



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

Jéssica de Andrade Gomes Silva

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE FOLHAS DO
Croton heliotropiifolius Kunth (EUPHORBIACEAE)**

Recife

2017

Jéssica de Andrade Gomes Silva

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE FOLHAS DO
Croton heliotropiifolius Kunth (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfotecnologia.

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite**

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Jéssica de Andrade Gomes

Investigação fitoquímica e biológica de folhas do *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) / Jéssica de Andrade Gomes Silva - Recife: O Autor, 2017.

76 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sônia Pereira Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Morfotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Química vegetal 2. Euphorbiaceae 3. Antioxidantes I. Leite, Sônia Pereira (orient.) II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-371

JÉSSICA DE ANDRADE GOMES SILVA

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE FOLHAS DO
Croton heliotropiifolius Kunth (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 20/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite (Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza (Interna)

Prof.^a Dr.^a Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório (Externa)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof.^a Dr.^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Larrazábal

VICE-DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães

Recife

2017



pósMorfotec

Programa de Pós-Graduação
em Morfotecnologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

VICE-COORDENADOR

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

CORPO DOCENTE

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Prof.^a Dr.^a Cláudia Sampaio de Andrade
Lima

Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues

Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcante da Silva

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso
Vieira

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros

Prof.^a Dr.^a Kenia Valenca Correia

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de
Seixas Maia

Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva

Prof.^a Dr.^a Paloma Lys de Medeiros

Prof. Dr. Ricardo Yara

Prof.^a Dr.^a Rosa Valeria da Silva
Amorim

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

Recife

2017

Até aqui nos ajudou o Senhor.

I Samuel 7,12.

Aos meus pais Alda Maria e José Maria,
minha irmã Maria Irene e meu primo
Florisvaldo José Gomes Coelho (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Alda Maria e José Maria, pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Maria Irene, pelo apoio constante e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sônia Pereira Leite, pela oportunidade, sábios conselhos, por me proporcionar o início da vivência acadêmica como monitora, além da amizade, incentivos, ensinamentos e por ter me mostrado que com força de vontade e sacrifício podemos alcançar nossos objetivos.

Aos meus companheiros de laboratório Izabela Rangel, Tainá Santos, Marcos Aurélio e Daniel Francisco pela colaboração no trabalho, apoio, conselhos e por serem pessoas tão generosas que sempre estiveram dispostas a me ajudar.

Ao Laboratório de Biofísica Química da UFPE, ao Departamento de Antibióticos da UFPE, ao Centro Universitário Tabosa de Almeida ASCES – UNITA e ao Instituto Nacional do Semiárido - INSA pelo apoio e disponibilidade dos equipamentos de seus laboratórios.

A amiga Amanda Santana e sua família por ajudar na coleta do material botânico.

A primeira turma de Morfotecnologia da UFPE, que com tanto companheirismo fez o curso mais leve e divertido.

Aos meus amigos Emerson Xavier, Erivaldo Alves, Maria Eduarda e Gibbelly Cavalcante do grupo “chegados”, com quem compartilhei mais do que a vida acadêmica.

As minhas queridas amigas Sanny Torres, Daniele Monteiro e Ionara Nobrega que se tornaram irmãs de vida.

As amigas Cibely Tenório, Ivanilde Cavalcanti, Laís Gomes e Priscila Oliveira, com quem partilho a amizade desde a graduação.

As minhas amigas Raquel Macêdo, Kalyne Pereira e minha afilhada Heloísa, que por vezes distante, sempre se fizeram presentes.

Ao amigo José Adalberto, por sempre estar dispostos a me ajudar em qualquer situação.

Aos meus avós, que mesmo não estando presentes fisicamente, são de fato, os verdadeiros motivadores de todas as minhas conquistas.

A todas as pessoas que colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

Croton heliotropiifolius Kunth constitui uma espécie endêmica do Nordeste Brasileiro. É popularmente conhecida por suas propriedades medicinais de alívio da dor de estômago, na disenteria e antitérmico. O presente trabalho avaliou o estudo fitoquímico e biológico do extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius*. Investigações fitoquímicas foram realizadas por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria de UV-visível e espectroscopia de Infravermelho por Transformação de Fourier (FT-IR). Para as atividades biológicas, foram empregados os métodos de difusão em ágar na avaliação antimicrobiana, o método de sequestro de radicais livres usando o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) para a atividade antioxidante e as atividades citotóxicas foram analisadas através do método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio em linhagens tumorais e para a investigação da capacidade citotóxica contra eritrócitos, foi realizado o ensaio hemolítico *in vitro* de fragilidade osmótica, seguido de análise morfológica dos eritrócitos. Análises fitoquímicas do extrato por cromatografia em camada delgada e líquida de alta eficiência identificaram a presença de compostos fenólicos: flavonoides (ácido gálico) e taninos hidrolisáveis. Foi demonstrada a ausência de alcaloides, cumarinas e saponinas. Bem como, no espectro de UV-visível e de infravermelho do extrato, que demonstram bandas de absorção em 268, 316, 406 nm e 1661 cm⁻¹, respectivamente; o que validou os achados cromatográficos. Nos ensaios biológicos, a avaliação antimicrobiana contra cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) e *Candida albicans* (ATCC-76645) mostrou resistência ao extrato. Na atividade antioxidante foram demonstrados valores de 10,67%, 13,92%, 20,31 % com nível de significância de $p < 0,001$. A atividade citotóxica mostrou baixo percentual de inibição celular para as linhagens tumorais NCI-H292, MCF-7, Hep-2 e moderado para HL-60. A investigação da capacidade citotóxica contra eritrócitos apresentou baixa atividade hemolítica, tendo a maior concentração (1000 µg/mL) exibido percentual de 2,95% e significância de $p < 0,001$. A morfologia dos eritrócitos manteve-se preservada. Deste modo, a espécie *C. heliotropiifolius* demonstrou baixo nível de citotoxicidade, capacidade antioxidante e presença de compostos fenólicos, o que possibilita o isolamento do ácido gálico em estudos futuros.

Palavras-chave: Fitoquímica. Antimicrobiano. Antioxidante. Citotoxicidade. Fragilidade Osmótica.

ABSTRACT

Croton heliotropiifolius Kunth is an endemic species of the Brazilian Northeast. It is popularly known for its medicinal properties of relief of stomach pain, dysentery and antipyretic. The present work evaluated the phytochemical and biological study of the methanolic extract of leaves of *C. heliotropiifolius*. Phytochemical investigations were performed by thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, UV-visible spectrophotometry and Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. For the biological activities, agar diffusion methods were used in the antimicrobial evaluation, the free radical sequestration method using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) for the antioxidant activity and the cytotoxic activities were analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in tumor cell lines and for the investigation of cytotoxic capacity against erythrocytes, the in vitro hemolytic assay of osmotic fragility, followed by a morphological analysis of the erythrocytes. Phytochemical analyzes of the extract by high efficiency liquid and thin layer chromatography identified the presence of phenolic compounds: flavonoids (gallic acid) and hydrolyzable tannins. The absence of alkaloids, coumarins and saponins was demonstrated. As in the UV-visible and infrared spectra of the extract, which show absorption bands at 268, 316, 406 nm and 1661 cm^{-1} , respectively. Which validated the chromatographic findings. In the biological assays, antimicrobial evaluation against strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) and *Candida albicans* (ATCC-76645) showed resistance to the extract. In the antioxidant activity, values of 10.67%, 13.92%, 20.31% were demonstrated, with a significance level of $p < 0.001$. Cytotoxic activity showed a low percentage of cell inhibition for the NCI-H292, MCF-7, Hep-2 and moderate to HL-60 tumor lines. Investigation of the cytotoxic capacity against erythrocytes showed low hemolytic activity, with the highest concentration ($1000\text{ }\mu\text{g / mL}$) presented a percentage of 2.95% and significance of $p < 0.001$. The erythrocyte morphology remained preserved. In this way, the *C. heliotropiifolius* species showed low levels of cytotoxicity, antioxidant capacity and the presence of phenolic compounds, which makes it possible to isolate gallic acid in future studies.

Keywords: Phytochemistry. Antimycobian. Antioxidant. Cytotoxicity. Osmotic Fragility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth. Fonte: Jéssica de Andrade Gomes Silva, 2014. 22
- Figura 2.** Mapa do Município de Garanhuns (Latitude: -8.89074, Longitude: -36.4966 8° 53' 27" Sul, 36° 29' 48" Oeste) – Pernambuco, Brasil. Fonte: Google Maps: <https://www.google.com.br/maps/@-8.8882844,-36.4810708,6256m/data=!3m1!1e3>. Criado em: 03/07/2017. 33
- Figura 3.** Cromatograma do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius* e identificação de ácido gálico. 40
- Figura 4.** Espectro de Uv- visível do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius* 40
- Figura 5.** Espectro de Infravermelho (FT-IR) do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius* 41
- Figura 6.** Curva dose-resposta com o percentual hemolítico dos eritrócitos submetidos ao extrato de *C. heliotropiifolius*. 42
- Figura 7.** Fotomicrografia dos eritrócitos tratados com o extrato metanólico de *C. heliotropiifolius* 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização Química do extrato de <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	34
Tabela 2.	Pesos e Rendimentos dos extratos metanólicos da espécie <i>C. heliotropiifolius</i>	39
Tabela 3.	Classes de metabólitos secundários identificados no extrato metanólico de folhas de <i>Croton heliotropiifolius</i> .	39
Tabela 4.	Resultados da atividade antioxidante dos extratos metanólicos das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> utilizando o radical DPPH	42
Tabela 5.	Percentual de atividade inibitória do extrato de <i>C. heliotropiifolius</i> nas células HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292.	42

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Letra grega alfa
β	Letra grega beta
δ	Letra grega delta
p	Posição química para
M	Molar
μM	Micromolar
h	Hora
%	Por cento
”	Aspas
<	Menor que
=	Sinal de igual
$\pm$	Mais ou menos
°	Grau
cm	Centímetro
mm	Milímetro
g	Grama
mg	Miligrama
μg	Micrograma
nm	Nanômetro
μL	Microlitro
mL	Mililitro

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ASCES	Associação Caruaruense de Ensino Superior
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATTCC	Coleção de microorganismos Norte americana
BHI	Meio Brain Heart Infusion
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida e de alta eficiência
DMEM	Meio Dulbecco MEM
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FBS	Soro fetal bovino
FT-IR	Infravermelho por Transformação de Fourier
Hep-2	Carcinoma de laringe humana
HL-60	Leucemia promielocítica aguda
INSA	Instituto Nacional do Semiárido
IPA	Instituto Agrônomo de Pesquisa
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humana
MS	Espectrometria de massas
MTT	Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2- il)-2,5- difeniltetrazólio
NCI-H292	carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
NEU	Ácido etilborilaminoéster
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV-Vis	Espectrometria na Região de Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Considerações Botânicas	20
2.1.1	Família <i>Euphorbiaceae</i>	20
2.1.2	Gênero <i>Croton</i>	20
2.1.3	Considerações gerais sobre <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.....	21
2.2	Fitoquímica	24
2.2.1	Investigação Fitoquímica.....	24
2.2.2	Compostos Fenólicos.....	25
2.3	Atividades Biológicas	27
2.3.1	Atividade Antimicrobiana	27
2.3.2	Atividade Antioxidante	27
2.3.3	Atividade Citotóxica	29
2.3.4	Fragilidade Osmótica	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Material vegetal	33
4.2	Obtenção do extrato metanólico	33
4.3	Caracterização Fitoquímica	33
4.3.1	Análise por cromatografia em camada delgada.....	34
4.3.2	Identificação de saponinas.....	34
4.3.3	Pesquisa de taninos	35
4.3.4	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	35
4.3.5	Espectrometria de UV-visível.....	35
4.3.6	Espectroscopia de infravermelho por transformação de fourrier (FT-IR).....	35
4.4	Atividades Biológicas	36
4.4.1	Atividade Antimicrobiana.....	36
4.4.2	Atividade Antioxidante	36
4.4.3	Atividade Citotóxica.....	37
4.4.4	Ensaio de Fragilidade Osmótica.....	38
4.4.5	Análises Estatísticas	38

5	RESULTADOS.....	39
5.1	Caracterização Fitoquímica	39
5.1.1	<i>Rendimento do extrato metanólico</i>	39
5.1.2	<i>Análise fitoquímica.....</i>	39
5.2	Atividades Biológicas	41
5.2.1	<i>Avaliação Antimicrobiana.....</i>	41
5.2.2	<i>Atividade Antioxidante</i>	41
5.2.3	<i>Atividade Citotóxica em Linhagens Tumorais</i>	42
5.2.4	<i>Avaliação Citotóxica de Fragilidade Osmótica</i>	42
6	DISCUSSÃO.....	44
6.1	<i>Caracterização Fitoquímica.....</i>	44
6.2	<i>Atividades Biológicas</i>	45
7	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A	62
	ANEXO B.....	63

1 INTRODUÇÃO

O poder medicinal das plantas é tão primitivo quanto à origem da espécie humana. As primeiras civilizações evidenciaram em algumas espécies vegetais, substâncias ativas que possuíam poder curativo, o que permitiu demonstrar empiricamente seu potencial farmacológico (BADKE et al., 2011).

O uso tradicional das ervas constituiu, por muito tempo, o principal auxílio medicinal empregado nos tratamentos de saúde. Entretanto, o aperfeiçoamento tecnológico da ciência ocasionou o surgimento de novos protocolos farmacológicos, dando lugar aos medicamentos industrializados. Estes tratamentos ganharam o gosto e a confiança da população moderna, o que enfraqueceu o uso medicinal das plantas (BADKE et al., 2011).

De modo geral, os benefícios proporcionados pelo uso medicinal das espécies vegetais são esperançosos para a saúde, contanto que haja conhecimento prévio das utilidades, vantagens e riscos. Desta forma, os profissionais da saúde devem estar atentos ao seu uso tradicional, tendo em vista os valores culturais e de estilo de vida das comunidades submetida aos tratamentos (ISERHARD et al., 2009).

Mudanças socioeconômicas mundiais inspiram os modelos de saúde e ocasionaram, no decorrer dos anos, o resgate do uso terapêutico dos recursos naturais que havia sido esquecido, fazendo com que as plantas retomem espaço e competitividade com os medicamentos convencionais (ALVIM et al., 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde destinou 6,7 milhões no ano de 2012, ao projeto “Arranjos Produtivos Locais de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no SUS”, com o objetivo de investir na aquisição de equipamentos e materiais, contratação de profissionais e qualificação técnica para promover a interação e a colaboração entre os agentes produtivos, a produção e a distribuição de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

Deste modo, estudos fitoquímicos e etnofarmacológicos são cada vez mais importantes para ampliar os conhecimentos do uso popular de extratos naturais, comprovar cientificamente as atividades de seus componentes, além de ajudar na busca de princípios ativos contra diversas enfermidades (GONÇALVES et al., 2017). Tais estudos são favorecidos pela disponibilidade de matéria prima, diversidade de compostos químicos, baixo custo, e seus resultados, muitas vezes superam os fármacos já existentes. Como por exemplo, muitos vegetais tem amplo espectro de atividade

antimicrobiana (ALMEIDA; SCHEFFER, 2012).

O potencial de alguns extratos de plantas em retardar ou inibir a oxidação de moléculas através da supressão de reações de oxidação em cadeia, confere efeito protetor que torna a sua utilização uma alternativa na medicina complementar (MAHBOUBI et al, 2013), pois o estresse oxidativo crônico é responsável por muitas doenças degenerativas, tais como: asma, doenças gastrointestinais, doenças cardíacas, doenças autoimunes e Alzheimer (LUSHCHAK, 2014; SIES, 2015).

Diante de todo esse potencial, uma medida prioritária é a determinação da capacidade tóxica de um produto vegetal, uma vez que vários compostos podem ser capazes de causar efeitos nocivos. Portanto, é recomendado que novos extratos ou extratos de ação ainda desconhecida sejam analisados quanto ao comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo. As vantagens dessas metodologias são, além do controle ambiental das células, a facilidade de execução e a rapidez (FRESHNEY, 2000).

Investigações que visem analisar o desempenho de compostos vegetais na homeostase celular, avaliam a capacidade de substâncias provocarem efeitos a nível de membrana, o que pode ocasionar dano celular (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008). Análises citotóxicas utilizando componentes hematológicos, células necessárias para a manutenção hemodinâmica, demonstraram que diversas plantas são capazes de causar perturbações osmóticas e alterações morfológicas em eritrócitos (MAIWORM ET AL., 2008).

A região Nordeste do Brasil comporta uma rica diversidade de uso de plantas com a finalidade medicinal, o que pode ser explicado por sua flora e pela interação de diferentes culturas (ALBULQUERQUE et al., 2010). A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro” devido aos seus minúsculos pelos, é endêmica no Nordeste Brasileiro e pode ser encontrada com frequência na vegetação da Caatinga, brejos, restingas e cerrado (RANDAU, 2001). Estudos voltados para o *C. heliotropiifolius* constatarem a presença predominante de alcalóides, polifenóis e compostos redutores, sendo referido pela população como útil no alívio da dor de estômago, na disenteria e antitérmico (RANDAU, 2001).

Assim, visando à importância de análises fitoquímicas e biológicas de plantas para a sua aplicação medicinal, este trabalho propôs-se a caracterizar fitoquimicamente

o extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* e avaliar seu potencial antimicrobiano, antioxidante e citotóxico contra linhagens tumorais e eritrócitos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Botânicas

2.1.1 Família *Euphorbiaceae*

A família *Euphorbiaceae* constitui um grupo muito diversificado encontrado principalmente nos trópicos e em regiões temperadas. Possui ao todo cerca de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros, 49 tribos e cinco subfamílias (WEBSTER, 1994). Pertence à ordem Malpighiales, devido à escassez de informações em vários aspectos, tais como a composição e morfologia dos táxons e ainda no que se refere a sua de distribuição geográfica, filogenia e conhecimentos moleculares constitui uma das ordens mais complexas (JUDD et al., 2009).

Na flora brasileira é uma das mais ricas e diversificadas famílias, com 63 gêneros e 921 espécies em todos os tipos de vegetação (CORDEIRO, 2010). Esta família apresenta representantes de destaque econômico, como por exemplo, *Hevea brasiliensis*, conhecida como árvore da borracha pela produção do látex. Também pertence à família a mamona, *Ricinus communis*, nativa da África e constitui uma fonte de fibras vegetais, óleo de rícino e diversos compostos químicos usados na medicina, além de óleo lubrificante para ônibus espaciais e foguetes (ANGÉLICO, 2011).

Outo importante representante desta família, a *Manihot esculenta*, popularmente conhecida como mandioca, constitui a base da alimentação no nordeste brasileiro através do consumo direto e da extração da farinha de mandioca, que é consumida em larga escala em todo o Brasil e também em muitos países Africanos (ANGÉLICO, 2011).

2.1.2 Gênero *Croton*

Croton é o gênero da família *Euphorbiaceae* que compreende cerca de 1300 espécies espalhadas por regiões tropicais do mundo. Várias destas espécies têm desempenhado um papel importante no uso tradicional de plantas medicinais na África, Ásia e na América do Sul (SALATINO et al., 2007). No Brasil constitui o gênero com maior número de representantes da família, com total de 350 espécies, distribuídas em 29 secções (BERRY et al., 2005). Na região Nordeste estima-se um total de 52 espécies distribuídas em 18 secções (CORDEIRO E CARNEIRO TORRES, 2006).

Linnaeus em 1753 descreveu 13 espécies de *Croton* da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Depois dessa descrição, o gênero passou a receber atenção de muitos estudiosos (e.g., Baillon 1858; Mueller 1865, 1866, 1873; Benth

1880), dos quais, destaca-se Webster (1992, 1993, 1994, 2001), que propôs a classificação infragenérica mais recente para o gênero (SILVA; SALES & CARNEIRO-TORRES, 2009).

Croton advém do grego *crston* que significa “carrapato” (*Ixodes ricinus* L.) uma alusão devido à semelhança das sementes de seus representantes com o inseto (BENIGNI, 1968). Os diversos membros do gênero *Croton* demonstram ação de alívio da dor e outras atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antiulcerogênica e anti-hipertensiva.

O gênero *Croton* possui um papel funcionalmente importante dentro do ecossistema terrestre, pois muitas de suas espécies são responsáveis por colonizar áreas desmatadas como matas, beira de estradas e margem de rios, isso se deve principalmente a produção de flores e frutos durante a maior parte do ano, possibilitando a restauração de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008).

Geograficamente o gênero possui uma significativa representação no nordeste do Brasil. Em Pernambuco já foram demonstradas aproximadamente 35 espécies. Cerca de 50 municípios foram registrados com a ocorrência do gênero. As espécies de maior incidência foram: *C. argyrophylloides* Muell. Arg.; *C. campestres* (St. Hil.) Muell Arg.; *C. floribundus* Spreng.; *C. glandulosus* L.; *C. grewoides* Baill.; *C. hirtus* L’ Herit; *C. lobatus* L.; *C. micans* (Swartz emend) Muell. Arg.; *C. moritibensis* Baill.; *C. regnellianus* Muell. Arg.; *C. heliotropiifolius* Kunth.; *C. sellowii* Baill.; *C. sonderianus* Muell. Arg. e *C. zenhtneri* Pax & Hoffm. Evidenciando assim, a larga distribuição do gênero em todo o estado e uma maior incidência próxima ao litoral e na zona da mata. (RANDAU et al., 2004).

2.1.3 Considerações gerais sobre *Croton heliotropiifolius* Kunth

A espécie *C. heliotropiifolius* possui ampla distribuição na região Neotropical, podendo ser encontrada desde o Panamá até o Brasil (GOVAERTS et al. 2000). Em território brasileiro estende-se do estado de Minas Gerais até a região Nordeste (LUCENA, 2000), ocorrendo predominantemente na vegetação da Caatinga, brejos, restinga e cerrado (RANDAU et al., 2004).

No noroeste do estado da Bahia, as chamadas dunas do Médio São Francisco constituem um corredor de terreno arenoso sobre o qual se desenvolve a vegetação da Caatinga, onde foram evidenciadas espécies da família Euphorbiaceae, bem como o *C. heliotropiifolius* (SÁTIRO et al., 2008). Em Pernambuco, a espécie pode ser encontrada

em terrenos baldios, áreas de brejos de altitudes, mata atlântica, zona da Mata e Caatinga (SILVA et al., 2010). Também foi descrita a presença da espécie nos estados do Rio grande do norte (ROQUE et al., 2010), Paraíba (TOLKE et al., 2011) e Goiás (SODRÉ et al., 2014).

O *C. heliotropiifolius* apresenta-se como subarbusto ou arbusto com até dois metros de altura, provido de látex incolor, creme a avermelhado. Ramos cilíndrico, verde a acinzentados. Estípulas pequenas (1 mm), lanceoladas. As folhas são alternas e ligeiramente subopostas no ápice, sésseis a pecioladas e esverdeadas; o limbo de consistência membranácea ou cartácea possui formato ovóide, com ápice agudo, base reentrante, bordo serrilhado, piloso em ambas as faces, penínérveo, com a nervura principal saliente na face dorsal; a inserção do pecíolo é do tipo marginal, sendo levemente biconvexo em seção transversal. As flores estão dispostas em inflorescências terminais, racemiformes, congestas. O fruto é uma cápsula oblonga a subglobosa. Sementes elípticas a oblongas, com tegumento castanho a preto. (RANDAU et al., 2004; SODRÉ et al., 2014).

A espécie possui tricomas estrelado-porrectos adensados nas estruturas vegetativas e reprodutivas, dando um aspecto tomentoso. Geralmente não apresenta nectários no pecíolo ou quando presente, estes são inconspícuos, globosos e muitas vezes encobertos pelos tricomas (SÁTIRO et al., 2008; SODRÉ et al., 2014).



Figura 1. Espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth (Fonte: Jéssica de Andrde Gomes Silva, 2014)

O emprego da espécie na medicina popular segue as potencialidades atribuídas ao gênero que faz parte, onde de um modo geral, as espécies pertencentes ao gênero são

frequentemente utilizadas na forma de infusões ou chás para o alívio da dor (ABREU et al., 2001), disfunções intestinais, no tratamento de diarreias, desordens digestivas, na cura de feridas, no tratamento das infecções (SALATINO et al., 2007). Também tem sido referida no tratamento de problemas comuns de saúde, como gripes, inflamações, dermatites e cistos (SARAIVA et al., 2015).

O extrato do *C. heliotropifolius* associado aos extratos de *Trichilia catiguá* e *Paullinia cupana Kunth*, compõe a formulação mais recente da Catuama, medicamento psicoanaléptico ou estimulante, registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária como um fitoterápico e comercializado pelo Laboratório Catarinense na forma de cápsulas ou como solução oral (LONGHINI et al., 2016).

O perfil fitoquímico do *C. heliotropifolius* demonstra as principais classes de compostos presentes em espécies do gênero *Croton* e da família Euphorbiaceae. Polifenóis como cumarinas mostraram-se ausentes na espécie e são substâncias raras na família Euphorbiaceae e no gênero *Croton*, existindo apenas a constatação de escopoletina no *C. sonderianus* (CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982). A ausência de saponinas evidenciada no *C. heliotropifolius* também é relatada no *C. linearifolius* (SILVA et al., 2014).

Investigações da composição química do óleo essencial extraído das folhas de *C. heliotropifolius* exibiu α -pineno, sabineno, linalol, acetato de bornila, β -cariofileno, germacreno D, δ -cadineno, α -humuleno, biciclogermacreno, espatulenol e o eucaliptol como majoritário. Já no talo dessa espécie foi verificado a presença de *p*-cimeno, α -pineno, eucaliptol, linalol, β -cariofileno e germacreno D semelhantes aos identificados nas folhas (SILVA, 2008; ANGÉLICO et al., 2012).

O óleo essencial de *C. heliotropifolius* apresentou efeito larvicida relevante contra o *Aedes aegypti* o que pode representar uma contribuição para métodos alternativos de controle do mosquito (DÓRIA et al., 2010).

O potencial antifúngico contra *Candida albicans* e a atividade inibidora da Acetilcolinesterase apresentada pelo extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropifolius* foi descrito por Queiroz et al. (2014) e em seu estudo, houve a identificação do alcaloide taspine, composto retratado como um forte inibidor da Acetilcolinesterase (ROLLINGER et al., 2006). A identificação de compostos inibidores da Acetilcolinesterase pode explicar a atividade inseticida observada no óleo essencial desta planta (MAGALHÃES et al., 2015).

Magalhães et al. (2015) em seu estudo também relatou a capacidade repelente

do óleo essencial contra *Tribolium castaneum*, esta capacidade constitui uma propriedade importante para o controle de pragas, pois quanto maior a repelência, menor será a infestação (COITINHO et al., 2006).

O potencial antimicrobiano do *C. heliotropiifolius* contra cepas de *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* foi descrito por Alencar Filho et al. (2017) e pode justificar o uso popular da espécie para tratar distúrbios do trato gastrointestinal.

2.2 Fitoquímica

2.2.1 Investigação Fitoquímica

A fitoquímica é a área de conhecimento responsável por caracterizar estruturalmente, avaliar as propriedades e investigar a biossíntese de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos (RODRIGUES et al., 2010). Os metabólitos secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação organismo e ambiente, na maioria das vezes apresentam atividades biológicas, sendo, muitos destes compostos de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (HAIDA et al, 2007).

Investigações fitoquímicas abrangem o recolhimento e classificação botânica da espécie em estudo, a extração, separação, purificação e determinação estrutural de constituintes químicos isolados (BESSA et al., 2007). Dedicando-se a desvendar os metabólitos secundários de espécies quimicamente desconhecidas, o que torna as técnicas de elucidação estrutural de compostos cada vez mais importantes e fundamentais para a compreensão das propriedades farmacológicas (STURM; SEGER, 2012).

Ensaios fitoquímicos têm sido utilizados em muitos trabalhos (IHA et al., 2008; ESTEVAM et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010; MULLER et al., 2013) com o objetivo de demonstrar e registrar os constituintes resultantes do metabolismo secundário de plantas. Para obtenção dessas informações são empregadas metodologias como separações cromatográficas, que são capazes de determinar a concentração dos compostos presentes, fazendo com que haja segurança e confiabilidade nos resultados (OBRADOVIC et al., 2007).

Técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida e de alta eficiência (CLAE) têm sido largamente

utilizadas tanto para o estudo fitoquímico, quanto na química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, visto que proporcionam vantagens como a alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004).

Outras técnicas que ajudam a identificar e a elucidar estruturas de substâncias orgânicas são a espectrometria de Uv-visível e a espectroscopia na região do infravermelho, que corresponde à região situada entre o visível e o micro-ondas, sendo 4000 a 400 cm^{-1} a região mais utilizada para compostos químicos orgânicos (MCMURRY, 2010; MORAIS et al., 2013). Estas técnicas possibilitam a determinação das estruturas de moléculas complexas de maneira rápida, usando pouca quantidade de amostra e não possuem o poder destrutivo (VESSECCHI et al., 2008; MCMURRY, 2010).

Usualmente, as metodologias utilizadas para a análise de compostos são empregadas em diversas áreas da ciência, principalmente na química, biologia e farmácia, pois auxiliam na identificação da constituição química de substâncias. Em alguns casos ela fornece a fórmula molecular, permite também a identificação de certos grupos funcionais e muitas vezes a determinação de partes estruturais (VESSECCHI et al., 2008).

2.2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são constituídos estruturalmente por um ou mais anéis aromáticos que contém grupos hidróxidos (TARAHOVSKY et al., 2014) e são sintetizados principalmente a partir da combinação de ácido chiquímico (ácido 3,4,5-trihidroxi-benzóico) e acetato ou derivados deste (OOTANI et al., 2013).

Os flavonoides são compostos polifenólicos que possuem em sua estrutura dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de três átomos de carbono (SIMÕES et al., 2004) e sua classificação é fundamentada em diferenças na estrutura dos três átomos de carbono que ligam os anéis aromáticos. As características desta cadeia estão relacionadas com a presença ou ausência da ligação dupla, a escolha de uma porção carbonila ou carboxila e a possibilidade de formação de um anel penta ou hexagonal (TARAHOVSKY et al., 2014). As modificações nas cadeias de três carbonos resultam em uma enorme diversidade de flavonoides, dentre os quais, destacam-se os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, os flavanóis (ou catequinas), as antocianidinas e as isoflavonas (MORTON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2010).

A diversidade estrutural dos flavonoides permite que desempenhem diversas funções biológicas, tais como, auxiliar no processo de polimerização, no envio de sinais moleculares para a interação de plantas com microrganismos, na eliminação de radicais livres, como anticancerígeno e anti-inflamatório, além de, estarem envolvidos nas respostas a perturbações bióticas e abióticas (SUHARTONO et al., 2012; LIU et al., 2013), sendo sua biossíntese mais intensa quando a planta está sob condições de grande estresse (AGATI et al., 2012).

O flavonoide ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um polifenol presente na castanha, chás, uvas, vinho tinto entre outros produtos naturais (MA et al., 2003) e pode ser obtido a partir da hidrólise ácida de taninos (LOCATELLI et al., 2013). Vários derivados do ácido gálico já foram sintetizados com o objetivo de melhorar suas características físico-químicas, apresentando diferença somente no número de carbonos da cadeia lateral, o que é capaz de alterar a sua lipofilicidade (LOCATELLI et al., 2013).

Vários estudos demonstram que o ácido gálico apresenta forte ação antioxidante (KIM et al., 2002), anti-inflamatória (KROES et al., 1992), antimutagênica (GICHNER et al., 1987) e antitumoral (LOCATELLI et al., 2013). Com relação à atividade antitumoral, o ácido gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando principalmente células tumorais e não as linhagens celulares normais (SERRANO et al., 1998; YOSHIOKA et al., 2000). Alguns derivados do ácido gálico têm demonstrado efeitos ainda mais potentes que o seu precursor, provavelmente por apresentarem uma maior permeabilidade às membranas plasmáticas (SAEKI et al., 2000).

Os taninos são compostos fenólicos de elevada massa molar, podem ser encontrados na maioria dos vegetais, tanto em espécies gimnospermas como angiospermas e despertam grande interesse ecológico e econômico (KHANBABAEI; REE, 2001; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; SEKOWSKI et al., 2014). São classificados de acordo com sua estrutura em taninos condensados e taninos hidrolisáveis (KOLECKAR et al., 2008; SEKOWSKI et al., 2014), os hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila e os taninos condensados ou proantocianidinas são formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol (catequina) e flavan 3,4-diol (leucoantocianinas), podendo conter de duas a cinquenta unidades de flavonoides (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Os taninos são responsáveis pela adstringência em sucos, chás, vinhos e outras bebidas. Nos vegetais, eles atuam na defesa química contra o ataque de herbívoros e contra microrganismos patogênicos (SIMÕES, 2004).

2.3 Atividades Biológicas

2.3.1 Atividade Antimicrobiana

O potencial antimicrobiano das plantas está associado à composição química de tais espécies. Frequentemente, este potencial é determinado por ensaios *in vitro* utilizando técnicas de difusão em ágar e diluições (macro e microdiluição) (ELOFF et al., 1998; AGRIPINO et al., 2004; LANGFIELD et al., 2004). Outro método de avaliação da capacidade antimicrobiana, a autobiografia, é capaz de determinar compostos bioativos de extratos de plantas a partir da inibição do crescimento de microrganismos através da detecção de anticorpos antimicrobianos (ALCERITO et al., 2002; AGRIPINO et al., 2004; SASIDHARAN et al., 2011).

As técnicas utilizadas para a avaliação da ação de compostos de plantas e a grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Também não existe um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

Em geral, a atividade antimicrobiana vem sendo relacionada a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e murleno, que também em sua forma pura exibem potencial antibacteriano e antifúngico. Apesar dos mecanismos de ação ainda não serem completamente elucidados, estes parecem estar associados ao caráter lipofílico dos compostos, ocasionando um acúmulo nas membranas e perda de energia pelas células.

Portanto, a identificação de novos compostos presentes nas plantas amplia os recursos terapêuticos, pois são capazes de promover a redução de possíveis efeitos adversos que algumas substâncias químicas sintéticas provocam, podem driblar a resistência aos fármacos antimicrobianos convencionais e minimizar os custos no desenvolvimento de medicamentos (ALVES et al, 2001).

2.3.2 Atividade Antioxidante

Radicais livres são constantemente produzidos pelo organismo humano através das atividades metabólicas normais, sendo definidos como moléculas ou átomos que

possuem elétrons de valência desemparelhados, tornando-os altamente reativos. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de antioxidantes, acarreta o estresse oxidativo, que é responsável por processos fisiopatológicos como inflamação, diabetes, aterosclerose, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, como o envelhecimento (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Compostos antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na indústria, porém existem evidências de que alguns desses compostos podem promover o desenvolvimento de células tumorais (BOTTERWECK et al., 2000). Estas evidências têm levado a uma busca crescente de similares naturais, como os extratos vegetais e óleos voláteis que, em geral, são constituídos por compostos terpênicos com importante atividade antioxidante (SACCHETTI et al., 2005).

Desse modo, o interesse pela pesquisa sobre novos antioxidantes naturais tem aumentado com os anos, levando as indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas a terem maior atenção em novas fontes, principalmente às de origem vegetal. Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (RAZAVI et al., 2008).

A eficiência antioxidante de compostos bioativos de origem vegetal depende tanto de sua estrutura quanto da sua concentração. Por sua vez, a concentração destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos. Considera-se ainda, que a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binômio tempo-temperatura (OLIVEIRA, 2009). Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras.

A diversidade de compostos, separação e estudo individual de cada substância antioxidante são praticamente inviáveis além de custosos. Assim, espera-se dos pesquisadores que venham a ter métodos rápidos para a determinação da eficiência dos antioxidantes. Entretanto, muitos métodos ainda precisam ser aperfeiçoados (HUANG et al., 2005).

O ensaio de atividade antioxidante usando a molécula do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) baseia-se na medida da capacidade de uma determinada substância em sequestrar o DPPH, radical livre estável em virtude da deslocação do elétron desemparelhado por toda a molécula, reduzindo-o à hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al, 2010).

Existem diversos ensaios que avaliam a atividade antioxidante, diferindo em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma com os resultados são expressos, não havendo um procedimento metodológico universal (OLIVEIRA, 2009).

2.3.3 Atividade Citotóxica

A toxicidade consiste na capacidade de substâncias influenciarem os mecanismos de quimiotaxia ou quimiorrepulsão em células, através da ação de agentes tóxicos como substâncias químicas ou células imunes, em um determinado meio extracelular (ALBERTS, 2004).

Há mais de 100 anos foram iniciados os primeiros experimentos de cultivo de células realizados na Universidade Johns Hopkins por Ross G. Harrison. Apesar do tempo transcorrido, seu foco de estudo permanece atual e em constante desenvolvimento nas diversas áreas biológicas. Em seu breve estudo no ano de 1907, Ross descreveu que quando se tomam as precauções assépticas adequadas, os tecidos sobrevivem nessas condições por uma semana e, em alguns casos, foram mantidos espécimes vivos durante aproximadamente quatro semanas. A partir desse momento, teve início à ciência da cultura de células *in vitro* (NANCY, 2003).

Diversos pesquisadores, ao longo dos anos, tem demonstrando à importância de análises citotóxicas. Segundo Spangberg (1978), testes *in vitro* servem para analisar a citotoxicidade prévia de determinado material e, de acordo com os achados sugerir ou não o seguimento do experimento *in vivo*. Schmalz (1994), em seu relato, afirma que os testes de citotoxicidade são valiosos para a compreensão do comportamento biológico das substâncias avaliadas, considerando as limitações destes testes durante a interpretação dos resultados, e que não irão substituir os testes *in vivo*, porém poderão diminuir substancialmente a quantidade de testes, diminuindo o número de materiais com aplicabilidade potencialmente clínica. Freshney, no ano 2000, declarou que devido

à dificuldade de monitorar os efeitos fisiológicos e sistêmicos, a maioria dos ensaios busca determinar os efeitos dos biomateriais ou drogas nas células, ou seja, a citotoxicidade, tendo através desses protocolos de análise, a determinação de morte celular ou se os danos causados às células ficaram resumidos às alterações metabólicas.

O ensaio de citotoxicidade usando o MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólico) é um teste laboratorial colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular. Também pode ser usado para a citotoxicidade de um potencial agente medicamentoso ou de outros materiais tóxicos (TANG et al., 2007). O sal MTT, de coloração amarela, é reduzido na mitocôndria das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (BHATIA et al., 2008).

De maneira geral, a citotoxicidade pode ser comparada entre diferentes biomateriais e substâncias. Os resultados das avaliações citotóxicas são extraídos do contato direto de células cultivadas e expostas ao meio de extração em teste. A viabilidade celular é expressa como uma percentagem de células vivas do material testado versus a percentagem de células do controle positivo de citotoxicidade (FRADE et al., 2001; CASTRO et al., 2004).

2.3.4 Fragilidade Osmótica

A ação de substâncias sintéticas ou naturais podem causar perturbações na membrana dos eritrócitos, acarretando alterações estruturais e/ou na sua permeabilidade. Por meio do estudo da fragilidade osmótica, pode-se avaliar o comportamento da membrana eritrocitária em diferentes soluções hipotônicas (PEREIRA, et al. 2007).

A membrana da hemácia é composta de ácidos graxos polinsaturados, o que a torna muito resistente ao ataque de radicais livres, que são capazes de ocasionar uma serie de alterações no eritrócito, como formação de lipoperóxidos, fragilidade de proteínas, redução da deformidade, mudanças na morfologia, ligação cruzada, alterações no metabolismo intracelular e hemólise (SADHU; WARE; GRISHAN, 1992; SANTOS et al., 1995; BEGUM; TERAQ, 2002).

A hemólise caracteriza-se pela lise dos eritrócitos, ocasionando a liberação de hemoglobina no plasma. Esta situação pode gerar danos, como nefrotoxicidade e efeito

vasomotor no coração. Processos hemolíticos liberam íons potássio no meio extracelular e seu rápido aumento pode levar a parada cardíaca e morte (CARVALHO et al., 2007).

A capacidade de resistência à hemólise pode ser detectada pelo teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE), que demonstra a capacidade anti- hemolítica, pelo fato dos eritrócitos resistirem à lise ao manterem sua integridade estrutural quando expostos ao estresse osmótico (ALDRICH, SAUNDERS, 2006; MOUSINHO et al., 2008), sendo a osmolaridade com que a célula sofre a lise relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos, tal como a relação entre volume/superfície do glóbulo (CAIRES, 2012).

Segundo Caires (2012), a FOE é um teste que apresenta como característica principal a diferença de tamanho e forma das hemácias. No entanto, o ensaio ainda é de difícil padronização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a composição fitoquímica e avaliar as atividades biológicas: antimicrobiana, antioxidante e citotóxica do extrato das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Extrair e identificar compostos presentes nas folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência;
- 3.2.2 Determinar o perfil espectrométrico de UV-visível e espectroscópico de infravermelho do extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth;
- 3.2.3 Investigar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;
- 3.2.4 Avaliar a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth;
- 3.2.5 Analisar a citotoxicidade *in vitro* do extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth frente a linhagens de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292), adenocarcinoma de mama humana (MCF-7), carcinoma de laringe humana (Hep-2) e leucemia promielocítica aguda (HL-60);
- 3.2.6 Avaliar o efeito citotóxico de fragilidade osmótica do extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth sob eritrócitos e observar sua morfologia.

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

As folhas (225 g) de *C. heliotropiifolius* (Euphorbiaceae) foram coletadas em julho de 2015 na área urbana do Município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil (Figura 2). A planta foi identificada pelo Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônômico de Pesquisa (IPA), onde uma exsicata foi depositada sob o número de catálogo 90440.

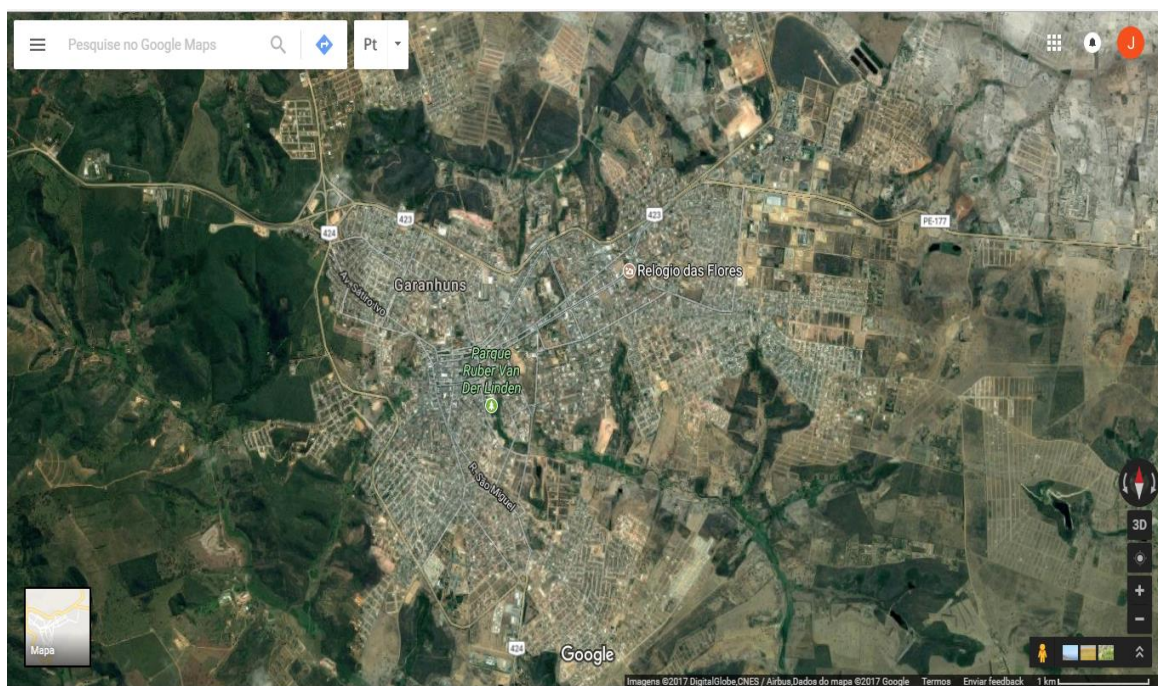


Figura 2. Mapa do Município de Garanhuns (Latitude: -8.89074, Longitude: -36.4966 8° 53' 27" Sul, 36° 29' 48" Oeste) – Pernambuco, Brasil. Fonte: Google Maps: <https://www.google.com.br/maps/@-8.8882844,-36.4810708,6256m/data=!3m1!1e3>. Criado em: 03/07/2017.

4.2 Obtenção do extrato metanólico

O extrato metanólico de *C. heliotropiifolius* foi preparado de acordo com o método descrito por Filho, Yunes (1998). As folhas (225 g) foram maceradas por 10 dias, em metanol (3000 mL) a temperatura ambiente e submetidas a agitações esporádicas. Depois deste período, a mistura foi filtrada e o filtrado resultante foi concentrado no rotaevaporador a vácuo BUCHI Switzerland, na temperatura de 60 °C.

4.3 Caracterização Fitoquímica

4.3.1 Análise por cromatografia em camada delgada

O extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* foi submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) para a verificação da presença de flavonoides, alcaloides e cumarinas. Foram utilizadas placas de gel sílica 60 F sobre base de alumínio, da marca Merck. Como fase móvel para flavonoides foi empregado Acetato de etila-Ácido fórmico-Ácido acético-água (AcOEt- HCOOH-AcOH-H₂O 100:11:11:27v/v), para cumarinas: Éter-tolueno-AcOH 10% (50:50:50v/v) e para alcaloides: Acetato de etila-Ácido fórmico-Ácido acético-água (AcOEt-HCOOH-AcOH- H₂O 100:11:11:27v/v). Após a migração cromatográfica, as placas foram borrifadas com reveladores e avaliadas sob luz UV (254nm a 365 nm). Os reveladores para flavonoides e alcaloides foram ácido etilborilaminoéster (NEU), Dragendorff, respectivamente. Para cumarinas, foi empregada a visualização por UV a 365 nm (Tabela 1).

Tabela 1. Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização Química do extrato de *Croton heliotropiifolius* Kunth

Grupo de Metabólicos	Fase Móvel	Revelador	Referência
Flavonóides	AcOEt- HCOOH- AcOH- H ₂ O (100:11:11:27v/v)	NEU	(WAGNER; BLADT, 1996)
Cumarinas	Éter-tolueno-AcOH 10% (50:50:50v/v)	U. V. (365 nm)	(WAGNER; BLADT, 1996)
Alcalóides	AcOEt-HCOOH- AcOH- H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Dragendorff	(WAGNER; BLADT, 1996) (MARKHAN, 1982)

4.3.2 Identificação de saponinas

Para a identificação de saponinas foi empregado o teste por agitação mecânica (SIMÕES et. al., 2004). O extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* (1 mg) foi diluído em água destilada (10 mL) e submetido a agitação mecânica. A formação de espuma persistente por 15 minutos foi considerada como pesquisa de saponinas positiva (DEWICK, 2002).

4.3.3 Pesquisa de taninos

A identificação de taninos seguiu a metodologia proposta por Matos (1997). Em tubo de ensaio contendo extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* (10 mg) hidratado (2 mL de água destilada) foram adicionadas 3 (cerca 60µL) gotas de cloreto férrico 0,5 M. Após agitação observou-se a possível variação da coloração e formação de precipitado azul, correspondente a taninos hidrolisáveis ou verde, correspondente a taninos condensados. Foi feita a comparação com um teste em branco, ou seja, usando água e cloreto férrico 0,5 M.

4.3.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência utilizou um sistema cromatográfico HPLC Waters (Autopurification System), onde o extrato metanólico de *C. heliotropiifolius* (5 mg) foi posto em coluna XBridge C18, com dimensões de 4,6 mm x 250 mm, tamanho de partícula de 5µm e com fluxo de 0,7mL/min. O sistema de solvente utilizado incluiu (A) 94% de H₂O e 6% de Acetonitrila em 0 min, (B) 65% de H₂O e 35% de Acetonitrila em 8 min, (C) 94% de H₂O e 6% de Acetonitrila em 9 min; volume de injeção: 40µL; e concentração da amostra: 20 mg / mL em metanol à 50%. Após a corrida cromatográfica o extrato foi submetido a amostras de referências contidas na biblioteca do equipamento.

4.3.5 Espectrometria de UV-visível

O espectro de UV-visível do extrato de *C. heliotropiifolius* foi obtido por meio da adição de uma alíquota do extrato (1 mg) em metanol (100%) P.A. (10 mL) e submetido ao espectrômetro Shimadzu Uv-vis 1800, na faixa de comprimento de onda de 200 a 700 nm.

4.3.6 Espectroscopia de infravermelho por transformação de fourrier (FT-IR)

O perfil espectroscópico do extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* foi obtido a partir da técnica de Infravermelho por Transformação de Fourier (FT-IR), no qual o extrato em estado semi-sólido (1 mg) foi prensado contra o cristal de diamante usando a braçadeira de pressão anexada ao espectrofotômetro Agilent 630, seguido de leitura e registro. O espectro de FT-IR foi adquirido em menos de 30 segundos e submetido a amostras de referências em sua biblioteca.

4.4 Atividades Biológicas

4.4.1 Atividade Antimicrobiana

A avaliação preliminar da atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em Ágar por cavidade em gel (BAUER et al., 1966) adaptado por Koneman et al., (1993) e Romeiro (2001). Foram utilizadas duas linhagens padrão, sendo uma Gram-positiva, o *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) e uma levedura, a *Candida albicans* (ATCC-76645), cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES).

As cepas de *S. aureus* e de *C. albicans* foram reavivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) e caldo nutritivo (ASD – Ágar Sabouraud Dextrose à 2% - DIFCO), respectivamente. Em seguida incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, foram inoculadas com auxílio de um swab estéril, em placas de Petri previamente preparadas com Agar Muller-Hilton para *S. aureus* e ASD - Ágar Sabouraud Dextrose à 2% - DIFCO para *C. albicans*, nas quais foram feitas cavidades (6 mm de diâmetro) preenchidas com 20µL das soluções preparadas com extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* (diluídos em DMSO) nas seguintes concentrações 10; 5; 2,5; 1,25; ,0,6 e 0,3 %. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Os ensaios foram realizados em duplicata, acompanhados de controle positivo com os antibióticos amicacina (30µg) e nistatina (50µg). Como controle negativo foi utilizado DMSO e água destilada. Foi considerado como resultado final suscetível, halo de inibição igual ou acima de 10 mm de diâmetro, correspondente ao diâmetro da cavidade no meio de cultura (ROMEIRO, 2001).

4.4.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* foi determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* realizada por meio do sequestro de radicais livres, usando o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (MENSOR et al., 2001). Essa análise é baseada na habilidade de compostos em doar um próton para o DPPH, estabilizando assim o radical livre.

A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a atividade antioxidante de uma amostra pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução de DPPH, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (NUNE et al., 2008).

As amostras para a realização do ensaio foram preparadas adicionando-se 1 mL

da solução de DPPH (60 µM) em 2,5 mL de soluções dos extratos que foram diluídas em etanol na concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL em triplicata. Após o tempo de reação de 30 min das amostras preparadas, as absorbâncias foram lidas com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis com comprimento de onda ajustado para 520 nm. Como controle negativo foi usada a mistura de 1 mL da solução de DPPH e 2,5 mL de etanol (MENSOR et al., 2001). Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes (AA) percentuais determinadas pela equação:

$$\text{Inibição da atividade de DPPH (\%)} = [(A-B) / A] \times 100$$

Onde A = Absorbância da solução de DHPP da amostra controle, B = Absorbância da solução de DHPP na presença do extrato.

4.4.3 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica do extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e Hep-2 (carcinoma de laringe humana) mantidas em meio de cultura DMEM e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantida em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células NCI-H292, HT-29 e Hep-2 (105 células/mL) e HL-60 (0,3 x 10⁶ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida o extrato dissolvidas em DMSO (1 %), foi adicionado aos poços na concentração final de 50 µg/mL. O fármaco doxorubicina (50 µg/mL) foi utilizado como padrão inibitório. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. Este método é capaz de visualizar a redução da atividade da enzima de MTT a formazan púrpura. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. O experimento ocorreu em

quadruplicata e a viabilidade celular expressa com a porcentagem de inibição em relação ao controle, designado como 100%.

4.4.4 Ensaio de Fragilidade Osmótica

A técnica de fragilidade osmótica realizada baseou-se na metodologia descrita por Darcie e Lewis (1975). Aliquotas de sangue de carneiro (25 µL) foram expostas ao extrato, durante 60 minutos à temperatura ambiente em diferentes concentrações, sendo estas de 50µg/ mL; 100µg/ mL; 250µg/ mL; 500µg/ mL; 750µg/ mL; e 1000µg/ mL diluídas em solução isotônica de cloreto de sódio (0,9%). Em seguida, as soluções com sangue e extrato foram centrifugadas (2500 rpm/ 3 min) e o conteúdo sobrenadante foi analisado por espectrofotômetro, a fim de formular uma curva de dose-resposta com o percentual de hemólise estimado pelos valores de absorbâncias obtidos.

O controle negativo foi realizado com solução isotônica de cloreto de sódio (0,9%) e o controle positivo com água destilada, os quais receberam os mesmos procedimentos empregados nas amostras teste. O ensaio foi realizado em duplicata e o percentual hemolítico foi estabelecido com a absorbância do controle positivo sendo designado como 100%. O percentual de hemólise baseando-se na fórmula:

$$\% = \frac{Ab. teste \cdot 100\%}{Ab. contr. +}$$

Com as alíquotas de eritrócitos obtidas após a centrifugação foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas e as preparações foram coradas com coloração panóptica rápida para análise ao microscópio óptico em aumento de 1000x.

4.4.5 Análises Estatísticas

Os dados do percentual hemolítico e atividade antioxidante foram analisados através de análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey. Os resultados com $p < 0,001$ foram considerados significantes. O software utilizado foi ASSISTAT versão 7.7.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Fitoquímica

5.1.1 Rendimento do extrato metanólico

O extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* demonstrou rendimento de 14,2% em relação ao peso fresco e o obtido após a preparação do extrato. Os respectivos valores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Pesos e Rendimento do extrato metanólico da espécie *C. heliotropiifolius*

<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	Peso fresco (g)	Peso do extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas	225,0	31,9	14,2

5.1.2 Análise fitoquímica

A análise cromatográfica em camada delgada constatou a presença de flavonoides. Ausência de alcaloides e cumarinas. A investigação de saponinas foi negativa e a pesquisa de taninos demonstrou a presença de taninos hidrossolúveis (Tabela 3).

Tabela 3. Classes de metabólitos secundários identificados no extrato metanólico de folhas de *Croton heliotropiifolius*.

Classes de metabólitos secundários	Extrato de Folhas
Alcaloides	-
Cumarinas	-
Flavonóides	+
Saponinas	-
Taninos hidrolisáveis	+
Taninos condensados	-

Legenda: - ausência/ não reagente, + presença/ reagente.

O cromatograma do extrato metanólico de *C. heliotropiifolius* obtido pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a identificação de ácido gálico, com tempo de retenção de 1.800 min (Figura 3).

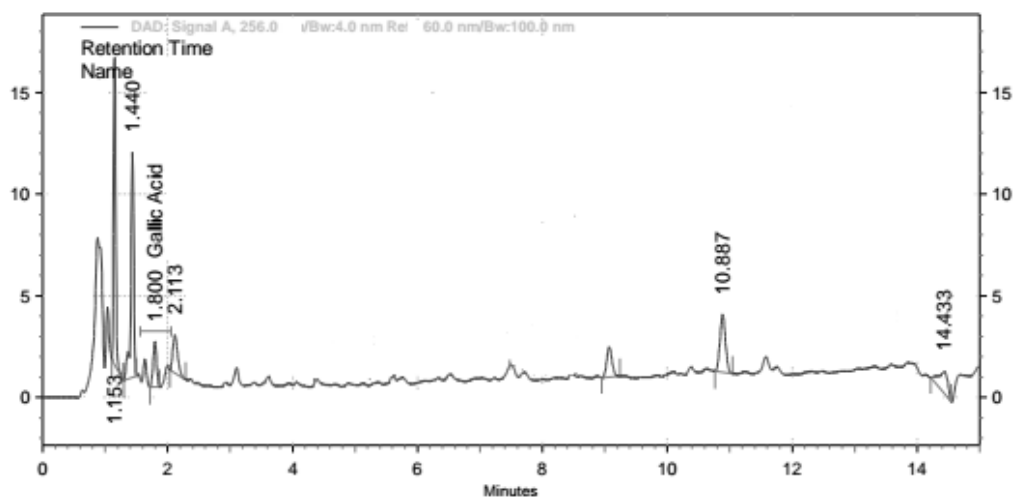


Figura 3. Cromatograma do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius* e identificação de ácido gálico.

O espectro na região de ultravioleta apresentou absorções máximas em 268, 316, 406 e 665 nm (Figura 4). O espectro na região de infravermelho apresentou bandas nas regiões de 3271 cm^{-1} , 2958 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} , 1478 cm^{-1} e 1146 cm^{-1} (Figura 5).

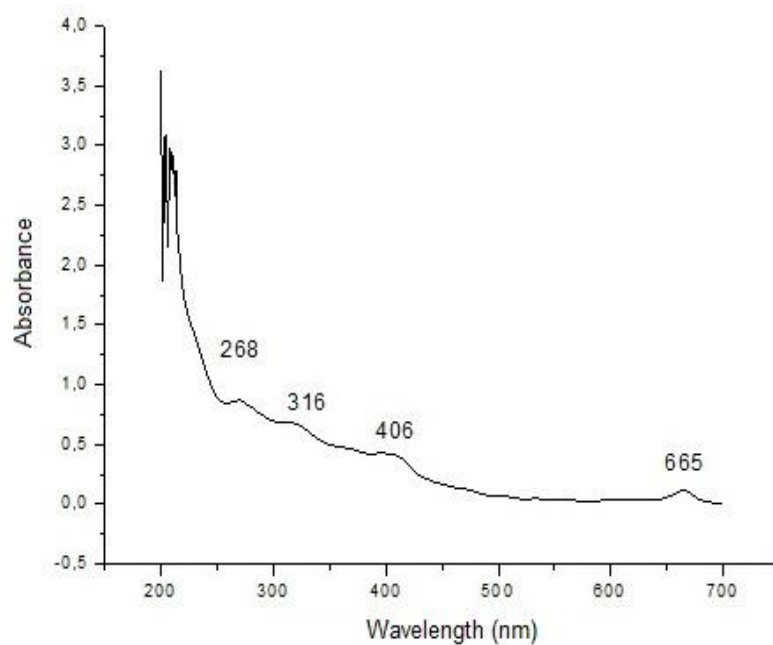


Figura 4. Espectro de Uv- visível do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius*

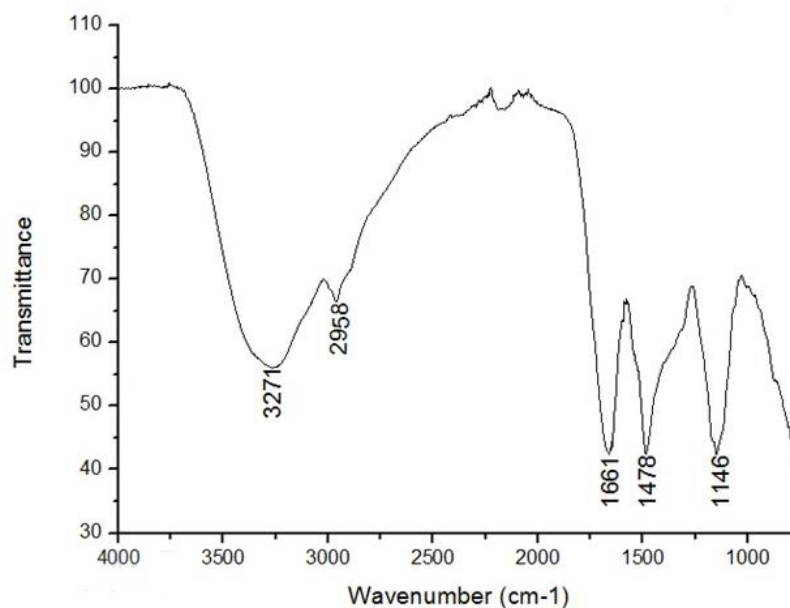


Figura 5. Espectro de Infravermelho (FT-IR) do extrato metanólico de *Croton heliotropifolius*

5.2 Atividades Biológicas

5.2.1 Avaliação Antimicrobiana

O extrato metanólico de folhas de *C. heliotropifolius* mostrou-se resistente contra a cepa de *Staphylococcus aureus* testada, visto que não houve formação de halo de inibição. Contra a linhagem de *C. albicans* observou-se que o extrato não apresentou atividade antimicrobiana, pois demonstrou uma média do halo de inibição inferior a 10,0 mm. Os controles positivos de amicacina e nistatina apresentaram média do halo de $19,5 \pm 0,7$ e $12,0 \pm 0,5$, respectivamente.

5.2.2 Atividade Antioxidante

O extrato metanólico de folhas de *C. heliotropifolius* apresentou percentuais de atividade antioxidante de 10,67%, 13,92%, 20,31% para as concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. Os resultados quantitativos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da atividade antioxidante do extrato metanólicos das folhas de *C. heliotropifolius* utilizando o radical DPPH

Extrato Metanólico de <i>Croton heliotropiifolius</i> (µg/mL)	Atividade Antioxidante (AA%)
50	10,67 (±0,16)
100	13,92 (±0,16)
200	20,31 (±0,35)

5.2.3 Atividade Citotóxica em Linhagens Tumoriais

A avaliação citotóxica do extrato *C. heliotropiifolius*, na concentração de 50 µg/mL, apresentou baixos a moderado percentuais de inibição de 59,5%, 21,7%, 26,7% e 46,5% e o controle com Doxorrubicina apresentou valores de 92,9%, 79,4%, 79,4% e 94,1% para as células HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual de atividade inibitória do extrato de *C. heliotropiifolius* nas células HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292.

Células	Extrato de <i>C. heliotropiifolius</i> (%)	Doxorrubicina (%)
HL-60	59,5 (±2,9)	92,9 (±0,6)
MCF-7	21,7 (±3,7)	79,4(±2,6)
Hep-2	26,7 (±7,1)	79,4(±2,6)
NCI-H292	46,5 (±2,6)	94,1(±1,9)

5.2.4 Avaliação Citotóxica de Fragilidade Osmótica

O ensaio de fragilidade osmótica com o extrato metanólico de *C. heliotropiifolius*, nas concentrações de 50µg/ mL; 100µg/ mL; 250µg/ mL; 500µg/ mL; 750µg/ mL; e 1000µg/ mL, apresentou baixos percentuais de hemólise (Figura 6). A concentração mais elevada, 1000µg/ mL, demonstrou diferença estatística significativa ($p<0,001$) em relação às demais concentrações, porém atingiu o percentual de 2,95%, sendo este, baixo para a constatação da hemólise.

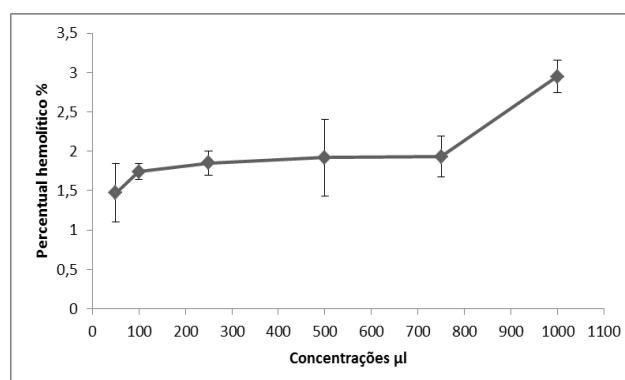


Figura 6. Curva dose-resposta com o percentual hemolítico dos eritrócitos submetidos ao extrato de *C. heliotropiifolius*.

A análise morfológica dos eritrócitos submetidos ao extrato de *C. heliotropiifolius*, apresentou predominantemente células com formato conservado em todas as concentrações testadas (Figura 7), quando comparados ao controle negativo.

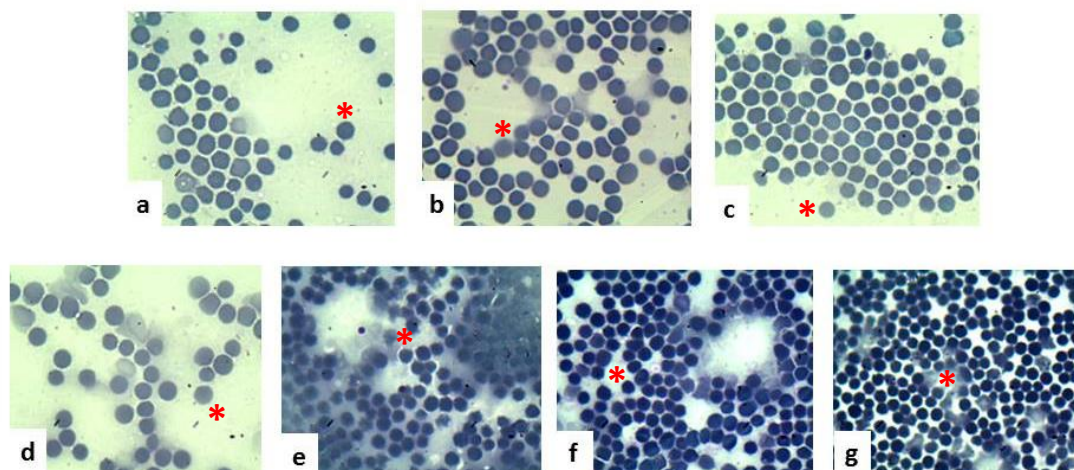


Figura 7. Fotomicrografia dos eritrócitos tratados com o extrato metanólico de *C. heliotropiifolius*, **a** controle negativo. **b** concentração de 50 µg/ml. **c** concentração de 100 µg/ml. **d** concentração de 250 µg/ml. **e** concentração de 500 µg/ml. **f** concentração de 750 µg/ml. **g** concentração de 1000 µg/ml. Coloração Panóptica rápida. Aumento de 1000x. * hemácia preservada.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização Fitoquímica

O extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* apresentou um perfil fitoquímico compatível com o gênero e com a maioria dos representantes da família Euphorbiaceae. A análise cromatográfica em camada delgada constatou a presença de flavonoides, ausência de alcaloides e cumarinas, corroborando com descrições fitoquímicas presentes na literatura.

Os flavonoides, grupo químico identificado em nossa investigação fitoquímica, também foi identificado no estudo de Randau et al. (2004) com o *C. heliotropiifolius*. Este grupo desempenha diversas funções biológicas, compreendendo a eliminação de radicais livres e ação anti-inflamatória (SUHARTONO et al., 2012; LIU et al., 2013), o que justifica o uso popular da espécie em disfunções intestinais, no tratamento de feridas e inflamações (SARAIVA et al., 2015).

A ausência de alcalóides nas folhas do *C. heliotropiifolius* evidenciada em nosso estudo, também foi descrita por Schoefs (2002). Entretanto, em seu trabalho foi elucidada a presença de alcalóides na casca das suas raízes (SCHOEFS, 2002).

Cumarinas estiveram ausentes no extrato estudado. Estas substâncias são raras na família Euphorbiaceae e no gênero *Croton*, existe a constatação apenas de escopoletina em *C. sonderianus* (CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982). A investigação de saponinas foi negativa, o que também foi relatada em outra espécie do gênero, o *Croton linearifolius* (CUNHA et al., 2014).

Os taninos hidrolisáveis são constituídos de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados. Possuem propriedades adstringentes e a estes compostos é atribuído o efeito antidiarréico, anti-séptico e impermeabilizador das camadas mais expostas da pele e mucosas, conferindo proteção às camadas subjacentes (BRUNETON, 1991). Desta forma, a presença destes compostos, como foi constatada em nossos resultados, justifica o uso popular da espécie no tratamento da diarreia, distúrbios digestivos e no tratamento de infecções (SALATINO et al., 2007). Foi constatada a ausência de taninos condensados, embora estes compostos tenham sido reconhecidos na espécie por Randau et al. (2004).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a identificação do ácido gálico, com tempo de retenção de 1.800 min (Figura 3). Este composto tem demonstrado ação antimutagênica (GICHNER et al., 1987), antioxidante (KIM et al.,

2002) e antitumoral (LOCATELLI et al., 2003). Sua identificação corrobora com os resultados da cromatografia em camada delgada e da pesquisa de taninos.

O espectro na região de ultravioleta (Figura 4) apresentou quatro bandas em 268, 316, 406 e 665 nm, sendo absorções nos comprimentos de onda de 266-295 nm correspondentes a fenóis simples. Para os flavonoides, o espectro tipicamente consiste em duas absorções máximas nas faixas de 240-285 nm e 300-550 nm (SILVA, 2015), confirmando os achados cromatográficos. Absorção na região de 665 nm está associada à presença de clorofila b (VICTÓRIO et al., 2007).

O espectro na região de infravermelho (Figura 5) apresentou uma banda na região de 3271 cm^{-1} sugerindo a presença de O-H. A banda na região de 2958 cm^{-1} indica a presença de C-H alifáticos, a região de 1661 cm^{-1} refere-se à presença de carbonila, cetônica alifática e de ésteres, que pode estar relacionado a ésteres do ácido gálico e sua hidrólise tem sido referida como um mecanismo de defesa natural (MATIAS et al., 2010).

Absorções na região 1478 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=C. A faixa $1140 - 1200\text{ cm}^{-1}$ está relacionada à sulfonas.

6.2 Atividades Biológicas

O extrato metanólico de *C. heliotropiifolius* não demonstrou atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* e apresentou média do halo de inibição inferior a 10,0 mm contra *C. albicans*, sendo considerado não significativo. Resultados de baixa susceptibilidade frente a microrganismos também foram observados com o óleo essencial no estudo de Angélica (2011).

Nossos dados permitiram demonstrar que extrato metanólico de *C. heliotropiifolius* possui atividade de depuração do DPPH, no qual, todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística ao nível de significância $p < 0,001$, tendo o melhoramento do índice de atividade antioxidante acompanhado o aumento da concentração do extrato (Tabela 4), sugerindo ação estabilizadora de radicais livres dos compostos presentes no extrato.

Os flavonóides são os metabólitos mais associadas à atividade antioxidante (VAN DEN BERG et al., 2000), visto que possuem esqueleto carbônico favorável para a estabilização de radicais livres. Esta classe de compostos foi identificada no extrato em estudo e em outros trabalhos com a espécie (RANDAU, 2001; SILVA et al., 2016).

O potencial antioxidante do *C. heliotropiifolius* foi anteriormente relatado por

Angélica (2011), que em seu trabalho evidenciou no extrato etanólico valores de atividade antioxidante superiores quando comparado aos nossos resultados. Isso pode ser atribuído à presença e a concentração de compostos fenólicos verificados no extrato testado.

Variações no teor de compostos bioativos estão associadas a fatores como tipo de solvente e metodologia empregada no processo de extração, fisiologia da planta, clima, solo, luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MORAIS, 2009). Assim, a intensidade da ação antioxidante exibida pelas plantas pode ser diferenciada, sendo principalmente determinada pelo número e posições de hidroxilas das moléculas dos compostos fitoquímicos presentes em sua composição (MELO et al., 2008).

Além das ações biológicas, a toxicidade de alguns metabólitos secundários presentes nos vegetais é bastante relatada (SILVA et al., 2012). Os flavonoides tem sua atividade citotóxica demonstrada contra diferentes linhagens tumorais (COSTA-LOTUFO et al., 2003).

Neste estudo, a avaliação citotóxica do extrato em linhagens tumorais apresentou percentuais de inibição de crescimento celular de 59,5%, 21,7%, 26,7% e 46,5% para as células HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292, respectivamente (Tabela 5). Sendo considerados sem atividade inibitória os que apresentaram percentuais de inibição de 1 a 20%, com baixa atividade inibitória os percentuais de 20 a 50%, atividade moderada aqueles com percentual de inibição de 50 a 70% e alta atividade inibitória os percentuais de 70 a 100% (ANDRADE et al., 2015).

O extrato em teste mostrou-se mais efetivo para a linhagem tumoral de leucemia promielocítica aguda (HL-60), apresentando moderada inibição do crescimento celular. Para as linhagens NCI-H292, MCF-7 e Hep-2, investigação semelhante foi realizada com o óleo essencial do *Croton zehntneri* e com seu principal componente, o estragol. Os resultados de tal estudo demonstraram percentuais de inibição inferiores a 20% (ANDRADE et al., 2015).

O ensaio de fragilidade osmótica do extrato de *C. heliotropiifolius*, nas condições testadas, obteve baixos percentuais de hemólise (Figura 6), tendo em vista que a ação hemolítica deve ser considerada elevada quando as porcentagens atingirem valores maiores de 40% e baixa quando esses valores forem inferiores a 10% (NOFIANI et al., 2011).

A maior concentração testada, 1000µg/ mL, demonstrou diferença estatística

significativa ($p < 0,001$) em relação às demais concentrações, porém atingiu o percentual de 2,95%, sendo este, baixo para a constatação da hemólise. Desta forma, é provável que não haja dano à membrana eritrocitária.

A ação hemolítica dos diferentes compostos vegetais é atribuída a vários mecanismos inespecíficos, como por exemplo, os compostos surfactantes que produzem seu efeito hemolítico por meio da solubilização da membrana plasmática, ou pela lise osmótica, promovendo alterações na permeabilidade das hemácias (APARICIO et al., 2005).

As saponinas possuem efeito hemolítico resultante da capacidade de interação com os elementos da membrana celular das hemácias, especialmente com as moléculas de colesterol, acarretando uma deformação na membrana e como consequência, causa o extravasamento do conteúdo intracelular (DEWICK, 2002; KARABALIEV et al., 2003). Este composto esteve ausente em nossas investigações fitoquímicas.

A morfologia dos eritrócitos manteve-se predominantemente conservada em formato esférico, para todas as concentrações, o que sugere a preservação da integridade celular.

Avaliação morfológica de eritrócitos submetidos ao óleo essencial de *Litsea elliptica*, demonstrou alterações estruturais na membrana e diminuição da concentração de fosfolípidios. Perturbações em lipídios podem resultar na dissolução da membrana, pois constituem a base da estrutura da bicamada lipídica (TAIB et al., 2009).

A instabilidade lipídica não pode ser considerada um efeito fisiologicamente positivo, pois pode acarretar a diminuição da fluidez nas membranas e por consequência alteração morfológica e lise celular. Nossos resultados de fragilidade osmótica e análise morfológica demonstraram estabilidade a nível de membrana, uma vez que não houve aparente extravasamento do conteúdo intracelular (FREITAS et al., 2008).

7 CONCLUSÕES

- O extrato metanólico de folhas de *C. heliotropiifolius* demonstrou a presença de compostos fenólicos: flavonoides (ácido gálico) e taninos hidrolisáveis, conferindo condições para o isolamento destes compostos em estudos posteriores. Foi demonstrada a ausência de alcaloides, cumarinas e saponinas.
- O espectro de UV-visível do extrato exibiu bandas de absorção em 268, 316, 406 nm, correspondente a fenóis simples e flavonoides. O espectro de infravermelho demonstrou absorbâncias na região de 1661 cm^{-1} , referente à presença de carbonila, cetônica alifática e de ésteres. Confirmando os achados cromatográficos.
- Não foi identificada atividade antimicrobiana, nas condições testadas e contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) e *Candida albicans* (ATCC-76645).
- A atividade antioxidante demonstrou valores de 10,67%, 13,92%, 20,31 % para as concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sugerindo ação estabilizadora de radicais livres dos compostos presentes no extrato.
- A atividade citotóxica do extrato testado apresentou baixo percentual de inibição celular para as linhagens tumorais NCI-H292, MCF-7, Hep-2 e moderado para HL-60, o que confere potencial para novas investigações.
- O ensaio de fragilidade osmótica apresentou baixa atividade hemolítica e a morfologia dos eritrócitos manteve-se preservada. O que pode ser considerado um efeito fisiologicamente positivo, uma vez que não houve aparente perturbação na membrana celular eritrocitária.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. D. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Rev Virt Iniciação Científica**, 1, 1-9, 2001.
- AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, 196, 67-76, 2012.
- AGRIPINO, D. G., LIMA, M. E. L., SILVA, M. R. D., MEDA, C. I., BOLZANI, V. D. S., CORDEIRO, I., MORENO, P. R. H. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and dna-damaging activities: I. Atlantic rain forest. Ecological station juréia-itatins. **Biota Neotropica**, 4(2), 1-15, 2004.
- ALBERTS, S. R., SCHROEDER, M., ERLICHMAN, C., STEEN, P. D., FOSTER, N. R., MOORE JR, D. F., FITCH, T. R. Gemcitabine and ISIS-2503 for patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial. **Journal of clinical oncology**, 22(24), 4944-4950.
- ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; ALENCAR, N. L. Métodos e técnicas para coleta de dados biológicos. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. (org) **Métodos e Técnicas na pesquisa Etnobilógica e Etnoecológica**. Recife PE: NUPEEA, 2010.
- ALCERITO, T., BARBO, F. E., NEGRI, G., SANTOS, D. Y., MEDA, C. I., YOUNG, M. C. M., BLATT, C. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, 30(7), 677-683, 2002.
- ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among eurytherms and endotherms at three temperature. **Journal of Thermal Biology**, 26, 179-182, 2006.
- ALENCAR FILHO, J. M.; ARAÚJO, L. D. C.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; PACHECO, A. G.; SILVA, F. S.; ARAÚJO, E. C. D. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2017.
- ALLEY, M. C., SCUDIERO, D. A., MONKS, A., HURSEY, M. L., CZERWINSKI, M. J., FINE, D. L., BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, 48(3), 589-601, 1988.
- ALMEIDA MELO, E., MACIEL, M. I. S., DE LIMA, V. L. A. G., DO NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(2), 193-201, 2008.

ALMEIDA, R. B. D., SCHEFFER, T. P. Estudo sobre a utilização de recursos vegetais com potencial terapêutico. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, 5(1), 59-71, 2012.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P. D. L., BAHIA, M. V., AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. 2010.

ALVES, E. S., GIUSTI, P. M., DOMINGOS, M. A. R. I. S. A., SALDIVA, P. H., GUIMARÃES, E. T., LOBO, D. J. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, 24(4), 567-576, 2001.

ALVIM, M. C. C.; PERET, A. C. Food resources sustaining the fish fauna in a section of the upper São Francisco River in Três Marias, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 2, p. 195-202, 2004.

ANDRADE T C, LIMA S G, FREITAS R M, ROCHA M S, ISLAM T, SILVA T G, MILITAO, G C. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**; 87(1), 173-182, 2015.

ANGÉLICO, E. C.; DA COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. Composição Química do óleo essencial das folhas de *Croton Heliotropiifolius* KANT (SINÔNIMO *C. Rhamnifolius*): resultados preliminares. 2012.

ANGÉLICO, ELISSANDRA COURAS. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de *Cróton heliotropiifolius* Kuntze e *Cróton blanchetianus* Baill. 2011. 87f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Patos-PB, 2011.

APARICIO, O., GEISBERG, J. V., SEKINGER, E., YANG, A., MOQTADERI, Z., & STRUHL, K. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. **Current protocols in molecular biology**, 21-3, 2005.

BADKE, M. R., BUDÓ, M. D. L. D., SILVA, F. M. D., RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc Anna Nery**, 15(1), 132-9, 2011.

BAILLON, H. 1865. Species Euphorbiacearum - Euphorbiacées Américaines. **Adansonia** 5:305-360.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.15, n.1, 2004.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, 45(4), 493, 1966.

- BEGUM, A. N., TERAQ, J. Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability. **The Journal of nutritional biochemistry**, 13(5), 265-272, 2002.
- BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P.E. **Piante Medicinali – Chimica, Farmacologia e Terapia**. v1.Milano: Messaggerie Italiane, 1968.
- BENTHAM, G. Euphorbiaceae Pp. 239-540. In: G. Bentham; **J.D. Hooker**. (eds). *Genera Plantarum*, London, United Kingdom, 1880.
- BERRY, P. E. CORDEIRO, I. WIEDENHOEFT, A. C., VITTORINO-CRUZ, M. A. LIMA, L. R. Brasiliocroton, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae from eastern Brazil. **SystemBot**. v. 30:: 357-365. 2005.
- BESSA, TATIANA; TERRONES, MANUEL G. H.; SANTOS, DOUGLAS Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus Echinatus*. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.
- BHATIA, S.K.; YETTER, A.B. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biol Toxicol**. 24:315-319, 2008.
- BOTTERWECK, A. A., SCHOUTEN, L. J., VOLOVICS, A., DORANT, E., VAN DEN BRANDT, P. A. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. **International journal of epidemiology**, 29(4), 645-654, 2000.
- BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, 68(22), 2722-2735, 2007.
- BRUNETON, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.
- CAIRES, A. C., DA COSTA GILENO, M. Padronização e Aplicação da Curva de Fragilidade Osmótica no Auxílio Diagnóstico de Anemias. **Revista ReBraM**, 15(2), 49-58, 2012.
- CANUTO, K. M., SILVEIRA, E. R., BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, 33(3), 662-666, 2010.
- CARVALHO, E. B., BORGES, E. L., CARLOS, L. M., SILVA, M. A. M., MAGALHÃES, S. M., GOMES, F. V. B. A. F, PITOMBEIRA, M. H. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 29(2), 149-52, 2007.
- CASTRO CMMB, AGUIAR JLA, MELO FAD. Citotoxicidade de Polímero de Cana-deAçúcar. **An. Fac. Méd. Univ. Fed. Pernambuco**. Recife. 49(2):119-123, 2004.

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**, 21(1), 99-105, 1998.

COITINHO, R. L. B. C. "Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae).": 176-182, 2006.

CONFORTI, F., STATTI, G., LOIZZO, M. R., SACCHETTI, G., POLI, F., MENICHINI, F. In vitro antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 28(6), 1098-1102, 2005.

CORDEIRO, A. O. D. O. Restauração ecológica de uma área degradada através de técnicas de nucleação, Juiz de Fora, MG, 2010.

CORDEIRO, I; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: Barbosa, M. R. V; Sothers, C.; Mayo, S.; Gamarra-Rojas, C. F. L. & Mesquita, A. C. eds. **Checklis das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiosperma e Gymnospermas**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 71-74.2006.

COSTA-LOTUFO L V, JIMENEZ P C, WILKE D V, LEAL L K A, CUNHA G, SILVEIRA E R, PESSOA C. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* AC Smith. **Zeitschrift für Naturforschung C**; 58(9-10), 675-680, 2003.

CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, 21(10), 2571-2574, 1982.

CUNHA, S. L.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg.(Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae). **Biotemas** 2014.

DACIE, J. V., LEWIS, S. M., CATOVSKY, D. Blood cell cytochemistry and supplementary techniques. **Practical Hematology, Churchill Livingstone, Edinburgh**, 120-148, 1975.

DEWICK P M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons; 2002.

DÓRIA, G. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical biology**, 48(6), 615-620, 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., DOS SANTOS, R. J., GENOVESE, M. I., & LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(2), 2006.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ESTEVAM, C. D. S., CAVALCANTE, A. D. M., CAMBUI, É. V. F., ARAÚJO NETO, V., LEOPOLDO, P. D. T. G., FERNANDES, R. P. M., SANTANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart.(Celastraceae), 2009.

FRADE, M.A.C.; VALVERDE, R.V.; DE ASSIS, R.V.C.; Chronic phebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Inter J Dermatol**. 40:238-240, 2001.

FREITAS, M. V., RITA DE CÁSSIA, M. N., DA COSTA HUSS, J. C., DE SOUZA, T. M. T., COSTA, J. O., FIRMINO, C. B., PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, 22(1), 219-224, 2008.

FRESHNEY I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biol Toxicol**. 17(4- 5): 213-30, 2001.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4a Edn. Indianapolis, In: **WileyLiss**, 2000.

GICHNER, T.; POSPÍŠIL, F.; VELEMÍNSKÝ, J.; VOLKEOVA, V.; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella Assay. **Folia microbiologica**, 32(1), 55-62, 1987.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, 30(2), 374.

GONÇALVES, A. P. P., DE DEUS VIEIRA, G., CUNHA, P. N. A., KISSLER, T. V. L., HERNÁNDEZ, A. E. F., TELES, C. B. G. Caracterização fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos de *Solanum subinerme* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, 18(2), 8-16, 2017.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. Croton. In: World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). Kew, **Royal Botanic Gardens Kew**. Pp. 417- 536, 2000.

HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., & INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, 11(3), 2007.

HUANG, S.; INGBER, D. E. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. **Cancer cell**, 8(3), 175-176, 2005.

IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C.; ISAAC, V. L. B.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium*

guajava L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista brasileira de farmacognosia**, 387-393, 2008.

ISERHARD, A. R. M.; BUDÓ, M. D. L.; NEVES, E. T.; BADKE, M. R. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascidos de risco do sul do Brasil. **Esc Anna Nery**, 13(1), 116-22, 2009.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. DONOGHUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª ed. **Artmed**, Porto Alegre. 612p. 2009.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 88(1), 101-105, 2003.

KHANBABAEI, KARAMALI; REE, TEUNIS VAN. Tannins: Classification and Definition. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 641–649, 2001.

KIM, D. O., LEE, K. W., LEE, H. J., LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and food chemistry**, 50(13), 3713-3717, 2002.

KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUCA, K.; JUN, D.; JAHODAR, L.; OPLETAL, L. Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 436-447, 2008.

KONEMAN, E. W. Allen. **SD, Dowell, VR, Sommers, HM**, 1993.

KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J. J.; VAN UFFORD, H. Q.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta medica**, 58(06), 499-504, 1992.

LANGFIELD, R. D., SCARANO, F. J., HEITZMAN, M. E., KONDO, M., HAMMOND, G. B., NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of ethnopharmacology**, 94(2), 279-281, 2004.

LIMA, L. R. D.; PIRANI, J. R.. Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae ss). **Biota Neotropica**, 8(2), 0-0, 2008.

LIU, M.; JOHNSTON, M. B.; SNAITH, H. J. Efficient planar heterojunction perovskite solar cells by vapour deposition. **Nature**, 501(7467), 395-398, 2013.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, Feb 2013.

LONGHINI, R.; LONNI, A. A.; SEREIA, A. L.; KRZYZANIAK, L. M.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2016.

- LUCENA, M. F. A. Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae – Euphorbiaceae) nas zonas do Litoral e da Mata do estado de Pernambuco – Brasil. 136 f. **Dissertação (Mestrado em Botânica)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2000.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, 224, 164-175, 2014.
- MA, J.; LUO, X. D.; PROTIVA, P.; YANG, H.; MA, C.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **Journal of Natural Products**, 66(7), 983-986.
- MAGALHÃES, C.; OLIVEIRA, C.; MATOS, C.; BRITO, S.; MAGALHÃES, T.; FERRAZ, M. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Rev. bras. plantas med**, 17(4, supl. 3), 1150-1158, 2015.
- MAHBOUB, M.; KHAMECHIAN, T.; KAZEMPOUR, N. Total Phenolic and Flavonoids Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Azilia eryngioides* Extracts. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 2, n. 3, p. 144-150, 2013.
- MAIWORM, A. I., PRESTA, G. A., SANTOS-FILHO, S. D., PAOLI, S. D., GIANI, T. S., FONSECA, A. S., BERNARDO-FILHO, M. Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(1), 42-46, 2008.
- MARKHAN, K.R. Techniques of flavonoid identification. **London: Academic Press**, 1982.
- MATIAS, E. F., KATIUCIA SANTOS, K., ALMEIDA, T. S., COSTA, J. G., & COUTINHO, H. D. Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, 8(3), 2010.
- MCMURRY, J.; CASTELLION, M.; BALLANTINE, D. S.; HOEGER, C. A.; PETERSON, V. E. **Fundamentals of general, organic, and biological chemistry**. Pearson Education, 2010.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. D.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, 15(2), 127-130, 2001.
- MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, 112(10), 3939-3948, 2008.
- MORAIS, J. M. D. Petróleo em águas profundas: uma história tecnológica da Petrobras na exploração e produção offshore, 2013.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras**, v. 27, n. 2, 2009.

MORTON, W. M.; AYSCOUGH, K. R.; MCLAUGHLIN, P. J. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. **Nature cell biology**, 2(6), 376-378, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, 65(1-2), 55-63, 1983.

MOUSINHO, K. C.; CORREIA, M. B. L.; SILVA, J. O. D.; MAGNATA, S. D. S. L. P.; SOUZA, I. A. D.; CATANHO, M. T. J. D. A. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with Technetium-99m and morphology of the cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51(6), 1139-1146, 2008.

MULLER, C. L.; CHAPMAN, L.; GRIMMOND, C. S. B.; YOUNG, D. T.; CAI, X. M. Toward a standardized metadata protocol for urban meteorological networks. **Bulletin of the American Meteorological Society**, 94(8), 1161-1185, 2013.

NANCY, G.S. Are Research Schools Necessary Contrasting Models of 20th Century Research at Tale Led by Ross Granville Harrison, Grace E. Pickford and G. Evelyn Hathinson. **Journal of History of Biology**. 36: 501-529, 2003.

NOFIANI, R.; JUANE, M. S.; ARDININGSIH, P.; JAYUSKA, A.; ZAHARA, T. A. Antimicrobial activity of actinomycetes associated with an unidentified sponge from lemukutan island, Indonesia on various medium and incubation time. **International Journal of Bioassays**, 1(10), 98-101, 2011.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C.; SILVA, M. V.; AGRA, M. D. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Rev Bras Farmacogn**, 18(supl), 2008.

OBRADOVIC, M.; KRAJESEK, S. S.; DERMASTIA, M.; KREFT S. A new method for the authentication of plant samples by analysing fingerprint chromatograms. **Phytochemical analysis**, v. 8 p. 123-132, 2007.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, 32(3), 689-702, 2009.

OLIVEIRA, G. L. D.; OLIVEIRA, A. F. M. D.; ANDRADE, L. D. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 24(2), 571-577, 2010.

OOTANI, M. A., AGUIAR, R. W., RAMOS, A. C., BRITO, D. R., SILVA, J. B. D., & CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, 4(2), 162-175, 2013.

PEREIRA, D. R.; CINTRA, A. J. L.; FARIAS, A. G. M.; LIMA, V. L. DE M. Fragilidade osmótica do extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre eritrócitos de ratos. **Resumo expandido**. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1492-1.pdf>. Acesso em: 18/03/2017.

PORTAL DA SAÚDE. Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>. Acesso em: 18/03/2017.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F. D.; ZERAIK, M. L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES-PIRES, C.; BOLZANI, V. D. S. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, 10, 2014.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* HBK and *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14(2), 89-96, 2004.

RANDAU, K.P. Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacoquímico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). Recife, 143p. **Dissertação (Mestrado)** – Departamento de Ciências, 2001.

RAZAVI, F.; ABYANEH, H. A.; AL-DABBAGH, M.; MOHAMMADI, R.; TORKAMAN, H. A new comprehensive genetic algorithm method for optimal overcurrent relays coordination. **Electric Power Systems Research**, 78(4), 713-720, 2008.

REE, J. H.; KWON, S. H.; PARK, Y.; KWON, S. T.; PARK, S. H. Pre-tectonic and post-tectonic emplacements of the granitoids in the south central Okchon belt, South Korea: Implications for the timing of strike-slip shearing and thrusting. **Tectonics**, 20(6), 850-867, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**. 2004.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo Fitoquímico de *Senna Alata* por duas Metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, 2009.

RODRIGUES, K. A. D. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. D. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção Fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cadernos de Pesquisa**, 17(2), 2010.

ROLLINGER, J. M.; LANGER, T.; STUPPNER, H. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. **Current medicinal chemistry**, 13(13), 1491-1507, 2006.

ROMEIRO, R.S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa: Editora UFC. 2001.

ROQUE, A. D. A.; ROCHA, R. D. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 12(1), 31-42, 2010.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R.. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, 91(4), 621-632, 2005.

SADHU, I. S.; WARE, K.; GRISHAN, M. B. Peroxyl radical-mediated hemolysis: role of lipid, protein and sulphhydryl oxidation. *Free Rad. Res. Comm.* v. 16, p. 111-122, 1992.

SAEKI, K., AKIRA, Y. U. O., ISEMURA, M., IKURO, A. B. E., TAKAHIRO, S. E. K. I., NOGUCHI, H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 23(11), 1391-1394, 2000.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18(1), 11-33, 2007.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Editora da ULBRA. 2004.

SANTOS, A. C., SIQUEIRA NETO, J. I., FABIO, S. R. C. Alterações cerebrais reversíveis na síndrome hemolítico-urêmica. **Arq. neuropsiquiatr**, 53(2), 284-7, 1995.

SARAIVA, M. E.; DE ALENCAR ULISSES, A. V. R.; RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA, L. G. S.; DE MACÊDO, D. G.; DE SOUSA, F. D. F. S.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, **Northeast Brazil. Journal of ethnopharmacology**, 171, 141-153, 2015.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 8(1), 2011.

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

SCHMALZ, G.; SCHWEIK H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using standard toxicant. **J Endod.**1994; 20(12):592-4.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in food science & technology** 2002.

SEKOWSKI, S.; IONOV, M.; KASZUBA, M.; MAVLYANOV, S.; BRYSEWSKA, M.; ZAMARAEVA, M. Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2014.

SERRANO, A.; PALACIOS, C.; ROY, G.; CESPÓN, C.; VILLAR, M. L.; NOCITO, M.; GONZÁLEZ-PORQUÉ, P. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Archives of biochemistry and biophysics**, 350(1), 49-54, 1998.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, 4, 180-183, 2015.

SILVA R V. Extrato dos frutos de *Spondias purpurea* L. como princípio ativo para formulação fitocosmética fotoprotetora [**dissertação**]. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; 2015.

SILVA, G. A.; DE BRITO, N. J. N.; DOS SANTOS, E. C. G.; LÓPES, J. A.; DAS GRAÇAS ALMEIDA, M. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, 10(1), 2014.

SILVA, J. A. G.; SILVA, G. C.; SILVA, T. M. S.; RANGEL, I. (2016). Estudo Fitoquímico das Folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Anais I Conbracis**. v. 1.

SILVA, J. S.; SALES, M. F. O gênero *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco. **Rodriguésia** 59: 435-448. 2008.

SILVA, J. S.; SALES, F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *croton* (euphorbiaceae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 4:: 879-901. 2009.

SILVA, J. S.; SALES, M. F. D.; GOMES, A. P. D. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L.(Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 24(2), 441-453, 2010.

SILVA, R. F.; DE FÁTIMA GUIMARÃES, M.; DE AQUINO, A. M.; MERCANTE, F. M. Análise conjunta de atributos físicos e biológicos do solo sob sistema de integração lavoura-pecuária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(10), 1277-1283, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., MELLO, J. C. P. de, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º Ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

SODRÉ, R. C.; SILVA, M.; SALES, M. *Croton* L.(Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 65(1), 221-234, 2014.

SPANGBERG, L.S. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. **J Endod.** 1978; 4(10):296-9.

STURM, S.; SEGERA, C. Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography–mass spectrometry hyphenations: Curious option or powerful and complementary routine tool. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 50– 61, 2012.

SUHARTONO, E.; VIANI, E.; RAHMADHAN, M. A.; GULTOM, I. S.; RAKHMAN, M. F.; INDRAWARDHANA, D. Total flavonoid and antioxidant activity of some selected medicinal plants in South Kalimantan of Indonesian. **APCBEE Procedia**, 4, 235-239, 2012.

TAIB, I. S., BUDIN, S. B., AIN, S. M. S. N., MOHAMED, J., LOUIS, S. R., DAS, S., HIDAYATULFATHI, O. Toxic effects of *Litsea elliptica* Blume essential oil on red blood cells of Sprague-Dawley rats. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, 10(11), 813, 2009.

TANG, L.L; LIU, H.; WANG, Y.L. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 2007; 57:215-218.

TARAOVSKY, Y. S.; KIM, Y. A.; YAGOLNIK, E. A.; MUZAFAROV, E. N. Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1838(5), 1235-1246, 2014.

TOLKE, E.; SILVA, J. B.; PEREIRA, A. R. L.; DE MELO, J. I. M. Flora vascular de um inselbergue no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Biotemas**, 24(4), 39-48, 2011.

VAN DEN BERG, EDUARDO; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Composição florística e estrutura fitossociológica de uma floresta ripária em Itutinga, MG, e comparação com outras áreas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 3, p. 231-253, 2000.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G.; CROTTI, A. E. Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. **Química Nova**, 31(4), 840-853, 2008.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G.; CROTTI, A. E. Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. **Química Nova**, 31(4), 840-853, 2008.

VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**; v. 5, n. 02, p. 213-215, 2007.

WEBSTER, J. P.; BRUNTON, C. F. A.; MACDONALD, D. W. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, v. 109, n. 1, p. 37-43, 1994.

WAGNER; BLADT 1996) WAGNER, H.; BLADT. S. Plant drug analysis. 2.ed. New York: **Springer Verlag**, 1996.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of drugs and dosage forms** (pp. 139-150). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.

ANEXO A



HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 73/2015

	Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1.	90440	Velame	Euphorbiaceae	<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.	O. Cano

Dr^a. Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbário IPA

Consulta: Jéssica de Andrade Gomes e Silva

Procedência: PE - Garanhuns - Área urbana, bairro Cohab 3, Rua Maria das Dores Ramos Correia, em terreno baldio. Material coletado em 26/07/2015.

Determinada em: 25/11/2014.

Obs.: Material em estudo na UFPE - para fim de dissertação de Mestrado no PPG em Morfotecnologia na UFPE, sob orientação da Prof^a Sônia Pereira Leite do Dept^o de Histologia e Embriologia.

Resultado encaminhado para o e-mail: jessica.andrade.gs@gmail.com

Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 - Bonfim - 50761-000 - Recife - PE - C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 - PABX: (81) 3184-7200 - Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento

ANEXO B

**Artigo publicado no periódico African Journal of Pharmacy and Pharmacology.
Data de aceite: 27/06/2017. Data de Publicação: 29/07/2017.**

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND CYTOTOXIC EFFECT OF THE
METHANOLIC EXTRACT OF *Croton heliotropiifolius* KUNTH (EUPHORBIACEAE)

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Croton heliotropiifolius* KUNTH (EUPHORBIACEAE)

Jéssica de Andrade Gomes Silva*,¹ Gibbelly Cavalcante da Silva,¹ Marília Grasielly de Farias
Silva,¹ Vanessa Farias da Silva,² Jaciana Santos Aguiar,³ Teresinha Gonçalves da Silva,³ Sônia
Pereira Leite¹

¹ Postgraduate programme in Morphotechnology Federal University of Pernambuco, Recife,
Brazil

² Nacional Semi-arid Institute, Campina Grande, Brazil

³ Antibiotics department of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

* Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Departamento de Histologia e Embriologia,
Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco Avenida Professor Moraes Rego,
1235 - Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife - PE, Brasil. E-mail:
jessica.andrade.gs@gmail.com. Phone: (81) 99623-9815

Summary title: Physicochemical characteristics and cytotoxic effect

ABSTRACT

Croton heliotropiifolius Kunth is an endemic specie in northeast of Brazil. It is renowned for its medicinal properties, larvicidal and insecticidal actions. This work investigated the chemical compounds present in the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius*, and the cytotoxic activity. Physical-chemical analyses were performed by Thin-layer Chromatography (TLC), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Fourier Transformation Infrared spectroscopy (FT-IR), and Ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis). Cytotoxic activity was evaluated in the following tumour cell lines; acute promyelocytic leukaemia (HL-60), human breast adenocarcinoma (MCF-7), human laryngeal carcinoma (hep-2), human lung mucoepidermoid carcinoma (NCI-H292). Results revealed the presence of flavonoids and absence of alkaloids, coumarins, saponins and condensed tannins. HPLC identified Gallic acid with retention time of 1.80 minutes. The infrared spectrum identified the presence of esters group at 1661 cm^{-1} of absorbance. On the other hand, the UV-Vis spectrum revealed bands of light absorbance on 268, 316, 406 nm indicating the presence of phenols and flavonoids. Results showed inhibition of cell growth of 59,5% on HL-60 cells, 46,5% on NCI-H292, 26,7% on Hep-2, and 21,7% on MCF-7 cells. In conclusion, the presence of phenolic compounds in the extract was demonstrated and a low to medium percentage of cell growth inhibition on tumour cell lines tested.

Keywords: *Croton*. *Croton heliotropiifolius*. Flavonoids. Gallic acid. Cytotoxicity. Tumour lines.

RESUMO

Croton heliotropiifolius Kunth constitui uma espécie endêmica do Nordeste Brasileiro. É popularmente conhecida por suas propriedades medicinais, ação larvicida e inseticida. O presente trabalho relata a investigação de compostos químicos do extrato metanólico de folhas de *Croton heliotropiifolius* e avaliação de sua atividade citotóxica. Análises físico-químicas foram realizadas por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de Infravermelho por Transformação de Fourier (FT-IR) e espectrofotometria de UV-visível. A atividade citotóxica foi avaliada nas linhagens tumorais de leucemia promielocítica aguda (HL-60), carcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma de laringe humano (Hep-2), carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292). Neste estudo, foi observada a presença de flavonoides, ausência de alcaloides, cumarinas, saponinas e taninos condensados. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a identificação do ácido gálico, com tempo de retenção de 1.800 min. O espectro de infravermelho demonstrou absorbâncias na região de 1661 cm^{-1} , referente à presença de carbonila, cetônica alifática e de ésteres e o espectro de UV-visível apresentou bandas de absorção em 268, 316, 406 nm, correspondente a fenóis simples e flavonoides. A atividade citotóxica do extrato, pelo método MTT, nas células HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292 exibiram percentuais de inibição de crescimento celular de 59,5%, 21,7%, 26,7% e 46,5%, respectivamente. Contudo, foi possível elucidar a presença de compostos fenólicos e baixo a moderado percentual de inibição para as linhagens tumorais testadas.

Palavras-chave: *Croton*. *Croton heliotropiifolius*. Flavonoides. Ácido gálico. Citotoxidade.

Linhagens tumorais.

Abreviaturas

TLC: Thin-layer Chromatography

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

FT-IR: Fourier Transformation Infrared spectroscopy

UV-Vis: Ultraviolet-visible spectrophotometry

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

HL-60: acute promyelocytic leukaemia

MCF-7: human breast adenocarcinoma

hep-2: human laryngeal carcinoma

NCI-H292: human lung mucoepidermoid carcinoma

INTRODUCTION

The genre *Croton* comprises more than 1300 species of trees, bushes, and herbs distributes all over the world. Such biodiversity is mainly found in India, Brazil and Madagascar where its ethnomedicinal value is recognized (Yankep et al., 2003; Ye et al., 2012).

Croton heliotropiifolius Kunth, is an endemic specie in the northeast of Brazil frequently found within “caatinga”, “brejo”, “resting” and “cerrado” vegetations. It is known by unofficial names such as “velame”, “velaminho” and “velame-de-cheiro” due to the presence of trichomes. Previous studies have described the presence of alkaloids, polyphenols and reducing agents in *C. heliotropiifolius*, including its medicinal use for relief of stomach pain, vomit, diarrhoea and as an antithermic (Randau et al., 2004). The essential oil has been described as larvicidal against *Aedes aegypti* (Dória et al., 2010) and the ethanolic extract demonstrated significant insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* (Silva et al., 2012).

The Human Toxicity Potential (HTP) is an important test to be performed early in the study of a medicinal herb. It is recommended that new herbs and those with unknown actions shall be analysed in a controlled cellular environment as free of complex interactions inherent an organism. Methodologies that aim in analysing the cellular behaviour, display several advantages such as low costs, easy and quick execution, and controlled cell environment (Freshney, 2000).

Cancer is a progressive chronic disease responsible for approximately 13% of deaths during last year (WHO, 2016). Genre, race, age, genetic predisposition and environmental exposure to carcinogenic agents, are directly related to the distribution and incidence of tumours (Chu et al., 2004).

Surgery removal of tumours combined with chemotherapy have been efficient methods in the treatment of several cancers. However, the appearance of side effects is very characteristic. Those effects very often compromise the continuity of the treatment which may lead to advanced stages of malignity and morbidity. Therefore, continuing efforts are focused towards the discovery of new antitumor compounds with more secure and efficient characteristics. In this context, the study of natural products seems promising (Erharuyi et al., 2017).

In knowledge that chemical analysis and the human toxicity potential are important assays for the medical use of a plant; this work aimed to characterize the physical-chemical properties of *C. heliotropiifolius* leaves, and to evaluate its cytotoxic activity in several tumour cell lines.

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedures

The methanolic extract of *C. heliotropiifolius* leaves was concentrated using a rotary evaporator with vacuum BUCHI Switzerland at 60 °C. Thin-layer chromatography (TLC) was performed with TLC Silicagel 60G F254 (Merck®) on top of an aluminium base. Compounds were sprayed with visualization reagents, visualized under UV light- (254nm-365nm), and for flavonoids, was compared with the quercetin standard. The HPLC system used was a HPLC Waters (Self cleaning System) attached to an UV spectrophotometer with detector model Waters 2998 PDA containing photodiodes (Photodiode Array Detector). Values in the infrared region (FTIR) and UV- visible spectrum were registered respectively by an Agilent 630 and Shimadzu UV-vis 1800 spectrophotometers. All chemical products used in those procedures were for analytic use (Sigma® e Merck®). The Division of Antibiotics from the Federal University of Pernambuco (UFPE) supplied the cells, antibiotic solutions (penicillin and streptomycin), and the drug doxorubicin. Both culture media; Dulbecco MEM (DMEM) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI); and the fetal bovine serum (FBS) were Gibco™ BRL. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was manufactured by Sigma®.

Plant Material

C. heliotropiifolius (Euphorbiaceae) leaves were collected in July 2015 in the urban area of Garanhuns city, Pernambuco State, Brazil (Latitude: -8.89074, Longitude: -36.4966 8° 53'

27" Sul, 36° 29' 48" Oeste). The plant was identified by the Dárdano de Andrade Lima herbarium in the Agronomic Research Institute (IPA). It was registered in the referred herbarium under the catalog number 90440 in which an exsiccatae was deposited.

Extraction of Compounds

The extract composed of plant leaves was prepared by soaking and maceration (Cechinel Filho et al., 1988). About 150 g of powdered material was taken in a clean, flat bottomed glass container and soaked in 200 mL of methanol. The container with its contents was sealed and kept for a period of 10 days accompanying occasional shaking and stirring. Next, filtration was performed followed by evaporation of all solvent to obtain the crude extract. The presence of flavonoids, alkaloids and coumarins was tested by thin layer chromatography (TLC). The mobile phase used for flavonoids and alkaloids was ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water (AcOEt- HCOOH-AcOH-H₂O 100:11:11:27v/v), for coumarins ether-toluene- acetic acid 10% (50:50:50v/v) was used. The visualization reagents used for flavonoids and alkaloids were respectively etilborilaminoester acid (*Neu*) and Dragendorff. For Coumarins, the visualization method used was UV light on 365nm (Wagner et al., 1996). The presence of saponins was tested by mechanical shaking of the extract and visualization of foam. Formation of foam for 15 minutes was considered as positive for presence of saponins (Dewick, 2002). The presence of tannins was investigated by addition of iron chlorine 0,5M to the hydrated form of extract. In this method, the formation of blue precipitate indicates the presence of hydrolysed tannins awhile green precipitated the presence of condensed tannins (Matos, 1997). HPLC was conducted in model Shimadzu®HPLC LC-10, XBridge C18 column with 4,6 mm x 250 mm dimensions, 5µm of particle size and 0,7mL/min flow. The solvent system displayed; 94% of H₂O and 6% of acetonitrile on 0 minute (A), 65% of H₂O and 35% of acetonitrile on 8 minutes (B), 94% of H₂O and 6% of acetonitrile on 9 minutes (C); with 40µL of injection volume and sample concentration of 20 mg / mL in 50% MeOH. Identification was performed using the standard method and external integration of the peaks at 256 nm for gallic acid. The spectroscopic profile of the extract was obtained by Fourier transform infrared spectroscopy

(FTIR). In the semisolid state, the extract was pressed against the diamond crystal of the equipment. Next, readings were recorded. The FTIR spectrum was obtained in less than 30 seconds and results compared against standards samples from the library. An aliquot (10ml) of the extract (1mg) diluted in MeOH (100%) was used to obtain the UV-visible spectrum, using the wavelength range of 200 to 700nm.

Cytotoxic Activity

Cytotoxic activity was tested by MTT assay on tumour cell lines. DMEM culture medium was used for incubation of NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma) MCF-7 (human breast adenocarcinoma), and Hep-2 (human laryngeal carcinoma) cells. HL-60 (acute promyelocytic leukaemia) cells were cultured in RPMI medium. In detail, all culture medium was supplemented with fetal bovine serum (10%) and antibiotic solution (1%) of penicillin and streptomycin. Cells were incubated on 37 °C in rich humidity and 5% CO₂.

Cells were cultured on a 96 well plate and incubated for 24 hours prior to addition of 50ug/ml of the extract dissolved in 1% DMSO. NCI-H292, HT-29, Hep-2 cell lines were incubated with initial concentration of 10⁵ cell/mL and HL-60 containing 3 x 10⁵ cell/mL. After a total of 72 hours of incubation, 25 µL of MTT (5 mg/mL) was added to the culture. After 3 hours of incubation, the culture medium was removed by aspiration, and 100ul of DMSO (1%) added to each well. Control samples received doxorubicin (50 µg/mL) for inhibition purposes. This method enables the visualization of enzymatic activity by formation of purpura colour. A plate reader was used to obtain absorbance values in the wavelength of 560nm and cell viability values expressed in percentage in comparison with a negative control, considered as “100% inhibited”. The experiment was performed with four sample replicates.

Statistical Analysis

The percentage of growth inhibition was calculated through descriptive statistics methods on GraphPad Prism 5.0 software, for all cell lines.

RESULTS AND DISCUSSION

Results from this study showed the methanolic extract of *C. heliotropiifolius* leaves have a chemical profile similar to its genre and to the majority of Euphorbiaceae family members. Thin-layer chromatography (TLC) identified the presence of flavonoids and the absence of alkaloids and coumarins. In addition, an alkaloid was identified in the root skin (Schoefs, 2002).

The test for presence of saponins revealed their absence. In fact, such result has been reported in another specie of the genre, *Croton linearifolius* (Cunha et al., 2014). Experiments showed the extract did not contain condensed tannins although they have been detected in such specie (Randau et al., 2004).

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) identified Gallic acid with retention time of 1.80 min. The hydrolysis of esters bonds on gallic acid have been reported as a natural defence mechanism (Matias et a., 2010).

FIGURE 1

The spectrum within the infrared region (Figure1) revealed a band in the region of 3271 cm^{-1} suggesting the presence of O-H in association to amides. The band in the region of 2958 cm^{-1} suggests the presence of C-H aliphatic. The region of 1661 cm^{-1} shows the presence of carbonyl, aliphatic ketones and esters. Those compounds may be related to esters from the gallic acid. Absorbance within the region of 1478 cm^{-1} refers to C=C. The range between 1140-1200 cm^{-1} indicates the presence of sulphones.

FIGURE 2

The UV spectrum (Figure 2) showed four absorbance bands with maximum values of 268, 316, 406 and 665 nm. Absorbance bands within 266-295 nm indicated the presence of simple phenols. The spectrum typically displays two maximum absorbance values for flavonoids; in 240-285 nm and 300-550 nm (Silva, 2015). Our results come in accordance to these values as demonstrated by chromatography and infrared spectrum results.

FIGURE 3

The toxicity of several secondary metabolites, present in vegetal, have been described (Silva et al., 2012). Flavonoids have their cytotoxic activity established in different tumour cells (Costa-Lotufo et al., 2003).

Experiments demonstrated cellular growth inhibition of 59,5%, 21,7%, 26,7% and 46,5% on the respective cell lines HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292 (Table 1). Percentage values of 1-20% were classified as “without inhibitory activity”, between 20-50% as “low inhibitory activity”, for values between 50-70% as “moderate inhibitory activity“, and as “high inhibitory activity” for 70-100% (Andrade et al., 2015).

TABLE 1

The extract here tested demonstrated to be more effective on acute promyelocytic leukaemia (HL-60) cells, with moderate growth inhibition. In a similar investigation, essential oil of *Croton zehntneri*, containing its major compound estragole, was tested on NCI-H292, MCF-7 and Hep-2 cell lines. Results revealed numbers lower than 20% of growth inhibition (Andrade et al., 2015). This study demonstrates that the physical-chemical profile of the extract is composed of phenolic compounds, flavonoids, and hydrolysed tannins. On the other hand, it devoid alkaloids and coumarins. The cytotoxic evaluation, within the conditions here tested,

showed low inhibition rates on NCI-H292, MCF-7, Hep-2 cells but moderate on HL-60 cells which is potential for further investigations.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank the Nacional Semi-arid Institute (INSA), the Biophysics and Chemistry laboratory and the Antibiotics department of the Federal University of Pernambuco (UFPE). This work was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

CONFLICT OF INTEREST

All authors have none to declare.

REFERENCES

- Andrade TC, Lima SG, Freitas RM, Rocha MS, Islam T, Silva TG, Militao GC (2015). Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *croton zehntneri* (euphorbiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(1), 173-182.
- Cechinel Filho V, Yunes RA (1998). Strategies for obtaining compounds pharmacologically active from medicinal plants. Concepts about structural changes to optimize the activity. *Química nova*; 21(1), 99-105.
- Chu E, Sartorelli AC (2004). Cancer chemotherapy. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*, 9th ed. U.S.A. Portland, OR: McGraw-Hill; 888–930.
- Costa-Lotufo LV, Jimenez PC, Wilke DV, Leal LKA, Cunha G, Silveira ER, Pessoa C (2003). Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* AC Smith. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(9-10), 675-680.
- Cunha SL, Gualberto SA, Carvalho KS, Fries DD (2014). Evaluation of the larvicidal activity of extracts obtained from *Croton linearifolius* Mull stem. Arg. (Euphorbiaceae) on larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Biotemas*, 27(2), 79-85.
- Dewick PM (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.

Dória GA, Silva WJ, Carvalho GA, Alves PB, Cavalcanti SC (2010). A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutical biology*, 48(6), 615-620.

Erharuyi O, Adhikari A, Falodun A, Jabeen A, Imad R, Ammad M, Gören N (2017). Cytotoxic, anti-inflammatory, and leishmanicidal activities of diterpenes isolated from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Planta medica*, 83(01/02), 104-110.

Freshney RI (2000). *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 4a Edn. Indianapolis, In: WileyLiss.

Matias EF, katiucia Santos K, Almeida TS, Costa JG, Coutinho HD (2010). In vitro antibacterial activity of *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. and *Cordia verbenacea* DC. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(3).

Matos FJA (1997). *Introduction to experimental phytochemical*, 2º edition., Ed. UFC: Fortaleza.

Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP, Xavier HS (2004). Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* HBK and *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm.(Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(2), 89-96.

Schoefs B (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in food science & technology*, 13(11), 361-371.

Silva LB, Torres EB, Silva KF, Souza JSN, Lopes MS, Andrade LH, Xavier ZF (2012). Toxicity of ethanolic extract of *Croton heliotropiifolius* in weevil populations of stored maize grains. *J. Entomol*, 6, 413-421.

Silva RV (2015). Excerpt from the fruits of *Spondias purpurea* L. as the active ingredient for formulation fitocósmética fotoprotetora. Feira de Santana. Dissertation, Estadual University of Feira de Santana.

Simões CMO, Schenkel E P, Melo JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2004). *Pharmacognosy: from the plant to the medicine*. 5ºedition. Porto Alegre/Florianópolis: Publisher of UFRGS / Publisher UFSC.

Victório CP, Kuster RM, Lage CLS (2007). Light quality and photosynthetic pigment production in in vitro plants of *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(02), 213-215.

Wagner H, Bladt S (1996). *Plant drug analysis*. 2.ed. New York: Springer Verlag.

World Health Organization (WHO) (1981). Intestinal protozoan and helminthic infections.

Tech. Rep. Ser. 666:1-150.

Yankep E, Njamen D, Fotsing MT, Fomum ZT, Mbanya JC, Giner RM, Ríos JL (2003). Griffonianone D, an Isoflavone with Anti-inflammatory Activity from the Root Bark of *Millettia griffoniana* 1. *Journal of natural products*, 66(9), 1288-1290.

Ye H, Fu A, Wu W, Li Y, Wang G, Tang M, Yang J (2012). Cytotoxic and apoptotic effects of constituents from *Millettia pachycarpa* Benth. *Fitoterapia*, 83(8), 1402-1408.

FIGURE 1-

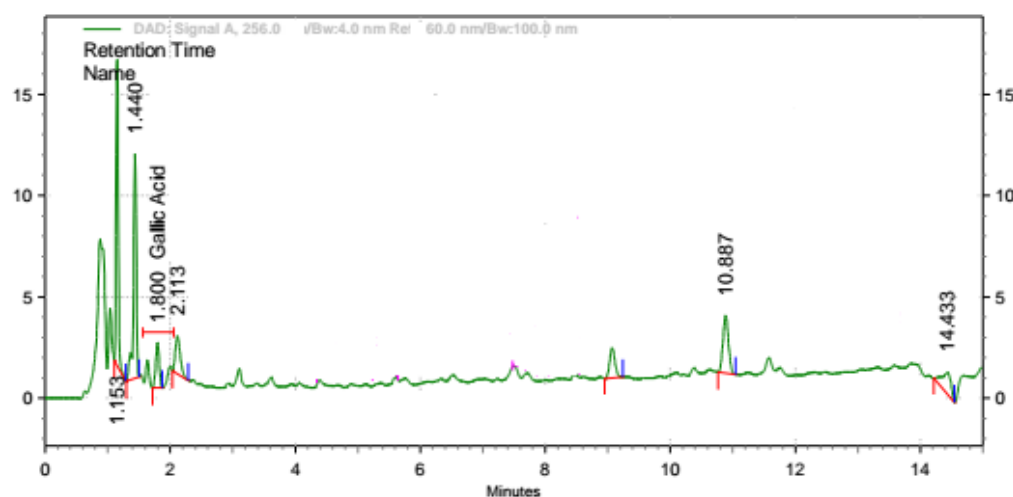


Figure 1. HPLC chromatogram shows the presence of gallic acid in the extract.

FIGURE 2-

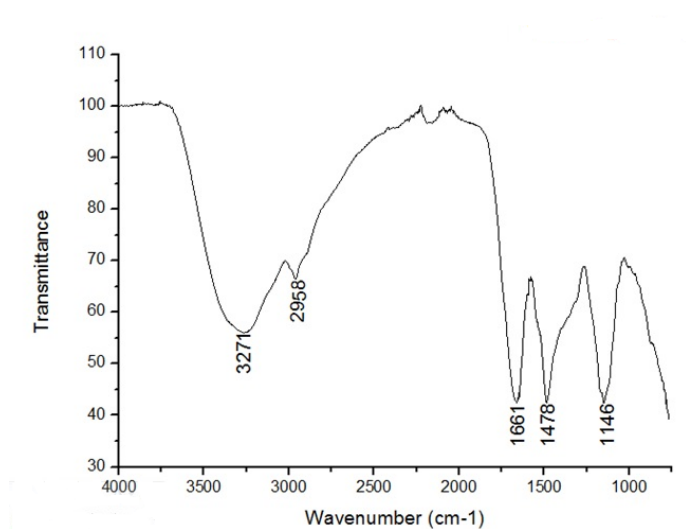


Figure 2. Infrared Spectrum (FTIR) of the methanolic extract of *C. heliotropiifolius*

FIGURE 3-

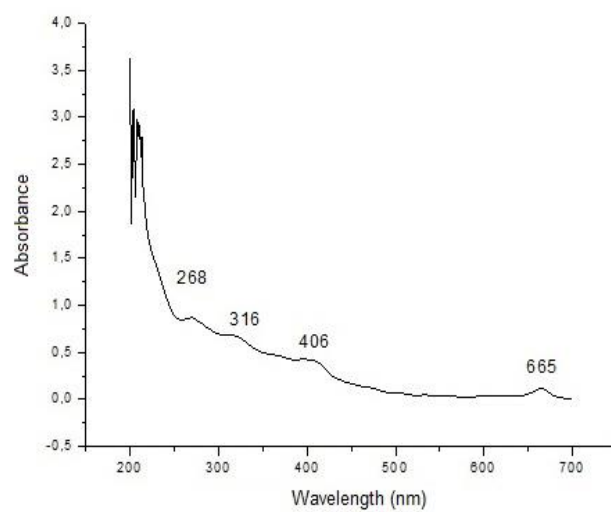


Figure 3. Ultraviolet-visible spectrum of the methanolic extract of *C. heliotropiifolius*

TABLE 1. Percentage of inhibitory activity of *C. heliotropiifolius* extract on HL-60, MCF-7, Hep-2 e NCI-H292 cells.

Cell line	<i>C. heliotropiifolius</i> extract (%)	Doxorubicin (%)
HL-60	59,5 ($\pm$ 2,9)	92,9 ($\pm$ 0,6)
MCF-7	21,7 ($\pm$ 3,7)	79,4($\pm$ 2,6)
Hep-2	26,7 ($\pm$ 7,1)	79,4($\pm$ 2,6)
NCI-H292	46,5 ($\pm$ 2,6)	94,1($\pm$ 1,9)