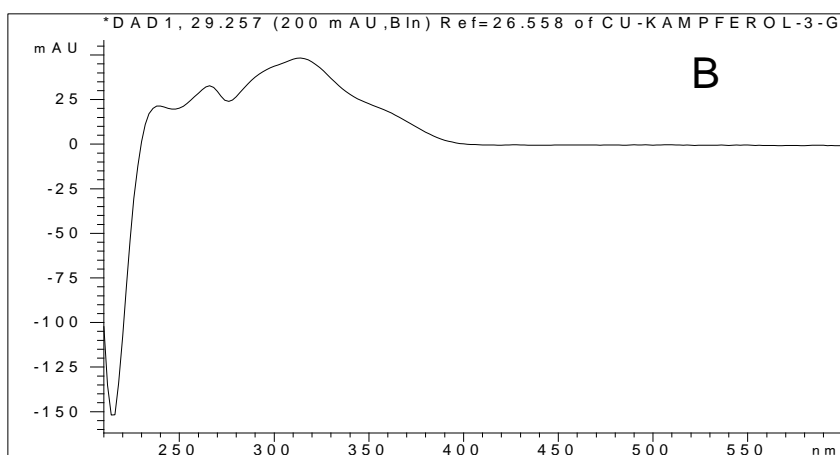
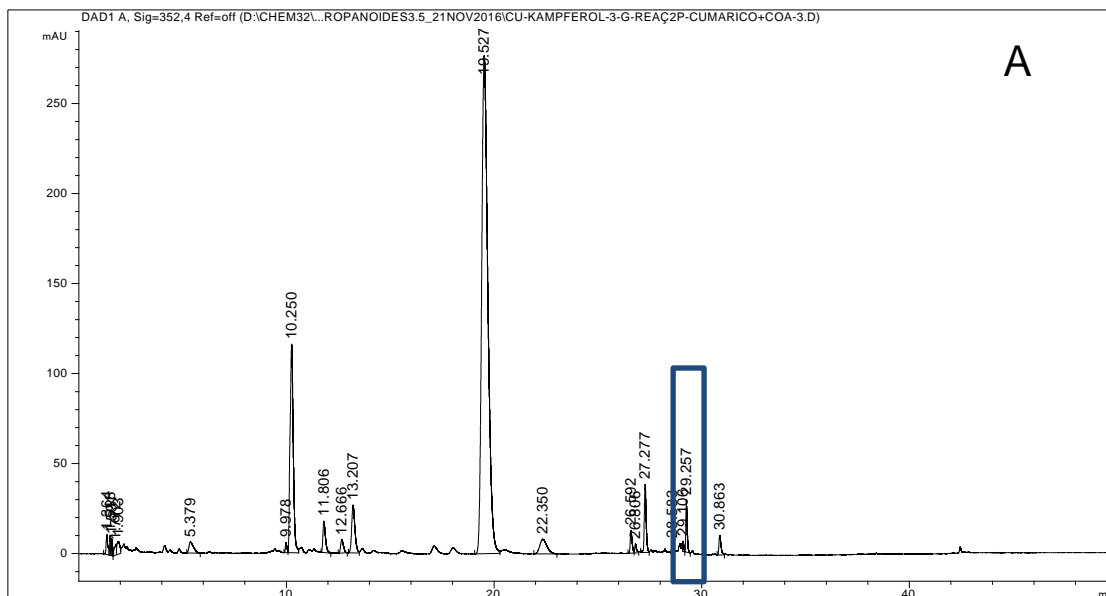
7. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-coumaroil-CoA - Controle negativo, sem presença do composto acilado.



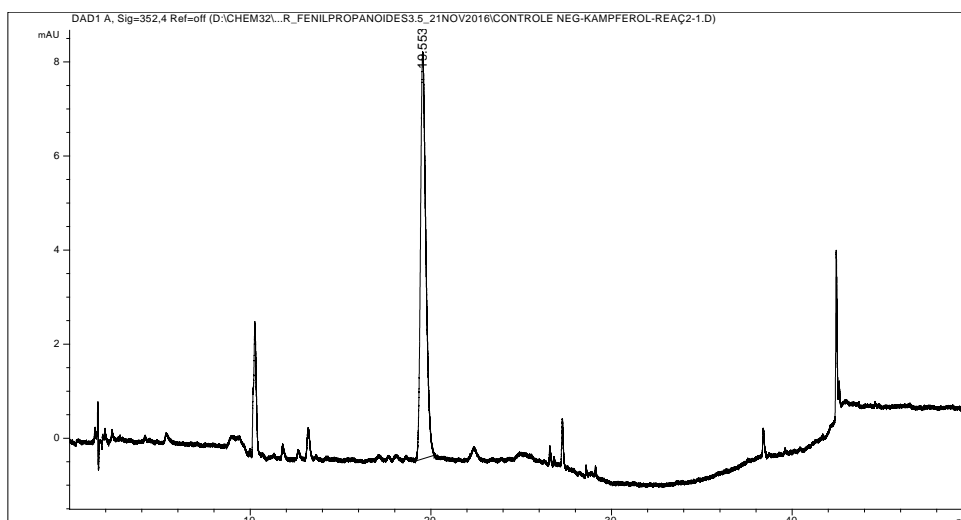
8. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-coumaroil-CoA - Controle negativo, sem presença do composto acilado.



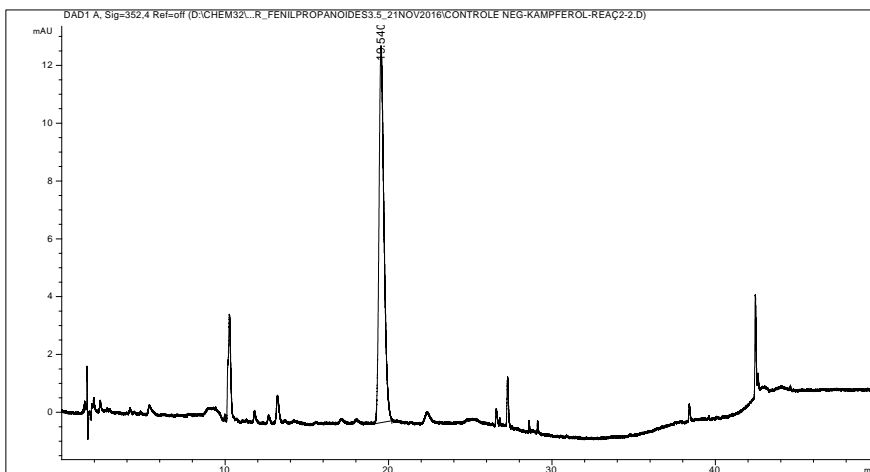
9. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e (ác.cumárico+CoA+ATP) – Sem reação.



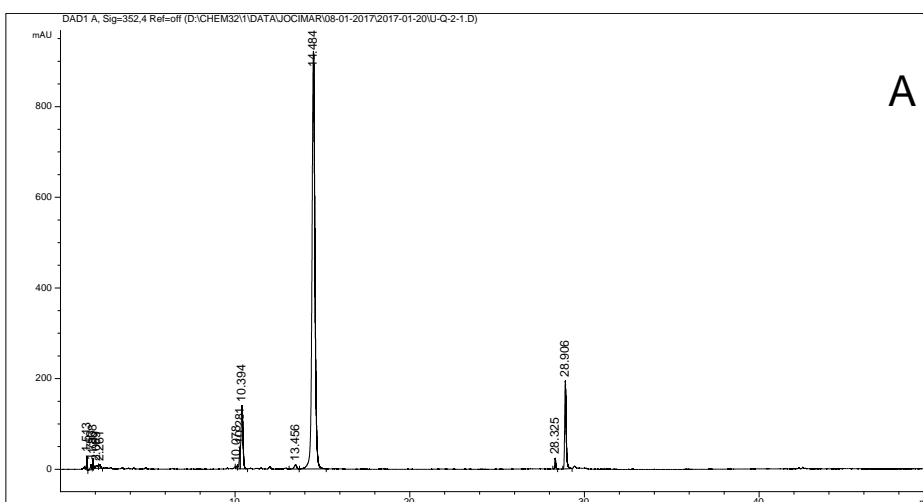
10. *C.urucurana* – Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e (ác.cumárico+CoA+ATP) - (A) Reação com presença de composto acilado em 29,257 min; (B) Espectro (UV/visível) do composto acilado.



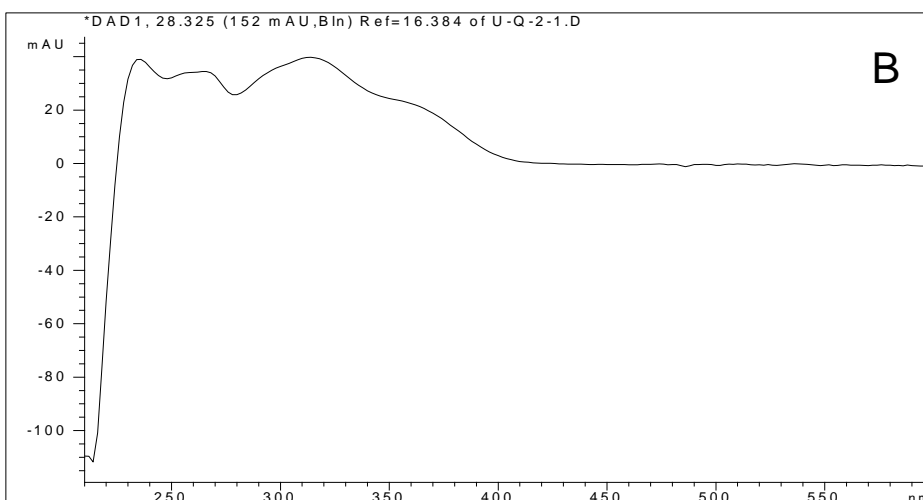
11. *C.urucurana* – Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e (ác.cumárico+CoA+ATP) - Controle negativo, sem presença do composto acilado.



12. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e (ác.cumárico+CoA+ATP) - Controle negativo, sem presença do composto acilado.

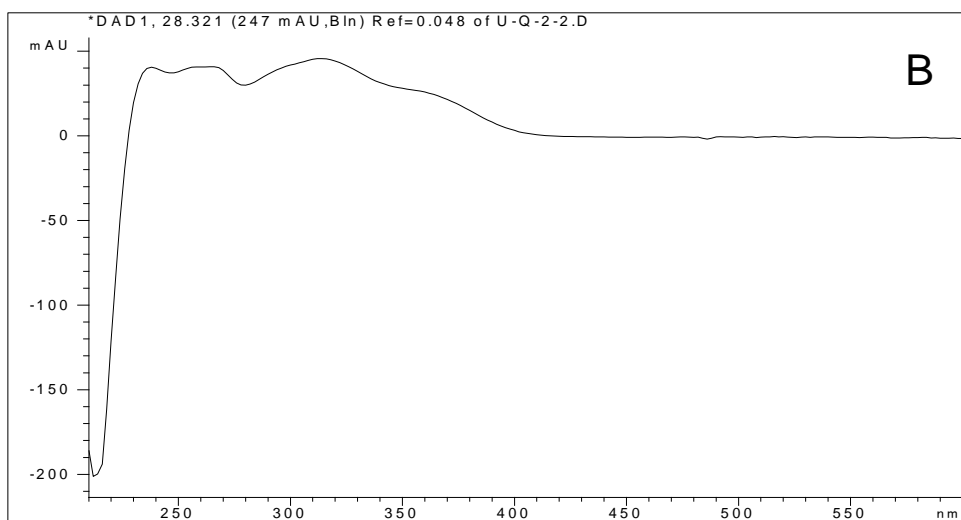
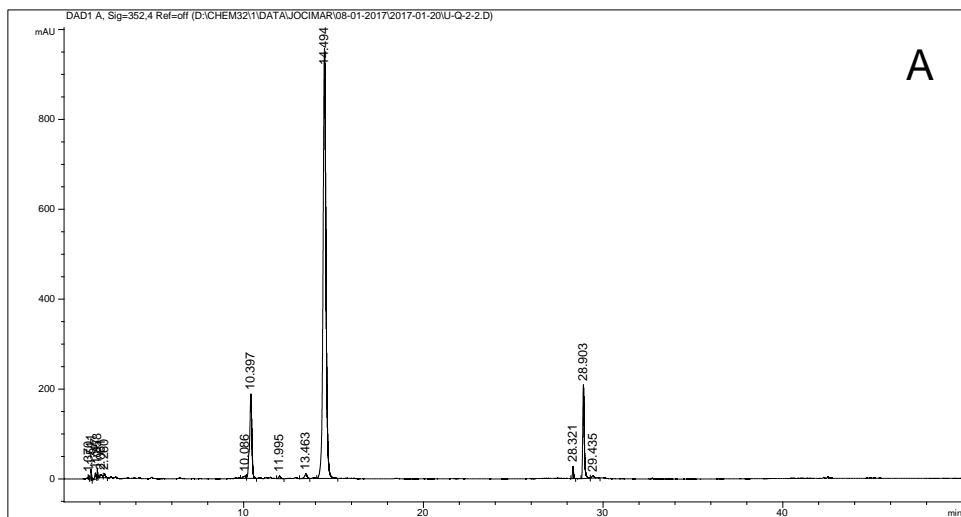


A

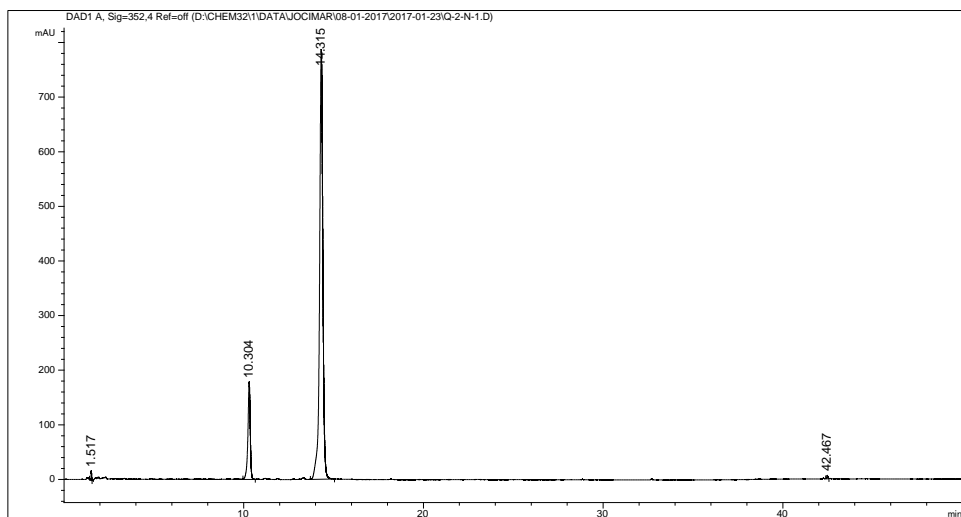


B

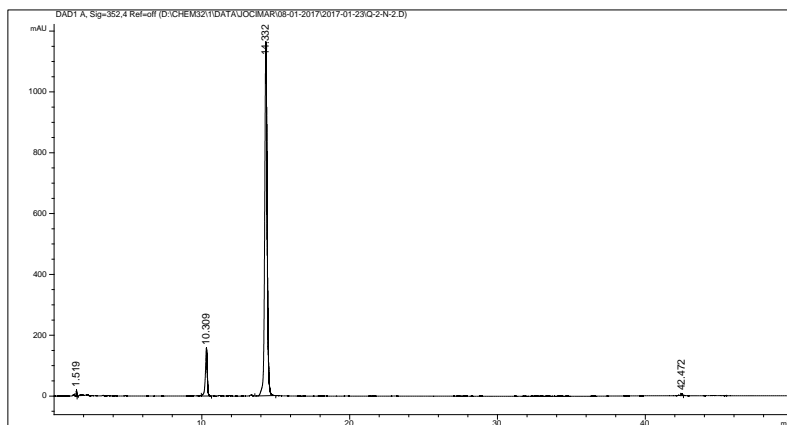
13. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com quercetina-3-O-glucosídeo com (ác.cumárico+CoA+ATP) - (A) Reação com presença de composto acilado em 28,325 min; (B) Espectro (UV/visível) do composto acilado.



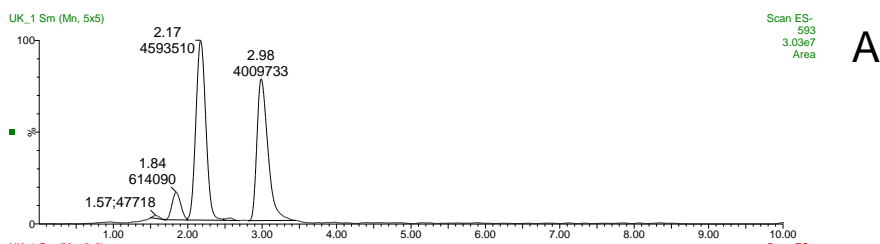
14. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com quercetina-3-O-glucosídeo com (ác.cumárico+CoA+ATP); (A) Reação com presença de composto acilado em 28,325 min; (B) Espectro (UV/visível) do composto acilado



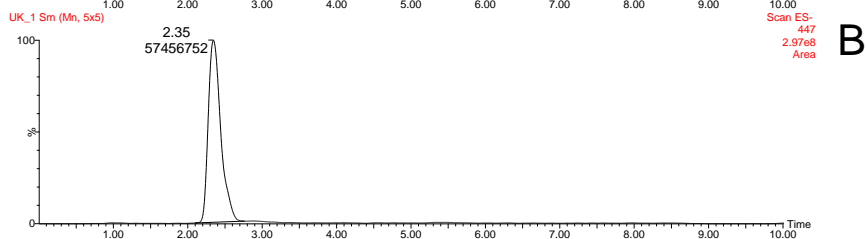
15. *C.urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático com quercetina-3-O-glucosídeo e (ác.cumárico+CoA+ATP) - Controle negativo, sem presença do composto acilado.



16. *C. urucurana* - Cromatograma de ensaio enzimático com quercetina-3-O-glucosídeo e (ác.cumárico+CoA+ATP) - Controle negativo, sem presença do composto acilado.

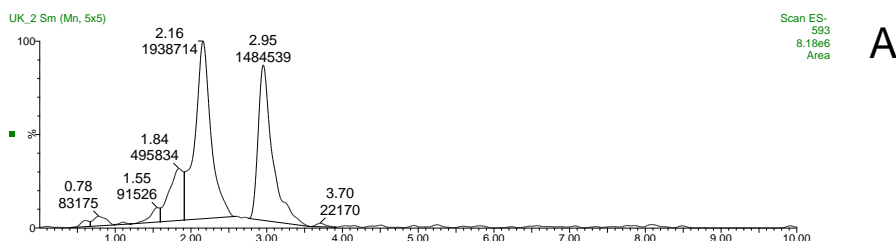


A

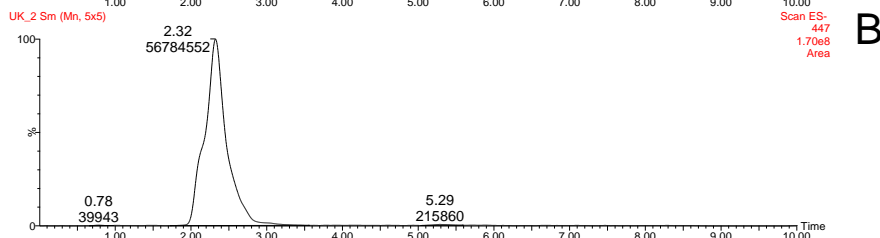


B

17. *C. urucurana* – Cromatogramas (UPLC) - ensaio enzimático com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com produto acilado em 2,98 min; (B) Padrão do substrato.

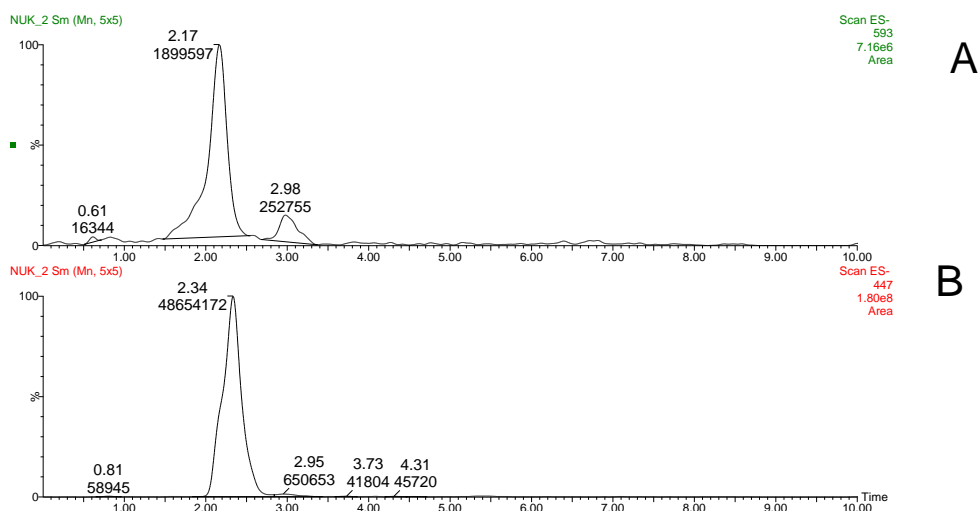


A

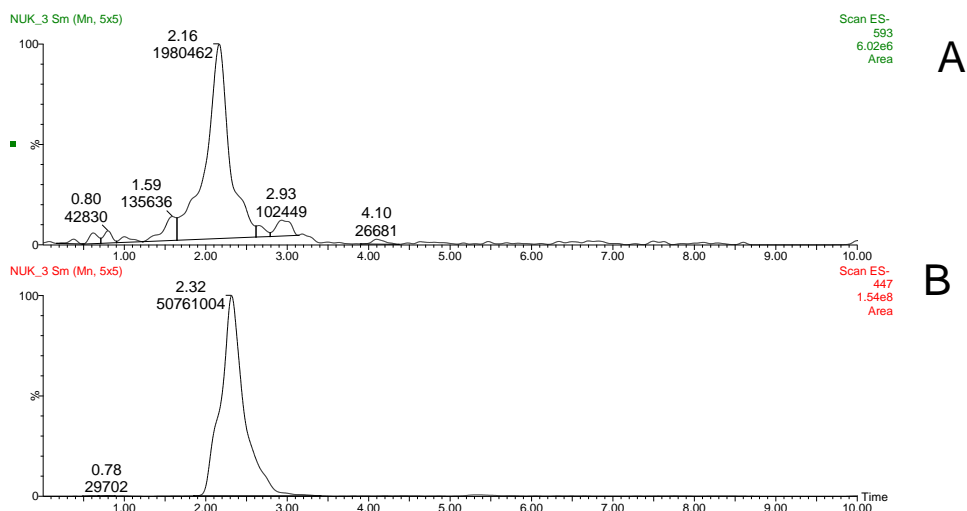


B

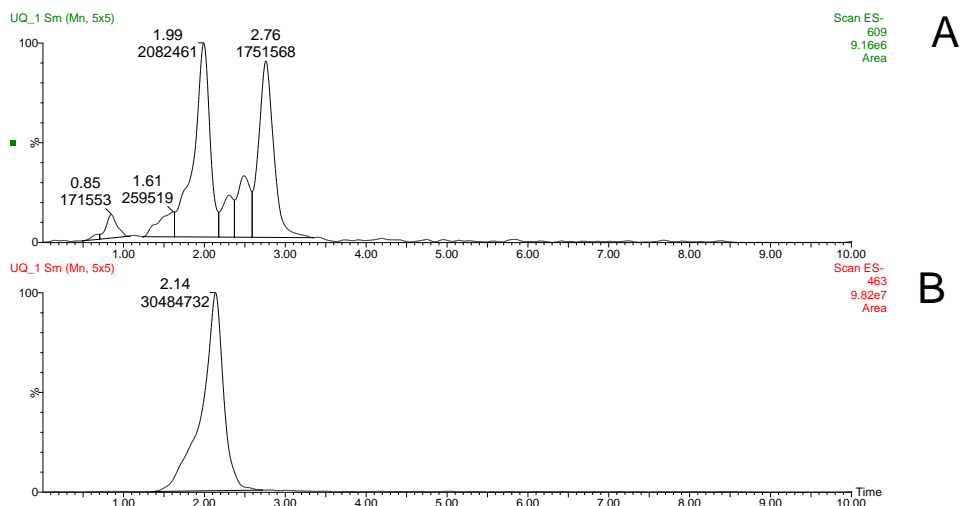
18. *C. urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com produto acilado em 2,95 min; (B) Padrão do substrato.



19. *C. urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroyl-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.

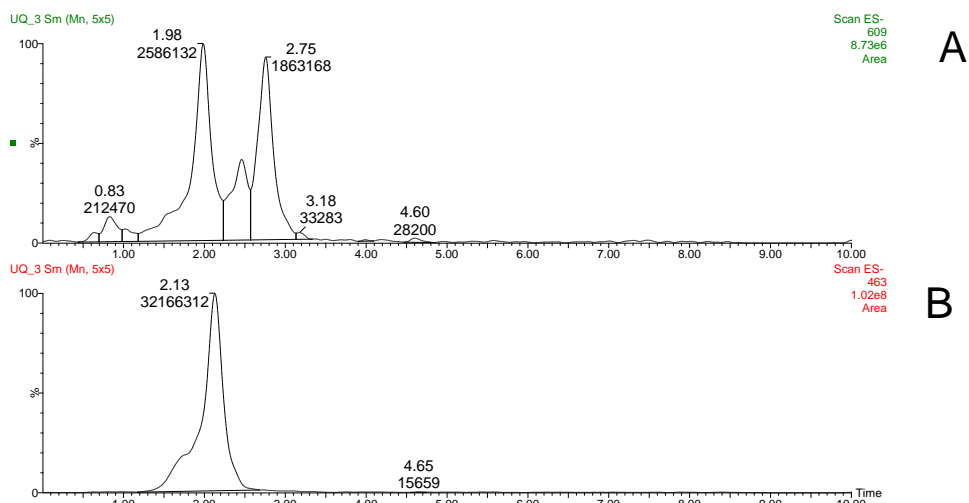


20. *C. urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroyl-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.

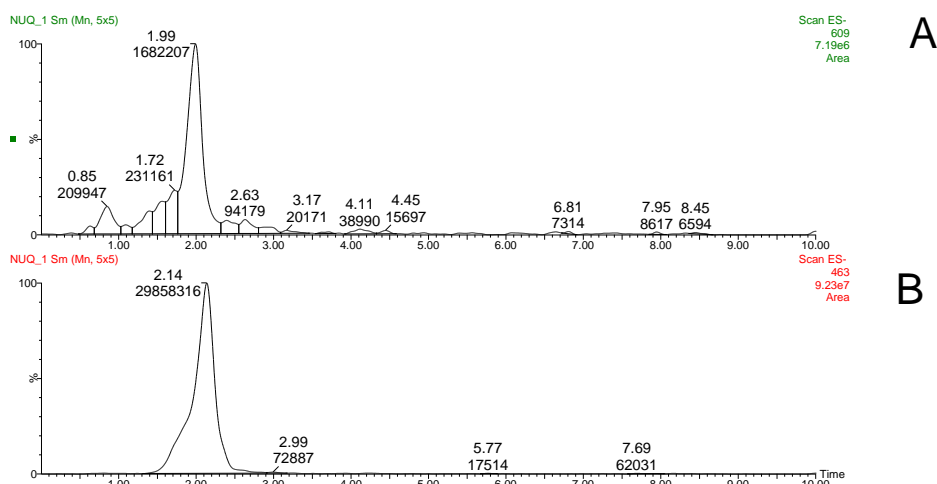


21. *C. urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-glucosídeo

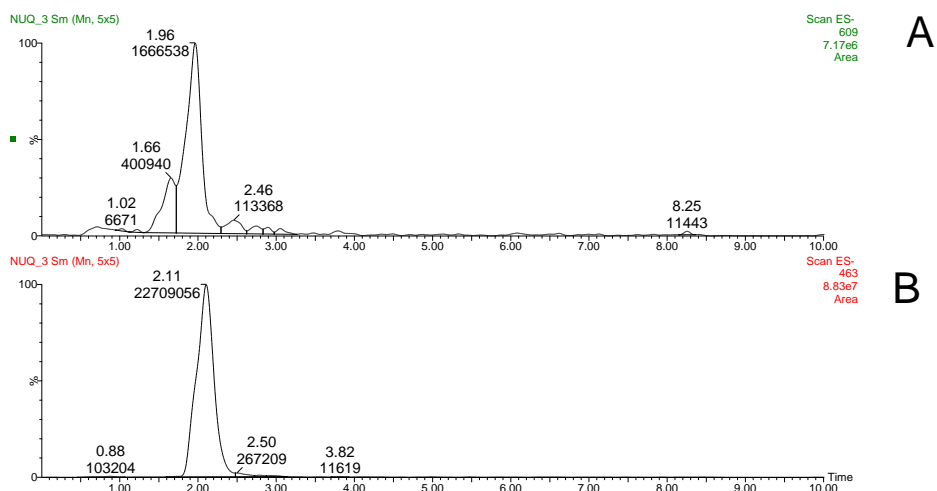
e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com produto acilado em 2,76 min; (B) Padrão do substrato.



22. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com produto acilado em 2,75 min; (B) Padrão do substrato.

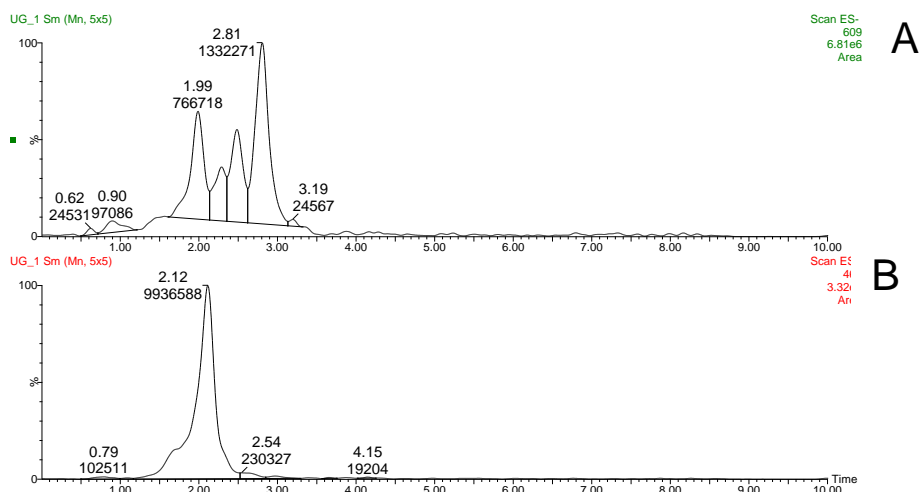


23. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.

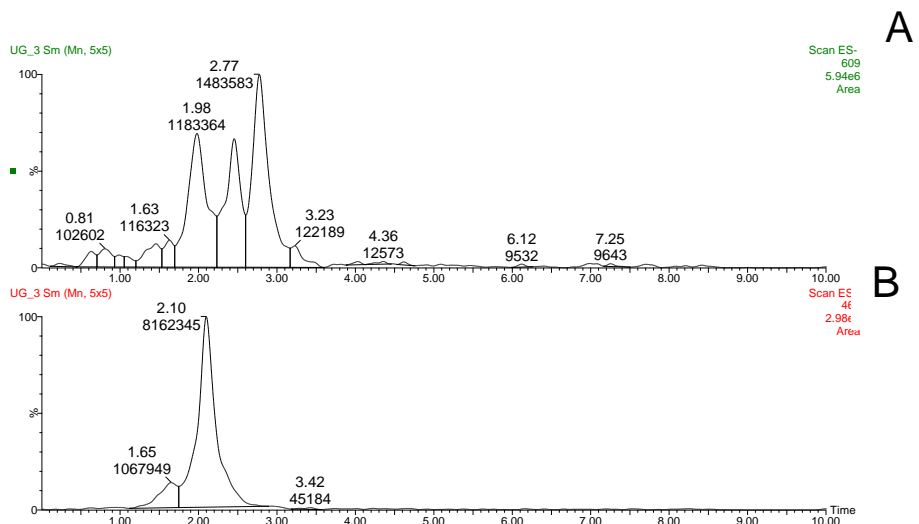


24. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-glucosídeo

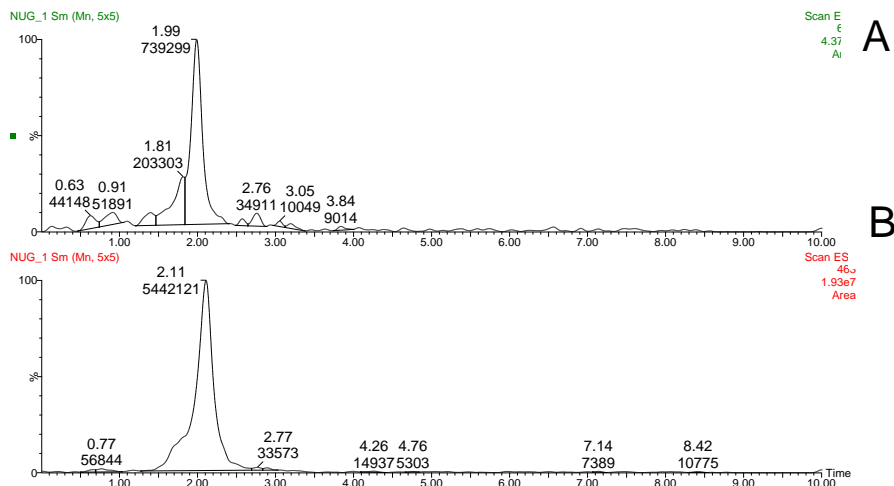
e *p*-cumaroil-CoA (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.



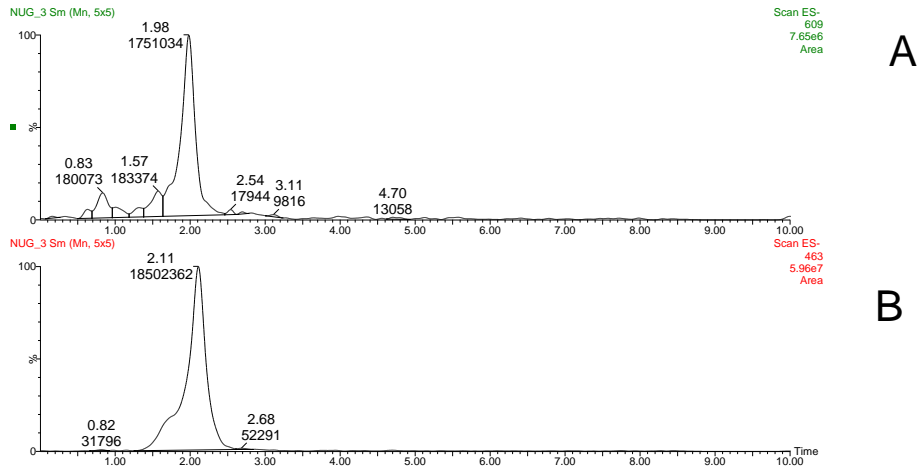
25. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-galactosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com produto acilado em 2,81 min; (B) Padrão do substrato.



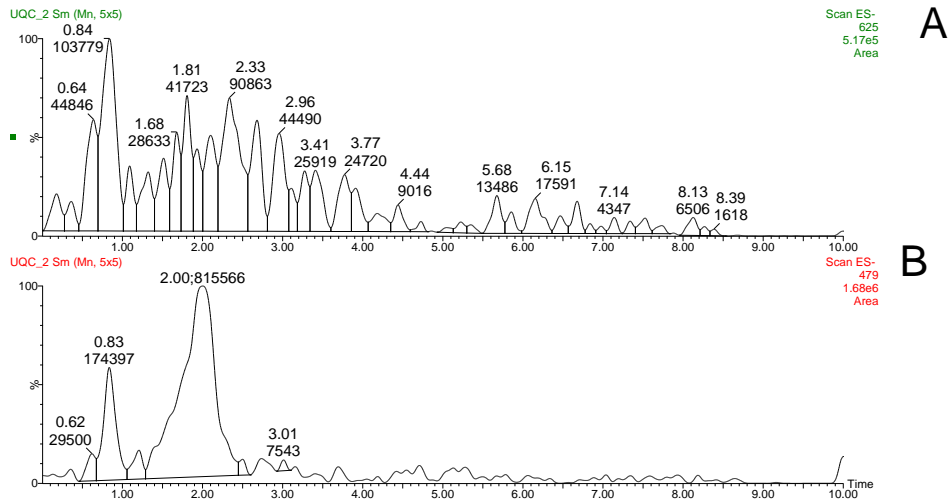
26. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-galactosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Reação com produto acilado em 2,77 min; (B) Padrão do substrato.



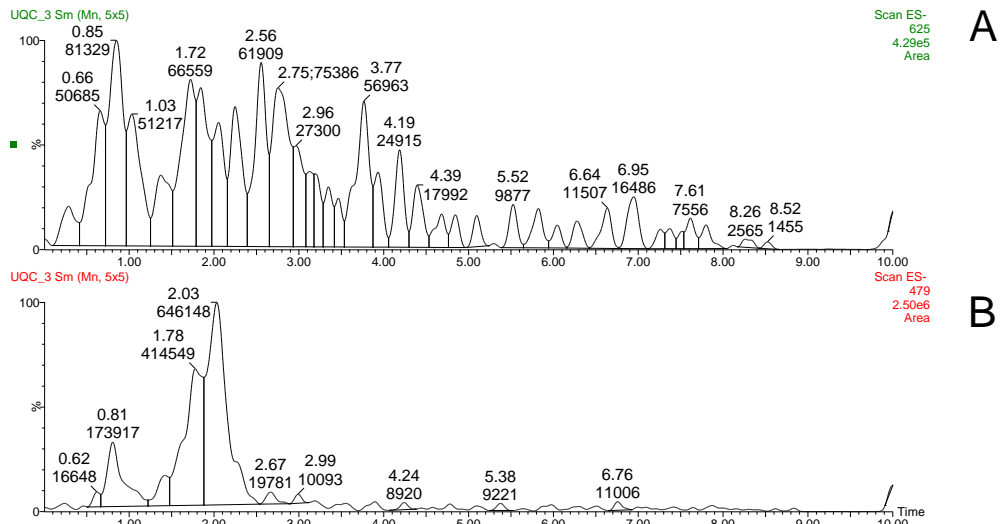
27. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-galactosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.



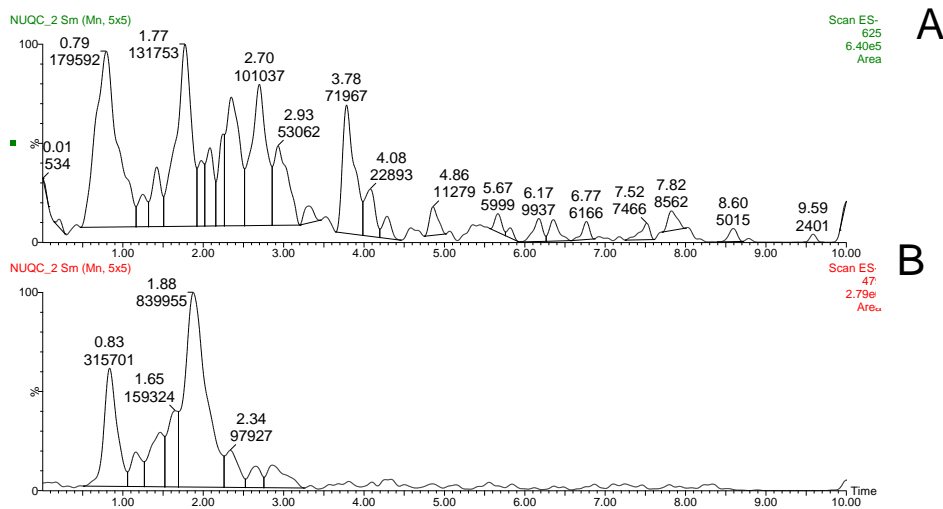
28. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-3-O-galactosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.



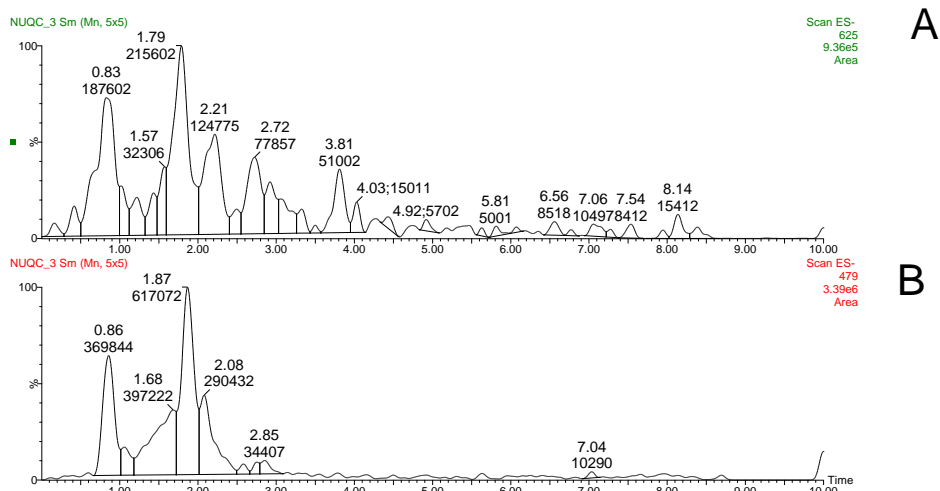
28. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetina-7-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Sem determinação da reação; (B) Padrão do substrato.



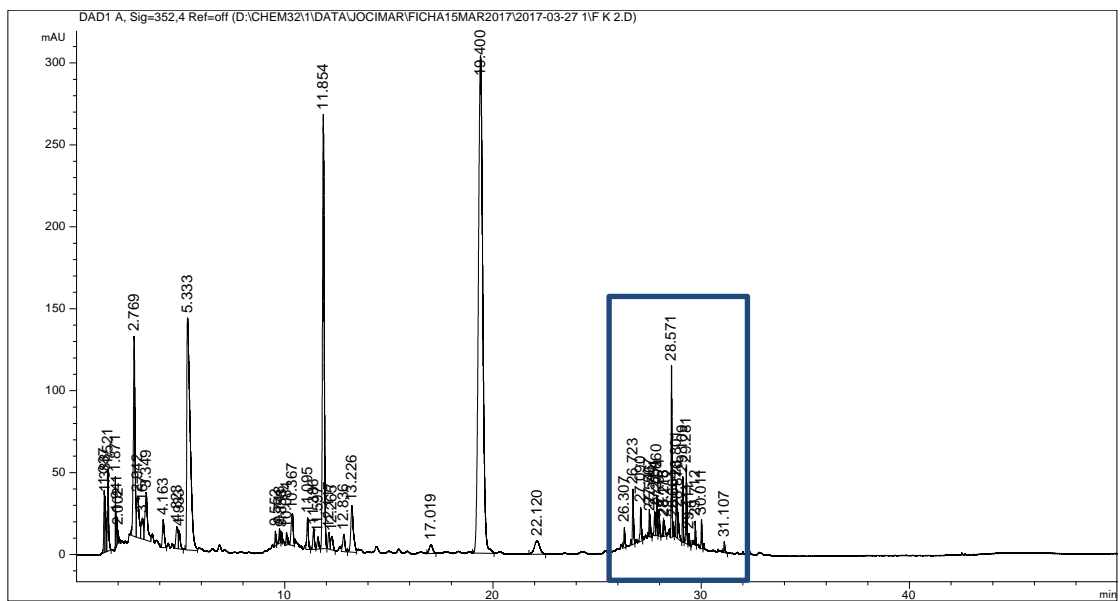
30. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetagina-7-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Sem determinação da reação; (B) Padrão do substrato.

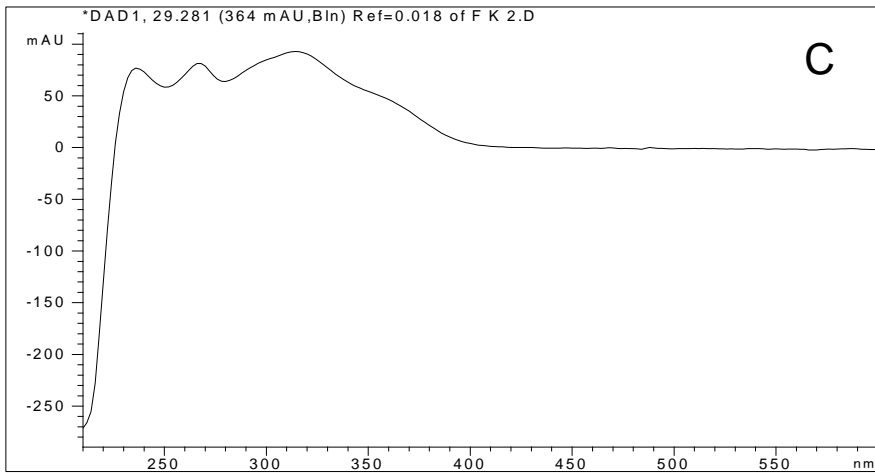
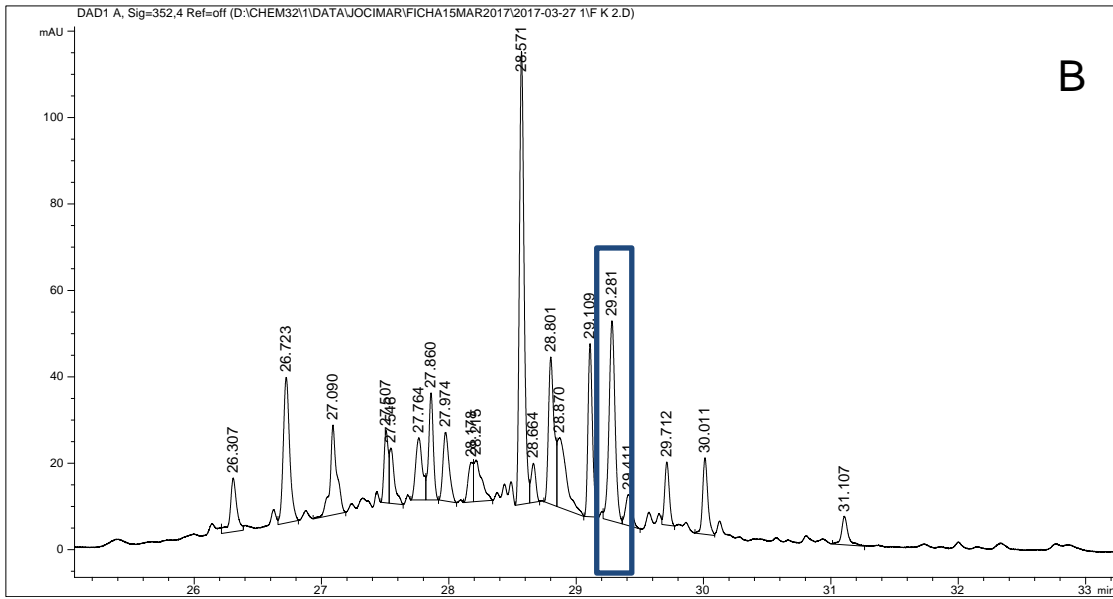


31. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetagina-7-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.

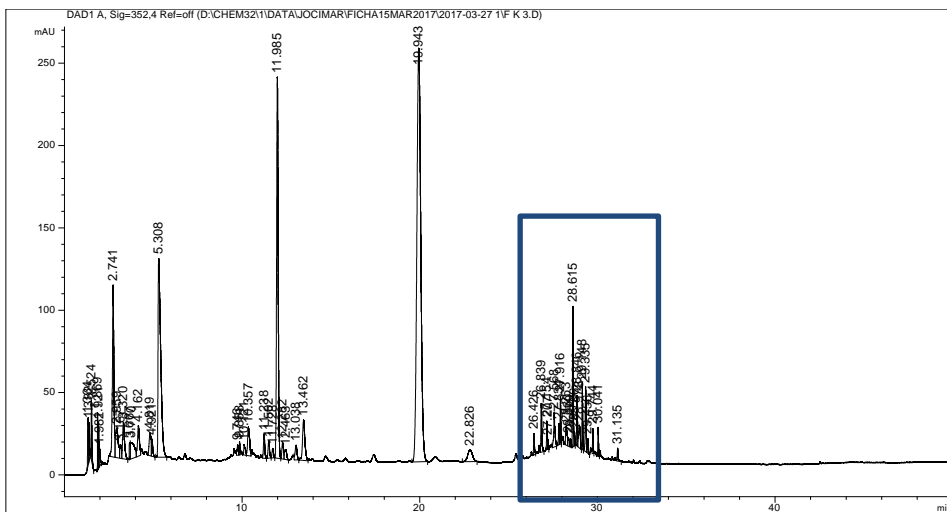


32. *C.urucurana* – Cromatogramas (UPLC) – ensaio enzimático com quercetagina-7-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA - (A) Controle negativo, sem reação; (B) Padrão do substrato.

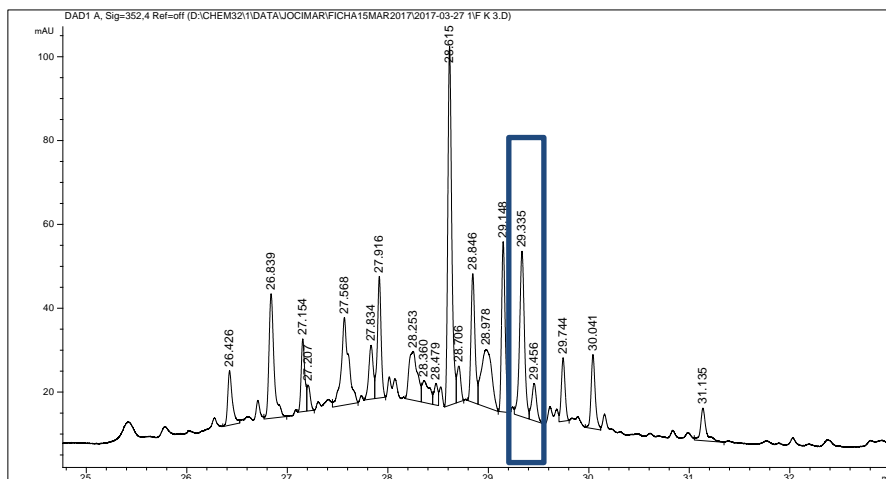




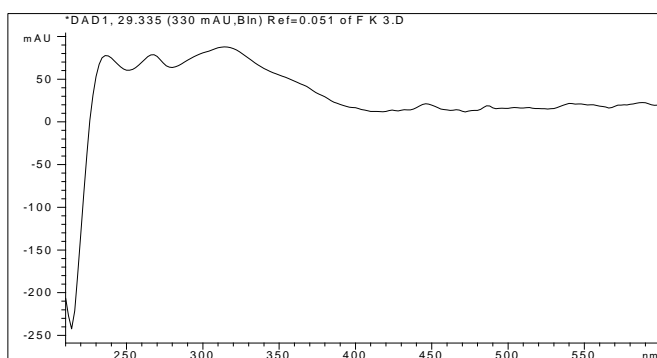
33. *C. floribundus* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaoil-CoA - (A) Reação com presença de composto acilado em 29,281 min; (B) Ampliação da área de interesse; (C) Espectro (UV/visível) do composto acilado.



A

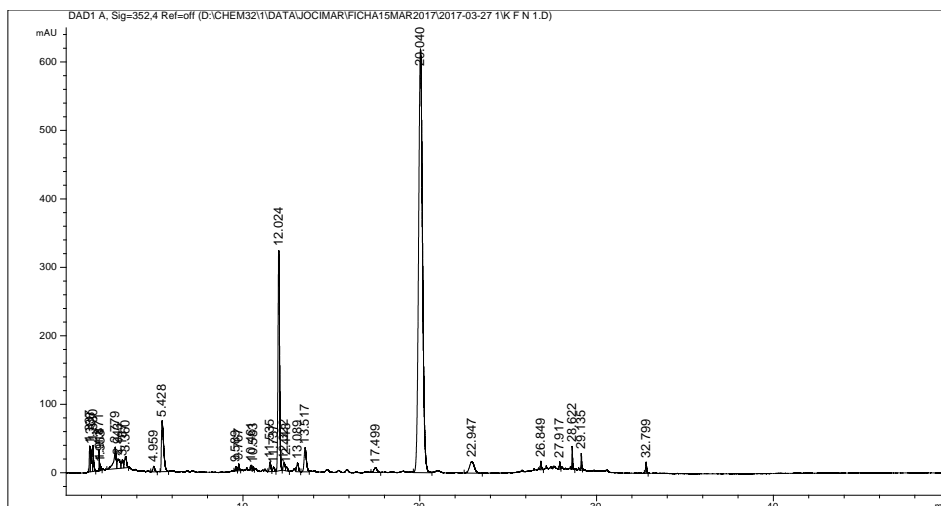


B

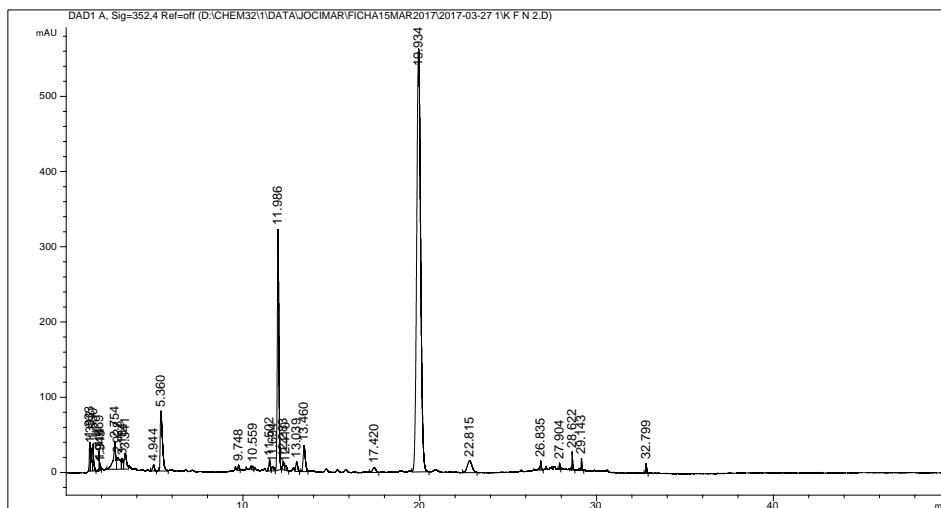


C

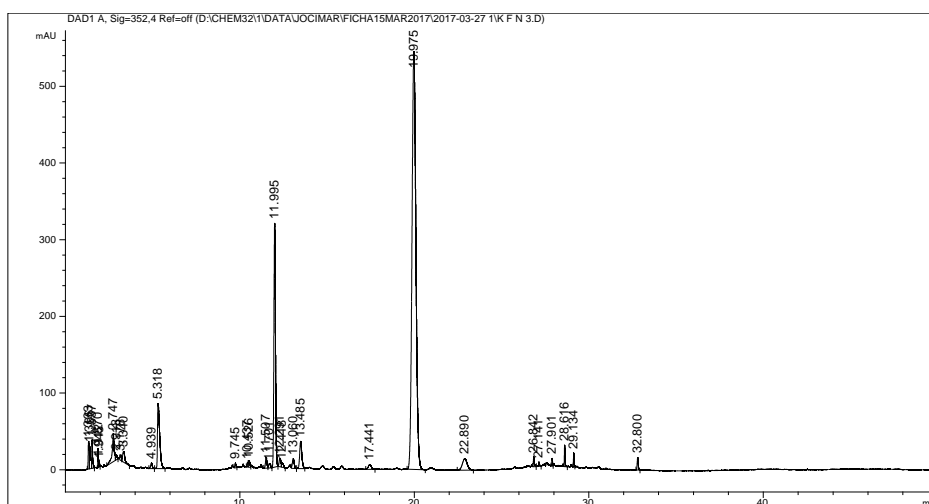
34. *C.floribundus* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaoil-CoA - (A) Reação com presença de composto acilado em 29,335 min; (B) Ampliação da área de interesse. (C) Espectro (UV/visível) do composto acilado – triplicata 1.



35. *C.floribundus* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com kaempferol-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – Controle negativo.



36. *C. floribundus* - Cromatograma de ensaio enzimático - Reação com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – Controle negativo.



37. *C. floribundus* - Cromatograma de ensaio enzimático – Reação com quercetina-3-O-glucosídeo e *p*-cumaroil-CoA – Controle negativo.