



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS



**PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DOS CAULES DE *Croton linearifolius* (EUPHORBIACEAE)**

MATEUS SANTOS BRITO

ITAPETINGA

2014

MATEUS SANTOS BRITO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, área de concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Andrade Gualberto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Deitos Fries

ITAPETINGA

2014

583.69 Brito, Mateus Santos.
B876p Prospecção química e avaliação da atividade antioxidante de extratos dos caules de *Croton Linearifolius* (Euphorbiaceae). / Mateus Santos Brito. - Itapetinga: UESB, 2014.
47f.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, área de concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação da Profa. D.Sc. Simone Andrade Gualberto e co-orientação da Profa. D.Sc. Daniela Deitos Fries.

1. Croton – Extrato - Antioxidante. 2. Croton linearifolius – Radicais livres. 3. Caatinga. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Gualberto, Simone Andrade. III. Fries, Daniela Deitos. III. Título.

CDD (21): **583.69**

Catálogo na fonte:
Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Croton – Extrato - Antioxidante
2. Croton linearifolius – Radicais livres
3. Caatinga

MATEUS SANTOS BRITO

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE EXTRATOS DOS CAULES DE *Croton linearifolius* (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

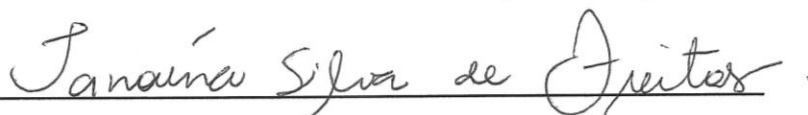
Aprovada em: 24/02/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Simone Andrade Gualberto (ORIENTADORA/UESB)

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (UNIVALI)



Prof^a. Dr^a. Janaína Silva de Freitas (UESB)

Prof^a. Dr^a. Janaína Silva de Freitas (UESB)

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa *Aline*, por compartilhar de mais esse objetivo e contribuir de maneira tão rica para conclusão desse trabalho. Sonhar junto com você é certeza de realização!

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus por me dar a vida e a força necessária para vencer todos os desafios.

À professora Dra. *Simone Andrade Gualberto* pela confiança, inspiração, amizade e inestimável orientação.

À professora Dra. *Daniela Deitos Fries* pelo exemplo de profissional e pesquisadora, além de toda motivação passada.

Aos amigos e colegas do NUPESQ, em especial a *Rafael, Kamila, Daiana, Rândila, Matheus, Rômulo e Karine*, pelo companheirismo e ajuda nos momentos de pesquisa.

À nossa estagiária *Renata* por manter o laboratório sempre organizado e os materiais disponíveis sempre que necessário.

Ao professor Dr. *Valdir Cechinel Filho* pelo auxílio, contribuições, conhecimento e recepção em sua “terra”, além da memorável experiência de vida que me acompanharão enquanto eu viver.

À *Adriana Campos* pelo valioso auxílio prestado durante parte do nosso experimento. “*Adri*” sua determinação, simplicidade, e competência são exemplares!

À equipe de colegas e amigos conquistados no Laboratório de Fitoquímica da UNIVALE, em especial à *Ângela* e seu esposo *Marcel*, e à carismática *Luiza* (a “*Lú*”).

Aos Professores *Rivaldo Niero* e *Theodoro Marcel Wagner* pelo conhecimento e disponibilidade.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À UESB por conceder o espaço e os funcionários, os quais foram essenciais para realização desta pesquisa.

À FAPESB pela concessão do Auxílio dissertação.

À todos aqueles que contribuíram, torceram ou esperaram de alguma forma para que essa pesquisa acontecesse.

RESUMO

BRITO, M. S. **Prospecção química e avaliação da atividade antioxidante de extratos dos caules de *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae)**. Itapetinga-BA: UESB, 2014. 47 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).*

A atividade antioxidante dos produtos naturais é de utilidade ímpar, pois doenças degenerativas e crônicas têm sido associadas ao estresse oxidativo originado pelo excesso de radicais livres nas células, provocados por fatores endógenos e exógenos. Substâncias antioxidantes atuam neutralizando ou minimizando o poder deletério das espécies reativas de oxigênio, evitando a oxidação de componentes celulares. Investigar a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos e das respectivas frações, obtidas dos caules de *Croton linearifolius*, e determinar sua composição química foram os objetivos dessa pesquisa. Realizou-se duas coletas na FLONA Contendas do Sincorá-Ba, nos meses de Abril e Setembro de 2013. O rendimento dos extratos foi de 4,44% e 9,12%, calculado a partir da matéria seca. Os extratos EtOH foram fracionados com solventes de baixa polaridade a fim de obter as respectivas frações. A análise qualitativa foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para avaliação de metabólitos secundários. A avaliação da atividade antioxidante do extrato foi determinada por dois métodos espectrofotométricos: o do sequestro de radicais livres DPPH e o do poder redutor de íons ferro (FRAP). Também foi realizada a quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos, através do método Folin-Ciocalteu. A prospecção química demonstrou a presença de compostos fenólicos, terpenóides, esteroides e alcalóides nos extratos. Os ensaios de atividade antioxidante mostraram que as frações acetato de etila foram as mais eficientes como antioxidantes para os dois métodos utilizados. Estimou-se os maiores teores de compostos fenólicos totais nas frações acetato de etila, sendo possível relacionar a atividade antioxidante total com os níveis destas substâncias nas amostras. As pesquisas com *C. linearifolius* são escassas, principalmente do ponto de vista fitoquímico, no entanto, o presente estudo pode auxiliar em futuras pesquisas com a espécie, pois contribui com aspectos ainda pouco explorados dessa espécie, além de indicar a existência de substâncias com potencial antioxidante.

Palavras-chave: Antioxidantes, Radicais livres, DPPH, FRAP, Caatinga.

* Orientadora: Dra. Simone Andrade Gualberto, UESB e Co-Orientadora: Dra. Daniela Deitos Fries, UESB.

ABSTRACT

BRITO, M. S. **Chemical prospecting and antioxidant activity evaluation of *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae) of stems extracts.** Itapetinga-BA: UESB, 2013. 47 p. (Dissertation – Masters Environmental Sciences – Concentration Area in Environment and Development).*

The antioxidant activity of natural products is unmatched utility because degenerative and chronic diseases have been associated with oxidative stress originating from the excess free radical in cells, caused by endogenous and exogenous factors. Antioxidants work by neutralizing or minimizing the deleterious power of reactive oxygen species by preventing the oxidation of cellular components. To investigate the antioxidant activity of ethanol extracts and their fractions, obtained from the stems of *Croton linearifolius*, and determine its chemical composition were the objectives of this research. Held two collections in FLONA Contendas Sincorá – Ba in the months of April and September 2013. The yield of the extract was 4.44 % and 9.12%, calculated on the dry matter. The EtOH extracts were fractionated using solvents of low polarity in order to get the respective fractions. Qualitative analysis was performed by thin layer chromatography (TLC) to evaluate secondary metabolites. The evaluation of the antioxidant activity of the extract was determined by two spectrophotometric methods: the DPPH scavenging free radicals and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Quantification of the phenolic compounds present in the extracts was also performed by the Folin - Ciocalteu method. Chemical prospecting showed the presence of phenolic compounds, terpenoids, steroids and alkaloids in the extracts. For the antioxidant activity showed that the fractions of ethyl acetate were the most effective as antioxidants for the two methods used. We estimated the highest levels of phenolic compounds in the ethyl acetate fractions it is possible to relate the total antioxidant activity with the levels of these substances in the samples. The studies about *C. linearifolius* is scarce, particularly from the point of view phytochemical , however , this study may aid in future research on the species , it contributes largely unexplored aspects of this species , as well as indicating the existence of substances with antioxidant potential.

Keywords: Antioxidants, free radicals, DPPH, FRAP, Caatinga.

* Primary Supervisor: Dsc. Simone Andrade Gualberto, UESB and Secondary Supervisor: Dsc. Sandra Lúcia da Cunha e Silva, UESB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização do bioma Caatinga. 10
Fonte: MMA (2011).
- Figura 2. Áreas desmatadas na Caatinga por município (2008-2009). 11
Fonte: MMA (2011).
- Figura 3. Relação entre metabolismo primário e secundário e principais vias biossintéticas para compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos. 13
Fonte: Adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2009; NETO e CAETANO, 2005.
- Figura 4. Estrutura básica e exemplo das três classes de metabólitos secundários. 14
Fonte: Adaptado de CROTEAU *et al.*, 2009; HAIDA *et al.*, 2011.
- Figura 5. . Aspecto morfológico de *C. linearifolius* coletado em estação chuvosa (a) e seca (b). 19
Fonte: Arquivo pessoal (2013).
- Figura 6. Precipitação média por mês no ponto de coleta 21
Dados: FREITAS *et al.*, (2011).
- Figura 7. Estrutura do DPPH (radical) e DPPH reduzido em reação com um antioxidante genérico. 31
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2009
- Figura 8. Estrutura do complexo Ferro-TPTZ no reagente FRAP na presença de uma espécie doadora de elétrons. 33
Fonte: Adaptado de HUANG *et al.*, 2005.
- Figura 9. Reação de um composto fenólico (ácido gálico) com o íon Mo^{6+} em meio básico, reduzindo-o a Mo^{5+} . 35
Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2009.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento em massa (g) do extrato etanólico e frações de <i>C. linearifolius</i> nas duas coletas realizadas.	27
Tabela 2. Resultados da prospecção química preliminar por CCD dos extratos etanólicos de <i>C. linearifolius</i>	28
Tabela 3. Cinética de reação do extrato etanólico dos caules de <i>Croton linearifolius</i> com o radical DPPH	29
Tabela 4. Resultados da atividade antioxidante expressos em porcentagem de inibição (%) e concentração efetiva 50 (CE ₅₀) dos extratos e frações obtidas dos caules de <i>C. linearifolius</i> , bem como dos padrões positivos sobre o radical livre DPPH.	30
Tabela 5. Resultados da atividade antioxidante das amostras e padrões pelo método FRAP	34
Tabela 6. Teores de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos etanólicos e frações dos caules de <i>C. linearifolius</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APx – Ascorbato peroxidase

BHT - Butilhidroxitolueno

Cat - Catalase

CCD - Cromatografia em Camada dDelgada

CE₅₀ – Concentração Efetiva 50

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG - Equivalentes de ácido gálico

ERO - Espécies reativas do oxigênio

EtOH – Etanólico ou etanol

FRAP - Poder redutor de íons ferro

GPx - Glutationa peroxidase

MMA - Ministério do Meio Ambiente

PAL – Fenilalanina Amônia Liase

PG - Propil galato

SoD - Superóxido dismutase

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	7
1.1 - OBJETIVOS.....	9
1.2.1. Objetivos Gerais.....	9
1.2.2. Objetivos Específicos	9
2 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1. A Caatinga.....	10
2.2. Metabólitos Secundários.....	12
2.3. Estresse Oxidativo e Antioxidantes Naturais.....	15
2.4. O Gênero <i>Croton</i>	18
2.4.1. <i>Croton linearifolius</i>	19
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Local de Coleta e Processamento do Material Botânico.....	21
3.2. Obtenção do Extrato Etanólico.....	22
3.3. Fracionamento do extrato etanólico	22
3.3.1. Fração Hexânica.....	22
3.3.2. Fração Diclorometânica.....	22
3.3.3. Fração de Acetato de Etila.....	23
3.3.4. Fração Hidroalcoólica.....	23
3.4. Prospecção Química.....	23
3.5. Determinação da Composição de Compostos Fenólicos Totais.....	24
3.6. Análise da atividade antioxidante.....	25
3.6.1. Método do sequestro de radicais livres DPPH.....	25
3.6.2. Método FRAP – <i>Ferric Reducinf Antioxidant Power</i>	26
3.6.3. Análise Estatística.....	26
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Rendimento	27
4.2. Prospecção Química Preliminar.....	28
4.3. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	29
4.3.1. Método do DPPH	29
4.3.2. Método do FRAP	33
4.4. Determinação da Composição Química de Compostos Fenólicos Totais	34
5 - CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades de todo o mundo, com representantes de vários táxons vegetais, milhares de espécies empregadas na medicina popular, e outras tantas ainda por descobrir, o que lhe confere relevante interesse junto à comunidade internacional no tocante ao uso e exploração desses recursos (GIULIETTE *et al.*, 2005).

As plantas trazem numerosos benefícios para o homem, sendo frequentemente utilizadas na terapia tradicional, desde os primórdios da humanidade, por possuírem substâncias bioativas (MENEZES, 2005). Esses compostos, denominados metabólitos secundários, apresentam um grande potencial para aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de agroquímicos, podendo vir a ser utilizados como antioxidantes, estabilizantes, fitoterápicos e inseticidas botânicos alternativos, a serem empregados em substituição ou associados aos compostos sintéticos (LAPA *et al.*, 2007).

A crescente demanda por produtos naturais de origem vegetal, segundo Menezes (2005), se deve à sua disponibilidade, eficácia e facilidade de uso. Contudo, a exploração inadequada desses recursos pode provocar graves impactos ao meio ambiente, levando a perturbações nos ecossistemas (GIULIETTI *et al.*, 2005).

O único bioma exclusivamente brasileiro é a Caatinga, sendo predominante no nordeste. Apesar de ter sido negligenciada até meados do século XX nas pesquisas científicas e políticas de conservação de recursos naturais, sendo considerado um bioma pobre, estudos recentes demonstram que esse tipo de pensamento é uma inverdade, já que muitas espécies têm sido descritas, algumas delas inéditas e exclusivas deste bioma (GIULIETTI *et al.*, 2002). Vale ressaltar que, várias espécies são usadas pelas comunidades tradicionais, incluindo espécies de *Croton*, evidenciando a necessidade na intensificação de estudos sobre essa vegetação, abrindo novos horizontes para a pesquisa e aplicação de produtos obtidos a partir dessa matéria prima (SILVA *et al.*, 2010).

Plantas do gênero *Croton* produzem uma diversidade de constituintes químicos bioativos, muitos deles com propriedades medicinais e inseticidas já comprovadas (SALATINO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010; THUONG *et al.*, 2012). Estudos com espécies desse gênero vêm aumentando entre a comunidade científica

brasileira, tanto no que se refere à investigação das suas propriedades químicas quanto farmacológicas e, dentre elas, destaca-se a atividade antioxidante.

A ação antioxidante de certas classes químicas tem importante papel, visto que os organismos utilizam-se desse recurso para se protegerem das adversidades inerentes ao processo de sobrevivência. A transferência de elétrons representa um dos mecanismos de sobrevivência mais básicos da natureza, pois, a oxidação ocorre naturalmente nos organismos, para permitir-lhes a produção de energia, além de auxiliar em outros processos vitais. Todavia, os radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio, são indesejáveis, por provocarem efeitos deletérios, estando associadas às enfermidades graves e processos de envelhecimento acelerado.

Na indústria de alimentos, a oxidação também é um transtorno, já que diminui o tempo de armazenamento e viabilidade de produtos, o que diminui o faturamento e causa prejuízos. Sendo assim, empregam-se diversos tipos de substâncias sintéticas com ação antioxidante, evitando-se a perda da qualidade nutricional e a decomposição dos produtos (ALVES *et al.*, 2010). Atualmente, o uso de antioxidantes sintéticos tem sido feito com cautela, pois alguns estudos sugerem haver malefícios a médio e longo prazo por consumo prolongado dessas substâncias, abrindo espaço para a busca por novos produtos, principalmente de origem vegetal.

1.1 - OBJETIVOS

1.1.1 - Geral

O Objetivo geral desse estudo foi determinar a composição química e avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações obtidas dos caules de *Croton linearifolius*, coletados em diferentes períodos do ano na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.

1.1.2 - Específicos

1. Obtenção do extrato etanólico dos caules secos e moídos de *Croton linearifolius*;
2. Fracionamento do extrato etanólico, para obtenção das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidroalcoólica;
3. Avaliação qualitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato etanólico;
4. Quantificação dos compostos fenólicos totais presentes no extrato bruto e nas frações obtidas;
5. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações obtidas.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - A Caatinga

A Caatinga (figura 1) é o tipo de vegetação predominante nas regiões de clima semiárido do Nordeste brasileiro. Com mais de 800.000 Km², segundo dados do Ministério do Meio Ambiente - MMA (2011), é o único bioma exclusivamente brasileiro, possuindo ainda um elevado grau de atividade antrópica, colocando-o como uma das áreas de maior importância para preservação.



Figura 1. Localização do bioma Caatinga.
Fonte: MMA (2011).

As plantas neste bioma não possuem características uniformes por se tratar de uma área tão ampla. Alguns caracteres, como o desenvolvimento de tolerância à seca, folhas reduzidas, folhas transformadas em espinhos, suculência e raízes tuberosas (PRADO, 2005; CHAVES e OLIVEIRA, 2004), e os fatores ambientais que os afetam (altas temperaturas, longos períodos de estiagem, baixa umidade do ar), fazem com que estas espécies se distribuam de tal maneira que, suas áreas de ocorrência têm um grau de sobreposição razoável, ou seja, não há uma transição gradativa da vegetação ao longo da paisagem, com trechos se constituindo em verdadeiros “mosaicos” de plantas (CREÃO-DUARTE *et al.*, 2012).

Um alto nível de endemismo é descrito na Caatinga, o que há bem pouco tempo (meados do século XX) era difícil de prever, pois se acreditava que esse

bioma era pobre em espécies e definido como sendo de baixa prioridade para conservação. Contudo, novas pesquisas têm revelado um grande potencial desta região, com a divulgação de um número cada vez maior de espécies vegetais e animais exclusivamente “catingueiros” (LEAL *et al.*, 2003).

Giuliette *et al.* (2002), identificaram 318 espécies botânicas, endêmicas da Caatinga, e salientam que ainda existem outras por descobrir, evidenciando a precariedade do conhecimento sobre esta rica vegetação. A flora da Caatinga apresenta inúmeras plantas utilizadas na alimentação, reflorestamento, medicinal, e se torna crescente o número de estudos com seus representantes.

A urgência em se conhecer e preservar esse bioma é advinda do risco de extinção de inúmeras espécies vegetais que ainda não foram completamente elucidadas, além de outras que nem sequer foram descritas. Em 2007, o MMA publicou um estudo onde fez um levantamento das áreas prioritárias para conservação dos biomas brasileiros, demonstrando que somente cinco por cento do território da caatinga era protegido por unidades de conservação federais, além de identificar 80 áreas de prioridade extremamente alta para conservação, correspondendo a 45% dentre todas as áreas identificadas.

A falta de preservação e a elevada atividade humana têm levado à perda de diversidade biológica (MMA, 2007). Barreiro e Bolzani (2009), afirmaram que a biodiversidade brasileira é a maior do mundo em espécies endêmicas, o que representa importante papel na obtenção de fármacos a partir de produtos naturais. Porém, a caatinga vem sofrendo intensos impactos, tornando cada vez mais séria a situação da perda de cobertura vegetal. A figura 2 apresenta a distribuição do desmatamento na caatinga.

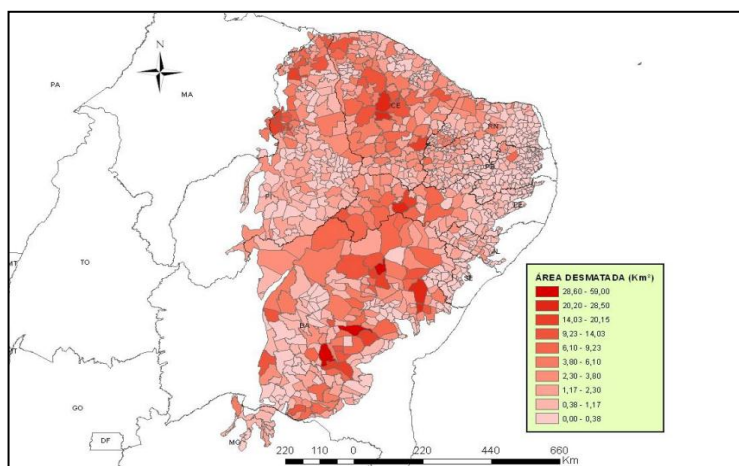


Figura 2. Áreas desmatadas na Caatinga por município (2008-2009).
Fonte: MMA (2011).

Dentre os vinte municípios que mais sofreram esse tipo de degradação ambiental, entre 2008 e 2009, sete se encontram no estado da Bahia, que possui a maior área do bioma (36,4%), trazendo a necessidade de reflexão e redirecionamento das políticas públicas para conservação e uso sustentável das potencialidades do semiárido baiano.

2.2 - Metabólitos Secundários

Em primeira instância, toda a energia disseminada e consumida nos ecossistemas emana do Sol. Os organismos fotossintetizantes têm a capacidade de utilizar a radiação eletromagnética solar para manutenção de suas atividades vitais, através de reações de óxido-redução, pois a água reduz o carbono inorgânico (com a energia fornecida pelo Sol) a carbono orgânico, resultando em água e oxigênio. É evidente que o mecanismo não é tão simples, pois envolve inúmeras enzimas e substâncias intermediárias no processo. Porém, o oxigênio liberado durante a fotossíntese é exclusivamente proveniente da água.

Taiz e Zeiger (2009) mostraram que as substâncias intermediárias e finais do processo fotossintético dos vegetais são precursoras ou coadjuvantes de inúmeras vias metabólicas que agirão na produção de proteínas, lipídeos, aminoácidos, carboidratos, ácidos nucleicos e enzimas. Esses compostos fazem parte do metabolismo primário e possuem relação direta com o crescimento e desenvolvimento do vegetal.

Existe uma ampla gama de constituintes químicos produzidos pelos vegetais, como subprodutos do metabolismo primário, que não participam de forma direta no seu crescimento e desenvolvimento, mas que possuem íntima relação com a adaptabilidade ambiental das plantas, tendo uma significativa importância evolutiva. Esses compostos, frequentemente chamados de metabólitos secundários, não tinham seu papel muito bem compreendido pela Biologia até pouco tempo, pois eram considerados biologicamente insignificantes (CROTEAU, 2009).

Segundo Makkar *et al.* (2007), inúmeros metabólitos secundários apresentam ação alelopática, ou seja, influenciam no crescimento ou desenvolvimento de outras plantas ou animais dos diferentes filós, com efeitos tóxicos ou antinutricionais, o que do ponto de vista ecológico, confere vantagens adaptativas às espécies possuidoras na luta pela sobrevivência. Além disso, várias dessas substâncias têm efeito terapêutico, sendo utilizadas por comunidades

tradicionais, desde tempos remotos. Essas propriedades dos metabólitos secundários despertam o interesse de muitos estudiosos, levando-os a investigarem novos usos e aplicações para estes compostos, nos mais variados campos de pesquisa, servindo, inclusive, como modelos moleculares para a obtenção de compostos sintéticos. Todavia, estas substâncias não estão presentes uniformemente em todas as plantas, sendo algumas classes de constituintes químicos encontradas restritas a determinadas famílias botânicas e em concentrações variadas nos diversos tecidos vegetais (CROTEAU, 2009; MENEZES, 2005).

Esses compostos são obtidos por rotas metabólicas distintas, onde participam enzimas que direcionam a sua biossíntese, de acordo com a necessidade de adaptação e sobrevivência do organismo que os sintetiza, sendo influenciadas por fatores exógenos, como temperatura, pluviosidade e radiação e fatores endógenos, tais como idade da planta, estado nutricional, órgão ou tecido de armazenamento (NETO e CAETANO, 2005).

A figura 3 apresenta resumidamente as principais vias metabólicas para a biossíntese das três principais classes de produtos naturais.

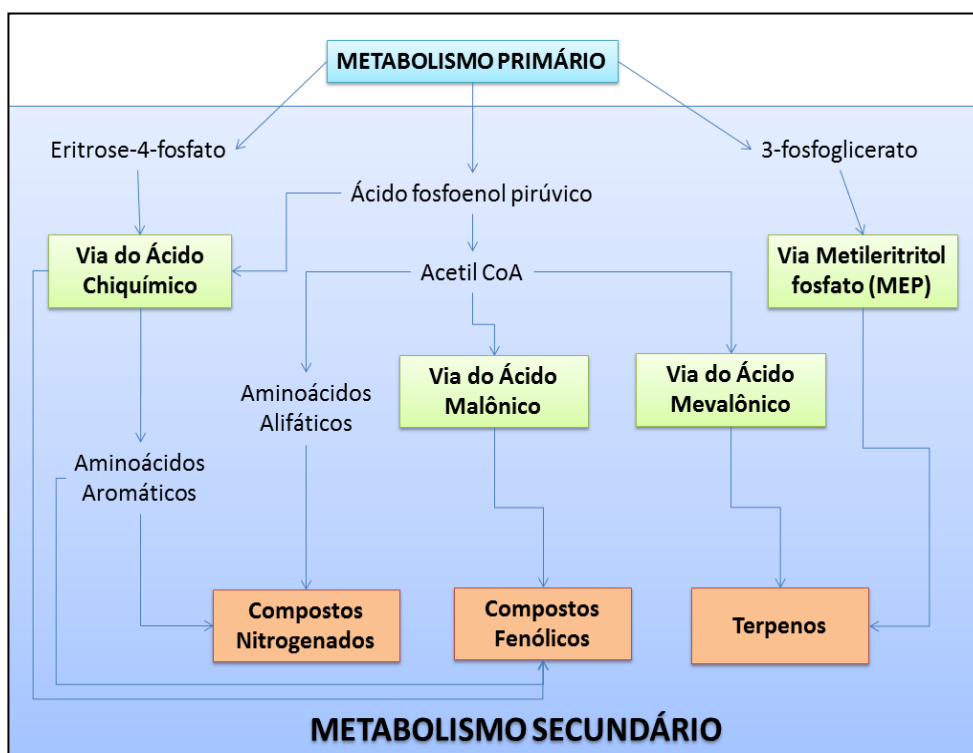


Figura 3. Relação entre metabolismo primário e secundário e principais vias biossintéticas para compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos. Fonte: Adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2009; NETO e CAETANO, 2005.

Os terpenos (ou terpenóides) são constituídos por unidades de isopreno (u.i) e, por isso, são com frequência também chamados de isoprenóides (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Inúmeras são as aplicações dos terpenos, tendo funções contra insetos e herbívoros, ação antibiótica, antitumoral e inseticida, sendo a maior classe de compostos secundários, em geral possuindo baixa ou nenhuma solubilidade em água. Originam-se do acetil CoA, através do ácido mevalônico, ou por meio de uma rota alternativa conhecida como rota do metileritritol fosfato – MEP, formando “polímeros” de isopreno (figura 4), contendo número de carbonos múltiplos de 5 (TAIZ e ZEIGER, 2009; CROTEAU *et al.*, 2009).

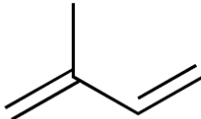
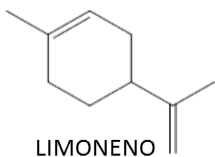
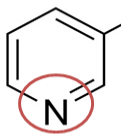

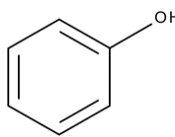
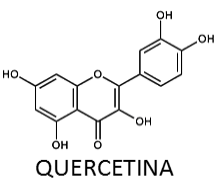
CLASSE DE METABÓLITO	ESTRUTURA BÁSICA	EXEMPLO
TERPENOS	 ISOPRENO	 LIMONENO
ALCALOIDES	 N	 NICOTINA
COMPOSTOS FENÓLICOS	 FENOL	 QUERCETINA

Figura 4. Estrutura básica e exemplo das três classes de metabólitos secundários.

Fonte: Adaptado de CROTEAU *et al.*, 2009; HAIDA *et al.*, 2011.

Os compostos nitrogenados (alcaloides), por outro lado, são sintetizados a partir de aminoácidos alifáticos (quando o precursor é o acetil-CoA) ou aromáticos (quando originados do ácido chiquímico). Esses compostos geralmente possuem átomo ou átomos de nitrogênio ligados a cadeias de hidrocarbonetos cíclicos, formando heterociclos, sendo solúveis em água (BARREIRO e BOLZANI, 2009). É a classe de metabólitos secundários mais conhecida, pois muitos alcaloides apresentam efeitos sobre o sistema nervoso central, sendo utilizados desde a antiguidade como venenos ou alucinógenos (figura 4).

Os compostos fenólicos são uma classe química diversificada em estrutura, que têm como principal característica a presença de um ou mais anéis aromáticos, ligados a hidroxilas livres ou substituídas (CARVALHO *et al.*, 2007), conforme mostra a figura 2. Porém, essa estrutura básica se complexifica de tal forma que permite a formação de milhares de derivados (ANGELO e JORGE, 2007). Esses derivados são originalmente obtidos nos vegetais por duas vias: a do ácido chiquímico e do ácido malônico, sendo a primeira via a mais importante, responsável pela produção da maior parte desses compostos. A partir do aminoácido fenilalanina (ou tirosina), a fenilalanina amônia liase - PAL (*phenylalanine ammonia lyase*) remove uma amônia, convertendo o aminoácido em ácido *trans*-cinâmico, precursor da síntese de inúmeros fenilpropanoides, pertencentes a diferentes classes de compostos fenólicos, como flavonoides, ligninas, taninos, entre outros (CROTEAU *et al.*, 2009; HAIDA *et al.*, 2011).

Com a descoberta das propriedades anticarcinogênicas e antioxidantes dos compostos fenólicos, um grande número de pesquisadores iniciou uma ampla discussão sobre sua aplicação, como alternativa aos fármacos e antioxidantes sintéticos (ANGELO e JORGE, 2007). Esses metabólitos, amplamente distribuídos na natureza, podem influenciar a qualidade da produção alimentícia, além de produzirem baixos resíduos tóxicos, que contaminariam a água e o solo, causando sérios riscos aos ecossistemas e à sociedade.

2.3 - Estresse Oxidativo e Antioxidantes naturais

Como os organismos estão frequentemente expostos a condições ambientais adversas, é possível que ocorra alterações decorrentes do excesso ou da ausência de componentes ambientais, tanto físicos quanto químicos. A essas alterações chama-se estresse, existindo diversas maneiras de caracterizá-lo. Em plantas, por exemplo, dependendo do fator que o desencadeia, este pode ser hídrico, quando há mudanças no potencial hídrico do solo, fazendo com que a planta evite ou tolere o déficit de água; salino, quando o teor de sais solúveis no solo encontra-se em concentrações elevadas; de congelamento, calor, alagamento e oxidativo, resultante da ação de radicais livres das chamadas espécies reativas de oxigênio (BRAY *et al.*, 2009).

Esse último tipo de estresse afeta todos os seres vivos aeróbios, sendo desencadeado por inúmeros fatores, como ações antrópicas (poluição do ar, uso de

herbicidas), fatores ambientais extremos (metais pesados, radiação ultravioleta, condições de alta luminosidade), senescência (nos vegetais), apoptose (nos animais), respostas a organismos patogênicos, além de outro estresse predecessor (estresse hídrico, estresse pelo calor, estresse salino, etc.) (SCOTTI *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo é extremamente danoso aos organismos vivos, mas na maioria das vezes é produzido por eles próprios, havendo a necessidade de mecanismos de defesa que o previna (BROINIZI *et al.*, 2008). Em condições estressantes os organismos vivos e, dentre eles os vegetais, tendem a produzir alterações no seu metabolismo, a fim de reajustar as rotas metabólicas, visando à diminuição na produção das Espécies Reativas do Oxigênio – ERO (CHAGAS, 2007). Os radicais livres de oxigênio singlete (1O_2), muitas vezes gerados pela cadeia mitocondrial ou cloroplástica de transporte de elétrons, desencadeiam a formação de outras espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas ($\cdot OH$) e peridroxil ($HO_2\cdot$), que provocam sérios danos aos lipídeos da membrana celular, às proteínas e aos ácidos nucléicos (BRAY *et al.*, 2009; BARREIROS e DAVID, 2006). Entretanto, apesar do seu potencial para causar danos às células vegetais, o ânion superóxido, sendo o mais estável dentro das ERO, também atua como sinalizador para diversos mecanismos de resposta a patógenos, além de ser requerido, juntamente com o H_2O_2 no processo de lignificação (CARPITA e MACCANN, 2009).

Mesmo hostis aos organismos, as ERO são necessárias, em determinada quantidade, para vários processos fisiológicos, com papéis importantes na geração de energia, sinalização e defesa celular. Entretanto, se acumuladas excessivamente, podem produzir oxidação exagerada e conseqüente dano às estruturas intracelulares, culminando na morte da célula (KOTCHONI e GACHOMO, 2006). Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio sejam responsáveis por moléstias graves, com alto poder deletério, já que afeta a homeostase celular, provocando envelhecimento precoce, aterosclerose, doenças cardíacas, neurodegenerativas, câncer, entre outras (ALVES *et al.*, 2010; ROESLER *et al.*, 2007; SCOTTI *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2005). Para enfrentar tal desafio, os organismos possuem um sofisticado sistema de regulação da produção de radicais livres, distribuídos entre as diversas estruturas celulares, não de maneira uniforme, mas de forma específica a cada compartimento intracelular (FELIU, 2011).

De maneira geral, o sistema de proteção antioxidante é bastante flexível, envolvendo compostos enzimáticos e não enzimáticos, que promovem o equilíbrio das ERO. Dentre os componentes enzimáticos que atuam na defesa celular contra o estresse oxidativo, com maior frequência, encontra-se o grupo das superóxido dismutases - SoD (Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD), catalase (Cat) e ascorbato peroxidase (APx), que são cruciais no controle das concentrações de O_2^- e H_2O_2 . De acordo com Asada (2006) e Ramalho e Jorge (2006), uma SoD age primariamente na conversão de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio que, por sua vez, serve como substrato para a APx e Cat, sendo que a sensibilidade da APx à concentração de H_2O_2 é da ordem de micromolar (μM) e da Cat da ordem de milimolar (mM), o que pode demonstrar diferenças funcionais, com APx e Cat, atuando no controle das ERO em estado homeostático e estressado, respectivamente (ROSA, 2008; NUNES, 2007).

Dentre as moléculas não enzimáticas que apresentam ação antioxidante encontram-se os carotenoides, a bilirrubina, o ascorbato, a glutathione reduzida, o alfa-tocoferol, dentre outras, sendo que o ciclo do ascorbato-glutathione constitui-se na via antioxidante mais importante nos vegetais (BRAY *et al.*, 2009) e os tocoferóis e o ácido ascórbico, na principal defesa antioxidante em humanos (BARREIROS e DAVID, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2005). Além disso, várias substâncias atuam como antioxidantes naturais, sem necessariamente estar presentes nos sistemas antioxidantes do organismo, como é o caso do licopeno, um carotenoide que ocorre naturalmente nas plantas, mas não em animais, sendo um poderoso anticarcinogênico (CEFALI *et al.*, 2009), assim como os compostos fenólicos, vastamente distribuídos no reino vegetal, sendo utilizados na dieta humana, na indústrias farmacêutica e de alimentos, por sua eficácia antioxidante comprovada, contribuindo na inibição da peroxidação lipídica e de enfermidades diversas (SOUSA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2008).

Um elevado teor de compostos fenólicos, embora associados à atividade antioxidante, não garante um efeito pleno, pois a eficiência dessas substâncias em interromper a cadeia de reações oxidativas está ligada ao tipo, distribuição e tamanho dos grupos funcionais acoplados ao anel aromático (ANGELO e JORGE, 2007; CARVALHO *et al.*, 2007). As pesquisas se intensificam a cada ano, pois são numerosas as aplicações dos fenólicos, seja na indústria alimentícia para conservação de alimentos, seja na nutrição humana, ou no emprego como

fitoterápicos, havendo a necessidade de aperfeiçoamento nas técnicas de identificação, separação, aplicação e quantificação das várias classes de compostos fenólicos presentes nos vegetais.

2.4 - O Gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae é uma das mais amplas dentro da ordem Malpighiales, com cerca de 8.000 espécies, distribuídas em cinco subfamílias, com morfologia variada e similaridade controversa. Muitas dessas plantas possuem significativo interesse econômico e cultural, tais como a mandioca (*Manihot sculenta*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), coroa-de-cristo (*Euphorbia milii*), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), pinhão-roxo (*Jatropha grossypiifolia*), mamona (*Ricinus communis*), entre outros. Dentre seus representantes, o gênero *Croton* é o segundo maior, com mais de 1200 espécies (LIMA e PIRANI, 2008), se destacando por apresentar potencial para aplicação farmacológica e tecnológica, além de seus metabólitos secundários servirem de protótipos para a produção de inúmeras substâncias biologicamente ativas (SALATINO *et al.*, 2007; NUNES, 2007).

O gênero *Croton* distribui-se naturalmente nas zonas tropicais e subtropicais da África, Ásia e Américas. O Brasil concentra quase 350 espécies, das quais, cerca de 70 espécies descritas somente na Caatinga. As plantas desse grupo apresentam morfologia diversificada, que vai desde pequenas ervas até robustas árvores, de ocorrência cosmopolita e, em sua maioria, produtoras de substâncias com ação cicatrizante, gastroprotetora, antidiarreica, anticâncer, anti-inflamatória e antioxidante (SALATINO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010; FELIU, 2011). Este número não é definitivo, haja vista o polimorfismo deste gênero e um número considerável de espécimes sem identificação nos herbários nordestinos. Apesar disso, a crescente atenção pelo uso de espécies de *Croton* é justificada pelo grande potencial econômico de seus metabólitos secundários, em virtude da possibilidade de aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de agroquímicos (MENEZES, 2005; SALATINO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012; NDHLALA *et al.* 2013).

O gênero *Croton* é rico em constituintes químicos da classe dos terpenóides (principalmente diterpenos) e triterpenóides (pentacíclicos ou esteroidais) (MORAIS *et al.* 2006). Várias espécies têm sido descritas como fontes de diferentes classes de

alcaloides, o que contribui para o aumento da importância do gênero a partir do ponto de vista medicinal. Inúmeras substâncias fenólicas têm sido relatadas, com destaque para flavonóides, proantocianidinas e lignóides (ANGELO e JORGE, 2007).

2.4.1 - *Croton linearifolius*

Estudos com a espécie *C. linearifolius* são pouco encontrados na literatura, provavelmente por ser uma espécie de ocorrência restrita a certas regiões geográficas e, também, por ser encontrada somente em períodos chuvosos (“estação chuvosa”), que, no nordeste do Brasil, vai de meados de novembro ao final de março (PRADO, 2005).

Da análise taxonômica do gênero *Croton*, seção *Lamprocroton*, EE e BERRY (2011) sugerem a inclusão das espécies *C. linearifolius* e *C. burchellii* na seção *Pedicellati* (Euphorbiaceae), por ambos possuírem atributos morfológicos que não se enquadram na seção anteriormente incluídas (como folhas mais estreitas e inflorescências mais contraídas que os demais representantes da seção *Lamprocroton*). Há relatos da ocorrência da espécie *Croton linearifolius* no nordeste brasileiro e também no sul do país, nos estados do Paraná e Santa Catarina (SILVA *et al.*, 2010; FELIU, 2011). Segundo LIMA e PIRANI (2008) o *C. linearifolius* ocorre em áreas de baixa drenagem, sendo um arbusto de porte variável (0,5m – 2,0m) com flores ocorrendo nos meses de janeiro, fevereiro, abril, outubro e novembro.

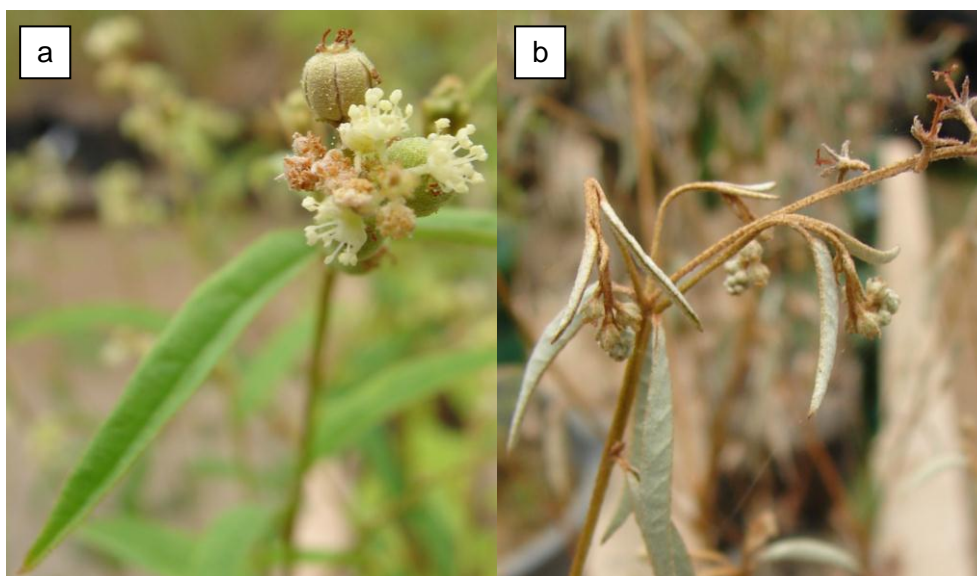


Figura 5. Aspecto morfológico de *C. linearifolius* coletado em estação chuvosa (a) e seca (b).

Fonte: Arquivo pessoal (2013).

Há uma notável diferença morfológica entre espécimes coletadas no período chuvoso e plantas adquiridas no início da “estação seca” (figura 5), não sendo possível coletar amostras vivas fora desse intervalo. No entanto, alguns autores começam a contribuir para o conhecimento da espécie, como Silva *et al.* (2010), que demonstraram as potencialidades inseticidas do extrato etanólico dos caules, Brito *et al.* (2011), que fizeram uma investigação da anatomia foliar, fornecendo parâmetros fisiológicos que auxiliam na elucidação das características adaptativa da espécie, além de outros estudos em curso realizados pelo Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada – NUPESQ, os quais contribuirão para seu conhecimento, conservação e uso sustentável.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Coleta e Processamento do Material Botânico

A espécie *Croton linearifolius* foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (13°56'34.61"S, 41°06'46.75"O), unidade de conservação federal, localizada no município de Contendas do Sincorá-Bahia, no meses de Abril e Setembro de 2013 (coleta 1 e 2). A figura 6 apresenta a precipitação mensal média nos meses de janeiro a setembro de 2013, segundo dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, através do Departamento de Sensoriamento Remoto, de acordo com a metodologia desenvolvida por Freitas *et al.* (2011).

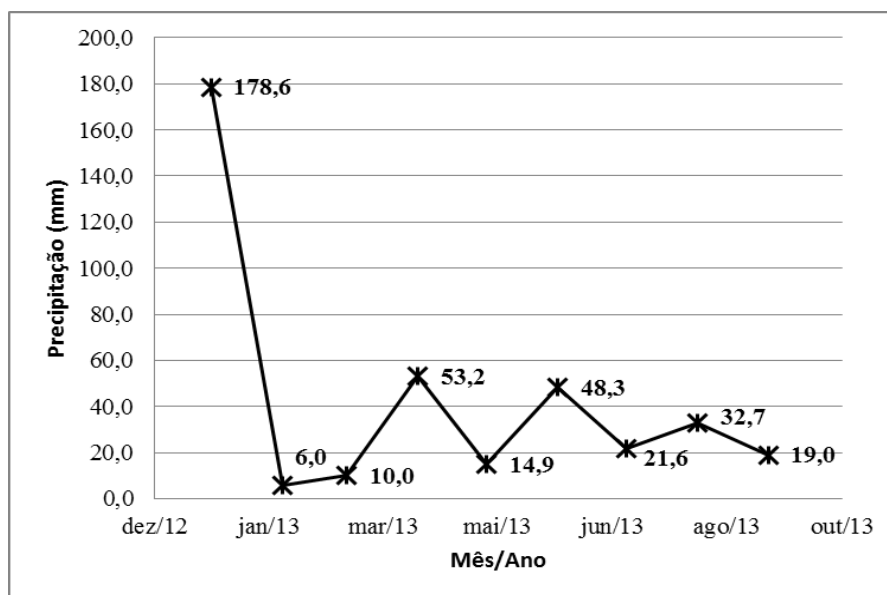


Figura 6. Precipitação média por mês no ponto de coleta
Dados: FREITAS *et al.*,(2011).

O material coletado foi levado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LAPRON, para processamento e análise. Exsiccatas do material botânico foram encaminhadas para o Herbário da Universidade Federal de Feira de Santana (HUEFS), para serem analisadas, identificadas e estão registradas no acervo sob o número HUEFS 146620. Os caules foram separados das folhas, pesados e, posteriormente, colocados em estufa de circulação de ar, a temperatura de 40°C, durante 72 horas, para a realização de uma pré-secagem. Em seguida, foram triturados em moinho de facas, obtendo-se 385,5 g e 135,5 g de caule seco e triturado, referente às coletas 1 e 2, respectivamente.

3.2 Obtenção do Extrato Etanólico

Procedeu-se à extração exaustiva dos caules secos e moídos, em um funil de separação de 2 litros, utilizando-se como solvente etanol a 95% durante sete dias. As fases líquidas reunidas foram transferidas para um balão de fundo redondo e levado para um evaporador rotativo, na temperatura de 50°C a 80 rpm, até a completa eliminação do solvente, para a obtenção do extrato etanólico, que foi armazenado em refrigerador, a temperatura de 5°C, até a realização das análises.

3.3 Fracionamento do extrato etanólico

O fracionamento ou partição do extrato etanólico foi realizado por extração líquido-líquido (ELL), através da solubilização de 10,0 g do extrato em solução hidroetanólica (7:3 v/v), transferência para funil de separação e, em seguida, extração com solventes de menor polaridade, sendo eles: hexano, diclorometano e acetato de etila, para se obter as frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidroalcoólica, respectivamente.

3.3.1 Fração Hexânica

À solução hidroalcoólica do extrato etanólico foram adicionadas porções de 30 mL de hexano, agitando-se pelas paredes do funil com cuidado, até completa extração. A fase inferior foi reservada para a extração com os demais solventes. As frações hexânicas reunidas foram concentradas em evaporador rotativo, até a eliminação da maior parte do solvente, e, posteriormente, o resíduo foi transferido para um frasco previamente pesado, deixando-se secar durante 72 horas a temperatura ambiente e no escuro. Após completa eliminação do solvente, verificada através da ausência do odor característico de hexano, o resíduo seco foi pesado e calculado o rendimento em relação ao peso inicial do extrato.

3.3.2 Fração Diclorometânica

A solução hidroalcoólica reservada após o processo de partição anterior foi então fracionada com porções de 30 mL de diclorometano, até completa extração. As frações de diclorometano foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo, seguindo-se os passos anteriormente utilizados.

3.3.3 Fração de Acetato de Etila

Particionou-se a solução hidroalcoólica reservada da extração com o diclorometano, utilizando-se porções de 30 mL de acetato de etila, seguindo-se o mesmo procedimento descrito no item 3.3.1.

3.3.4 Fração Hidroalcoólica

A fração remanescente foi concentrada em evaporador rotativo, adicionando-se etanol absoluto, até completa eliminação do solvente. O rendimento da fração também foi calculado como no item 3.3.1.

3.4 Prospecção Química

Com o extrato etanólico dos caules de *C. linearifolius* realizou-se a prospecção química, através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se soluções reveladoras específicas para as diferentes classes de compostos orgânicos analisados.

As placas cromatográficas foram preparadas no laboratório, através do espalhamento de uma suspensão de sílica gel em placas de vidro, preparadas com 25 mm de espessura. A suspensão de sílica foi obtida através da agitação de 7 g de sílica gel com indicador de ultravioleta (Marcherey-Nagel) em 15 mL de água deionizada. Após sua preparação, as cromatoplasmas foram secas em estufa de secagem à 110°C, por um período de duas horas, tornando-as ativas para sua utilização.

A análise qualitativa dos constituintes químicos presentes no extrato etanólico foi realizada utilizando-se as soluções reveladoras listadas abaixo, preparadas de acordo com os protocolos descritos.

- Sulfato Cérico (CeSO_4) a 1% em Ácido Sulfúrico (H_2SO_4): pesou-se 2,5 g de CeSO_4 em um béquer e adicionou-se uma quantidade de água deionizada suficiente para dissolver o soluto, transferindo o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 250 mL. Na capela, utilizando-se uma proveta graduada, acrescentou-se 13,6 mL de H_2SO_4 concentrado, e completou-se o volume com água deionizada, agitando o balão para homogeneizar a solução.

- Vanilina a 0,1% em Etanol acidificado com H₂SO₄: em um béquer pesou-se 100 mg de vanilina e dissolveu-se com 20 mL de etanol absoluto, transferindo-se seu conteúdo para um balão volumétrico de 100,0 mL. Acrescentou-se 20 gotas de H₂SO₄ concentrado à solução, completando-se o volume com etanol.
- Ninhidrina a 0,2% em Metanol: em um béquer pesou-se 0,2 g de Ninhidrina e dissolveu-se com metanol, transferindo-se para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com metanol.
- Cloreto Férrico (FeCl₃) a 0,5% em Etanol: em um béquer pesou-se 0,5 g de FeCl₃ e dissolveu-se com quantidade suficiente de etanol. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com etanol.
- Reagente de Dragendorff Modificado: este reagente é preparado através da mistura de duas soluções, A e B. Para preparar a solução A, dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água deionizada; a solução B foi preparada com 16 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água deionizada. O reagente foi obtido misturando-se partes iguais das duas soluções. Transferiu-se 25,0 mL do reagente para um balão volumétrico de 100,0 mL, acrescentou-se 10,0 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume com água deionizada.

Para a identificação dos metabólitos secundários, uma pequena quantidade do extrato etanólico foi colocada em uma placa de toque, solubilizada com uma mistura de etanol e acetato de etila (1:1) e a solução aplicada com um capilar nas placas cromatográficas preparadas, a cerca de 1 cm da parte inferior. Utilizou-se como eluente uma solução de diclorometano e hexano (8:2), em um béquer, no qual as placas cromatográficas foram inseridas na posição vertical, deixando-se eluir até que a fase móvel alcançasse aproximadamente 1 cm da borda superior. Logo após, borrifou-se as placas com as soluções reveladoras descritas anteriormente, colocando-as em placa aquecedora por 60 segundos.

3.5 Determinação da Composição de Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação da composição de compostos fenólicos totais adotou-se a metodologia descrita por Sousa *et al.* (2007), com modificações. Em balão

volumétrico de 10,0 mL, uma alíquota de 500,0 µL da solução do extrato etanólico, na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, foi agitada com 500,0 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6,0 mL de água deionizada por 60 segundos, em ambiente escuro. Após esse tempo, 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15% foram adicionados à mistura e, novamente, agitado por 30 segundos. Finalmente, o volume foi completado para 10,0 mL com água deionizada. Após 2 horas em ambiente escuro, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 750 nm e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato etanólico.

3.6 Análise da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico de *C. linearifolius* foi realizada por dois métodos diferentes, o do sequestro de radicais livres DPPH, e pelo poder redutor de íons ferro (FRAP).

Para a realização dos testes foram preparadas diluições, do extrato etanólico e das frações, em álcool metílico, para obterem-se as concentrações de 5,0 mg.mL⁻¹ (para o método FRAP) e 2,5, 5,0 e 10,0 mg.mL⁻¹ (para o método do DPPH).

3.6.1 Método do sequestro de radicais livres DPPH

A atividade sequestrante do radical livre DPPH foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). Foram adicionados em tubos de ensaio, 100 µL de cada uma das diluições dos extratos etanólicos e das frações (2,5, 5,0 e 10,0 mg.mL⁻¹), bem como os controles positivos, butilhidroxitolueno (BHT), quercetina e rutina (0,25, 0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹), em triplicata. Em ambiente escuro, adicionou-se aos tubos de ensaio, 3,9 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06 mM e homogeneizou-se as soluções em agitador de tubos. A solução de DPPH foi preparada diluindo-se 2,4 mg do reagente 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Sigma-Aldrich) em álcool metílico PA e completando-se o volume para 100,0 mL em balão volumétrico. As soluções foram mantidas no escuro a temperatura ambiente e, após 30 minutos (tempo determinado em ensaio de cinética de reação realizado previamente), foram feitas as leituras em espectrofotômetro de UV-Vis, no comprimento de onda de 515 nm. Foi utilizado como branco a mistura composta de 3,9 mL da solução de DPPH a 0,06 mM e 0,1 mL de álcool metílico.

A curva padrão foi preparada com soluções de DPPH nas concentrações de 10,0 a 60,0 μM , em álcool metílico, medindo-se as respectivas absorbâncias a 515 nm e plotando-se em um gráfico para encontrar a equação de regressão linear.

A partir das leituras das absorbâncias das amostras, foi calculada a Concentração Eficiente 50 (EC_{50}), que corresponde à quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, e o valor final foi expresso em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, além do percentual de inibição, calculado pela fórmula: $\% = [(\text{ABS DPPH} - \text{ABS Amostra}) / \text{ABS DPPH}] * 100$, onde ABS DPPH é a leitura de absorbância da solução de DPPH puro e ABS Amostra a leitura registrada de cada amostra após a aplicação do método DPPH.

3.6.2 Método do FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*

A metodologia do poder redutor dos íons ferro foi realizada como descrito por Rufino *et al.* (2006). A solução do reagente FRAP foi obtida misturando-se 25,0 mL de tampão acetato a 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL da solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, marca Sigma-Aldrich), na concentração de 10 mM em solução aquosa de HCl a 40 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM, utilizando-se logo após seu preparo.

Transferiu-se para tubos de ensaio, 90,0 μL das amostras e dos controles positivos (BHT, Rutina e Quercetina) na concentração de 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, em triplicata e acrescentou-se 270,0 μL de água deionizada e 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizando-se em agitador de tubos. As soluções foram mantidas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, fazendo-se a leitura das absorbâncias ao final desse tempo, a 595 nm. Construiu-se a curva padrão com soluções de sulfato ferroso, nas concentrações de 500,0 a 2000,0 μM . As absorbâncias das amostras foram lidas e os resultados foram expressos em mg de Fe^{2+} / g de extrato.

3.6.3 Análise Estatística

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote STAT do software Statistical Analysis System (SAS) versão 9.0.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Rendimento

O rendimento em massa em relação ao peso seco (massa inicial) dos extratos etanólicos e respectivas frações encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Rendimento em massa (g) do extrato etanólico e frações de *C. linearifolius* nas duas coletas realizadas.

Amostra	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Rendimento %
1. Ex-EtOH 1	385,5 [*]	17,1	4,436
2. Fr-Hx 1	10 ^{**}	2,847	28,470
3. Fr-DCM 1	10 ^{**}	4,304	43,040
4. Fr-AE 1	10 ^{**}	0,030	0,300
5. Fr-HA 1	10 ^{**}	2,776	27,760
6. Ex-EtOH 2	135,5 [*]	12,356	9,119
7. Fr-Hx 2	10 ^{**}	0,748	7,480
8. Fr-DCM 2.	10 ^{**}	2,899	28,990
9. Fr-AE 2	10 ^{**}	0,101	1,010
10. Fr-HA 2	10 ^{**}	2,4924	24,924

Ex-EtOH, Fr-Hx, Fr-DCM, Fr-AE e Fr-HA correspondem respectivamente ao extrato etanólico, fração hexanânica, fração diclorometânica, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica. Os números referem-se à respectiva coleta: 1-Abril/2013; 2-Setembro/2013.

* massa dos caules secos; ** massa do extrato etanólico.

Partindo-se de uma massa inicial de caules secos de 135,5g, contra 385,5g da coleta de abril de 2013, é possível perceber que o rendimento do extrato etanólico da última coleta (setembro de 2013) é superior ao obtido no extrato da primeira coleta. Fatores como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação, estado nutricional, sazonalidade, idade da planta, dentre outros fatores, influenciam de forma direta na produção e qualidade de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Porém, as frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica foram melhores na primeira coleta do que na segunda.

A disponibilidade de água é um dos fatores mais determinantes no desenvolvimento vegetal, estimulando ou inibindo a produção de compostos que auxiliam na aclimação da planta relacionada com a hostilidade das altas

temperaturas, que nas regiões áridas, como a caatinga, são extremas, levando as plantas ao seu limite de tolerância (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Já o rendimento dos extratos etanólicos não alcançou 10% da massa seca inicial utilizada. Acredita-se que a perda de material durante o processo de moagem além da redução da água durante o processo de extração, sejam responsáveis por tal rendimento, todavia, há a necessidade de ensaios que averiguem todos os fatores envolvidos.

4.2 - Prospecção Química Preliminar

As placas cromatográficas foram analisadas de acordo a presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos secundários identificados pelos reveladores, conforme mostrado na Tabela 2. De acordo com os resultados, verifica-se que a espécie produz diferentes classes de constituintes químicos, destacando-se os alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos.

Tabela 2. Resultados da prospecção química preliminar por CCD dos extratos etanólicos de *C. linearifolius*.

Classe de metabólito secundário	Revelador	Coloração Positiva	Resultado
Compostos Aminados	Ninhidrina	Púrpura	+
Terpenoides e Esteroides	Vanilina acidificada	Violeta - Roxo	+
Compostos Fenólicos	Cloreto Férrico	Azul escuro	+++
Alcalóides	Dragendorff (modificado)	Azul - Roxo	++

(+) - Fraco; (++) – Moderado; (+++) – Forte.

Plantas do gênero *Croton*, assim como a maioria das espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, apresentam uma constituição química muito diversa, aumentando os estudos fitoquímicos com essas espécies, ampliando-se as perspectivas para a aplicação de seus constituintes. Pudhom e Sommit (2011) conseguiram isolar um novo diterpeno clerodano e um furano trissubstituído (além de outros seis diterpenos conhecidos), das cascas de *C. oblongifolius*. Outros autores têm demonstrado a presença de flavonoides, alcaloides e uma série de seus derivados, presentes nos diversos órgãos de espécies como *C. lechleri*, *C. urucurana*, *C. zambezicus*, *C. flavens*, *C. pullei*, dentre outras (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2012; SCALON *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011; OKOKON & NWAFOR, 2009).

Como os resultados foram positivos para todas as classes testadas na prospecção química qualitativa, há evidências de que a pesquisa com os compostos isolados de *C. linearifolius* seja bastante promissora, o pode fornecer um panorama mais completo da composição molecular e propriedades farmacológicas dessa espécie, ficando evidente a presença predominante de compostos fenólicos nos extratos etanólicos da espécie.

4.3 - Avaliação da Atividade Antioxidante

4.3.1 - Método DPPH

Para a determinação do tempo ótimo de reação das amostras com o radical livre DPPH, realizou-se o monitoramento das absorbâncias a cada cinco minutos, até a observação de sua estabilização. Os resultados da cinética encontram-se na tabela 3, onde se observa que o decréscimo das leituras de absorbância cessou aos 30 minutos.

Tabela 3. Cinética de reação do extrato etanólico dos caules de *Croton linearifolius* com o radical DPPH

Tempo de reação (min)	Absorbância ABS*	Desvio Padrão DP
0	0,645	± 0,0006
5	0,614	± 0,0035
10	0,596	± 0,0025
15	0,580	± 0,0032
20	0,576	± 0,0035
25	0,575	± 0,0021
30	0,573	± 0,0032
35	0,573	± 0,0032
40	0,573	± 0,0032

*ABS=Absorbância a 515 nm

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da atividade antioxidante, pelo método do sequestro de radicais livres DPPH, dos extratos e frações, expresso em porcentagem de inibição e Concentração Efetiva 50 (CE₅₀).

Tabela 4. Resultados da atividade antioxidante expressos em porcentagem de inibição (%) e concentração efetiva 50 (CE₅₀) dos extratos e frações obtidas dos caules de *C. linearifolius*, bem como dos padrões positivos sobre o radical livre DPPH.

Amostra	Inibição (%) ± DP	CE ₅₀ (µg/mL) ± DP	Equação CE ₅₀ *
1. Ex-EtOH 1	64,31 ± 0,12 ^{bcd}	11,499 ± 0,002 ^f	y = -0,0397x + 0,3893 (R ² =0,9440)
2. Fr-Hx 1	11,53 ± 0,03 ^f	60,326 ± 0,001 ^m	y = -0,0091x + 0,5465 (R ² =0,9933)
3. Fr-DCM 1	26,68 ± 0,07 ^{ef}	25,119 ± 0,002 ^j	y = -0,0216x + 0,5365 (R ² =0,9972)
4. Fr-AE 1	89,90 ± 0,02 ^{ab}	5,952 ± 0,001 ^b	y = -0,0564x + 0,3200 (R ² =0,9990)
5. Fr-HA 1	15,47 ± 0,04 ^f	45,74 ± 0,001 ^l	y = -0,0119x + 0,5410 (R ² =0,9846)
6. Ex-EtOH 2	74,45 ± 0,11 ^{abc}	26,56 ± 0,001 ^j	y = -0,0292x + 0,3128 (R ² =0,9693)
7. Fr-Hx 2	26,68 ± 0,06 ^{ef}	29,895 ± 0,00 ^k	y = -0,0172x + 0,5093 (R ² =0,9987)
8. Fr-DCM 2.	45,58 ± 0,11 ^{de}	15,394 ± 0,00 ^h	y = -0,0327x + 0,4942 (R ² =0,9780)
9. Fr-AE 2	83,47 ± 0,10 ^{ab}	6,117 ± 0,00 ^c	y = -0,0360x + 0,2100 (R ² =0,9989)
10. Fr-HA 2	64,22 ± 0,14 ^{bcd}	10,946 ± 0,00 ^e	y = -0,0414x + 0,4415 (R ² =0,9581)
11. Quercetina	94,15 ± 0,002 ^a	3,192 ± 0,006 ^a	y = -0,0165x + 0,0480 (R ² =0,9992)
12. Rutina	76,46 ± 0,12 ^{ab}	6,741 ± 0,010 ^d	y = -0,0067x + 0,0433 (R ² =0,9988)
13. BHT	48,51 ± 0,13 ^{cde}	13,790 ± 0,005 ^g	y = -0,0374x + 0,5055 (R ² =0,9776)

Ex-EtOH, Fr-Hx, Fr-DCM, Fr-AE e Fr-HA correspondem respectivamente ao extrato etanólico, fração hexanânica, fração diclorometânica, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica. Os números referem-se à respectiva coleta. Letras iguais nas colunas não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

* Equação de regressão para obtenção da CE₅₀ (n=3) seguida do respectivo coeficiente de correlação (R²).

O valor de CE₅₀ de cada amostra foi calculado segundo a respectiva equação de regressão (tabela 4), construída a partir das médias de absorbância das três concentrações usadas (2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL), para extratos e frações e (0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL) para os padrões. Esse parâmetro estima qual é a concentração da amostra (em µg/mL), necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH.

A porcentagem de inibição indica qual é a capacidade das amostras e padrões em sequestrar o radical livre DPPH, sendo que aqueles que produzem um maior percentual de inibição são os mais eficientes. O radical livre DPPH possui em sua estrutura um elétron desemparelhado (Figura 7), que faz com que ele seja muito reativo, agindo como um oxidante e retirando elétrons de compostos que possam estabilizá-lo. Por outro lado, moléculas que têm a capacidade de doar elétrons com maior facilidade (redutoras), reagem rapidamente com o DPPH, produzindo sua redução e promovendo sua estabilidade. Na forma de radical livre, o DPPH apresenta uma coloração violeta, entretanto, quando é reduzido, adquire uma coloração amarela, passando a absorver em comprimento de onda diferente. Essa mudança na absorção dos compostos é utilizada como ferramenta, para que se

possa fazer a quantificação das espécies presentes no meio, por espectroscopia na região do visível, quando colocadas na presença de diferentes compostos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

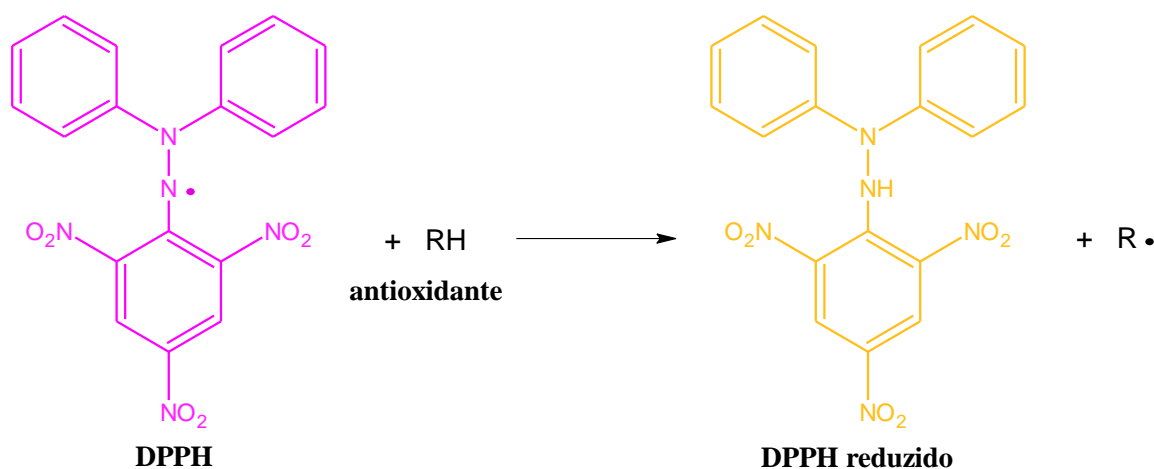


Figura 7. Estrutura do DPPH (radical) e DPPH (reduzido) em reação com um antioxidante genérico.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2009.

Analisando-se a porcentagem de inibição do DPPH produzida pelas amostras, em comparação com os antioxidantes padrões utilizados, quercetina, rutina e BHT, verifica-se que as frações de acetato de etila, obtidas nos diferentes períodos de coleta, foram as que se mostraram mais eficientes (89,90% e 83,47%), igualando-se aos controles positivos mais efetivos, quercetina (94,15%) e rutina (76,46%), superando, inclusive, o BHT (48,51%), um antioxidante sintético muito conhecido e utilizado industrialmente. A porcentagem de inibição produzida pelos extratos EtOH (64,31% e 74,45%) foi equivalente, porém, os resultados encontrados para as outras frações analisadas diferiram significativamente, independente do período de coleta. As frações que se apresentaram menos efetivas para inibir o radical DPPH foram a hexânica (11,53%) e a hidroalcoólica (15,47%) obtidas na primeira extração.

Portanto, a avaliação dos resultados permite afirmar que as frações de acetato de etila são as que apresentam os compostos com maior capacidade antioxidante, uma vez que foram as que produziram o maior percentual de inibição do radical livre DPPH. Em contrapartida, as frações que se mostraram menos ativas frente a esse radical foram as hexânicas e, portanto, são as que possuem a menor quantidade de compostos redutores.

A atividade antioxidante de extratos e frações tem sido atribuída à presença de compostos fenólicos, que são moléculas reconhecidamente redutoras, pelo fato de apresentarem hidroxilas fenólicas em suas estruturas, que podem doar hidrogênio radicalar (H[•]) com facilidade para os radicais livres e, dentre eles, o radical DPPH utilizado no experimento (QAISAR, *et al.*, 2013). Por serem moléculas polares, esses compostos têm mais afinidade por solventes mais polares e, portanto, justifica-se o fato da fração acetato de etila ter sido mais eficiente que as frações hexânicas e diclorometânicas, uma vez que o hexano e o diclorometano são solventes menos polares que o acetato de etila. O extrato etanólico, por apresentar inicialmente compostos de diferente polaridade, apresentou uma eficiência mediana, menor que as frações acetato de etila, porém, maior que as frações hexânica e diclorometânica. Isso pode ser explicado pelo fato de que, no extrato etanólico, compostos de diferentes classes estão presentes concomitantemente, havendo uma interação espacial entre eles, impedindo, muitas vezes, que moléculas redutoras possam doar seus elétrons ou radicais hidrogênio. Já na fração acetato de etila, as moléculas polares estão mais puras, e podem reagir mais facilmente, sem a interferência de outros compostos (NDHLALA *et al.*, 2013).

Com relação às frações hidroalcoólicas, os resultados mostram que na primeira extração, ela apresentou um percentual de inibição equivalente à fração hexânica (15,47%), indicando que apresenta compostos com baixa capacidade antioxidante. Isso é um indicativo de que o processo de fracionamento foi efetivo para separar os compostos presentes no extrato etanólico, ficando os compostos mais ativos na fração acetato de etila e restando na fração hidroalcoólica só os compostos menos ativos. Já a fração hidroalcoólica da segunda extração (64,22%), apresentou um percentual de inibição bem maior que a fração hexânica (26,68%) e equivalente à do extrato etanólico (74,45%), podendo levar a uma suspeita de que o fracionamento não tenha sido totalmente satisfatório, permanecendo alguns compostos mais polares na fração restante, com uma boa capacidade antioxidante.

Os resultados acima apresentados indicam a alta eficiência antioxidante dos extratos e frações de *Croton linearifolius*, pois, em estudos com extratos butanólicos de *C. gratissimus* e *C. zambezicus*, Ndhlala *et al.* (2013), obtiveram valores de CE₅₀ acima de 11 µg.mL⁻¹, enquanto que Qaisar *et al.* (2013), obtiveram valores de CE₅₀ maiores que 390 µg.mL⁻¹ para o extrato metanólico de *C. bonplandianum* e

inatividade para a fração diclorometânica, valores muito superiores aos verificados neste estudo.

4.3.2 - Método FRAP

Esse método se baseia na capacidade que os compostos antioxidantes apresentam em reduzir o íon Fe^{3+} , componente do reagente de FRAP, a Fe^{2+} através da transferência de elétrons (figura 8). Sendo assim, quanto maior a quantidade de íons Fe^{2+} na amostra, maior a capacidade redutora dos compostos nela presentes e, portanto, maior sua atividade antioxidante. Os resultados da atividade antioxidante das amostras e padrões pelo método FRAP, expressos como mg de Fe^{2+} / g de amostra (extrato ou fração de *C. linearifolius*), bem como dos padrões são mostrados na tabela 5. Estes foram calculados inserindo-se os valores médios das leituras das absorbâncias na equação de regressão encontrada para a curva de sulfato ferroso ($y = 0,0007x - 0,0284$) ($R^2 = 0,9997$), onde y é a absorbância a 595 nm e x é a concentração de sulfato ferroso em μM .

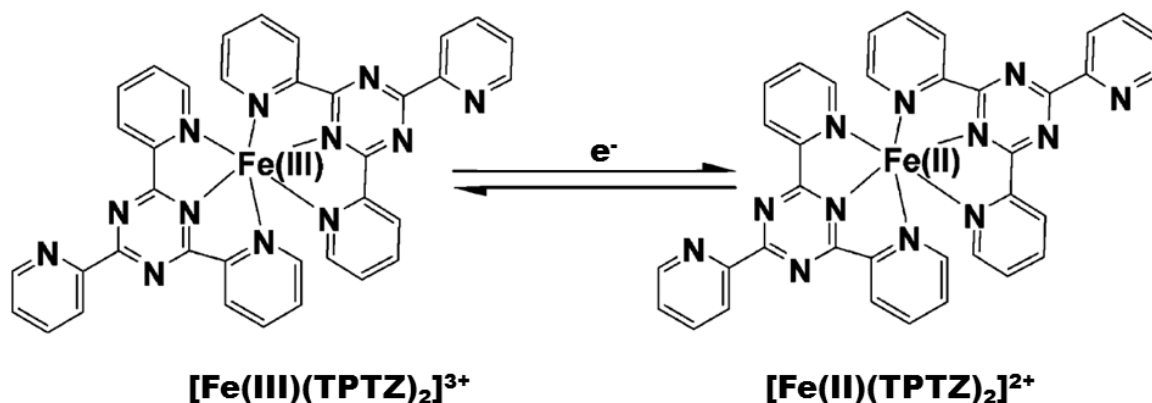


Figura 8. Estrutura do complexo Ferro-TPTZ no reagente FRAP na presença de uma espécie doadora de elétrons.

Fonte: Adaptado de HUANG *et al.*, 2005.

O ensaio FRAP para avaliação da atividade antioxidante mostrou que mesmo neste método as frações acetato de etila dos caules de *C. linearifolius* são eficientes, com destaque para a fração da primeira coleta que obteve níveis equivalentes ao padrão quercetina, além de superar, os padrões rutina e BHT.

Tabela 5. Resultados da atividade antioxidante das amostras e padrões pelo método

Amostra	mg de Fe ²⁺ / g amostra ± DP
1. Ex-EtOH 1	70,085 ± 0,12 ^f
2. Fr-Hx 1	33,499 ± 0,03 ^h
3. Fr-DCM 1	33,899 ± 0,07 ^h
4. Fr-AE 1	174,059 ± 0,02 ^a
5. Fr-HA 1	14,165 ± 0,04 ⁱ
6. Ex-EtOH 2	78,272 ± 0,11 ^e
7. Fr-Hx 2	33,845 ± 0,06 ^h
8. Fr-DCM 2.	63,312 ± 0,11 ^f
9. Fr-AE 2	138,619 ± 0,10 ^c
10. Fr-HA 2	54,085 ± 0,14 ^g
11. Quercetina	167,872 ± 0,002 ^a
12. Rutina	148,939 ± 0,12 ^b
13. BHT	126,699 ± 0,13 ^d

Ex-EtOH, Fr-Hx, Fr-DCM, Fr-AE e Fr-HA correspondem respectivamente ao extrato etanólico, fração hexanânica, fração diclorometânica, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica. Os números referem-se à respectiva coleta.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As amostras menos eficientes, ou seja, as que produziram a menor quantidade de íons Fe²⁺ foram as frações hidroalcoólica 1, hexânicas (1 e 2), dicrometânica 1 e hidroalcoólica 2, verificando-se a produção de menos de 55 mg de Fe²⁺/g de amostra, comportando-se de maneira semelhante ao ensaio com o DPPH.

4.4 - Determinação da Composição de Compostos Fenólicos Totais

O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico, em meio básico. Dessa forma, os íons molibdênio que formam o reagente encontram-se no estado de oxidação 6⁺ (Mo⁶⁺), apresentando uma coloração azulada. Na presença de compostos antioxidantes (moléculas redutoras), elétrons são doados para o íon molibdênio, que passa para o estado de oxidação 5⁺ (Mo⁵⁺), adotando uma coloração amarelada. Como no método de redução do DPPH, essa mudança de coloração é um indicativo da presença de substâncias redutoras no meio e pode ser correlacionada à concentração de compostos antioxidantes (compostos fenólicos, nesse caso) presentes nas amostras (figura 9).

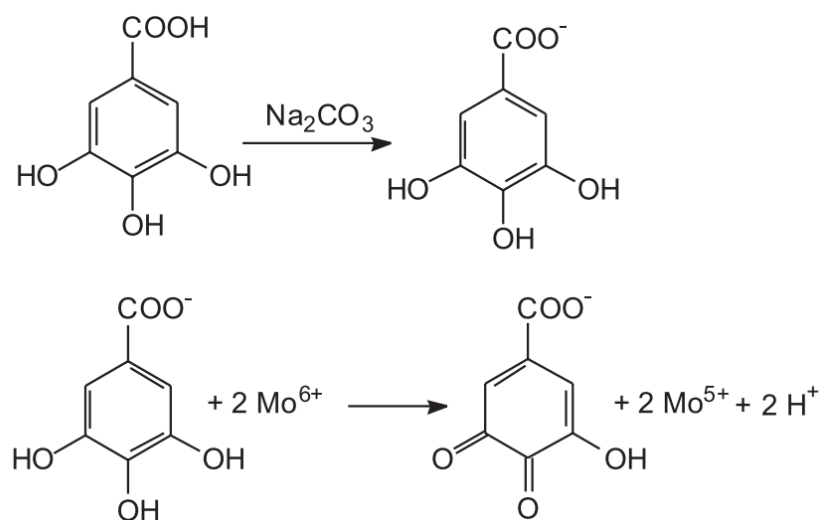


Figura 9. Reação de um composto fenólico (ácido gálico) com o íon Mo⁶⁺ em meio básico, reduzindo-o a Mo⁵⁺.
 Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2009.

Os teores de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos etanólicos e frações dos caules de *C. linearifolius* encontram-se na tabela 6, os quais foram calculados através da equação de regressão $y = 0,0012x + 0,0049$, ($R^2 = 0,9967$), obtida pela curva de calibração do ácido gálico (y é a absorbância a 750 nm e x é a concentração de ácido gálico em mg/L).

Confirmando o que os ensaios do DPPH e FRAP já sugeriam, a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de *C. linearifolius* deve-se, em sua maioria, aos compostos fenólicos presentes nas frações acetato de etila das duas extrações (tabela 6), porém, não se pode descartar a existência de alguma substância com essa propriedade nas demais frações, uma vez que, os resultados de todos os ensaios indicam a presença metabólitos com ação anti-radicalar.

Este método é bastante empregado para a quantificação de compostos fenólicos em extratos e frações obtidas de plantas, pois são a classe de metabólitos secundários presentes em vegetais que apresentam uma maior facilidade em doar elétrons e, portanto, são geralmente associadas à capacidade antioxidante que estas espécies podem apresentar.

No entanto, Angelo e Jorge (2007), afirmaram que a quantificação desses compostos por este método sofre a influência de diversos fatores, que podem estar ligados ao método de preparo das amostras ou de extração, ou ainda à presença de substâncias contaminantes, como pigmentos, resinas, entre outros, que também podem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, produzindo resultados falso positivos, ou que superestimem a quantidade de fenóis no meio. Mesmo assim ainda

é uma técnica espectrofotométrica bastante utilizada, sendo constantemente revalidada para comprovar sua eficácia (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Tabela 6. Teores de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos etanólicos e frações dos caules de *C. linearifolius*

Amostra	mg EAG / g amostra \pm DP
1. Ex-EtOH 1	215,08 \pm 0,023 ^{ef}
2. Fr-Hx 1	120,36 \pm 0,027 ^{gh}
3. Fr-DCM 1	62,58 \pm 0,004 ^h
4. Fr-AE 1	575,08 \pm 0,049 ^b
5. Fr-HA 1	79,25 \pm 0,013 ^h
6. Ex-EtOH 2	184,25 \pm 0,11 ^{fg}
7. Fr-Hx 2	178,97 \pm 0,016 ^{fg}
8. Fr-DCM 2.	371,47 \pm 0,021 ^c
9. Fr-AE 2	538,69 \pm 0,047 ^b
10. Fr-HA 2	272,86 \pm 0,019 ^{de}
11. Quercetina	933,42 \pm 0,047 ^a
12. Rutina	311,19 \pm 0,007 ^{cd}

Ex-EtOH, Fr-Hx, Fr-DCM, Fr-AE e Fr-HA correspondem respectivamente ao extrato etanólico, fração hexanânica, fração diclorometânica, fração acetato de etila e fração hidroalcoólica. Os números referem-se à respectiva coleta.

Letras iguais não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5 – CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos dos caules do *Croton linearifolius* foram obtidos com rendimento em massa inferior a 10%. Com relação às frações, as que apresentaram os melhores rendimentos foram as diclorometânicas.

Os extratos etanólicos e as frações obtidas dos caules de *C. linearifolius* apresentaram potencial antioxidante, quando avaliadas pelos métodos FRAP e DPPH, com destaque para as frações acetato de etila, as quais apresentaram, ainda, os maiores teores de compostos fenólicos, indicando uma relação positiva entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos.

A avaliação qualitativa dos extratos etanólicos por CCD demonstrou a presença de várias classes de metabólitos secundários, como terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos. No entanto, é necessária a realização de outros ensaios para a identificação e quantificação de tais compostos, por métodos analíticos mais específicos, a fim de se determinar inequivocamente os constituintes presentes e sua quantidade na planta.

Esse trabalho fornece parâmetros ecológicos, químicos e farmacológicos sobre o *Croton linearifolius*, espécie pouco estudada e com escassas informações na literatura científica, o que pode ajudar na justificativa de projetos conservacionistas e de desenvolvimento sustentável com a flora do semiárido baiano.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202-2210. 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, v.141, n.6, p. 391-396. 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688. 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BURCHMAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.(s)). *Biochemistry e Molecular Biology of Plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2009. p. 1158-1202.
- BRITO, M. S. *et al.* Anatomia foliar de *Croton linearifolius* Mull. Arg. *Enciclopédia Florescer*, v. 7, n. 13, p. 77-83. 2011.
- BROINIZI, P. R. B. *et al.* Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados em ratos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 4, p. 773-781. 2008.
- CARPITA, N.; MACCANN, M. The Cell Wall. In: BURCHMAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.(s)). *Biochemistry e Molecular Biology of Plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2009. p. 52-108.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia : da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 519-535.
- CEFALI, L. C. *et al.* Tomate salada: uma alternativa como fonte de antioxidante para uso tóxico. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 4, p. 589-593. 2009.
- CHAGAS, R. M. *Alterações fisiológicas e respostas oxidativa de Cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.) tratadas com paraquat*. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.
- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, v.55, n.407, p.2365-2384, 2004.

CREÃO-DUARTE, A. J.; ANJOS, U. U.; SANTOS, W. E. Diversidade de membracíceos (Hemiptera, Membracidae) e sobreposição de recursos tróficos em área do semi-árido. *Iheringia Série Zoologia*, Porto Alegre, v.102, n. 4, p. 453-458, 2012.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G.; Natural Products (Secondary Metabolites). In: BURCHMAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.(s)). *Biochemistry e Molecular Biology of Plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2009. p. 1250-1318.

EE, B. W. van; BERRY, P. E. *Croton* section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a novel new world group, and a new subsectional classification of *Croton* section *Lamprocroton*. *Systematic Botany*, v. 36, n.1, p, 88-98. 2011.

FELIU, D. A. *Análise de Terpenóides de espécies de Croton Sect. Laprocroton (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)*. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

FREITAS, R. M. *et al.* Virtual laboratory of remote sensing time series: visualization of MODIS EVI2 data set over South America. *Journal of Computational Interdisciplinary Sciences*, v. 2, n. 1, p. 57-68. 2011.

GIULIETTI, A. M. *et al.* Plantas endêmicas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B. *et al.*, (ed.). *Vegetação e flora das caatingas*. Recife: APNE / CNIP, 2002. p.103-115.

GIULIETTI, A. M. *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. In: SILVA, J. M. C. da *et al.* (Ed.). *Megadiversidade: Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade no Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional Brasil. 2005. p. 52-61.

GOBBO-NETO, L. LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v.30, n. 2, p. 374-381. 2007.

HAIDA, K. S. *et al.* Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas espécies de goiaba e arruda. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 9, n. 28. 2011.

HUANG, D. *et al.* The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 1841-1856. 2005.

KOTCHONI, O. S.; GACHOMO, E. W. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of Bioscience*, v. 31, n. 3, p. 389-404. 2006.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia : da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 247-262.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C da (Ed.). *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife: Ed. Universitária da UFPE. 2003. 822 p.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect.. *Laprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euforbiaceae s.s.). *Biota Neotropica*, v. 8, n. 2, p. 177-231. 2008.

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. *Pant Secondary Metabolites*. Totowa: Humana Press Inc., 2007. 130 p.

MENEZES, E. L. A. *Inseticidas Botânicos: Princípios ativos, modo de ação e uso agrícola*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p.

MMA - Ministério do Meio Ambiente (BRASIL), Secretaria de Biodiversidade e Florestas. *Áreas Prioritárias para Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira: Atualização - Portaria MMA nº9, de 23 de janeiro de 2007*. Brasília: MMA. 2007. (Série Biodiversidade, 31)

MMA - Ministério do Meio Ambiente (BRASIL), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. *Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA: Monitoramento do bioma Caatinga 2008-2009*. Brasília: MMA. 2011

MORAIS, S. M. de *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Química Nova*, v. 29, n.5, p. 907-910. 2006.

NDHLALA, A. R. *et al.* Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. *Molecules*, v. 18, n. 2, p.1916-1932. 2013.

NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C. *Plantas Medicinais: Do popular ao científico*. Maceió: EdUfal, 2005. 90 p.

NUNES, R. S. *Avaliação da atividade antioxidante e antimutagênica da acerola (Malpighia glabra L)*. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas. 2007.

OKOKON, J. E.; NWAFOR, P. A. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 121, n. 1, p. 74–78. 2009.

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

PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. da (Ed.). *Ecologia e Conservação da Caatinga*. 2 ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. p. 3-74.

PUDHOM, K.; SOMMIT, D. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius*. *Phytochemical Letters*, v. 4, n. 2, p. 147–150. 2011.

QAISAR, M. N. *et al.* Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Capacity of *Croton bonplandianum*. *Baill. American Journal of Plant Sciences*, v. 4, p. 1709-1712. 2013.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v.29, n.4. São Paulo, 2006.

RIBEIRO, S. M. R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativa de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 3, p. 133-149. 2005.

- ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia Alimentícia*, v. 27, n. 1, p.53-60. 2007.
- ROSA, S. B. *Caracterização das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em arroz (Oryza sativa L.)* 2008. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.
- RUFINO, M. S. M. *et al.* *Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.* Comunicado Técnico *On line* Embrapa 127. Fortaleza, CE. Julho, 2007.
- RUFINO, M. S. M. *et al.* *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).* Comunicado Técnico *On line* Embrapa 125. Fortaleza, CE. Dezembro, 2006.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, v. 18, n. 1, p. 11-33. 2007.
- SCALON, S. P.Q. *et al.* A. Germination of *Croton urucurana* L. seeds exposed to different storage temperatures and pre-germinative treatments. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 84, p. 191-200. 2012.
- SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 153-166. 2007.
- SILVA, J. S. *et al.* Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 2, p. 441-453. 2010.
- SILVA, L. B. *et al.* Effects of *Croton urucurana* extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 3, p. 653-664. mai./jun. 2009.
- SILVA, S. L. C. *et al.* Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 4, p. 252-258. 2010.
- SILVA, S. O. *et al.* Identification of (-) (E)-N-[2 (S) -Hydroxy-2- (4-hydroxyphenyl)ethyl] ferulamide, a natural product isolated from *Croton Pullei*: theoretical and experimental analysis. *International Journal of Molecular Science*, v. 12, n. 12, p. 9389-9403. 2011.
- SILVA, M. J. D. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 33, n. 2, p. 267-274. 2012.
- SOARES, M. *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.
- SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundário e defesa vegetal. In:_____. *Fisiologia Vegetal*. Trad. Santarém et al. Porto Alegre: Artmet, 2009. p. 342-372.

THUONG, P. T. *et al.* Symmetric dimers of *ent*-kaurane diterpenoids with cytotoxic activity from *Croton tonkinensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 2, p. 1122-1124. 2012.