



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



ANTONIO CARLOS MATTAR MUNHOZ

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE CASCAS DO CAULE DE *Synadenium grantii* Hook. f.
(Euphorbiaceae)

Ponta Grossa

2013

ANTONIO CARLOS MATTAR MUNHOZ

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DE CASCAS DO CAULE DE *Synadenium grantii* Hook. f.
(Euphorbiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame
Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos R. Velloso

**Ponta Grossa
2013**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M966 Munhoz, Antonio Carlos Mattar
Avaliação fitoquímica e da atividade
antioxidante e antimicrobiana de cascas do
caule de *Synadenium grantii* Hook. f.
(Euphorbiaceae)/ Antonio Carlos Mattar
Munhoz. Ponta Grossa, 2013.
84f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís
Beltrame.

Co-Orientador: Prof. Dr. José Carlos R.
Velloso.

1.Synadenium grantii. 2.Euphorbiaceae.
3.HPLC. 4.Atividade antioxidante.
5.Terpenos. I.Beltrame, Flávio Luís. II.
Velloso, José Carlos R.. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.4



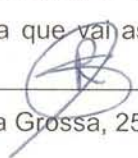
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 08/2013

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DO PÓS-GRADUANDO ANTONIO CARLOS MATTAR MUNHOZ, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2013, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo quinto dia do mês de fevereiro de dois mil e treze, às 9 h, no Auditório de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação do pós-graduando Antonio Carlos Mattar Munhoz. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação química e biológica de produtos naturais. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame (Presidente) / UEPG, Prof. Dr. Airton Vicente Pereira / UEPG e Profa. Dra. Lúcia Regina Rocha Martins / UTFPR, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e o candidato das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi “**Avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e fitoquímica de *Synadenium grantii* Hook. f. (*Euphorbiaceae*)**”. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido o candidato aprovado. Foi dada ciência ao mestrando que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, *para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso.* Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Rubyan Lucas Santos Piazzetta, , secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2013.

Observação (se necessária):


Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame


Prof. Dr. Airton Vicente Pereira


Profa. Dra. Lúcia Regina Rocha Martins

Dedico essa dissertação a todas as pessoas que de alguma forma me inspiram e me motivam na minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Ana Elisa pelo amor, dedicação e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu filho Breno cuja simples existência me alegra, motiva e inspira diariamente.

Aos meus familiares, especialmente ao meu pai e minha mãe que, além de tudo, me proporcionaram as referências do meu ser.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, pela generosidade em repassar seus conhecimentos e me proporcionar a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, também pela amizade, confiança, conversas e conselhos que me foram muito importantes.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso, que compartilhou comigo seus conhecimentos e técnicas nos ensaios de avaliação antioxidante, e também por toda a consideração, confiança, amizade e parceria.

Ao Prof. Dr. Luís Antonio Esmerino, pela colaboração na realização das avaliações de atividade antimicrobiana realizadas nesse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Rosi Zanoni da Silva, pelo espécime de *Synadenium grantii*, coletado em sua residência, e também pelos aconselhamentos no trabalho fitoquímico.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison e à Angelita Nepel do Laboratório de RMN da UFPR, pela parceria e colaboração nas análises de RMN realizadas nesse trabalho.

Ao professor Dr. Ivo Mottin Demiate pela disponibilidade do aparelho de HPLC utilizado nesse trabalho.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Airton Vicente Pereira e Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Rocha Martins, pela avaliação, bem como pelas sugestões e críticas que enriqueceram a finalização desse trabalho.

À prof^a. Dr^a. Francinete Ramos Campos pelas sugestões e críticas enriquecedoras, durante a qualificação desse trabalho.

A todos os professores envolvidos no PPGCF da UEPG, pelas aulas e pela força de vontade de tornar possível a pesquisa farmacêutica de alto nível em nossa universidade.

À turma do mestrado, em especial aos amigos Thaís L. Oliveira, Rodrigo M. C. Pinto, Livia E. Camargo, Francine A. Manente e Willian M. Machado pela amizade, descontração e ajuda.

Aos alunos de iniciação científica: Bruno Minozzo, Bruna Lemes, Luiza Stoltz, Danielle Pacheco, Harli Pasquini e Isabella Heinrich pela amizade, descontração e ajuda.

Às técnicas de laboratório Aparecida e Júlia, pela ajuda e colaboração.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

As palavras parecem poucas para expressar meu **Muito Obrigado!**

"Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu mesmo vejo-me como um pobre garoto que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim."

(Isaac Newton)

RESUMO

A *Synadenium grantii* é uma planta arbustiva que atinge entre 3 e 5 metros de altura, nativa da África tropical, produtora de um látex tóxico. É conhecida no Brasil como janaúba, tiborna ou leitossinha e seu látex é popularmente utilizado como remédio para a redução de verrugas, tratamento de câncer, doenças gástricas e inflamatórias. Do látex e partes aéreas da planta já foram isolados alguns terpenos, antocianinas e glicoproteínas como lectina e serino-proteases. Pesquisas biológicas já realizadas com esta espécie indicam ação antitumoral, antiparasitária, anti-hemostática e antiúlcera. O presente estudo objetivou isolar e identificar compostos bioativos, bem como identificar o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato bruto das cascas do caule da *S. grantii* e suas frações. O estudo químico foi realizado com a fração clorofórmica obtida do extrato bruto (EB) utilizando-se técnicas de cromatografia em coluna e camada delgada o que possibilitou o isolamento de três triterpenos: o eufol e também, pela primeira vez nesta espécie, a friedelina e o 3 β -friedelinol. As substâncias foram identificadas por espectroscopia de RMN e IV, comparando os dados obtidos com os existentes na literatura. Pela técnica de HPLC foi detectada a presença de compostos flavonoídicos no EB, resultado corroborado com a quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu realizado tanto com o extrato bruto quanto com suas frações. Observou-se que esta espécie é fonte de compostos antioxidantes, devido à acentuada ação do extrato, tanto em sistemas químicos (ABTS⁺, DPPH[•], O₂^{•-}, HOCl) e enzimáticos (MPO) *in vitro*, quanto em sistema *ex vivo* (hemólise induzida por radicais livres) indicando o potencial não apenas para neutralizar, mas também para reduzir a formação, bem como proteger células (eritrócitos) da ação deletéria de radicais livres. Ainda, um estudo antimicrobiano utilizando-se as técnicas de disco-difusão e CIM foi conduzido com os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Esta última demonstrou sensibilidade ao EB tanto na técnica de disco-difusão quanto na técnica de CIM (312 μ g/mL).

Palavras-chave: *Synadenium grantii*, Euphorbiaceae, HPLC, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, terpenos.

ABSTRACT

The *Synadenium grantii* specie is a shrub that reaches between 3 and 5 meters high, native of tropical Africa, producing of toxic latex. It is known in Brazil as janauba, tiborna or leitosinha and its latex is popularly used as remedy for reducing warts, treatment of cancer, gastric and inflammatory diseases. From its latex and aerial parts, some terpenes, anthocyanins, glycoproteins as lectin and serine proteases were already isolated. Biological studies report antitumor, antiparasitic, anti-haemostatic and anti-ulcer activities. The current study aimed to isolate and indentify bioactive compounds, as well as to identify the antioxidant and antimicrobial potential of the crude stem bark extract of *S. grantii* and its fractions. The chemical study was performed with the chloroform fraction, obtained from the crude stem bark extract (CE) using column and thin layer chromatographic techniques what enabled to isolate three triterpenes: eufol, and for the first time from this specie friedelin and 3 β -friedelinol. The compounds were identified by NMR and IR spectrometry and compared with literature data. With HPLC technique it was detected the presence of flavonoids in the CE, result that was reinforced with the quantification of total phenolics, by Folin-Ciocalteau method, for both CE and its fractions. It was observed that this specie is source of antioxidant compounds, due to the pronounced CE action for both chemical (ABTS⁺, DPPH[•], O₂^{•-}, HOCl) and enzymatic (MPO) *in vitro* systems, as well as *ex vivo* system (free radical induced haemolysis) indicating potential not only to neutralize, but for reduce formation of free radicals, as protect cells (erythrocytes) of free radicals deleterious action. In addition, an antimicrobial study was performed using disc-diffusion and MIC methods with the following microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. The last one exhibited sensibility to CE in both disc-diffusion and MIC (312 μ g/mL).

Keywords: *Synadenium grantii*, Euphorbiaceae, HPLC, antioxidant activity, antimicrobial activity, terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Espécime de <i>Synadenium grantii</i> Hook. f. (Euphorbiaceae).....	20
Figura 2 –	Látex da planta obtido por inserções realizadas na casca da planta.....	21
Figura 3 –	Gradiente de eluição do extrato de <i>Synadenium grantii</i> (cromatograma <i>fingerprint</i>).....	35
Figura 4 –	Perfil da atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico da casca de <i>Synadenium grantii</i> e do resveratrol sobre o $O_2^{\bullet-}$; $\lambda = 560$ nm.....	36
Figura 5 –	Perfil da atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico da casca de <i>Synadenium grantii</i> e do resveratrol sobre o HOCl; $\lambda = 652$ nm.....	38
Figura 6 –	Perfil da atividade do extrato bruto hidroalcoólico da casca de <i>Synadenium grantii</i> e do resveratrol sobre a oxidação do guaiacol pela MPO.....	39
Figura 7 –	Perfil da atividade do extrato bruto hidroalcoólico da casca de <i>Synadenium grantii</i> e do resveratrol sobre o AAPH (25 mM); $\lambda = 414$ nm.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Gêneros da Família Euphorbiaceae nativos da flora brasileira	17
Tabela 2 -	Gêneros da Família Euphorbiaceae introduzidos na flora brasileira	18
Tabela 3 -	Ação antioxidante e fenólicos totais do extrato e frações das cascas do caule de <i>Synadenium grantii</i>	42
Tabela 4 -	Halos de inibição do teste de disco-difusão para o extrato bruto das cascas de <i>Synadenium grantii</i>	53
Tabela 5 -	Resultados de CIM para o extrato bruto das cascas de <i>Synadenium grantii</i> .	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH: [2,2'-azobis(2-amidinopropano) diidroclore]

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ABTS^{•+}: radical ABTS

AcOEt: acetato de etila

CC: coluna cromatográfica

CCD: cromatografia em camada delgada

CCV: coluna cromatográfica à vácuo

CIM: concentração inibitória mínima

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DPPH[•]: radical DPPH

EB: extrato bruto

Hex: n-hexano

HPLC: *high performance liquid chromatography*

IC₅₀: concentração que promove 50% de inibição

MeOH: Metanol

MPO: mieloperoxidase

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NBT: *nitrobluetetrazolium*

O₂^{•-}: ânion superóxido

PMS: metassulfato de fenazina

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

R_f: fator de retenção

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C/DEPT 135°: ressonância magnética nuclear de carbono

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TMS: tetrametilsilano

UV/DAD: ultravioleta fotodiodo

UV/Vis: ultravioleta visível

v₀: velocidade inicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	FAMÍLIA EUPHORBIACEAE	16
2.2	GÊNERO <i>Synadenium</i>	18
2.3	<i>Synadenium grantii</i> Hook.f.	19
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVOS GERAIS	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	ARTIGO CIENTÍFICO	25
5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	51
5.1.1	Micro-organismos.....	51
5.1.2	Disco-Difusão.....	51
5.1.3	Concentração Inibitória Mínima	52
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.2.1	Disco-Difusão e Concentração Inibitória Mínima.....	52
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXO A - Protocolo de Pesquisa Aprovado pela Comissão de Ética.....	68
	ANEXO B - Avaliação da Citotoxicidade do EB Sobre Eritrócitos - Hemólise na Ausência de AAPH.....	70
	ANEXO C - Fluxogramas da Obtenção de Frações, Subfrações e Compostos a Partir das Cascas do Caule de <i>Syndenium grantii</i>.....	72
	ANEXO D - Espectro de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135° do Composto 1 – Friedelina em CDCl₃.....	77
	ANEXO E - Espectro de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135° do Composto 2 – Eufol em CDCl₃.....	80
	ANEXO F - Espectro de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135° do Composto 3 – 3β-Friedelinol em CDCl₃.....	82

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte e também para fins medicinais (TESKE; TRENTINI, 1995; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004). Plantas medicinais conhecidas há muito tempo ainda hoje são utilizadas em todo o mundo, sendo o uso dado através da automedicação ou pela recomendação de médicos e farmacêuticos (PETROVSKA, 2012).

As plantas possuem moléculas complexas e com infinitas variações estruturais, as quais podem apresentar diversas atividades biológicas, conduzindo à descoberta de novos fármacos, constituindo-se em ferramentas importantes na pesquisa biomédica e representando claramente uma janela de oportunidade para a indústria de medicamentos, visto que entre 25-30% de todos os medicamentos disponíveis na terapêutica são derivados de produtos naturais como plantas, micro-organismos e animais (CALIXTO, 2005; VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007; RISHTON, 2008; BRAZ FILHO, 2010).

A obtenção de substâncias bioativas a partir de plantas envolve diversas etapas. Inicialmente faz-se a seleção da espécie e do material botânico a ser estudado. Essa seleção pode ser realizada a partir de quatro tipos básicos de abordagens: randômica, etológica, quimiotaxonômica e etnodirigida, sendo essa última abordagem a que oferece maior probabilidade na obtenção de novas substâncias bioativas (MACIEL, *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2005; CALIXTO, 2005).

Após a seleção da planta para o estudo, é necessária uma série de procedimentos que começam na correta identificação botânica, colheita e secagem do material vegetal, seguindo-se da partição do material vegetal em extratos, visando uma semipurificação das substâncias através de suas polaridades. Posteriormente, os extratos semipuros devem ser testados biologicamente e aqueles que apresentarem atividade de interesse devem ser submetidos aos procedimentos cromatográficos e espectroscópicos visando o isolamento e a elucidação estrutural dos princípios ativos que compõe os extratos. Esses princípios ativos, por sua vez, são submetidos a mais testes biológicos com a finalidade de se determinar o potencial de atividade da substância isolada (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; MACIEL, *et al.*, 2002).

A bioatividade de extratos e substâncias isoladas a partir da espécie vegetal pode ser avaliada frente a diversos modelos experimentais, envolvendo testes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. A partir de resultados obtidos frente a modelos que avaliam o potencial biológico, diversas

plantas utilizadas na medicina tradicional vêm sendo relatadas com propriedades como: ação antioxidante e diminuição da ação deletéria de radicais livres no organismo (VELLOSA *et al.*, 2007; MARIUTTI *et al.*, 2008; TANG; HALLIWELL, 2010), auxílio na prevenção e no tratamento de câncer (MANS; ROCHA; SCHWARSTMANN, 2000; SUGANUMA; SAHA; FUJIKI, 2011; SHUKLA; SINGH, 2011), ação antimicrobiana (NAVARRO *et al.*, 1996, MAHASNEH *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2006; BELTRAME, *et al.*, 2011) e ação anti-inflamatória (JÄGER, *et al.*, 1996; TALHOUK, *et al.*, 2007).

Nesse contexto, insere-se a proposta formulada para o estudo fitoquímico juntamente com o estudo do potencial antioxidante e antimicrobiano de cascas do caule da espécie *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae) de forma que se possa ampliar as informações científicas já relatadas para esta espécie, e direcionar as pesquisas para obtenção de fármacos a partir dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae ocorre principalmente em ambientes tropicais e subtropicais, sendo considerada como uma das maiores famílias de Angiospermas, formada por 4 subfamílias, com 218 gêneros e 5.735 espécies já reconhecidas (LEE *et al.*, 2010). Muito comum no Brasil, contabilizam-se 72 gêneros e 1.100 espécies, sendo em torno de 500 espécies de ocorrência no nordeste do Brasil, das quais grande parte em área de Caatinga (ALVES, 1998).

Essa família inclui diversas espécies de interesse econômico, destacando-se a seringueira (*Hevea brasiliensis*), espécie nativa da Amazônia, responsável por um de nossos ciclos econômicos. Também pertence a essa família a mandioca, aipim ou macaxeira (*Manihot esculenta*) e a mamona (*Ricinus communis*), espécie africana, invasora de culturas no Brasil, com sementes ricas em óleo (óleo de rícino) de ampla aplicação industrial e medicinal (SOUZA; LORENZI, 2008).

Como plantas medicinais, as Euphorbiaceae são utilizadas desde a antiguidade, sendo exemplo a espécie *Euphorbia fischeriana*, que é utilizada na medicina chinesa como medicamento anticancerígeno há mais de 2000 anos. Várias espécies do gênero *Croton* são tradicionalmente utilizadas na América Latina como remédios para uma grande variedade de enfermidades e processos dolorosos. Algumas espécies são supostamente úteis para uma vasta gama de doenças, sendo vendidas ou utilizadas como remédios cura-tudo (BITTNER, 2001).

As Euphorbiaceae são consideradas um grupo botânico controverso, pois as espécies apresentam estruturas morfológicas aparentemente relacionadas, mas com origens ancestrais diferentes. Apresentam-se como árvores, arbustos, ervas ou lianas, às vezes afilas e semelhantes a cactáceas, às vezes espinescentes; geralmente com látex, que é normalmente tóxico; suas folhas são, em geral, dispostas helicoidalmente em torno do galho, sendo menos comum a disposição oposta das mesmas; as flores são em geral pequenas, não vistosas, unissexuadas (monóicas ou dióicas); dotadas de estames e frutos deiscentes ou não, além de outras características (JUDD *et al.*, 2002; APG II, 2003; SOUZA; LORENZI, 2008; MACHADO, 2008).

Desta família já foram identificados mais de 55 triterpenóides (tetra e pentacíclicos), que foram isolados tanto do látex quanto de outras partes da planta, como casca, folhas, flores,

raízes e sementes. Também foram encontrados compostos fenólicos como flavonóides em vários gêneros e diferentes partes da planta, além de antocianidinas, cumarinas, lignanas, taninos, fenantrenos e quinonas, ácidos fenólicos, entre outros. Relatando-se também glicosídeos cianogênicos, além de ser muito comum a presença de várias classes de alcalóides nessa família, em particular nos gêneros *Croton*, *Phyllanthus* e *Securinega* (RIZK, 1987; JUDD *et al.*, 2002).

De acordo com Souza e Lorenzi (2008), a listagem abaixo define os gêneros nativos (Tabela 1) e introduzidos (Tabela 2), presentes na flora brasileira.

Tabela 1 – Gêneros da família Euphorbiaceae nativos da flora brasileira.

GÊNEROS NATIVOS

<i>Acalypha</i>	<i>Glycydendron</i>
<i>Acidoton</i>	<i>Gymnanthes</i>
<i>Actinostemon (Dactylostemon)</i>	<i>Haematostemon</i>
<i>Adelia (Ricinella)</i>	<i>Hevea</i>
<i>Adenophaedra</i>	<i>Hura</i>
<i>Alchornea</i>	<i>Jatropha</i>
<i>Alchorneopsis</i>	<i>Joannesia</i>
<i>Algernonia</i>	<i>Julocroton</i>
<i>Angostyles</i>	<i>Mabea</i>
<i>Anomalocalyx</i>	<i>Manihot</i>
<i>Aparisthium</i>	<i>Maprounea</i>
<i>Apodandra</i>	<i>Micrandra</i>
<i>Argythamnia</i>	<i>Micrandropsis</i>
<i>Astraea</i>	<i>Nealchornea</i>
<i>Astrococcus</i>	<i>Omphalea</i>
<i>Ateramnus</i>	<i>Ophthalmoblapton</i>
<i>Bernardia</i>	<i>Pachystroma</i>
<i>Brasiliocroton</i>	<i>Pausandra</i>
<i>Caryodendron</i>	<i>Pedilanthus</i>
<i>Chamaesyce</i>	<i>Philyra</i>
<i>Chiropetalum</i>	<i>Plukenetia (Fragariopsis, Vigia)</i>
<i>Cleidion</i>	<i>Polyandra</i>
<i>Cnidoscolus</i>	<i>Pseudosenefeldera</i>
<i>Colliguaja</i>	<i>Rhodothyrsus</i>
<i>Conceveiba (Conceveibastrum)</i>	<i>Romanoa (Anabaena, Anabaenella)</i>
<i>Croton</i>	<i>Sagotia</i>
<i>Cunuria</i>	<i>Sandwithia</i>
<i>Dalechampia (Megalostylis)</i>	<i>Sapium</i>
<i>Dendrothrix</i>	<i>Sebastiania</i>
<i>Ditaxis</i>	<i>Senefeldera</i>
<i>Dodecastigma</i>	<i>Senefelderopsis</i>
<i>Euphorbia (Poinsettia)</i>	<i>Stillingia (Gymnostillingia)</i>
<i>Gavarretia</i>	<i>Tetraplandra</i>

Tabela 1 – Gêneros da família Euphorbiaceae nativos da flora brasileira (continuação).

<i>Tetrorchidium</i>
<i>Tragia</i>
<i>Vaupesia</i>

Tabela 2 – Gêneros da família Euphorbiaceae introduzidos na flora brasileira.

GÊNEROS INTRODUZIDOS	
<i>Aleurites</i>	<i>Phyllanthus</i>
<i>Codiaeum</i>	<i>Ricinus</i>
<i>Macaranga</i>	<i>Sauropus</i>
<i>Pachysandra</i>	<i>Synadenium</i>

2.2 GÊNERO *Synadenium*

O gênero *Synadenium* possui mais de 20 espécies e subespécies (AZEREDO, 2008), sendo que 15 espécies são nativas do continente africano, mas também são encontradas nas Américas e Europa, onde são utilizadas como plantas ornamentais (KINGHORN, 1980).

As espécies do gênero *Synadenium* são historicamente utilizadas pelas populações dos vários países onde ocorrem, principalmente em países tropicais como o Brasil, sendo remédio para um grande número de doenças (MACHADO, 2008).

Dentre as espécies deste gênero, o látex de *Synadenium carinatum* é amplamente utilizada na medicina popular para, por exemplo, o tratamento de alergias, asma e desordens inflamatórias, além de câncer, úlcera e diabetes, sem nenhuma, ou pouca evidência científica (ROGERIO *et al.*, 2007; MACHADO, 2008).

O uso popular da espécie *Synadenium umbellatum* na região centro-oeste do Brasil é relatado por Ortêncio (1997), recomendando o uso de 18 gotas do látex da planta em 1L de água, conserva-se em geladeira, e se administra um cálice de licor pela manhã, à tarde e à noite para a cura e prevenção de câncer.

Apesar da ampla utilização de espécies deste gênero na medicina popular, o conhecimento científico disponível sobre a composição química dessas plantas e estudos que comprovem suas ações farmacológicas ainda é pequeno e necessita ser ampliado.

Hermansson *et al.* (1990) avaliaram a espécie *Synadenium pereskiiifolium* que é utilizada popularmente no Kênia para o tratamento de asma, e isolaram, do extrato aquoso das partes aéreas da planta, um glucosídeo do ácido málico. Apesar desta substância não ter

apresentado atividade biológica nos experimentos realizados, esta foi a primeira vez que a substância foi relatada em vegetais superiores.

No mesmo sentido, Rogerio *et al.* (2007) isolaram uma lectina do látex de *Synadenium carinatum* e estudaram seu potencial anti-inflamatório. Esta lectina exibiu uma significativa atividade imunorregulatória e anti-inflamatória, sugerindo que o látex da planta pode ser útil no tratamento da asma.

Affonso-Cardoso *et al.* (2011) verificaram que a lectina do látex de *Synadenium carinatum* possui efeito antiparasitário contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, sem demonstrar efeitos tóxicos na célula hospedeira.

Outra espécie do gênero, a *Synadenium umbellatum* é recomendada popularmente para cura e prevenção do câncer. O potencial citotóxico e mutagênico desta espécie foi verificado (VALLADARES; CASTRO; CUNHA, 2007; CUNHA *et al.*, 2009), e os extratos das partes aéreas desta planta demonstraram um potencial antitumoral e antiangiogênico promissor (NOGUEIRA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2012).

2.3 *Synadenium grantii* Hook. f.

A espécie *S. grantii* (Figura 1) é uma planta arbustiva que pode atingir entre 3 e 5 metros de altura. É nativa da África tropical mas também é encontrada em países como o Brasil e a Índia onde foi introduzida, a princípio, como planta ornamental. No Brasil, é popularmente conhecida como janaúba, tiborna, leitosinha ou cola-nota, dependendo da região onde se encontra (BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988; OLIVEIRA Jr. *et al.*, 2005).



Figura 1 – Espécime de *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae).
(Fonte: Dr. Flávio Luís Beltrame).

No Brasil, o látex da planta (Figura 2) é popularmente utilizado diluído em água, sendo esta solução denominada de “garrafada”. Esta é popularmente utilizada topicamente na redução de verrugas e oralmente para o tratamento de doenças gástricas, tratamento para o câncer, diabetes e desordens inflamatórias (OLIVEIRA Jr. *et al.*, 2005). Na Índia, o látex é utilizado popularmente com finalidade analgésica (BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988).

Apesar dos relatos sobre a utilização do látex de *S. grantii* na medicina popular, é comum a ocorrência de intoxicação, bem como lesões dérmicas e oftálmicas, principalmente em crianças e animais que acidentalmente entram em contato com o látex (BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988; DOCAMPO *et al.*, 2010). Costa *et al.* 2012 avaliaram o potencial tóxico da *Synadenium grantii* em experimentos com *Artemia salina*, uma espécie de microcrustáceo, e confirmaram a alta toxicidade do látex ($LC_{50} = 26,58 \mu\text{g/mL}$). Por outro lado, no mesmo experimento, foi demonstrado que o extrato bruto das cascas apresentou baixa toxicidade ($LC_{50} = 778,66 \mu\text{g/mL}$). Portanto, alguns cuidados devem ser tomados na coleta do látex como o uso de luvas e óculos de proteção (Figura 2).



Figura 2 – Látex da planta obtido, por inserções realizadas na casca da planta.
(Fonte: Dr. Flávio Luís Beltrame).

Alguns estudos científicos sobre a composição química e o potencial biológico da espécie *Synadenium grantii* estão descritos na literatura.

Kinghorn (1980) isolou do látex da planta o 12-O-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato, uma substância que é irritante à pele. Outros ésteres diterpenos tipo tiglianos, foram isolados do látex da *S. grantii* por Bagavathi, Sorg e Hecker (1988), mas não os do tipo ingenano, o que contrasta com as demais euforbiáceas e pode representar um importante diferencial quimiotaxonômico desta espécie.

Hassan, Mohammed e Mohamed (2012) isolaram, do extrato clorofórmico das folhas de *S. grantii*, dois ésteres diterpenos inéditos, do tipo forbol. Os autores também avaliaram a capacidade biológica deste extrato e encontraram atividade antiparasitária *in vitro* para *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum*, e também encontraram atividade citotóxica para células MRC-5.

Os terpenos são compostos metabólicos recorrentes nesta espécie, além dos ésteres diterpenos, também foram isolados triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos tanto do látex quanto das folhas da planta, dentre eles o eufol, o tirucalol, o euforbol, e o germanicol (UZABAKILIHO; LARGEAU; CASADEVALL, 1987; HASSAN; MOHAMMED; MOHAMED, 2012).

Das folhas de *Synadenium grantii* também foram isoladas seis antocianinas, quatro destas compostas com um monossacarídeo apiosil que até então não havia sido encontrado ligado a antocianinas (ANDERSEN *et al.*, 2010). Dasari *et al.* (2012) realizaram uma quantificação de fenólicos totais e alcalóides, e observaram que a planta possui uma quantidade significativa destes metabólitos secundários.

Uma lectina do látex foi isolada e apresentou uma importante atividade de hemaglutinação (PREMARATNA *et al.*, 1984a; DURGAWALE *et al.*, 2001); detectou-se também a propriedade biológica desta lecitina em suprimir o crescimento tumoral de fibrosarcoma, bem como inibir a síntese de proteína em células de tumor de Yoshida (PREMARATNA *et al.*, 1984b).

Nesta espécie também são encontradas enzimas proteolíticas. Menon *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram duas serino-proteases do látex, e também uma glicoproteína com atividade fibrinolítica humana, a qual pode ser de importância no processo de hemostasia (RAJESH *et al.*, 2006). Costa *et al.* (2010) comparam as enzimas proteolíticas do látex de plantas como a *S.grantii* com o veneno de cobras e sugerem estas enzimas como potenciais ferramentas no desenvolvimento de medicamentos para a prevenção e tratamento de muitas enfermidades como trombose e desordens cardiovasculares.

Em um estudo *in vivo* com ratos Wistar, Costa *et al.* (2012) demonstraram a capacidade protetora do látex *in natura* contra úlcera gástrica, embora a garrafada da planta não tenha demonstrado efeito significativo nas concentrações empregadas.

Como expõe Machado (2008), a *S. grantii* possui uma variedade de substâncias potencialmente tóxicas, mas é evidente, pelo amplo uso popular e pelas pesquisas científicas já realizadas, que o potencial farmacológico da espécie é muito promissor. Mais estudos devem ser realizados para contribuir com o conhecimento sobre esta planta, especialmente das cascas do caule, visto que não se tem informações na literatura científica para esse órgão em específico.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar avaliação fitoquímica, antimicrobiana e antioxidante do extrato bruto de cascas do caule de *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae) para ampliar as informações científicas sobre a espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule de *Synadenium grantii*;
- Realização de um cromatograma *fingerprint* do extrato bruto;
- Fracionamento do extrato bruto em fração hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica;
- Isolar e identificar substâncias presentes na fração clorofórmica, obtida do extrato bruto.
- Testar atividade antioxidante do extrato bruto em sistemas químicos e enzimáticos *in vitro* e sistemas *ex vivo* (celular);
- Testar atividade antioxidante da fração hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica frente aos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•];
- Determinar a concentração de polifenólicos nas frações acetato de etila e metanólica;
- Testar atividade antimicrobiana do extrato bruto;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Chemical composition and biological activity of *Synadenium grantii* Hook. f. stem barks

Antonio C. M. Munhoz,^{1*} Bruno R. Minozzo,¹ Bruna M. Lemes,¹ Luiza S. Cruz,¹ Thaís L. Oliveira,¹ Angelita Nepel,² Andersson Barison,² Ailton V. Pereira,¹ José C. R. Velloso,³ Flávio L. Beltrame,^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, Brasil,

²Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, Brasil,

ABSTRACT: *Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae, popularly named as janauba or leitossinha is used for medicinal purposes in the treatment of cancer, peptic ulcer and inflammatory diseases, in southern Brazil. The HPLC fingerprinting of crude stem bark extract was obtained and crude extract and fractions were evaluated in different scavenger and oxidant systems, including enzymatic and *ex vivo* models. The content of total phenolic compounds in the crude stem bark extract and fractions were quantified and a phytochemical study was conducted with chloroform fraction. The HPLC analysis identified flavonoids in crude extract composition and antioxidant experiments from this material exhibited an elevated antioxidant activity, as well as in methanolic and ethyl acetate fractions. Ethyl acetate and methanol fractions presented high quantities of phenolic compounds. Also three terpenes named euphol, friedelin and 3 β -friedelinol were isolated and identified using chromatographic and spectroscopic techniques.

Keywords: *Synadenium grantii*, Euphorbiaceae, janauba, HPLC, antioxidant activity, triterpenes.

Introdução

A família Euphorbiaceae é uma das maiores famílias de plantas florescentes, constituída por 218 gêneros e 5.735 espécies (Lee, 2010), estando presentes em diversos ecossistemas brasileiros (Alves, 1998).

O gênero *Synadenium* se apresenta com elevada importância medicinal dentro de sua família e é constituído por mais de 20 espécies e subespécies (Azeredo, 2008) popularmente utilizadas como remédio para um grande número de doenças como câncer, diabetes e desordens inflamatórias (Rogerio *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2009).

Estudos demonstram o potencial farmacológico de algumas espécies do gênero, tais como atividade antiparasitária (Afonso-Cardoso *et al.*, 2011); antitumoral e antiangiogênica (Nogueira *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2012); inibidora de prostaglandinas (Jäger *et al.*, 1996); imunorregulatórias e anti-inflamatórias (Rogerio *et al.*, 2007).

A espécie *Synadenium grantii* Hook. f. é uma planta arbustiva, latescente, que atinge cerca de 3 a 5 metros de altura. É conhecida no Brasil como janaúba ou leitosinha e o uso popular dá-se para o tratamento de doenças gástricas, câncer, também como analgésico e anti-inflamatório (Bagavathi *et al.*, 1988; Oliveira Jr. *et al.*, 2005).

Algumas substâncias já isoladas da espécie são da classe dos ésteres de diterpenos do tipo forbol (Kinghorn, 1980; Bagavathi *et al.*, 1988; Hassan *et al.*, 2012), bem como dos triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos (Uzabakiliho *et al.*, 1987; Hassan *et al.*, 2012) e antocianinas (Andersen *et al.*, 2010). Outros metabólitos como proteases (Menon *et al.*, 2002; Rajesh *et al.*, 2006) e lectina (Premaratna *et al.*, 1984) também já foram isolados.

Com o objetivo de contribuir e incrementar as informações científicas sobre a *S. grantii*, neste trabalho foi realizado um estudo químico na busca de novos compostos bioativos, assim como a avaliação do extrato bruto do caule e das frações frente a experimentos de atividade antioxidante.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Cascas do caule de *Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae foram coletadas em Ponta Grossa, Paraná, Brasil (975 metros de altitude, 25° 05'38'' S de latitude, 50° 09'30'' O de longitude), em abril de 2010 e identificadas pelo botânico Osmar dos Santos Ribas. Uma exsicata foi depositada no acervo do Museu Botânico Municipal de Curitiba sob o número 363509.

Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados foram metanol grau HPLC (J.T.Baker, Philipsburg, PA, USA), ácido acético, n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol grau analítico (Synth, Diadema, SP, Brasil). A água foi purificada em um sistema Millipore Milli-Q (Millipore, São Paulo, SP, Brasil). Nos testes antioxidantes, foram utilizados resveratrol, ABTS, DPPH, TMB (Sigma-Aldrich, USA), AAPH (Aldrich Chemistry), NBT (Sigma Chemical) e MPO humana (EMD Chemicals).

Processamento Inicial, Partição do Extrato Bruto e Isolamento de Constituintes

O material vegetal (334 g) foi seco, pulverizado e submetido à extração por maceração fracionada em etanol:água (70:30 v/v) durante sete dias e ao abrigo de luz. O EB obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a 40 °C, sob pressão reduzida e por fim liofilizado. O EB seco (8 g) foi particionado em coluna cromatográfica a vácuo (CCV - sílica-gel 60, 35-70 mesh), empregando-se n-hexano (Hex), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila

(AcOEt) e metanol (MeOH) como solventes extratores e se obteve as frações I (1,138 g), II (3,448g), III (2,291 g) e IV (1,096 g), respectivamente. As frações e o EB foram mantidos sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso.

Parte da fração II (1,5 g) foi cromatografada (cromatografia em coluna - CC) em sílica-gel 60 empregando os eluentes Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 330 subfrações. As subfrações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas conforme semelhança de fator de retenção (R_f). As subfrações 18 até 33 foram reunidas (416 mg; Hex:CHCl₃ 1:1; v/v) e submetidas à nova CC, agora, no modo *flash* de eluição (sílica-gel 60M, 230-400 *mesh*) resultando na obtenção de 121 subfrações. As frações reunidas 37 até 43 (Hex:CHCl₃ 1:1; v/v) e 86 até 89 (Hex:CHCl₃ 3:7; v/v) obtidas a partir deste procedimento cromatográfico resultaram na separação das substâncias 1 (4 mg) e 2 (13,1 mg) respectivamente. A subfração 56 até 60 (Hex:CHCl₃ 1:1; v/v) foi usada para realização de uma nova tentativa de separação de compostos em CC no modo *flash* de eluição e este procedimento permitiu o isolamento da substância 3 (12 mg). Os espectros de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135° utilizados na identificação das substâncias isoladas foram obtidos em espectrômetro de RMN Bruker Avance 400 e os dados comparados com valores encontrados na literatura. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com uso de pastilhas de KBr a 1% em aparelho modelo Nicolet Nexus 470.

Fingerprinting do extrato bruto

O extrato bruto (EB) foi solubilizado em metanol (1mg/mL) e filtrado em membrana (Millipore 0,45 µm), 40 µL foram injetados para a análise em coluna analítica fenilhexil (15 x 0.46 cm I.D., Luna[®], 10 µm de partícula e 100 Å de poro) com eluição gradiente otimizada com metanol (B) em água purificada Milli-Q[®], acidificada a 0,1% (v/v) com ácido acético grau analítico (A) (17 a 76% B em 45 min., Δ%B/min. = 1,31; 76 a 100% em 2 min.,

isocrático a 100% de B durante 3 min., gradiente reverso 100 a 17% de B em 2 min.), com fluxo de 1 mL/min. A análise foi realizada empregando um equipamento HPLC Waters 2695 Alliance, composto de uma bomba quaternária, um degaseificador e um autoinjeter; detector de fotodiodo (200-400 nm) Waters 2998 – DAD para obtenção dos cromatogramas.

Estudo da Atividade Antioxidante

Para avaliação do potencial antioxidante, as amostras (EB e frações I, II, III e IV) foram solubilizadas em metanol na concentração inicial de 1 mg/mL e realizadas diluições para a concentração final no meio reacional. O resveratrol foi usado como agente antioxidante padrão, nas mesmas condições das amostras, em todos os testes. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placas Biotek μ Quant, e espectrofotômetro UV/Vis em sistema duplo feixe, com termostatização Perkin-Elmer Lambda 25. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos por média e desvio-padrão da concentração que promoveu 50% da inibição dos radicais livres (IC_{50}). Os gráficos foram obtidos através do *software* Microcal Origin 6.0[®].

Ação Scavenger sobre o ABTS^{•+}

O radical catiônico do ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi preparado reagindo 5 mL de solução aquosa de ABTS (7mM) com 88 μ L de persulfato de potássio (2,46 mM), deixando-se a reação ocorrer em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, durante 12 a 16h antes do uso (Pellegrini et al., 1999). Antes do ensaio, a solução de ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato de sódio 10 mM (relação 1:20). As amostras (EB e frações I, II, III e IV), em concentrações entre 0,4 e 40 μ g/mL, foram adicionadas em tubos de ensaio juntamente com ABTS^{•+} e tampão fosfato de sódio completando um volume final de 500 μ L

de meio reacional. Procedeu-se uma incubação de 30 min. ao abrigo da luz, e após, a leitura foi feita em 734 nm.

Ação Scavenger sobre o DPPH[•]

A atividade das amostras foi testada frente a 60 μ M do radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) solubilizado em etanol absoluto (Soares *et al.*, 1997). O meio foi composto pelas amostras (EB e frações I, II, III e IV) com concentração entre 2,8 e 143 μ g/mL, solução de DPPH[•] e o meio reacional completado para 500 μ L com etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A ação *scavenger* foi observada pelo decréscimo na absorbância em 531 nm.

Ação Scavenger sobre o HOCl

O procedimento foi feito segundo Costa *et al.* (2004), com algumas modificações. A concentração da solução de ácido hipocloroso (HOCl) foi determinada pelo seu coeficiente de extinção molar em $\lambda = 295$ nm. As reações foram realizadas em tampão pirofosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, para um volume final de 300 μ L. Adicionaram-se ao meio EB (0,1 e 100 μ g/mL) e HOCl (30 μ M). Incubou-se ao abrigo de luz por 10 minutos. Após, adicionou-se 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (2,8 mM), preparado imediatamente antes do uso, seguido de uma incubação de 5 min. ao abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em 652 nm.

Ação Scavenger sobre o O₂^{•-}

O ânion superóxido, gerado pela reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e NADH, reage com o nitroazultetrazolio (NBT) para formar uma formazana, produto cromógeno, cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de radical. A reação deu-se em tampão pirofostado de sódio 25 mM pH 8,3, PMS 372 μ M, NBT 600 μ M e NADH 1560 μ M, na presença do EB em concentrações entre 33,3 e 200 μ g/mL, formando-se um meio reacional final de 300 μ L. Após incubação de 5 min. ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em 560 nm (Kakkar *et al.*, 1984; Velloso *et al.*, 2007).

Ação sobre oxidação catalisada por mieloperoxidase humana (MPO)

A cinética de oxidação do guaiacol (70 mM) pela MPO (8 nM), catalisada por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (0,3 mM), foi feita em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, 37°C. A reação foi monitorada a 470nm por 1 minuto em espectrofotômetro com termostatização (KHALIL, 2000). Determinaram-se velocidades iniciais das cinéticas (v_0), calculadas através dos gráficos “produto formado vs. tempo de reação” ($v_0 = \Delta A / \Delta t$) na ausência e na presença do EB nas concentrações variando entre 0,2 e 40 μ g/mL.

Ação sobre a hemólise provocada por radicais livres

O ensaio foi realizado segundo Velloso (2008a), com adaptações. O EB foi avaliado na presença e na ausência do radical AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropano) diidrocloro], para avaliar tanto o potencial antioxidante quanto uma possível toxicidade sobre os eritrócitos. Em tubos *ependorf*, o meio foi composto pelo EB em concentrações entre 0,2 e 40 μ g/mL, suspensão de eritrócitos 5%, AAPH 25 mM e tampão fosfato de sódio 10mM/NaCl 150mM completando 1 mL de volume. Em seguida, foi realizada incubação com homogeneização constante, por 5 horas a 37 °C, ao abrigo da luz. Após, os tubos foram centrifugados por 10

min. em 2500 rpm, e o sobrenadante teve a absorbância medida em 414 nm. Os eritrócitos foram obtidos a partir do sangue coletado de pessoas híginas, conforme protocolo de pesquisa 08766/2010, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Determinação de Fenólicos Totais

A concentração de fenólicos totais dos extratos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (Farmacopéia Brasileira, 2002). As amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 1mg/mL. Alíquotas de 0,2 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 7 mL de água deionizada, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e após 30 segundos, 2,5 mL de carbonato de sódio 10,6% (m/v). As amostras foram aquecidas em banho-maria durante 5 minutos a 50°C, e após resfriamento realizou-se a leitura das absorbâncias em 715 nm em espectrômetro Genesys 10. O branco foi preparado da mesma forma, substituindo-se as amostras por água deionizada. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por gramas de amostra (mg/g). A curva de calibração foi realizada com concentrações conhecidas de ácido gálico (50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/mL) a partir de uma solução estoque de 5mg/mL, assim como descrito com as amostras. Os testes foram realizados em triplicada.

Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

(*Friedelina*) (1): RMN ^1H (CDCl_3/TMS ; 400,15 MHz): δ 1,96 (m; H-1a); 2,39 (ddd; 13,7; 5,1 e 1,9 Hz; H-2a); 2,24 (q; 6,5 Hz; H-4); 1,27 (m; H-6b); 1,44 (m; H-8a); 0,87 (d; 6,5 Hz; H-23); 0,73 (s; H-24); 0,88 (s; H-25); 1,01 (s; H-26); 1,05 (s; H-27); 1,18 (s; H-28); 1,00 (s; H-29); 0,95 (s; H-30); RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS ; 100,61 MHz): δ 22,3 (C-1); 41,5 (C-2); 213,2

(C-3); 58,2 (C-4); 42,1 (C-5); 41,3 (C-6); 18,2 (C-7); 53,1 (C-8); 37,4 (C-9); 59,4 (C-10); 35,6 (C-11); 30,6 (C-12); 39,7 (C-13); 38,3 (C-14); 32,4 (C-15); 36,0 (C-16); 30,0 (C-17); 42,8 (C-18); 35,3 (C-19); 28,1 (C-20); 32,7 (C-21); 39,2 (C-22); 6,8 (C-23); 14,6 (C-24); 17,9 (C-25); 20,2 (C-26); 18,6 (C-27); 32,1 (C-28); 35,0 (C-29); 31,8 (C-30). IV (KBr): ($U_{\max}/\text{cm}^{-1}$): $\sqrt{2927, 2870, 1715, 1463, 1390, 1071}$.

Eufol (2): RMN ^1H (CDCl_3/TMS ; 400,15 MHz): δ 3,24 (dd; 4,4 e 11,6 Hz; H-3); 0,75 (s; H-18); 1,00 (s; H-19); 0,92 (d; 6,0 Hz H-21); 5,10 (m; 7,2 Hz; H-24); 1,60 (s; H-26); 1,68 (s; H-27); 0,87 (s; H-28); 0,95 (s; H-29); 0,80 (s; H-30); RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS ; 100,61 MHz): δ 35,3 (C-1); 27,7 (C-2); 79,0 (C-3); 39,0 (C-4); 50,9 ou 50,0 (C-5); 19,0 (C-6); 28,0 (C-7); 133,5 (C-8); 134,0 (C-9); 37,3 (C-10); 21,5 (C-11); 28,1 (C-12); 44,1 (C-13); 49,6 (C-14); 30,9 (C-15); 29,8 (C-16); 50,0 ou 51,0 (C-17); 15,6 (C-18); 20,2 (C-19); 36,4 (C-20); 18,7 (C-21); 35,3 (C-22); 24,8 (C-23); 125,2 (C-24); 130,9 (C-25); 17,7 (C-26); 25,8 (C-27); 24,5 (C-28); 28,2 (C-29); 15,6 (C-30). IV (KBr): ($U_{\max}/\text{cm}^{-1}$): $\sqrt{3.304, 2.930, 1.464}$.

3 β -Friedelinol (3): RMN ^1H (CDCl_3/TMS ; 400,15 MHz): δ 1,44 (m; H-1); 1,90 (dt; 10,0 e 2,3; H-2a); 1,56 (m; H-2b); 3,74 (m; H-3); 1,25 (m; H-4); 1,74 (dt; 10,0; 3,0; H-6a); 1,45 (m; H-6b); 1,55 (m; H-18); 0,93 (m; H-22); 0,94 (d; 7,0; H-23); 0,96 (s; H-24); 0,86 (s; H-25); 0,99 (s; H-26); 1,00 (s; H-27); 1,17 (s; H-28); 0,94 (s; H-29); 1,00 (s; H-30) RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS ; 100,61 MHz): δ 15,8 (C-1); 35,2 (C-2); 72,8 (C-3); 49,2 (C-4); 37,9 (C-5); 41,8 (C-6); 17,6 (C-7); 53,2 (C-8); 37,1 (C-9); 61,4 (C-10); 35,6 (C-11); 30,6 (C-12); 38,4 (C-13); 39,7 (C-14); 32,4 (C-15); 36,1 (C-16); 30,0 (C-17); 42,8 (C-18); 35,4 (C-19); 28,2 (C-20); 32,8 (C-21); 39,3 (C-22); 11,6 (C-23); 16,4 (C-24); 18,3 (C-25); 20,2 (C-26); 18,7 (C-27); 32,1 (C-28); 35,0 (C-29); 31,8 (C-30). IV (KBr): ($U_{\max}/\text{cm}^{-1}$): $\sqrt{2980, 2860, 2860; 1470; 1450; 1380; 1170; 1100; 1060; 1030; 980; 900}$.

Resultados e Discussão

O cromatograma *fingerprint* do extrato bruto (Figura 3) de *S. grantii* demonstra que esta espécie apresenta compostos fenólicos em sua constituição. Quatro bandas cromatográficas atribuídas a flavonóides foram identificadas no cromatograma otimizado através da análise dos espectros de UV/DAD e interpretação das características espectrais típicas para essa classe de compostos, com máximos de absorção variando entre 246 a 280 nm relativos ao anel A (banda II) e entre 360-364 nm relativo ao anel B (banda I) (Zuanazzi & Montanha, 2004).

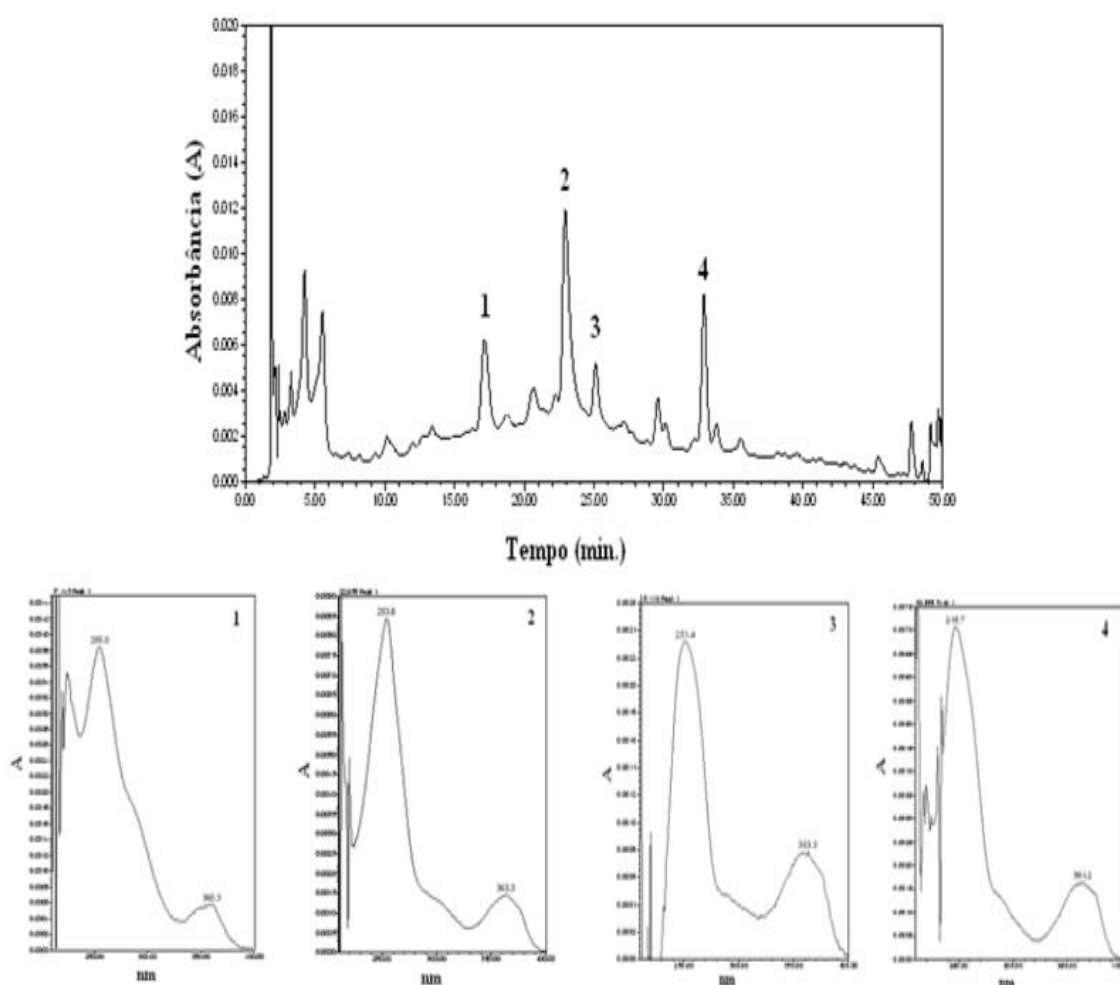


Figura 3 – Gradiente de eluição do extrato de *Synadenium grantii*. Fase móvel: metanol (B) em água acidificada com ácido acético (0,1% v/v) (A) (17 a 76% B em 45 min., $\Delta\%B/\text{min.} = 1,31$; 76 a 100% em 2 min., isocrático a 100% de B durante 3 min., gradiente reverso 100 a 17% de B em 2 min.), fluxo de 1 mL/min. Espectro U.V dos compostos flavonoídicos: (1) $r_t = 17$ min. (2) $r_t = 23$ min. (3) $r_t = 25$ min. (4) $r_t = 32$ min.

O resultado observado na avaliação cromatográfica preliminar demonstrou que o extrato bruto das cascas de *S. grantii*, apresenta em sua constituição compostos flavonoídicos que reforçam a importância de se avaliar o mesmo frente a modelos antioxidantes (Van Acker *et al.*, 1996), visto que a atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de características estruturais que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos (Velloso *et al.*, 2007; Scotti *et al.*, 2009).

Desta forma, o extrato bruto das cascas do caule de *S. grantii* foi utilizado em um estudo da atividade antioxidante, no qual se avaliou a capacidade do EB frente agentes oxidantes como o $O_2^{\bullet-}$, o HOCl e a enzima mieloperoxidase, presentes em situações de estresse oxidativo, bem como se avaliou este extrato frente a lipoperoxidação, medida pela hemólise de eritrócitos, na presença de radicais livres.

Neste estudo, as amostras demonstraram boa atividade antioxidante frente ao modelo do ânion superóxido. Para o resveratrol foi determinado valor de $IC_{50} = 143,1 \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$, enquanto que para o EB da *S. grantii* valor de $IC_{50} = 158,1 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$ foi obtido (Figura 4).

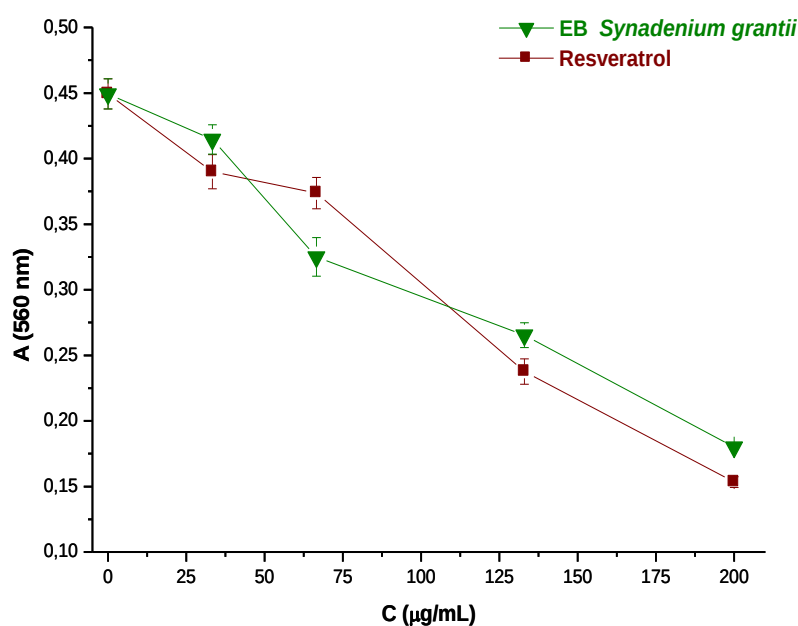


Figura 4 – Perfil da atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico da casca de *Synadenium grantii* e do resveratrol sobre o $O_2^{\bullet-}$; $\lambda = 560 \text{ nm}$.

Precursor de outras espécies reativas de oxigênio (ERO) (Barreiros *et al.*, 2006), a formação do ânion superóxido é exacerbada nas células aeróbicas em condições de estresse oxidativo durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos, sendo relacionado à ocorrência de lesões celulares (Bergendi *et al.*, 1999).

Estudos realizados com extratos vegetais de *Hypericum androsaemum* e *Maytenus ilicifolia* indicam que os compostos fenólicos encontrados nas frações mais polares, como flavonoides, são os principais responsáveis da ação *scavenger* deste radical (Valentão *et al.*, 2002; Velloso *et al.*, 2008b).

Sendo assim, o ânion superóxido é um potencial alvo no desenvolvimento de novos medicamentos, visto que além da ação nos tecidos, pode também interagir com outras moléculas, formando outras ERO, entre elas o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que é muito deletério, e causa grandes danos ao DNA, podendo influenciar no surgimento ou agravamento de várias doenças como câncer, aterosclerose e disfunções cardiovasculares (Weseler & Bast, 2010).

No mesmo sentido, o HOCl exacerbado em processos inflamatórios e infecciosos causa danos a biomoléculas e tecidos, além de formar outros radicais livres (Lapenna, *et al.*, 1994; Babior, 2000; Costa *et al.*, 2004). O EB e o resveratrol foram bastante efetivos como agentes sequestrantes de HOCl e apresentaram uma curva concentração-resposta semelhantes, sendo que o resveratrol, uma substância pura, apresenta uma $\text{IC}_{50} = 1,02 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{g/mL}$ muito próxima do encontrado para o EB com valor de $\text{IC}_{50} = 1,14 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (Figura 5).

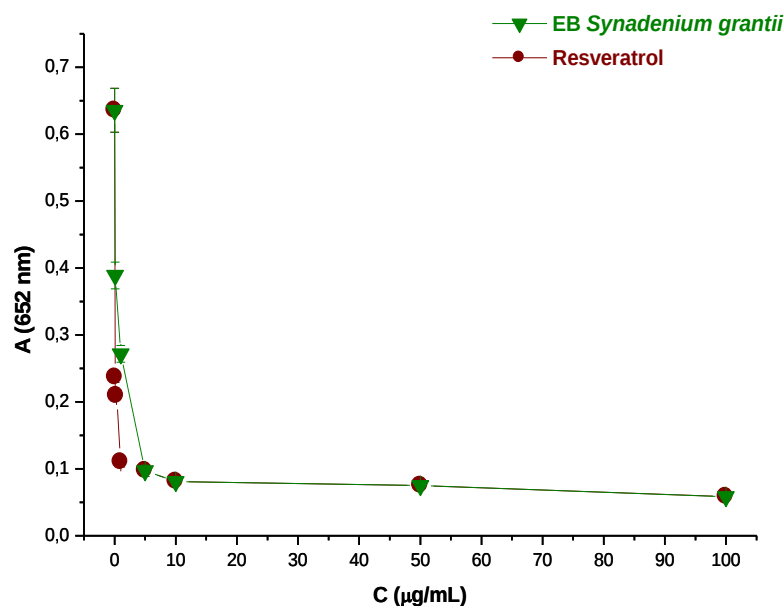


Figura 5 – Perfil da atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico da casca de *Synadenium grantii* e do resveratrol sobre o HOCl; $\lambda = 652$ nm.

Govindarajan *et al.* (2003) apontam que parte do efeito protetor *in vivo* dos extratos de *Desmodium gangeticum* durante processos inflamatórios pode ser devido a capacidade *scavenger* contra o HOCl. Neste sentido, Velloso *et al.* (2007) atribuem que parte da ação da *Maytenus aquifolium* contra úlceras gástricas pode estar relacionada à ótima capacidade *scavenger* de HOCl (IC_{50} do extrato bruto etanólico = $0,002 \pm 0,0001$ mg/mL), visto que este oxidante além de causar danos ao tecido, reage com a amônia produzida pelo *Helicobacter pylori* formando monocloroaminas que, apesar de microbicidas, estão diretamente associadas às injúrias estomacais observadas nas úlceras gástricas.

A formação do HOCl deve-se à oxidação de íons cloreto (Cl^-), na presença de H_2O_2 , pela enzima mieloperoxidase secretada dos grânulos azurófilos dos neutrófilos (Hansson *et al.*, 2006). Esta enzima, além da função fundamental exercida na defesa contra micro-organismos patógenos, é associada à patogênese de diversas doenças onde há recrutamento de neutrófilos, como desordens inflamatórias crônicas, doenças cardiovasculares (Babior, 2000; Stamp *et al.*, 2012; Nussbaum *et al.*, 2013) e câncer (Gomez-Mejiba *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, o EB de *S. grantii* foi capaz de inibir a oxidação do guaiacol pela MPO, apresentando uma $IC_{50} = 8,45 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$, bem como o resveratrol apresentando uma $IC_{50} = 0,40 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ (Figura 6).

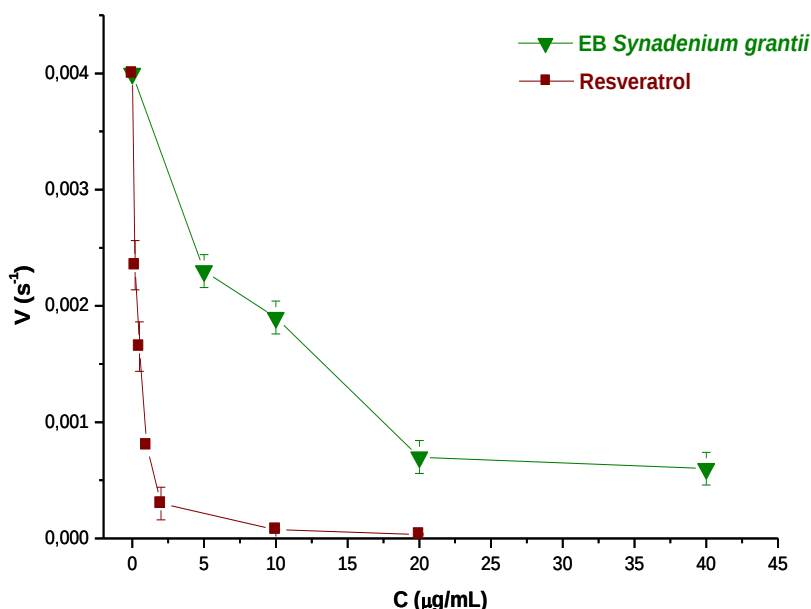


Figura 6 – Perfil da atividade do extrato bruto hidroalcoólico da casca de *Synadenium grantii* e do resveratrol sobre a oxidação do guaiacol pela MPO.

Regasini *et al.* (2008) demonstraram que os flavonóis isolados do extrato etanólico dos frutos de *Pterogyne nitens*, como quercetina, rutina, canferol e pterognosídeo possuem forte ação na inibição da oxidação do guaiacol pela enzima MPO, com IC_{50} de $1,22 \pm 0,01$; $3,60 \pm 0,02$; $8,30 \pm 0,03$ e $10,3 \pm 0,03$ nM respectivamente.

Os polifenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de plantas utilizadas na dieta e na medicina popular como *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae), *Abelmoschus esculentus* (Malvaceae), *Hibiscus acetosella* (Malvaceae) e *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae) possuem a capacidade de diminuir a liberação de MPO de neutrófilos ativados e estão associados à capacidade medicamentosa destas espécies (Tsumbu *et al.*, (2012).

A capacidade do EB em inibir a ação da enzima MPO indica que este é capaz de atuar contra os radicais livres, bem como ter potencial para promover uma ação anticatalítica, diminuindo as consequências oxidativas que ocorrem em desordens inflamatórias devido à presença de peroxidases como a MPO (Nussbaum *et al.*, 2013).

Também, a hemólise de eritrócitos tem sido muito utilizada como um modelo de estudo *ex vivo*, para o entendimento da ação das ERO nas membranas celulares e o efeito protetor que agentes antioxidantes exercem nestas membranas (Ximenes *et al.*, 2010). Além disso, os ensaios com eritrócitos também possuem a função de avaliar a citotoxicidade que o agente antioxidante pode exercer sobre estas células (Khalil, 2011).

O EB não apresentou potencial citotóxico sobre os eritrócitos nas concentrações testadas, na ausência do AAPH (Anexo B). A figura 7 apresenta a diminuição da hemólise a medida que a concentração das amostras aumenta. Neste sistema, o resveratrol apresentou uma IC_{50} de $2,37 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, enquanto que o EB da *S. grantii* teve IC_{50} com valor de $5,17 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$.

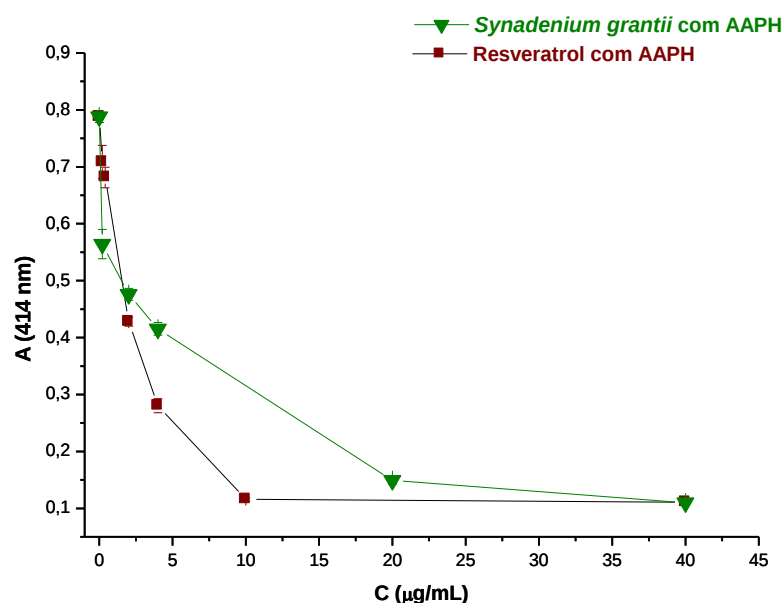


Figura 7 – Perfil da atividade do extrato bruto hidroalcoólico da casca de *Synadenium grantii* e do resveratrol sobre o AAPH (25 mM); $\lambda = 414 \text{ nm}$.

Olchowik *et al.* (2012) reportam que a ação anti-hemolítica dos extratos de *Rhus typhina* ($IC_{50} \cong 15 \mu\text{g/mL}$) e *Vitis vinifera* (IC_{50} entre 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$) está relacionada à concentração de taninos encontrada nestes extratos. Da mesma forma, Schmitz *et al.* (2008) associam às catequinas encontradas no extrato etanólico chá-verde a capacidade de inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH, sendo que uma concentração de 0,18 mg/mL do extrato do chá-verde foi capaz de inibir 70,3% da hemólise.

Os resultados obtidos com o EB das cascas de *S. grantii* revelam que a planta tem um grande potencial de inibir a lesão de eritrócitos pela ação de radicais livres presentes no sangue.

Conforme citado anteriormente, aos compostos fenólicos é atribuída, na literatura, a responsabilidade por uma atividade antioxidante de extratos de plantas medicinais (Kähkönen *et al.*, 1999; Shadyro *et al.*, 2003; Scotti *et al.*, 2009). Desta forma, uma quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada para o EB e para as frações com o objetivo de se avaliar a concentração destes compostos nestes extratos. No mesmo sentido, uma avaliação dos extratos fracionados (extratos I, II, III, IV) foi realizada empregando os sistemas DPPH[•] e ABTS^{•+} com o objetivo de se avaliar o potencial *scavenger* destas frações em decorrência de um fracionamento dos compostos presentes no extrato bruto com características de polaridade mais específicas.

A relação entre a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do extrato bruto e das frações de *S. grantii* pode ser observada na Tabela 3.

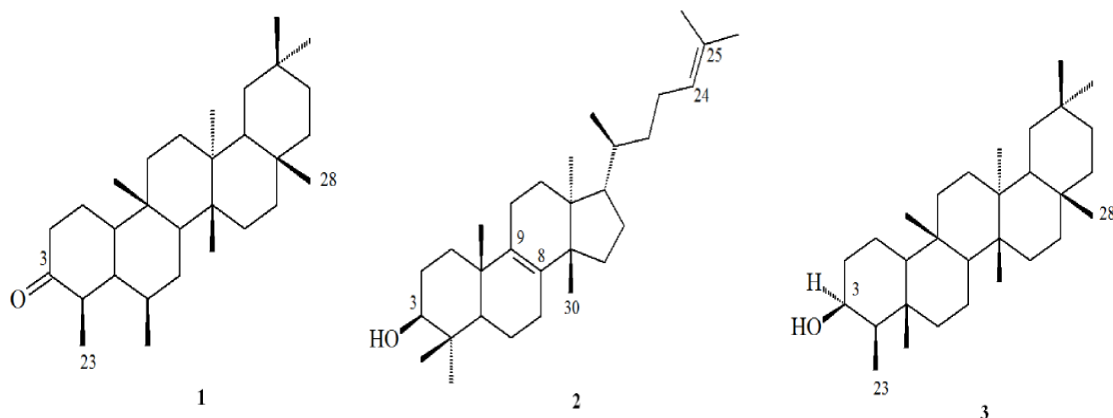
Tabela 3 – Ação antioxidante e fenólicos totais do extrato e frações das cascas do caule de *Synadenium grantii*

Amostras	ABTS ⁺⁺ IC ₅₀ (µg/mL)	DPPH [*] IC ₅₀ (µg/mL)	Fenólicos Totais (µg/mL)
EB	3,57 ± 0,31	12,1 ± 0,25	404,8
Fração IV	2,18 ± 0,12	10,5 ± 0,14	478,4
Fração III	3,58 ± 0,16	19,5 ± 0,40	262,0
Fração II	33,0 ± 0,64	*	**
Fração I	35,3 ± 1,30	*	**
Resveratrol	0,50 ± 0,06	63,4 ± 0,96	***

* Não atingiu 50% de inibição ** Não quantificado *** Experimento não realizado

Dasari *et al.* (2012) realizaram um estudo com a *S. grantii* e verificaram que a fração metanólica da espécie possui a maior concentração de compostos fenólicos e apresentou a melhor capacidade *scavenger* de radicais livres. Desta forma, os resultados obtidos por estes autores corroboram os dados encontrados em nosso estudo.

Na tentativa de se isolar compostos aos quais pudessem ser atribuídas as ações antioxidantes observadas neste estudo, procedimentos fitoquímicos foram realizados, numa primeira abordagem, com a fração II. Segundo Cechinel Filho & Yunes (1998), algumas classes de compostos fenólicos podem ser encontrados na fração clorofórmica devido a sua característica de polaridade. Como é visto no cromatograma fingerprint realizado, a presença de flavonóides de média polaridade (40 a 60% MeOH) justifica um estudo a partir da fração clorofórmica. No desenvolvimento dos procedimentos cromatográficos buscando isolar os compostos em questão, o isolamento de tais substâncias não foi alcançado, mas puderam ser isolados e identificados os triterpenos pentacíclicos friedelina (1) (Mahato & Kundu, 1994; Almeida *et al.*, 2011) e 3β-friedelinol (3) (Mahato & Kundu, 1994; Salazar *et al.*, 2000) e o triterpenos tetracíclico eufol (2) (Moreira, *et al.*, 2010), os quais foram identificados pela análise dos espectros RMN de ¹H e ¹³C e DEPT 135°, IV e por comparação com os dados encontrados na literatura.



A friedelina já foi isolada em outras plantas da família Euphorbiaceae como, por exemplo, *Mallotus barbatus* (Rivière *et al.*, 2012), *Thecacoris annobonae* (Kuate *et al.*, 2010), *Drypetes gossweileri* (Ngouela *et al.*, 2003). Porém, não foi encontrado outro relato de isolamento dessa substância na *S. grantii* sendo que, portanto, pode-se considerar esta a primeira vez que a substância foi isolada nessa espécie.

Outro composto isolado pela primeira vez nessa espécie, o 3β-friedelinol já foi isolado em outras espécies como, por exemplo, *Camellia japonica* (Thao *et al.*, 2010), *Gustavia elliptica* (Almeida *et al.*, 2011), bem como na espécie *Thecacoris annobonae* (Kuate *et al.*, 2010).

O triterpeno tetracíclico eufol é um metabólito secundário comum na espécie *S. grantii*, e seu isolamento já foi relatado em outros trabalhos (Uzabakiliho *et al.*, 1987; Hassan *et al.*, 2012).

Sunil *et al.* (2013) demonstraram a boa atividade antioxidante da friedelina, comparável ao BHT e à vitamina C, para atividade *scavenger in vitro* do DPPH[•], O₂^{•-}, NO[•] e [•]OH e um forte efeito supressor da lipoperoxidação, bem como demonstraram *in vivo* que a administração de friedelina diminuiu o estresse oxidativo induzido no fígado de ratos através da proteção dos hepatócitos e a normalização dos níveis de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GSH e GPx.

O isolamento da friedelina nesta espécie é um indicativo de que a capacidade antioxidante do extrato bruto das cascas do caule de *S. grantii* pode estar associada não somente aos compostos flavonoídicos presentes em sua composição, mas também aos triterpenos como os isolados em nosso estudo.

Conclusão

Os resultados demonstram que as cascas do caule de *S.grantii* apresentam potencial antioxidante demonstrando ação *scavenger* contra oxidantes importantes como $O_2^{\bullet-}$, o HOCl e a enzima MPO, associados à patogenia de diversas doenças, bem como demonstra capacidade de proteger células como os eritrócitos contra a ação de radicais livres. Ainda, ampliou-se o conhecimento químico sobre a planta, de forma que foram isolados a friedelina e o 3 β -friedelinol, dois triterpenos pentacíclicos relatados pela primeira vez nesta espécie e que podem ter papel importante na capacidade antioxidante desta espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária e à CAPES pelo suporte financeiro e apoio à pesquisa.

Ao professor Dr. Ivo Mottin Demiate e ao professor Dr. Alessandro Nogueira pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas

Afonso-Cardoso SR, Silva CV, Ferreira MS, Souza MA 2011. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. *Exp Parasitol* 128: 61-67.

- Almeida MFO, Melo ACR, Pinheiro, MLB, Silva JRA, Souza ADL 2011. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Quim Nova* 34(7): 1182-1187.
- Alves MV 1998. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil. *Acta bot bras* 12(3): 485-495.
- Andersen OM, Jordheim M, Byamukama R, Mbabazi A, Ogweng G, Skaar I, Kiremire B 2010. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 71: 1558-1563.
- Azeredo FS 2008. *Avaliação da toxicidade pré-clínica do látex e do extrato etanólico das folhas de Synadenium umbellatum PAX*. Goiania 99p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás.
- Babior BM 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Sci* 109: 33-44.
- Bagavathi R, Sorg B, Hecker E 1988. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. *Planta Med* 54(6): 506-510.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29(1): 113-123.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65: 1865-1874.
- Cechinel Filho V, Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova* 21 : 99-105.
- Costa M, Ximenes VF, Fonseca LM 2004. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. *Biol Pharm Bull* 27(8): 1183-1187.
- Cunha LC, Azeredo FS, Mendonça ACV, Vieira MS, Pucci LL, Valadares MC, Freitas HOG, Sena AAS, Lino Jr RS 2009. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum Pax*. *Rev Bras Farmacogn* 19: 403-411.
- Dasari NP, Rao BG, Rao ES, Rao TM, Praneeth VS 2012. Quantification of phytochemical constituents and *in vitro* antioxidant activity of *Synadium grantii*. *Free Rad Antiox* 2(2): 68-72.
- Farmacopéia brasileira 2002. 4 ed. São Paulo: Atheneu.
- Gomez-Mejiba SE, Zhai Z, Gimenez MS, Ashby MT, Chilakapati J, Kitchin K, Mason RP, Ramirez DC 2010. Myeloperoxidase-induced genomic dna-centered radicals. *J Bio Chem* 285(26): 20062–20071.
- Govindarajan R, Rastogi S, Vijayakumar M, Shirwaikar A, Rawat AKS, Mehrotra S, Pushpangadan P 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol Pharm Bull* 26(10): 1427-1427.

- Hansson M, Olsson I, Nauseef WM 2006. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 445: 214-224.
- Hassan EM, Mohammed MMD, Mohamed SM 2012. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook f. leaves. *Rec Nat Prod* 6(3): 255-262.
- Jäger AK, Hutchings A, Van Staden J 1996. Screening of zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *J Ethnopharmacol* 52: 95-100.
- Kakkar P, Das B, Viswanathan PN 1984. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Bio* 21: 130-132.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954-3962.
- Khalil NM 2000. *Interação nicotina-peroxidases (mieloperoxidase e horseradish): implicações no burst oxidativo de leucócitos polimorfonucleares*. Araraquara 99p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.
- Khalil OAK 2011. *Avaliação da interação entre a curcumina e o ácido ascórbico em ensaios de atividade antioxidante e antimicrobiana*. Araraquara 110p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista.
- Kinghorn DA 1980. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. *J Pharm Sci* 69(12): 1446-1447.
- Kuete V, Poumale HMP, Guedem AN, Shiono Y, Randrianasolo R, Ngadjui BT 2010. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). *S Afr J Bot* 76: 536-542.
- Lapenna D, Cellini L, Gioia S, Mezzetti A, Ciofani G, Festi D, Cuccurullo F 1994. Cephalosporins are scavengers of hypochlorous acid. *Biochem Pharmacol* 49(9): 1249-1254.
- Lee DE, Bannister JM, Raine JI, Conran JG 2010. Euphorbiaceae: Acalyphoideae fossils from early Miocene New Zealand: *Mallotus-Macaranga* leaves, fruits and inflorescence with in situ *Nyssapollenites endobalteus* pollen. *Rev Palaeobot Palyno* 163: 127-138.
- Mahato SB, Kundu AP 1994. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37(6): 1517-1575.
- Menon M, Vithayathil PJ, Raju SM, Ramadoss CS 2002. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, f. *Plant Sci* 163: 131-139.
- Moreira CPS, Zani CS, Alves TMA. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* e isolamento do constituinte majoritário. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2(3): 16-27.

- Mota FM, Benfica PL, Batista AC, Martins FS, Paula JR, Valadares MC 2012. Investigation of ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *J Ethnopharmacol* 139: 319-329.
- Ngouela S, Ngoupayo J, Nougoue DT, Tsamo E, Connolly JD 2003. Gossweilone: a new podocarpane derivative from the stem bark of *Drypetes gossweileri* (Euphorbiaceae). *Bull Chem Soc Ethiop* 17(2): 181-184.
- Nogueira IAL 2008. *Atividade antitumoral e antiangiogênica de Synadenium umbellatum PAX in vitro e in vivo*. Goiânia 141p. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Goiás.
- Nussbaum C, Klinke A, Adam M, Baldus S, Sperandio M 2013. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Sign* 18(6): 692-713.
- Olchowik E, Lotkowski K, Mavlyanov S, Abdullajanova N, Ionov M, Bryszewska M, Zamaraeva M 2012. Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*rhus typhina* L.) and grape seeds (*vitis vinifera* L.). *Cell Mol Bio Lett* 17: 333-348.
- Oliveira Jr RJ, Rodrigues CS, Lacerda EPS 2005. Avaliação da atividade antitumoral do látex bruto de *Synadenium grantii* Hook, f. DL 50 e tratamento *in vivo* via oral. Reunião Anual da SBPC. Fortaleza, Brazil.
- Pellegrini N, Re R, Yang M, Evans CR 1998. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. *Method Enzymol* 299: 379-389.
- Premaratna, A.; Shdaksharaswamy, M.; Nanjappa SS 1984. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex *Synadenium grantii* Hook f. *Indian J Biochem Bio* 18: 32-35.
- Rajesh R, Nataraju A, Gowda CDR, Frey BM, Frey FJ, Vishwanath BS 2006. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. *Biochimie* 88: 1313-1322.
- Regasini LO, Velloso JCR, Silva DHS, Furlan M, Oliveira OMM, Khalil NM, Brunetti IL, Young MCM, Barreiro EJ, Bolzani VS 2008. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 69: 1739-1744.
- Rivière C, Hong VNT, Hoai NN, Dejaegher B, Tistaert C, Van KP, Heyden YV, Van MC, Quetin-Leclercq J 2012. N-methyl-5-carboxamide-2-pyridone from *Mallotus barbatus*: A chemosystematic marker of the Euphorbiaceae genus Mallotus. *Biochem Syst Ecol* 44: 212-215.
- Rogério AP, Cardoso CR, Fontanari C, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Silva EVG, Koyama NS, Basei FL, Soares EG, Calixto JB, Stowell SR, Dias-Baruffi M, Faccioli LH 2007. Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glicobiology* 17: 795-804.

- Salazar GCM, Silva GDF, Duarte LP, Vieira Filho SA, Lula IS 2000. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. *Magn Reson Chem* 38: 977-980.
- Shadyro OI, Edimecheva IP, Glushonok GK, Ostrovskaya NI, Polozov GI, Murase H, Kagiya T 2003. Effects of phenolic compounds on reactions involving various organic radicals. *Free Radical Res* 37(10): 1087-1097.
- Schmitz WO, Simão ANC, Cecchini R, Saridakis HO 2009. Estresse oxidativo em eritrócitos submetidos a 2,2-azobis amidinopropano (AAPH): efeito antioxidante e antihemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). *Arqu Ciênc Saúde Unipar* 12(3): 175-179.
- Scotti L, Scotti MT, Pasqualoto KFM, Bolzani VS, Ferreira EI 2009. Molecular physicochemical parameters predicting antioxidant activity of Brazilian natural products. *Rev Bras Farmacogn* 19(4): 908-913.
- Soares JR, Dinis TC, Cunha AP, Almeida LM 1997. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Res* 26: 469-478.
- Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG, Kettle AJ 2012. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51: 1796-1803.
- Sunil C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA 2013. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. leaves. *Food Chem* doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.041.
- Thao NTP, Hung TM, Lee MK, Kim JC, Min BS, Bae K 2010. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull* 58(1): 121-124.
- Tsumbu CN, Deby-Dupont G, Tits M, Angenot L, Frederich M, Kohnen S, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D, Franck T 2012. Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *Int J Mol Sci* 13: 628-650.
- Uzabakiliho B, Largeau C, Casadevall E 1987. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. *Phytochemistry* 26(11): 3041-3045.
- Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML 2002. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull* 25(10): 1320-1323.
- Van Acker SABE, Van Den Berg D, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF, Bast A 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Bio Med* 20(3): 331-342.
- Velloso JCR, Barbosa VF, Khalil NM, Santos VAFFM, Furlan M, Brunetti IL, Oliveira OMMF 2007. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Rev Bras Ciênc Farm* 43: 447-453.

- Velloso JCR 2008a. *Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistema modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”*. Araraquara 112p. Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Velloso JCR, Khalil, OAK, Khalil NM, Santos VAFFM, Hakime-Silva RA, Furlan M, Brunetti IL, Oliveira OMMF 2008b. *Maytenus ilicifolia* as source of antioxidants and antiradicals agents and its action on neutrophils peroxidase (myeloperoxidase). *African Journal of Biochemistry Research* 2(12): 232-239.
- Weseler AR, Bast A 2010. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr Hypertens Rep* 12: 154-161.
- Ximenes VF, Lopes MG, Petrônio MS, Regasini LO, Silva DHS, Fonseca LM 2010. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,20-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. *J Agr Food Chem* 58: 5355-5362.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA 2004. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 577-614.

5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 MICRO-ORGANISMOS

A avaliação da atividade antimicrobiana ocorreu frente aos seguintes micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231), obtidas com o Prof. Dr. Luís Antônio Esmerino do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

As culturas foram inoculadas em solução fisiológica 24 horas antes da realização dos testes, ocorrendo a padronização do inóculo para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As suspensões de micro-organismos foram padronizadas com uma solução de sulfato de bário de turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland (CLSI, 2005).

5.1.2 DISCO-DIFUSÃO

Este ensaio foi realizado de acordo com os padrões técnicos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

Para o teste de disco-difusão, o extrato bruto hidroalcoólico de *S. grantii* (EB) foi preparado em DMSO (500 mg/mL de solução estoque) e esterilizado por filtração em filtro Millipore de 0,45 µm.

A solução-estoque foi diluída (1:2; 1:4 e 1:8 v/v) e se procedeu a adsorção de 10 µL em discos de papel (6 mm) (concentrações finais de 2,5; 1,25 e 0,625 mg/disco).

Os discos foram fixados em placas de Petri com ágar Müller-Hinton contendo os micro-organismos e em seguida as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento foram medidos em milímetros e valores acima de 8 mm de diâmetro determinam a suscetibilidade da cepa em relação ao extrato testado (SILVA *et al.*, 2011).

Como controle positivo utilizou-se o ciprofloxacino (5 µg/disco - NEWPROV®) para as cepas de bactéria, e cetoconazol (40 µg/disco) para *C. albicans*. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

5.1.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em microplacas com 96 poços. Os micro-organismos foram inoculados em caldo Müller-Hinton por 6 horas. O EB foi solubilizado em DMSO (solução estoque de 50mg/mL) sendo realizadas as diluições necessárias para obtenção das concentrações finais.

Nos poços, depositou-se uma alíquota de 10 µL do EB (concentrações finais de 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL) e 5 µL das suspensões de micro-organismos. Os poços foram então preenchidos com caldo Müller-Hinton para as bactérias e caldo Sabouraud para *C. albicans* para um volume final de 200 µL. Após 24 horas de incubação a 35 °C, mediu-se a densidade óptica em leitor de ELISA a 650 nm.

A menor concentração dos extratos testados capaz de inibir o crescimento microbiano foi designada concentração inibitória mínima. Todos os testes foram realizados em duplicata.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 DISCO-DIFUSÃO E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O teste de disco-difusão, embora simples, é um método confiável e utilizado na seleção de extratos biologicamente ativos, em meio de cultura sólido, e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do organismo com a concentração da substância testada. O teste é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (RÍOS; RECIO; VILLAR, 1988; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Neste estudo, os halos de inibição foram medidos e os valores acima de 8 mm determinaram a sensibilidade da cepa em relação ao extrato (SILVA *et al.*, 2011). O teste de disco-difusão revelou atividade do EB contra *Staphylococcus aureus* na concentração de 2,5 mg/disco (halo = 8 mm) e contra *Candida albicans* na concentração de 2,5, 1,25 e 0,625 mg/disco (halos = 11, 9 e 8 mm, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4 – Halos de inibição do teste de disco-difusão para o extrato bruto das cascas de *Synadenium grantii*.

Micro-organismos	Concentração do EB		
	2,5 mg/disco	1,25 mg/disco	0,625 mg/disco
<i>S. aureus</i>	8 mm (S)	7 mm (R)	0 mm (R)
<i>P. aeruginosa</i>	0 mm (R)	0 mm (R)	0 mm (R)
<i>E. coli</i>	0 mm (R)	0 mm (R)	0 mm (R)
<i>E. faecalis</i>	0 mm (R)	0 mm (R)	0 mm (R)
<i>C. albicans</i>	11 mm (S)	9 mm (S)	8 mm (S)

(S) = Sensível (R) = Resistente

Para a verificação da CIM realizou-se a técnica de microdiluição, onde se considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo no meio líquido e concentração do extrato testado. O resultado dá-se de acordo com a proporção da turbidez causada pelo crescimento microbiano (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Este teste demonstrou que o EB apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* em concentrações a partir de 312 µg/mL, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados de CIM para o extrato bruto das cascas de *Synadenium grantii*.

Micro-organismos	CIM
	EB (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	Inativo
<i>P. aeruginosa</i>	Inativo
<i>E. coli</i>	312
<i>E. faecalis</i>	Inativo
<i>C. albicans</i>	312

Segundo Aligianis *et al.* (2001), quando trata-se de materiais vegetais, considera-se os resultados como: forte inibição – CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1.500 µg/mL; e como fraca inibição – CIM acima de 1.600 µg/mL.

Em nosso estudo, observa-se que no teste de disco-difusão, o EB foi eficaz para *S. aureus* e *C. albicans*, enquanto que no teste de CIM por microdiluição observa-se que o EB obteve forte inibição para *E. coli* e *C. albicans*.

Esta diferença entre os dois modelos experimentais, tratando-se dos resultados exibidos para as duas bactérias pode ser explicada pela diferença existente entre os dois métodos em relação à difusão de algumas substâncias no ágar, principalmente quando se trata de extratos vegetais (SEJAS *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2010). Sendo assim, a possível limitação da difusão dos componentes do EB, devido à variedade de substâncias presentes em um extrato vegetal pode ter influenciado os resultados discrepantes para *E. coli* e *S. aureus*.

Por outro lado, o EB demonstrou ser bastante efetivo contra a cepa de *Candida albicans*, presumindo-se que o extrato e seus compostos possam atuar no tratamento de infecções causadas por esta levedura.

Várias plantas, alguma utilizadas popularmente, vêm sendo avaliadas quanto à capacidade antimicrobiana de seus extratos (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; BRASILEIRO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2006).

Irobi *et al.* (1994) realizaram um estudo com os extratos aquosos e etanólicos das cascas da *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae), e encontraram atividade no teste de difusão em ágar para os dois extratos. Os resultados dos halos de inibição na concentração de 5 mg/disco para a solução etanólica e aquosa foram, respectivamente $8 \pm 0,19$ e $10 \pm 0,73$ para *S. aureus*, $4 \pm 0,01$ e $4 \pm 0,10$ para *E. coli* e $10 \pm 0,10$ e $15 \pm 0,39$ para *C. albicans*. Ainda, *screening* fitoquímico realizado pelos autores, nos extratos desta planta, demonstrou a presença de taninos e outros compostos polifenólicos.

Oliveira *et al.* (2008) realizaram os testes de disco-difusão e microdiluição para avaliar a capacidade antimicrobiana do látex, das folhas e da entrecasca da *Croton urucurana* (Euphorbiaceae). O látex da planta demonstrou espectro de ação e maior potência do que os extratos das folhas e das entrecascas. Dos extratos da entrecasca, a fração clorofórmica foi a que apresentou maior potência de inibição no método de disco-difusão contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *E. coli*, na concentração de 1mg/disco, os halos de inibição (mm) foram 14, 15, 14, 12, respectivamente. Por outro lado, no teste de CIM o extrato etanólico da entrecasca apresentou atividade ligeiramente melhor que o clorofórmico para estes micro-organismos. Sendo os resultados 0,5; 0,25; 0,5; 0,25 mg/mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *E. coli* respectivamente. Os autores destacam a presença de compostos polifenólicos, entre outros metabólitos secundários encontrados no látex da espécie.

Algumas classes de metabólitos secundários são frequentemente citadas como responsáveis pela ação antimicrobiana dos extratos vegetais, entre estes estão ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóides, flavonóis, alcalóides, óleos essenciais e terpenos (COWAN, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2005; CUSHNIE; LAMB, 2005).

O resultado do teste antimicrobiano do presente estudo pode estar associado a classes de compostos polifenólicos quantificados, bem como pode estar associado aos terpenos presentes na espécie *Synadenium grantii*.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, o estudo fitoquímico realizado com o extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule de *Synadenium grantii* Hook. f. permitiu o isolamento de três triterpenos da fração clorofórmica: eufol, friedelina e 3 β -friedelinol, sendo os dois últimos encontrados pela primeira vez na espécie.

Ainda, um cromatograma *fingerprint* indicou a presença de compostos flavonoídicos no extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule.

A partir dos resultados obtidos com os experimentos antioxidantes, conclui-se que a planta tem um potencial antioxidante considerável, apresentando não somente capacidade *scavenger* de radicais livres e agentes oxidantes, como também inibindo a mieloperoxidase e a catálise para a formação de mais radicais livres. Ressalta-se ainda que o EB também possui um potencial de proteção celular, pois foi capaz de proteger as células eritrocitárias da ação de radical livre.

Das frações obtidas do extrato bruto, as frações mais polares (metanólica e acetato de etila) apresentaram a maior quantidade de compostos polifenólicos, bem como maior potencial biológico em modelos antioxidantes, se comparando com as frações mais apolares.

O EB de *Synadenium grantii* revelou um potencial antimicrobiano interessante, principalmente frente à levedura *C. albicans*, mais experimentos devem ser realizados tanto com as frações obtidas do extrato bruto como com substâncias isoladas, para que este potencial seja mais definido.

Por fim, este trabalho amplia o conhecimento prévio sobre esta espécie e demonstra vários potenciais biológicos que abrem caminho para novos estudos direcionados de acordo com os resultados apresentados, como, por exemplo, o estudo químico das frações mais polares do EB na tentativa de se isolar os compostos flavonoídicos; assim como o estudo de bioatividade dos triterpenos isolados da fração clorofórmica em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* relacionados à atividade antioxidante, bem como às doenças e distúrbios que estejam ligados ao estresse oxidativo e ao uso popular da espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO-CARDOSO, S.R. *et al.* Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 61-67, 2011.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 678-689, Dez. 2006.
- ALIGIANIS N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, M.F.O. *et al.*, Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE), **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1182-1187, 2011.
- ALVES, M.V. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil. **Acta botânica brasílica**. v. 12, n. 3, p.485-495, 1998.
- ANDERSEN, O.M. *et al.* Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 1558-1563, 2010.
- APG II. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of Linnean Society**. London, v. 141, p. 399-436, 2003.
- AZEREDO, F.S. **Avaliação da toxicidade pré-clínica do látex e do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* PAX.** 2008, 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The american journal of medicine**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Medica**. Stuttgart, v.54, n. 6, p. 506-510, 1988.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BELTRAME, F.L. *et al.* Evaluation of biochemical and microbiological effects of *Cordyline dracaenoides* Kunth (Uvarana) barks. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n.20, p. 2255-2264, Nov. 2011.

BERGENDI, L. *et al.* Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65, n. 18/19, p.1865-1874, 1999.

BITTNER, M. *et al.* Estudio químico de especies de la familia euphorbiaceae en Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, Concepción, v. 46, n. 4, p. 1-15, Dec. 2001.

BRASILEIRO, B. G. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão : norma aprovada**. 8 ed. Documento M2.A8. Brasília. Editora da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 23, n.1, 58 p. 2005.

COSTA, J. O. *et al.* Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochemie**, v. 92, p. 1760-1765, 2010.

COSTA, L. L. G. *et al.* Antiulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1070-1078, set./out. 2012.

COSTA, M.; XIMENES, V.F; FONSECA, L. M.. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil funtions. **Biological and Pharmaceutical Boletim**, 27, 1183-1187, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

CUNHA *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 403-411, 2009.

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

DASARI, N. P. *et al.* Quantification of phytochemical constituents and *in vitro* antioxidant activity of *Synadium grantii*. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n.2, p. 68-72 2012.

DOCAMPO, P.C. *et al.* Eritrodermia secundaria a planta productora de látex (*Synadenium grantii*). **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 108, n. 6, p. 126-129, 2010.

DURGAWALE, P.P. *et al.* Differential erythrocyte agglutination pattern in normal and cancer patients with *Synadenium grantii* root (Hook f) lectin. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 16, n. 1, p. 110-112, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

GOMEZ-MEJIBA, S.E. *et al.* Myeloperoxidase-induced genomic dna-centered radicals. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 26, p. 20062–20071, Jun., 2010.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.3, p. 353-358, jul./set., 2005.

GOVINDARAJAN, R. *et al.* Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological and Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 10, p. 1427-1427, 2003.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p.214-224, 2006.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M. M. D.; MOHAMED, S. M. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook f. leaves. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 3, p. 255-262, 2012.

HERMANSSON, K. *et al.* Isolation and characterization of 2-O-β-d-glucopyranosyl-l-malic acid from *Synadenium pereskiaefolium*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 513-515, 1990.

IROBI, O. N. *et al.* Antimicrobial activity of bark extracts of *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 185-190, 1994.

JÄGER, A.K.; HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Screening of zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 95-100, 1996.

JUDD, W.S. *et al.* **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 2002. 576 p.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 21, p. 130-132, 1984.

KÄHKÖNEN, M.P. *et al.* Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KHALIL, N. M. **Interação nicotina-peroxidases (mieloperoxidase e horseradish): implicações no burst oxidativo de leucócitos polimorfonucleares**. 2000, 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

KHALIL, O. A. K. **Avaliação da interação entre a curcumina e o ácido ascórbico em ensaios de atividade antioxidante e antimicrobiana**. 2011, 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

KINGHORN, D.A. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Washington, v. 69, n. 12, p. 1446-1447, 1980.

KUETE, V. *et al.* Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v.76, p. 536-542, 2010.

LAPENNA, D. *et al.* Cephalosporins are scavengers of hypochlorous acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 9, p. 1249-1254, 1994.

LEE, D.E. *et al.* Euphorbiaceae: Acalyphoideae fossils from early Miocene New Zealand: *Mallotus-Macaranga* leaves, fruits and inflorescence with in situ *Nyssapollenites endobalteus* pollen. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 163, p. 127-138, 2010.

LIMA, M. R. F. *et al.* The antibiotic activity of some brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n.3, p. 300-306, Jul./Set. 2006.

MACHADO, A.A. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae)**. 2008, 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25: 429-438, 2002.

MAHASNEH *et al.* Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, 64(3): 271-276, 1999.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MANS, D.R., ROCHA, A.B., SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: target plant collection as rational strategy to acquire candidate anti-cancer-compounds. **The Oncologist**, 5, 185-198, 2000.

MARIUTTI, L.R.B. *et al.* Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 51, n. 6, p. 1225-1232, nov./dec. 2008.

MARTINS, C.H.G. *et al.* Determinação *in vitro* da atividade antibacteriana dos extratos brutos da casca e polpa farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação**. v. 10, p.37-43, 2010.

MENON, M. *et al.* Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, f. **Plant Science**, v. 163, p. 131-139, 2002.

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

MOREIRA, C.P.S; ZANI, C.S; ALVES, T.M.A. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* e isolamento do constituinte majoritário. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 3, p. 16-27, 2010.

MOTA, F.M. *et al.* Investigation of ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 319-329, 2012.

NAVARRO, *et al.* Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, 53(3): 143-147, 1996.

NGOUELA, S. *et al.* Gossweilone: a new podocarpane derivative from the stem bark of *drypetes gossweileri* (Euphorbiaceae). **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 17, n.2, p. 181-184, 2003.

NOGUEIRA, I.A.L. **Atividade antitumoral e antiangiogênica de *Synadenium umbellatum* PAX *in vitro* e *in vivo***. 2008, 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

NUSSBAUM, C. *et al.* Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 692-713, 2013.

OLCHOWIK, E. *et al.* Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*rhus typhina* L.) and grape seeds (*vitis vinifera* L.). **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 17, p. 333-348, 2012.

OLIVEIRA, I. S. *et al.* Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 n. 4, p. 587-593, Out./Dez. 2008.

OLIVEIRA Jr., R. J.; RODRIGUES, C. S.; LACERDA, E. P. S. Avaliação da atividade antitumoral do látex bruto de *Synadenium grantii* Hook, f. DL 50 e tratamento *in vivo* via oral. In: Reunião Anual da SBPC, 57, 2005, Fortaleza. **Anais...** Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/tema9551210cex.asp>. Acesso em 27 jun. 2011.

ORTÊNCIO, W.B. **Medicina popular do centro-oeste**. 2. ed. Brasília: Theasaurus, 1997. 464 p.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-

ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p.379-389, 1998.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants usage. **Pharmacognosy Reviews**, p.1, jan./jun. 2012.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex *Synadenium grantii* Hook f. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 18, p. 32-35, 1984a.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA. Some biological properties of *Synadenium grantii* lectin. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 27, p. 91-97, 1984b.

QUEIROGA, C.L. *et al.* Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3b-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 465-468, (2000).

RAJESH, R. *et al.* Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313-1322, 2006.

REGASINI, L.O. *et al.* Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, p.1739-1744, 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

RISHTON, M. G. Natural product as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101 (10A), p. 43-49D, may, 2008.

RIVIÈRE, C. *et al.* N-methyl-5-carboxamide-2-pyridone from *Mallotus barbatus*: A chemosystematic marker of the Euphorbiaceae genus Mallotus. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 212-215, 2012.

RIZK, A.-F.M. The chemical constituents and economic plants of the euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 94, p. 293-326, 1987.

RODRIGUES, E.A. Parceria Universidade-Empresa privada na produção de Fitoterápicos no Brasil. **Fármacos e Medicamentos**, n. 37, ano VI, p. 14-18, 2005.

ROGERIO, A.P. *et al.* Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glicobiology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 795-804, 2007.

SALAZAR, G.C.M. *et al.* Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 977-980, 2000.

SHADYRO, O.I. *et al.* Effects of phenolic compounds on reactions involving various organic radicals. **Free Radical Research**, v. 37, n. 10, p. 1087-1097, Out. 2003.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 371-402.

SCHMITZ, W. O. *et al.* Estresse oxidativo em eritrócitos submetidos a 2,2-azobis amidinopropano (AAPH): efeito antioxidante e antihemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 12, n. 3, p. 175-179, Set./Dez. 2009.

SCOTTI, L. *et al.* Molecular physicochemical parameters predicting antioxidant activity of Brazilian natural products. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19 n. 4, p. 908-913, Out./Dez. 2009.

SEJAS, L. M. *et al.* Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial**, v. 39, n.1, p. 27-35, 2003.

SHUKLA, Y.; SINGH, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, 1215, 1-8, 2011.

SILVA, L. C. *et al.* Antimicrobial activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae) : a biomonitored study. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n.1, p. 147-153, 2011.

SOARES, J. R.; DINIS, T. C.; CUNHA, A. P.; ALMEIDA, L. M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p. 469-478, 1997.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

STAMP, L.K. *et al.* Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, p.1796-1803, 2012.

SUGANUMA, M.; SAHA, A.; FUJIKI, H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. **Cancer Science**, Japan, v. 102, n. 2, p. 317-323, Feb. 2011.

SUNIL, C. *et al.* Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. **Food Chemistry**, v. 139, p. 860-865, 2013.

TALHOUK, R.S. *et al.* Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2007.

TANG, S.Y; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 394, p. 1-5, 2010.

THAO, N. T. P. *et al.* Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n.1, p. 121-124, 2010.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M. **Compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 318 p.

TSUMBU, C.N. *et al.* Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13, p. 628-650, 2012.

UZABAKILIHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**. v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N.C; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.4, p. 631-638, Out./Dez. 2007.

VALENTÃO, P. *et al.* Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 10, p. 1320-1323, 2002.

VAN ACKER, S.A.B.E. *et al.* Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VELLOSA, J.C.R. *et al.* Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 447-453, 2007.

VELLOSA, J.C.R. **Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistema modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”**. 2008, 112f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008a.

VELLOSA J.C.R. *et al.* *Maytenus ilicifolia* as source of antioxidants and antiradicals agents and its action on neutrophils peroxidase (myeloperoxidase). **African Journal of Biochemistry Research** v. 2, n.12, p. 232-239, 2008b.

VILLAS BÔAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, vol.23, n. 6, Rio de Janeiro, 2007.

WESELER, A.R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current Hypertension Reports**. v. 12, p. 154-161, 2010.

XIMENES, V. F. *et al.* Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,20-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5355-5362, 2010.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 577-614.

ANEXO A

Protocolo de Pesquisa Aprovado pela Comissão de Ética



PARECER Nº 68/2010
Protocolo: 08766/10

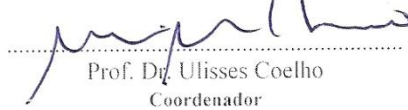
Em reunião ordinária, realizada dia 26 de Agosto de 2010, a Comissão de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa intitulado "Ação de xenobióticos sobre eritrócitos: hemólise provocada por radicais livres e interferência de produtos naturais vegetais e de anti-inflamatórios" de responsabilidade do pesquisador José Carlos Rebuglio Velloso.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Final: 01/12/2010

Ponta Grossa, 27 de Agosto de 2010.

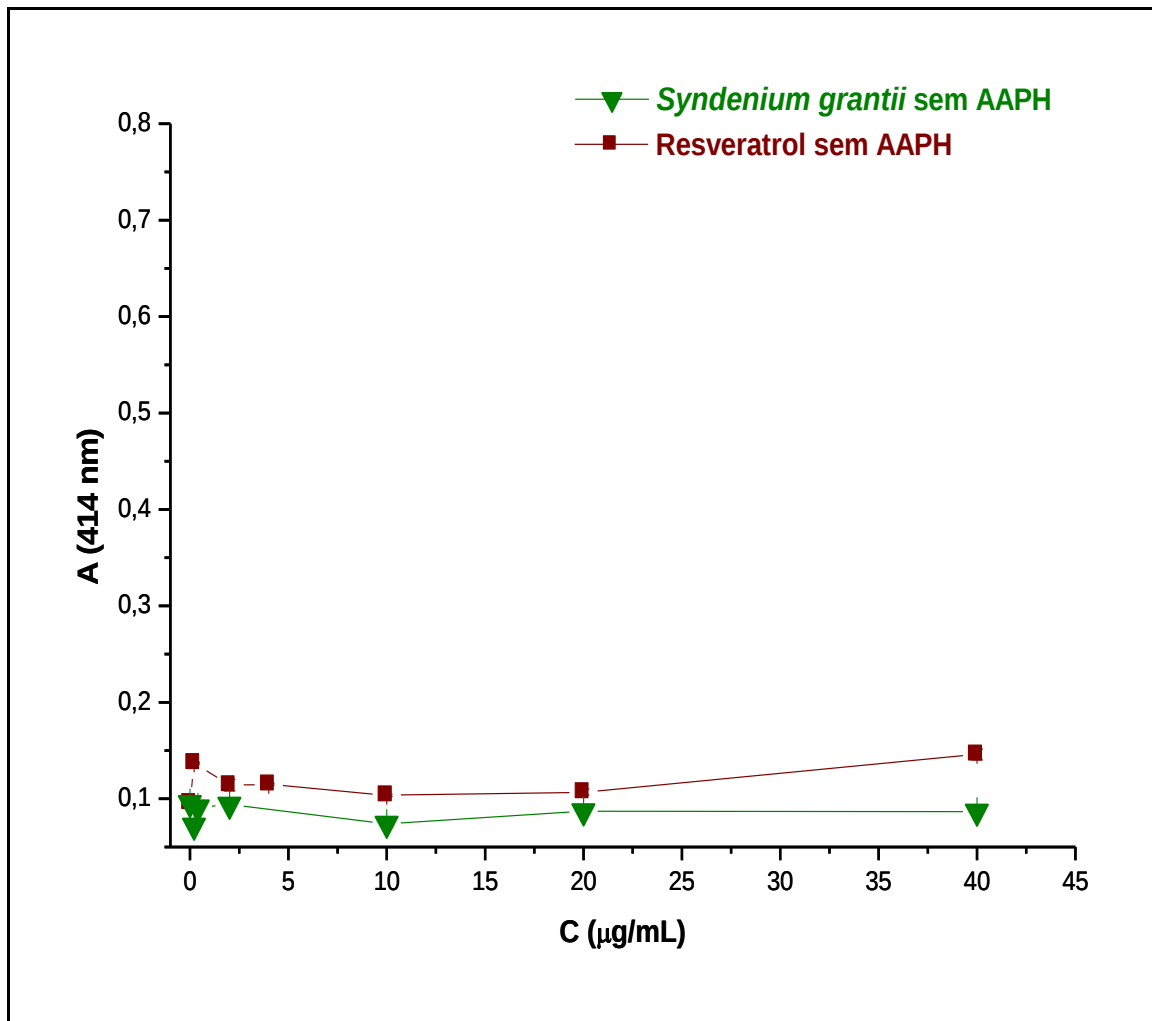
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP



Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador

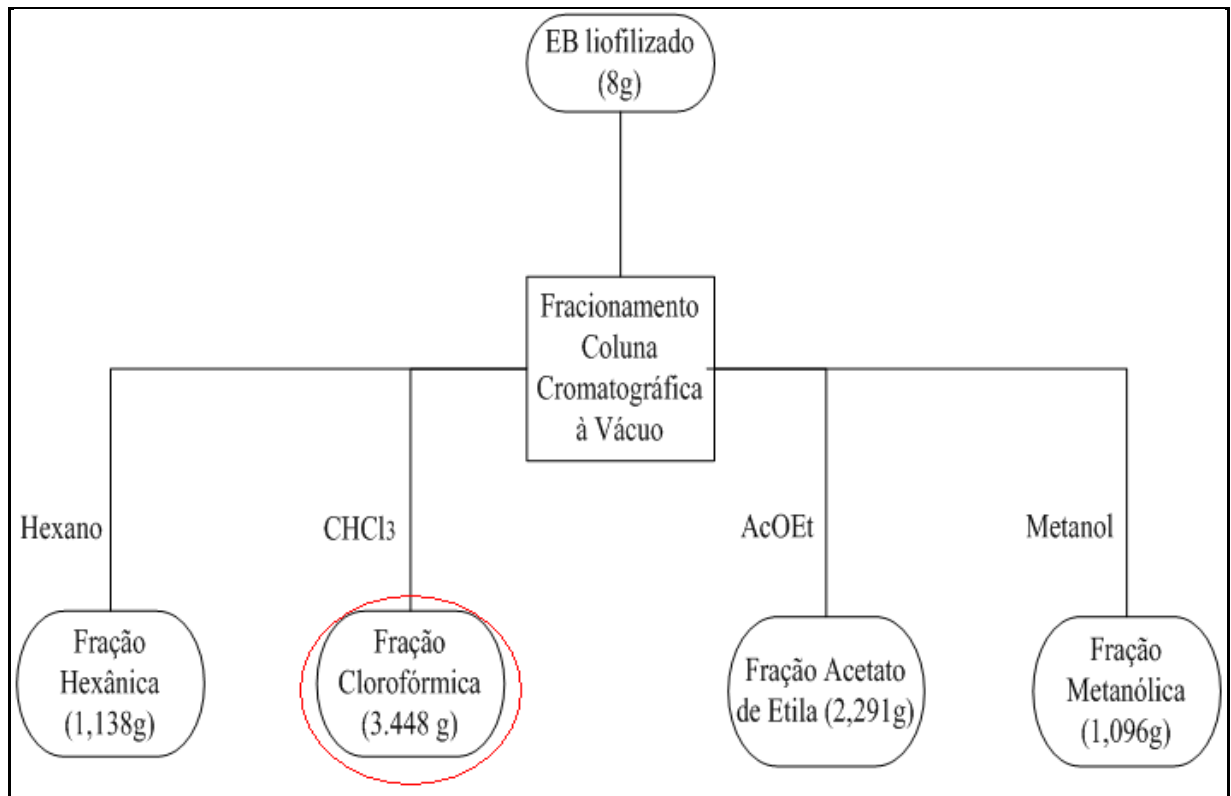
ANEXO B

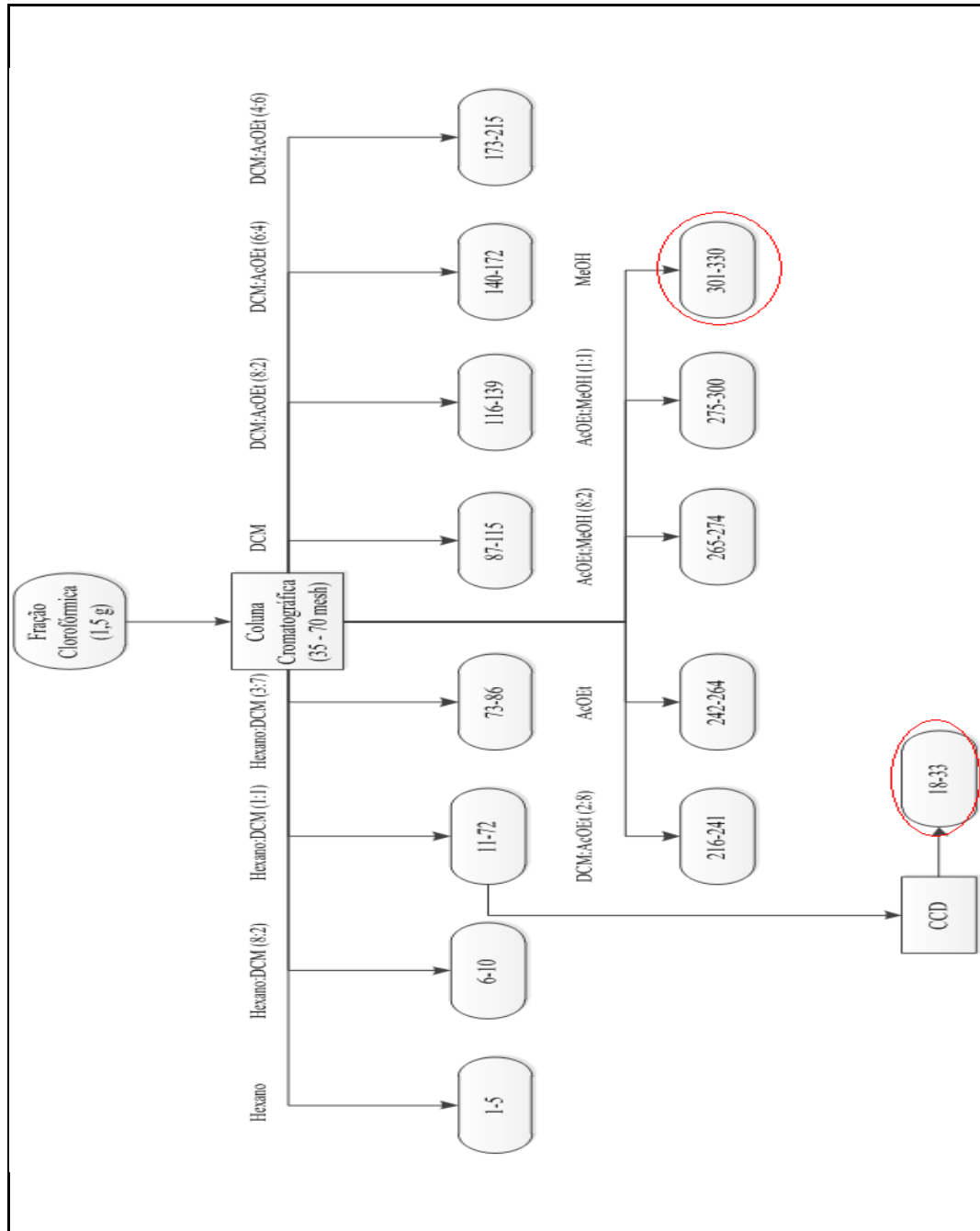
Avaliação da Citotoxicidade do EB Sobre Eritrócitos - Hemólise na Ausência de AAPH

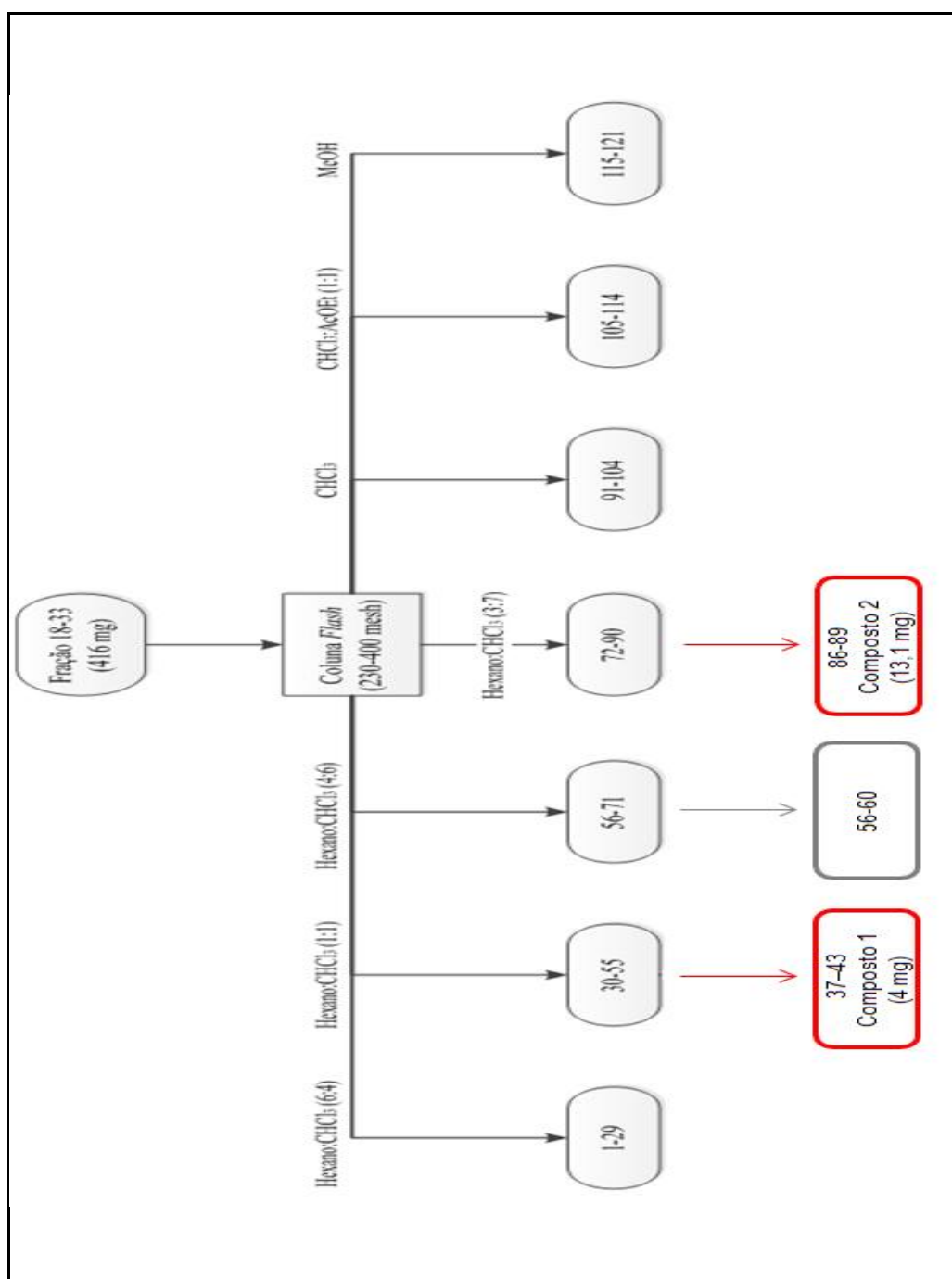


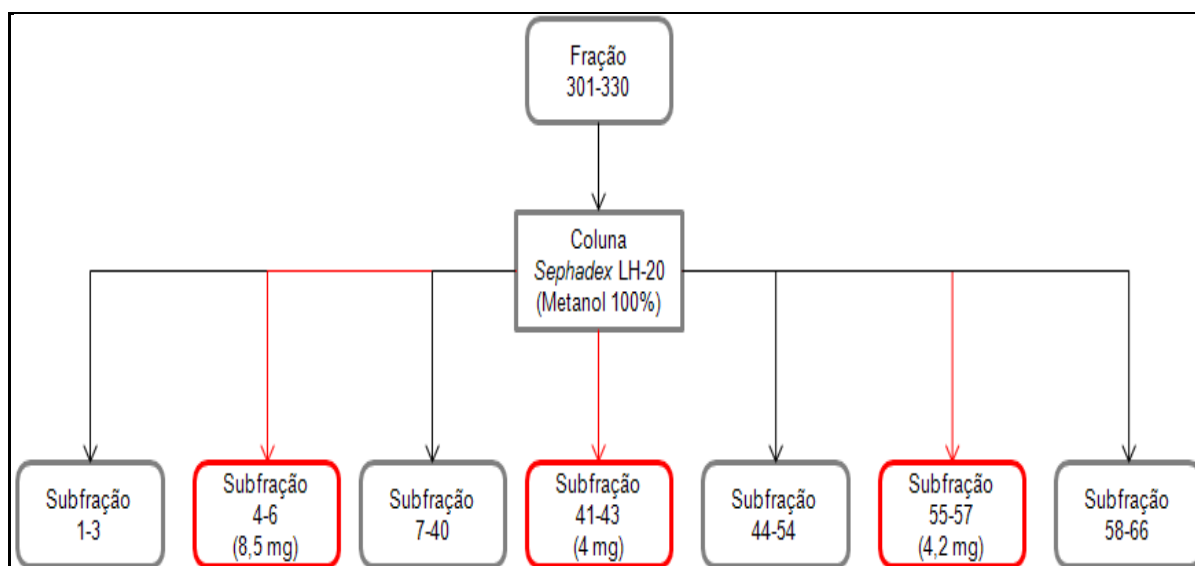
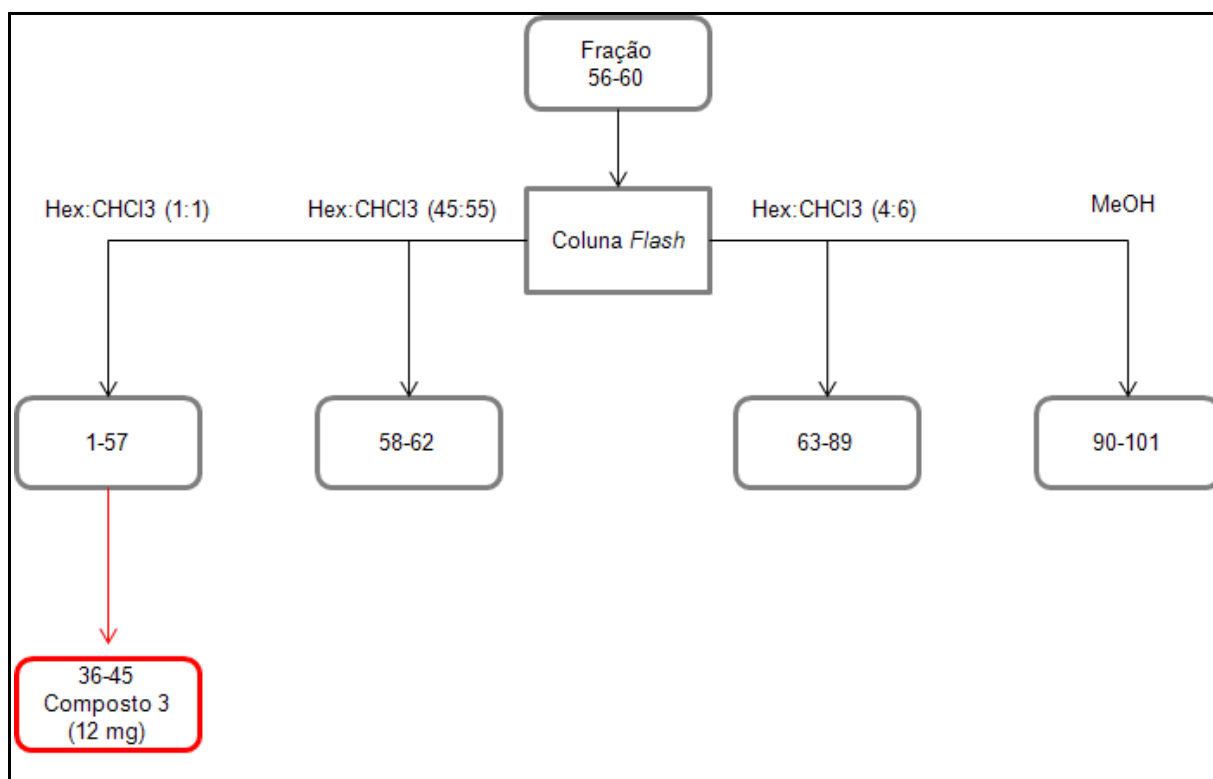
ANEXO C

**Fluxogramas da Obtenção de Frações, Subfrações e Compostos a Partir das Cascas do
Caule de *Sydenium grantii*.**





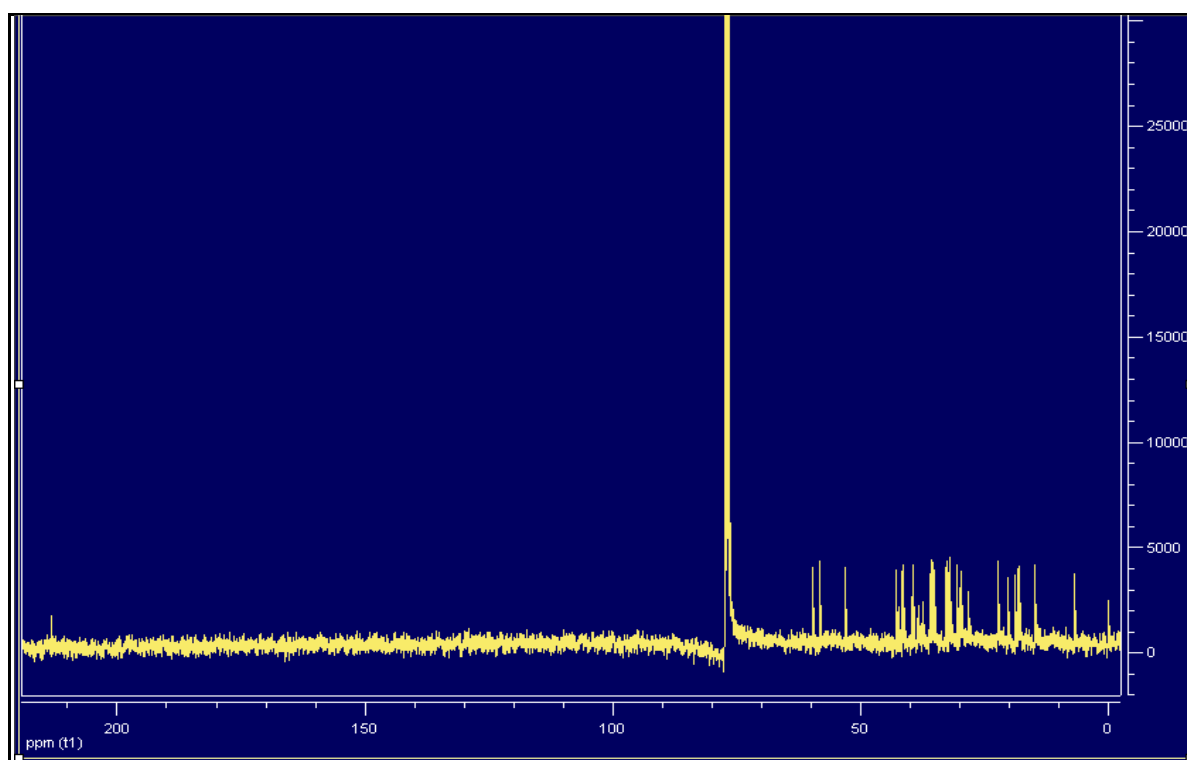
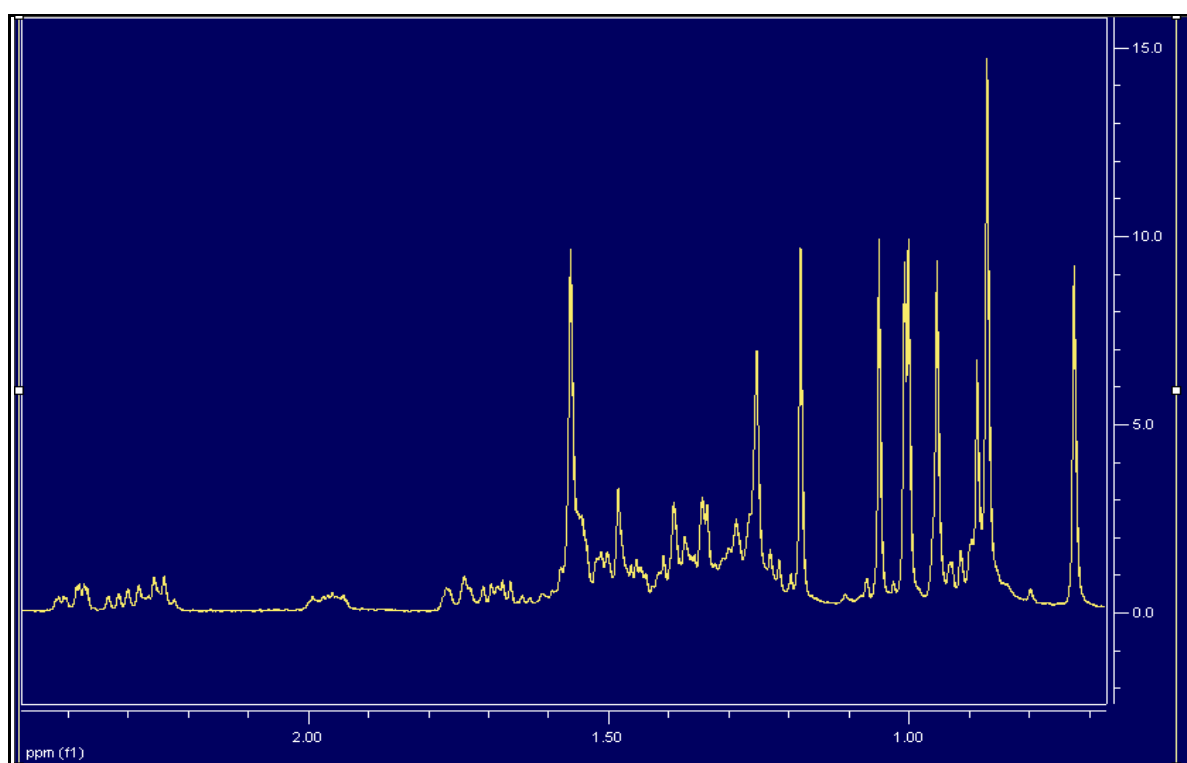


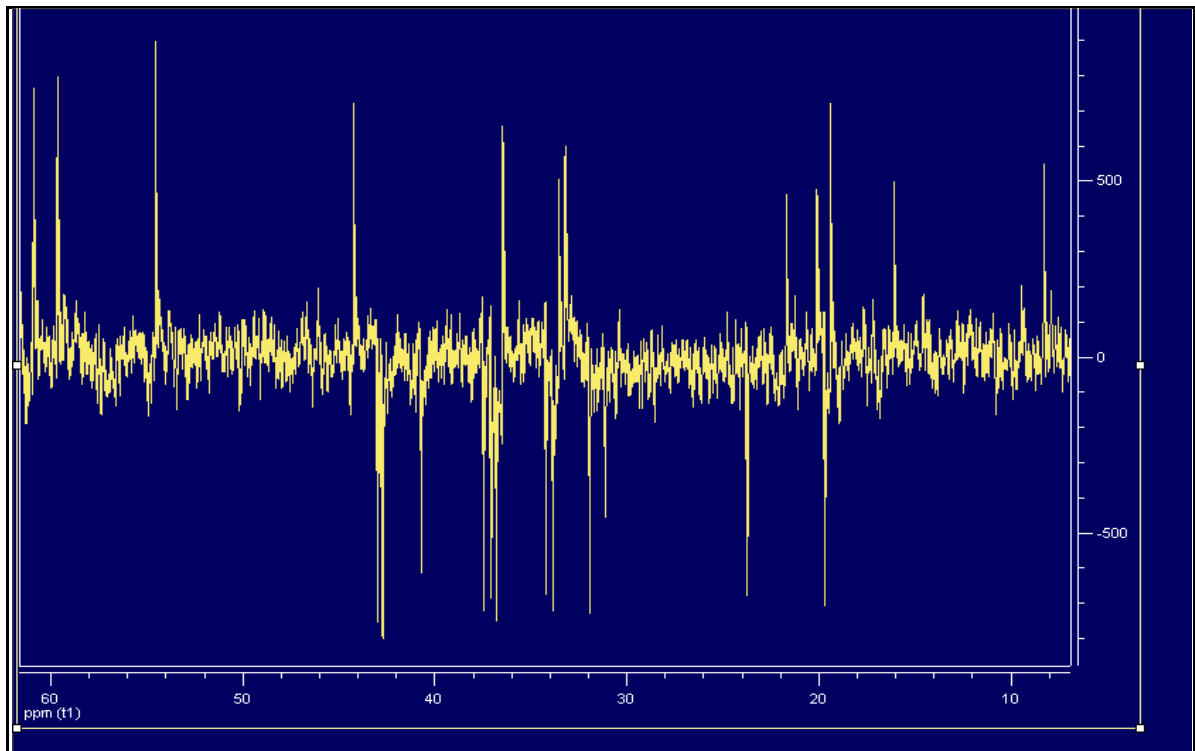


- ❖ Não foi possível a identificação por técnicas de RMN das subfrações obtidas através da *Coluna Sephadex LH-20*.

ANEXO D

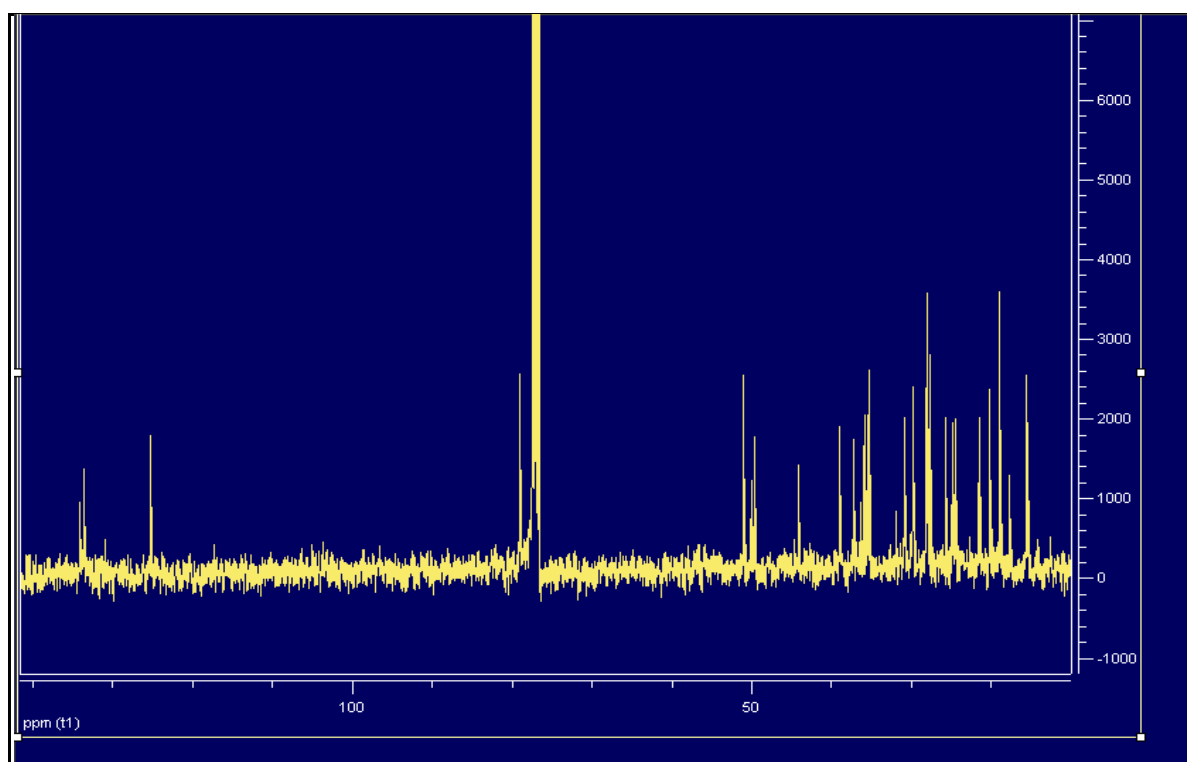
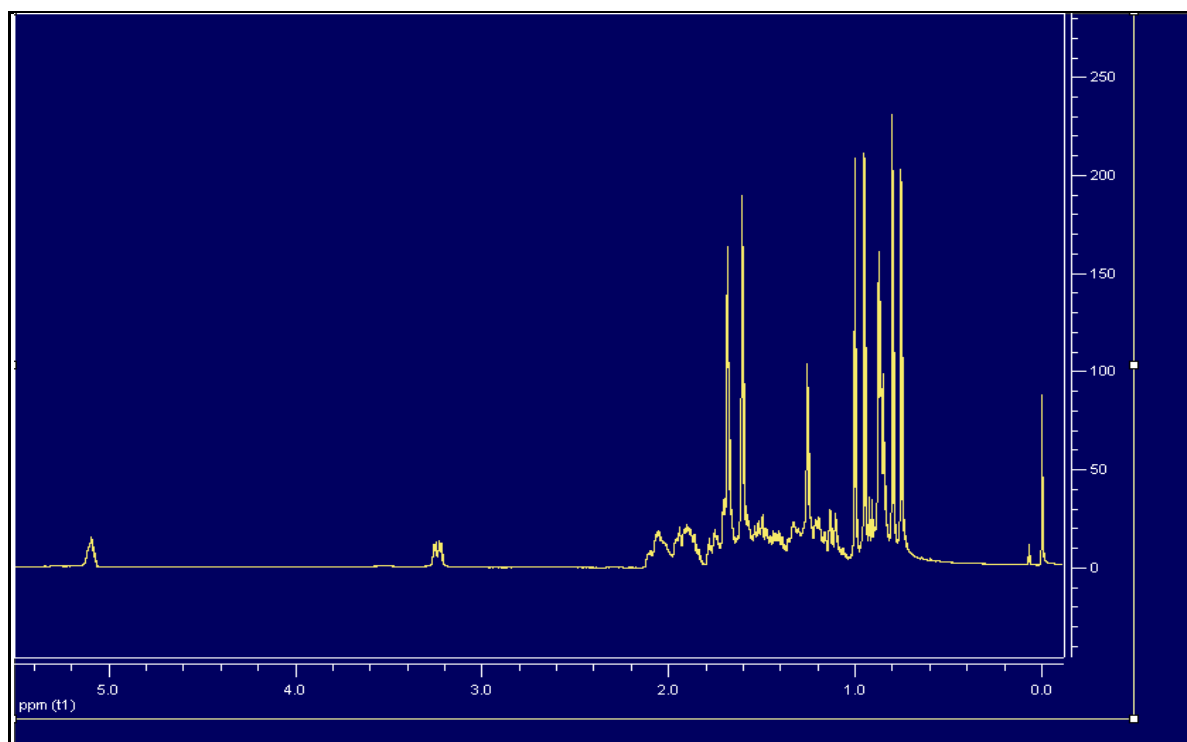
Espectro de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° do Composto 1 – Friedelina em CDCl_3





ANEXO E

Espectro de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° do Composto 2 – Eufol em CDCl_3



ANEXO F

Espectro de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° do Composto 3 – 3 β -Friedelinol em CDCl_3

