



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

THIAGO SILVA DE ALMEIDA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE *Croton campestris* A. ST-HILL**

CRATO, CE

2012

THIAGO SILVA DE ALMEIDA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE *Croton campestris* A. ST-HILL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de Mestre Em Bioprospecção Molecular (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador:

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Co-orientador:

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

CRATO, CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A451e Almeida, Thiago Silva de.
Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de *Croton campestris* A. St-Hill/ Thiago Silva de Almeida. – 2012.
103 f.. : il.

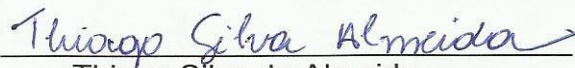
Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Crato, 2012.
Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.
Orientação: Profª Drª José Galberto Martins da Costa.
Coorientação: Profª Drª João Batista Teixeira da Rocha

1. *Croton campestris* 2.Extratos etanólicos 3. Óleos essenciais 4. Atividade antioxidante
I.Título.

CDD 615.32

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

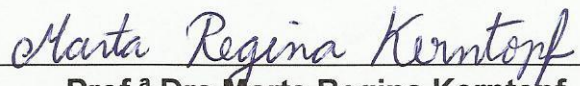
A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

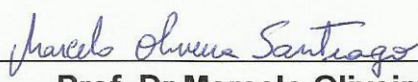

Thiago Silva de Almeida

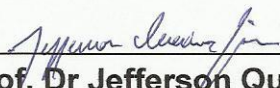
Dissertação apresentada em: 24/07/2012

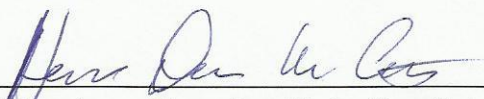
Examinadores:


Prof. Dr José Galberto Martins da Costa (Orientador)
Departamento de Química Biológica – URCA


Prof.ª Dra Marta Regina Kerntopf
Departamento de Química Biológica – URCA


Prof. Dr Marcelo Oliveira Santiago
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr Jefferson Queiroz Lima
Instituto Federal do Ceará – IFCE


Prof Dr Henrique Douglas Melo Coutinho (suplente)
Departamento de Química Biológica – URCA

Dedico este trabalho aos meus pais: José Tarcisio Rodrigues de Almeida e Maria Edleusa Silva de Almeida, exemplos de força, perseverança e dedicação. Eles que sempre confiam e acreditam em mim, não medindo esforços para minha formação acadêmica e crescimento profissional e pessoal, sempre me incentivam a seguir superando todos os obstáculos. **Meus irmãos:** Denise Silva de Almeida e Talysson Silva de Almeida, pelo companheirismo, incentivo e amor, apesar da distância.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**; Ser supremo que guia o caminho de todos com amor e justiça.

Aos animais e plantas utilizadas pelo sacrifício de suas vidas em prol da ciência e do desenvolvimento tecnológico.

Aos meus avôs, **Maria Irenilce Silva Costa e Antônio Nunes da Costa**, por todo apoio, incentivo, confiança e amor.

A minhas tias e tios, que sempre me tratam como um irmão e sempre estão dispostos a me ajudar sendo grandes apoios em minha caminhada.

Ao Orientador; **Prof. Dr José Galberto Martins da Costa da URCA**, pelos ensinamentos, competência, oportunidade, amizade, paciência, incentivo, dedicação e confiança depositada em mim.

Ao Co-orientador; **Prof. Dr João Batista Teixeira da Rocha**, da Universidade Federal de Santa Maria, por me receber em seu laboratório com paciência, sempre me incentivando na busca de informações. Sua participação foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular** na pessoa do Coordenador Waltécio de Oliveira Almeida, do Vice-coordenador Allysson Pontes Pinheiro, e as secretárias Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira.

Aos professores que compõem o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da – URCA e Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica – UFSM, pelo incentivo e pela contribuição ofertada.

A minha turma e todos os meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da – URCA e Ciências Biológicas: Bioquímica

Toxicológica – UFSM, pela torcida, força e amizade durante esse período que estivemos lutando juntos.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, em especial a Profa. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues e aos amigos: Erlânio Oliveira Sousa, Eidla Mikaelle Maciel do Nascimento, Fábio Fernandes Galvão Rodrigues, George Souza Feitoza, Walmir Emanuel Miranda Cunha, Victor Alves, Valéria Christina, Neyrilane Torquato, Camilla Miris, Leonardo Brasil, Héverton Mendes, Josniel Pires da Silva, Leonardo Pinheiro Landim e Aracélio Viana Colares.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Toxicológica: Prof^a. Nilda Vargas Barbosa, Romaiana Picada Pereira, Cristiane Lenz Dalla Corte, Daniel Henrique Ross, Marcelo Reis, Diones Caeran Bueno, Rafael Dias Ferreira, Francielli Vieira, Bruna Karoline Occai, Emily Waczuk, Maria Eduarda Scapin de Moura, André Storti Appel, Jean Poul Kamdem, Daiane Francine Meinerz, Douglas Oscar Ceolin Mariano, Natália Hoffmann Rossi, Tatiane Montanari, Cláudia Vargas Klimaczewski, Jessie Sudati e Alessandro de Souza Prestes.

De forma especial aos amigos: Edinardo Fagner Ferreira Matias, Rogério de Aquino Saraiva, Pablo Andrei Nogara, Angélica Ramos, Fernanda Hernandez, Guilherme Feltraco, Paulo Moreira Bordin, Renata Sampaio, Gerlânide Oliveira Leite, Helenicy Veras, Samara Alves Brito, Liana Oliveira Geraldo Sousa, Manuele Eufrazio Saraiva, Paula Ferreira dos Santos e Francisco Stefânio Barreto.

Aos funcionários, Fernando, Marcos, Silvana e Seu Luís, por estarem sempre disponíveis e pela amizade.

A **Universidade Regional do Cariri – URCA**, pelo espaço cedido e por proporcionar a difusão de conhecimento na região e por ser o local de conclusão de minha graduação em ciências biológicas.

A **FUNCAP, CNPq e CAPES**, pelo suporte financeiro, durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Atodosque direta ou indiretamente fazem parte da minha história e tiveram sua parcela de contribuição.

*“A capacidade de uma pessoa é medida pelos
obstáculos que ela supera.”*

Thiago S. Almeida

*“Não se contente em trilhar um caminho
estabelecido. Ao contrário, vá para onde não há
caminho algum, e deixe seu rastro.”*

Johnnie Walker

RESUMO

Estudos recentes apontam para utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais podendo ser utilizados no auxílio do tratamento de diversas doenças. O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae, compreendendo cerca de 1300 espécies de plantas. Dessas, cerca de 50 ocorrem na região nordeste do Brasil destacando-se a espécie *Croton campestris* conhecida popularmente como “velame-do-campo”. Essa espécie é utilizada na medicina popular como poderoso depurativo, no combate à escabiose, doenças de pele e diarreia, estando presente nas regiões sudeste e nordeste do Brasil. Este trabalho trata da identificação da composição química dos óleos essenciais das folhas e galhos, relata aspectos químicos dos extratos etanólicos das folhas, galhos e raízes e a determinação de suas atividades antioxidantes por diversas metodologias. A análise dos dados foi realizada utilizando ANOVA seguida do *post test* de Student-Newman ou Tukey. Os principais constituintes do óleo essencial das folhas foram: β -cariofileno (17,0%) e biciclogermacreno (16,2%); para o óleo essencial dos galhos predominam o biciclogermacreno (11,3%) e espatulenol (14,7%). Foi demonstrada através de prospecção fitoquímica dos extratos a presença de flavonóides, alcalóides e taninos. A análise por CLAE quantificou os flavonóides (quercetina, rutina e campferol) e os ácidos fenólicos (gálico, clorogênico e cafeico). Os extratos apresentaram a capacidade de neutralizar radicais livres, o mesmo não foi evidenciado para os óleos essenciais. A capacidade de inibir a peroxidação lipídica foi verificada para todos os materiais, assim como o processo de estresse oxidativo mitocondrial indicando potencial biológico.

Palavras chave: *Croton campestris*, extratos etanólicos, óleo essenciais, atividade antioxidante.

Abstract

Recent studies suggest the use of plants as juice or tea as sources of natural antioxidant agents can be used as an aid to treatment of various diseases. The genus *Croton* is the second largest of the family Euphorbiaceae, comprising about 800 species of plants. Of these, about 50 occur in the northeastern region of Brazil highlighting the *Croton campestris* species popularly known as "velame do campo." This species is used in folk medicine as a powerful cleanser, to combat scabies, skin diseases and diarrhea, is present in the southeastern and northeastern Brazil. This work deals with the identification of the chemical composition of essential oils from leaves and branches, reports chemical aspects of the ethanol extracts of leaves, branches and roots and determination of their antioxidant activity by different methodologies. Data analysis was performed using ANOVA followed by post test of Tukey or Student-Newman. The main constituents of the essential oil of the leaves were: β -caryophyllene (17.0%) and bicyclogermacrene (16.2%), the essential oil of bicyclogermacrene branches predominate (11.3%) and spathulenol (14.7%) . It was demonstrated by phytochemical extracts of flavonoids, alkaloids and tannins. HPLC analysis quantified flavonoids (quercetin, rutin and kaempferol) and phenolic acids (gallic, caffeic and chlorogenic). The extracts showed the capacity to neutralize free radicals, it was not observed for the essential oils. The ability to inhibit lipid peroxidation was observed for all materials as well as the process of mitochondrial oxidative stress indicating biological potential.

Keywords: *Croton campestris*, ethanol extracts, essential oils, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons com formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio sob ação das superóxido desmutases.....	27
Figura 2 -Formação de radicais livres através da reação de Fenton	29
Figura 3 - Formação de radicais livres através da reação de Haber-Weiss.....	31
Figura 4 - Neutralização do ânion superóxido, através das enzimas superóxido desmutases e a subsequente ação da catalase na conversão do superóxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.....	32
Figura 5 - Ação da glutathione na conversão do peróxido de hidrogênio em água	35
Figura 6 - Partes aéreas de <i>C. campestris</i> ; a) detalhes das folhas; b) frutos e sementes; c) disposição dos frutos; d) arbusto inteiro.....	39
Figura 7 - Local de coleta do material de estudo	41
Figura 8 - Obtenção dos extratos etanólicos brutos das folhas, galhos e raízes de <i>C. campestris</i>	42
Figura 9 - Obtenção dos óleos essenciais das folhas e galhos de <i>C. campestris</i>	45
Figura 10 - Organização dos testes aos quais os materiais foram submetidos.....	46
Figura 11 - Reação de neutralização do DPPH.....	51
Figura 12 - Reação do MDA ao TBA	52
Figura 13 - Etapas da reação de oxidação da DCF-DA para formação de DCF	55

Figura 14 - Representação da cromatografia líquida de alta eficiência de *C. campestris*, extrato das raízes (a), extrato dos galhos (b) e extrato das folhas (c), a faixa de detecção UV foi a 325nm. Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), rutina (pico 4), quercetina (pico 5) e campferol (pico 6). Condições cromatográficas descritas na sessão de métodos 61

Figura 15 -Estrutura dos flavonóides identificados nos extratos etanólicos das folhas, galhos e raízes de *C. campestris*..... 62

Figura 16 - Estrutura de ácidos fenólicos identificados dos extratos etanólicos de folhas, galhos e raízes de *C. campestris*..... 63

Figura 17 -Fórmula estrutural dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *C. campestris*..... 65

Figura 18 - Efeitos de diferentes concentrações de extratos etanólicos e óleos essenciais de *C. campestris* frente ao radical DPPH. Os resultados são expressos como percentagem de inibição e ácido ascórbico utilizado como controle positivo. Dados mostram médias $\pm$ DP valores médios de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata.....70

Figura 19 -Propriedade antioxidante de diferentes extratos de *Croton campestris*: a) EERCC; b) EEFCC; c) EEGCC. Peroxidação lipídica (produção TBARS) em fosfolípidos de ovo foi determinada quer na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experiências independentes efetuadas em triplicata. * $P < 0,05$ vs Fe^{2+} induzido; ** $P < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido..... 73

Figura 20 - Propriedade antioxidante de diferentes extratos de *Croton campestris*: a) OEGCC; b) OEFCC. Peroxidação lipídica (produção TBARS) em fosfolipídios de ovo foi determinada quer na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experiências independentes efectuadas em triplicata. * $P < 0,05$ vs Fe^{2+} induzido; ** $P < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido 74

Figura 21 - Propriedade antioxidante de diferentes extratos de *C. campestris*: a) EERCC; b) EEFCC; c) EEGCC. Peroxidação lipídica (produção TBARS) em homogeneizados de fígado foi determinada na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experiências independentes realizadas em triplicata. *** $p < 0,001$ vs Fe^{2+} -induzido TBARS; ** $p < 0,01$ versus Fe^{2+} induzida TBARS; * $p < 0,05$ vs basal77

Figura 22 - Propriedades antioxidantes de diferentes extratos de *C. campestris*: a) OEGCC; b) OEFCC; Peroxidação lipídica (produção TBARS) em homogeneizados de fígado foi determinada na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experiências independentes realizadas em triplicata *** $p < 0,001$ vs Fe^{2+} -induzido TBARS; ** $p < 0,01$ versus Fe^{2+} -induzida TBARS; * $p < 0,05$ vs basal 78

Figura 23 - Propriedades antioxidantes dos diferentes extratos de *C. campestris*: a) EERCC; b) EEFCC; DCFDA oxidação em mitocôndrias de ratos do fígado. Os valores de 3 a 4 experimentos independentes, *** $p < 0,001$ vs H_2O_2 oxidação induzida; ** $p < 0,01$ vs H_2O_2 oxidação; * $p < 0,05$ vs H_2O_2 oxidação; # $p < 0,05$ vs oxidação basal80

Figura 24 - Propriedades antioxidantes dos diferentes extratos de *C. campestris*: a) EEGCC; b) OEGCC, DCFDA oxidação em mitocôndrias do fígado de ratos. Os valores de 3 a 4 experimentos independentes, *** $p < 0,001$ vs H_2O_2 oxidação induzida; * $p < 0,01$ vs H_2O_2 oxidação; * $p < 0,05$ vs H_2O_2 oxidação; # $p < 0,05$ vs oxidação basal81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura de compostos isolados de <i>C.campestris</i>	37
Tabela 2 - Classes de metabólitos identificados	59
Tabela 3 -Determinação de compostos fenólicos em extratos etanólicos de <i>C. campestris</i>	59
Tabela 4 - Composição de fenóis e flavonóides de <i>C. campestris</i>	64
Tabela 5 - Composição química dos óleos essenciais das folhas e galhos de <i>Croton campestris</i>	67
Tabela 6 -Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos por meio da reação dos extratos etanólicos das folhas galhos e raízes de <i>C. campestris</i> com o radical livre DPPH	71

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	percentagem
>	maior
±	mais ou menos
μL	microlitro
μm	micrômetro
μmol	micromol
AG	ácido gálico
AL	Alagoas
ANOVA	análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BA	Bahia
ca	com aproximadamente
CE	Ceará
CE ₅₀	concentração efetiva capaz de inibir cinquenta por cento
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – acoplada a Arranjo Diiodo
cm	centímetros
DCF	Diclorofluoriceína fluorescente
DCF-DA	Diclorofluorisceína diacetilada
DCFH	Diclorofluoriceína
DF	Distrito Federal
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)
EEFCC	extrato etanólico das folhas de <i>Croton campestris</i>
EEGCC	extrato etanólico dos galhos de <i>Croton campestris</i>
EERCC	extrato etanólico das raízes de <i>Croton campestris</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio
ES	Espírito Santo

<i>et al.</i>	e outros
EUA	Estados unidos da América
eV	eletronvolt
FeSO ₄	Sulfato de ferroso
g	gramas
GO	Goiás
GPr	Glutathione redutase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	L-Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCDAL	Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima
IR	Índice de retenção
l	litros
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
m	metros
MDA	malondialdeído
MG	Minas Gerais
min	minuto
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
MO	Missouri
MS	Mato Grosso do Sul
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
OEFCC	óleo essencial das folhas de <i>Croton campestris</i>
OEGCC	óleo essencial dos galhos de <i>Croton campestris</i>
P.A.	pureza analítica
PB	Paraíba

PE	Pernambuco
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Piauí
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
RS	Rio Grande do Sul
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)
SP	São Paulo
<i>St. Lois</i>	Saint Lois
TBA	ácido tiobabaturico
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
URCA	Universidade Regional do Cariri
UV	Ultravioleta
VS	Versus
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS.....	255
2.1 OBJETIVOS GERAIS:	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1. ERO (EPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO)	277
3.2. EFEITOS DANOSOS DAS ERO.....	31
3.3.MECANISMO DE PROTEÇÃO DO ORGANISMO	32
3.4.FAMÍLIA EUPHORBIACEAE E GÊNERO CROTON.....	34
3.5.CROTON CAMPESTRIS	366
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1.SUMULA METODOLÓGICA.....	42
4.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	44
4.3. OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	45
4.4. ANÁLISES QUÍMICAS	48
4.4.1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	48
4.4.2. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	488
4.4.3. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM).....	488
4.4.4. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	499
4.4.4.1. QUÍMICA, APARELHOS E PROCEDIMENTOS GERAIS	49
4.4.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR CLAE-DAD	499
4.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	51
4.5.1. REAGENTES	51

4.5.2.	ANIMAIS	51
4.5.3.	SEQÜESTRO DO RADICAL DPPH (<i>Diphenyl-picryl-hidrazil</i>)	51
4.5.4.	TBARS (<i>THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES</i>)	53
4.5.5.	PREPARAÇÃO DO FOSFOLIPÍDEO DE OVO	53
4.5.5.1.	TBARS COM FOSFOLIPÍDEO DE OVO	54
4.5.6.	PREPARAÇÃO DE FOSFOLIPÍDEO DE TECIDO	54
4.5.6.1.	TBARS COM TECIDO	54
4.5.7.	DICLOROFLUORICEINA.....	55
4.5.7.1.	ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS.....	55
4.6.	ANALISE ESTATÍSTICA.....	577
5.	RESULTADOS	599
5.1.	ANÁLISES QUÍMICAS.....	599
5.1.1.	PROSPECCÃO FITOQUÍMICA	599
5.1.2.	CONCENTRAÇÃO DE FENOIS TOTAIS	599
5.1.3.	ANÁLISE POR CLAE	61
5.1.4.	ANÁLISE POR CG/EM.....	676
5.2.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	70
5.2.1.	DPPH.....	70
5.2.2.	TBARS COM FOSFOLIPÍDEO DE OVO.....	72
5.2.3.	TBARS COM TECIDO.....	76
5.2.4.	DICLOROFLUORESCEINA.....	80
6.	CONCLUSÕES.....	84
7.	REFERÊNCIAS	87
8.	PERSPECTIVAS.....	89

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em diversos organismos aeróbicos como nos humanos, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies altamente reativas são naturalmente formadas no metabolismo como exemplo pode-se citar o ânion superóxido, radical peroxil e o peróxido de hidrogênio estes são capazes de induzir oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios insaturados (DAIBER, 2010).

Em organismos no estado fisiologicamente ativo as ERO são detoxificados e/ou eliminados por enzimas e antioxidantes de origem endógena e/ou obtidos de forma exógena. Indivíduos idosos e pessoas submetidas a fatores de aumento da produção de ERO estão sujeitos a um quadro de estresse oxidativo, onde essas espécies químicas podem desencadear processos de peroxidação lipídica, lipooxygenase e danos ao DNA induzindo estados fisiopatológicos relacionados com o envelhecimento precoce, câncer, Parkinson e Alzheimer (FUSCO *et al.*, 2009; TERASHIMA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2009; NADOUR *et al.*, 2012)

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco, podendo ser utilizado como coadjuvante no tratamento de diversas doenças (SILVA *et al.*, 2005).

Plantas medicinais possuem diversos compostos químicos com potencial antioxidante. Dentre as classes com essa propriedade, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por apresentarem comprovada atividade na inibição da peroxidação lipídica e da lipooxygenase *in vitro* (SOUSA *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2012).

A família Euphorbiaceae que compreende cerca de 300 gêneros e 8000 espécies e possui afinidade pelas regiões tropicais e subtropicais, com hábito heterogêneo, onde se incluem árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (CRONQUIST, 1981). O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae com mais de 1300 espécies, pertence à subfamília

Crotonoideae e tribo Crotoneae (BRAGA, 1976). Dessas espécies, cerca de 350 ocorrem no Brasil e 52 na região nordeste (CORDEIRO e CARNEIRO-TORRES, 2006). Dentre os muitos exemplares dessa família muitas plantas são utilizadas com fins medicinais e algumas já apresentaram potencial antioxidante comprovado (SHAWAR *et al*, 2010).

A espécie *Croton campestris*, popularmente conhecida como “velame-do-campo” ou “velame-do-mato” possui hábito arbustivo podendo atingir entre 1-2 metros de altura, ocorrendo principalmente nas regiões sudeste e nordeste (CORRÊA, 1975). É utilizada na medicina popular como poderoso depurativo, no combate à escabiose, afecções de pele e diarreia. Dentre as atividades farmacológicas comprovadas destaca-se: moluscicida, antimicrobiana e moduladora de antibióticos aminoglicosídeos (BABILLI *et al.*, 2006; BABILLI *et al.*, 2009, MATIAS *et al*, 2010^a, BRITO-JUNIOR *et al.*, 2011).

Este trabalho de mestrado trata-se do primeiro estudo a descrever a atividade antioxidante para extratos de *Croton campestris*, demonstrando que a mesma possui não só a capacidade de neutralizar radicais livres, como impedir a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio. A elucidação química demonstra que esses extratos possuem substâncias com potencial terapêutico real podendo servir de base para estudos futuros na tentativa de desenvolvimento de novos fitofármacos.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Estudar a composição química e analisar a atividade antioxidante (*invitro*) de *Croton campestris* A. ST-HILL.

2.2 Objetivos Específicos:

- Extrair óleos essenciais dos galhos e folhas de *Croton campestris*;
- Identificar a composição química dos óleos obtidos;
- Preparar extratos de folhas, galhos e raízes de *Croton campestris*;
- Realizar prospecção fitoquímica dos extratos;
- Quantificar fenóis totais presentes nos extratos;
- Realizar quantificação dos extratos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Verificar os potenciais antioxidantes, *in vitro*, de extratos e óleos essenciais por sequestro de radicais livres DPPH (difenil-picril-hidrazil), TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), e diclorofluoresceína;

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ERO (Espécies Reativas de Oxigênio)

O termo radical livre refere-se a átomo, molécula ou espécie química altamente reativa. Em geral, os autores consideram que ERO contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, e este não-emparelhamento confere alta reatividade a essas substâncias, no entanto, algumas moléculas não possuem elétrons desemparelhados, mas possuem alta reatividade e/ou participam diretamente das reações de produção de outras ERO sendo então classificados na mesma categoria (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Diversos radicais livres são produzidos naturalmente em sistemas biológicos, para organismos aeróbicos, o oxigênio molecular (O_2) é uma substância vital e leva invariavelmente a formação de diversas ERO por vias metabólicas distintas, um exemplo pode ser observado através do O_2 utilizado na cadeia transportadora de elétrons para a formação de ATP que durante o fluxo de elétrons através dos complexos mitocondriais desencadeia a produção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, devido ao escape dos elétrons no sistema que compõem a cadeia respiratória (Figura 1). Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O^{2-} (seja enzimático, fagocitário ou químico) (HALLIWELL *et al.*, 1990).

O radical hidroperoxila $HO_2^{\cdot}$ representa a forma protonada do superóxido. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, e possui maior facilidade em desencadear processos de destruição de membranas biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE *et al.*, 1999).

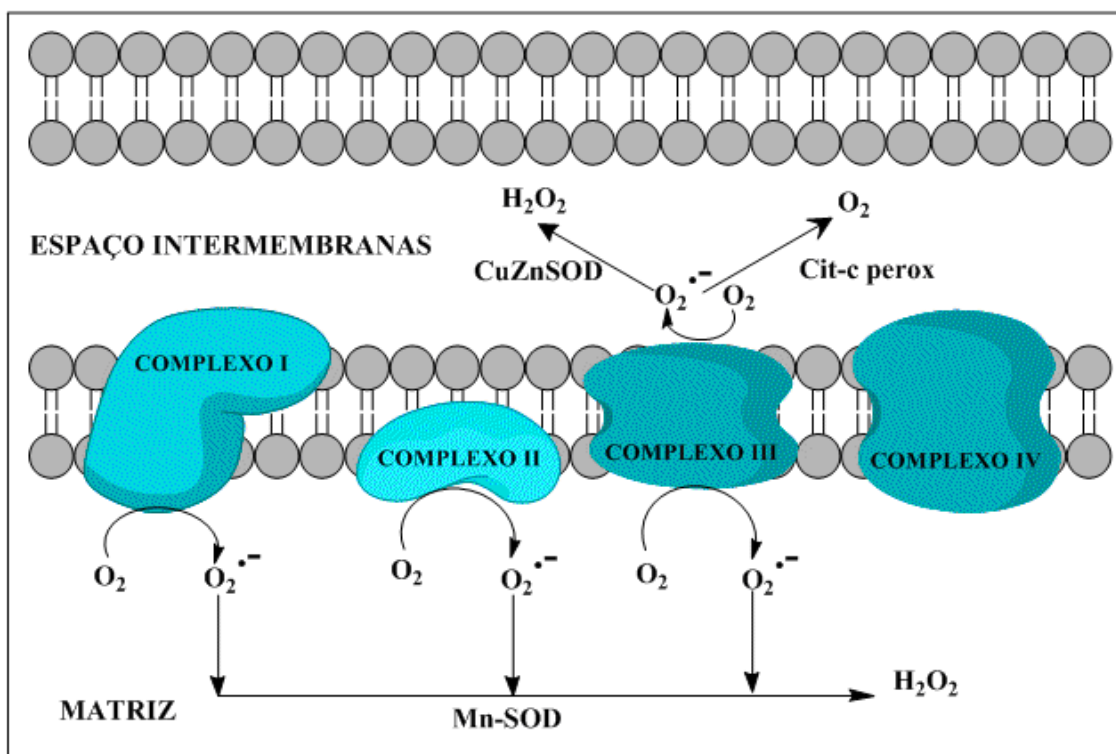


Figura 1: Escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons com formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio sob ação das superóxido desmutases (Fonte: adaptado de CERQUEIRA *et al.*, 2007); O_2 : oxigênio singlete; $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; Cit-c perox: Citocromo-c peroxidase; Mn-SOD: manganês-superóxido-desmutase; CuZn-SOD: cobre-zinco-Superóxido-Desmutase.

O radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, e reage rapidamente até mesmo com outros radicais e/ou metais dispersos. Quando produzida próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativações ou mutações. A hidroxila pode inativar proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrilas ($-SH$) e pontes dissulfeto ($-SS$). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre, por não possuir elétrons desemparelhados na última camada, mas participa de diversas reações que produzem diversos outros ERO, além de possuir “vida longa” e alta permeabilidade a membranas lipídicas. Por sua capacidade de reagir é considerado altamente tóxico para as células.

Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) é a forma excitada do oxigênio molecular e assim como o peróxido de hidrogênio não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença.

Metais podem atuar como agentes que induzem a formação de ERO, um exemplo pode ser demonstrado pelas reações de Fenton e de *Haber-Weiss* (Figuras 2). Embora o cobre possa também catalisar a reação de *Haber-Weiss*, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (AUST *et al.*, 1991)

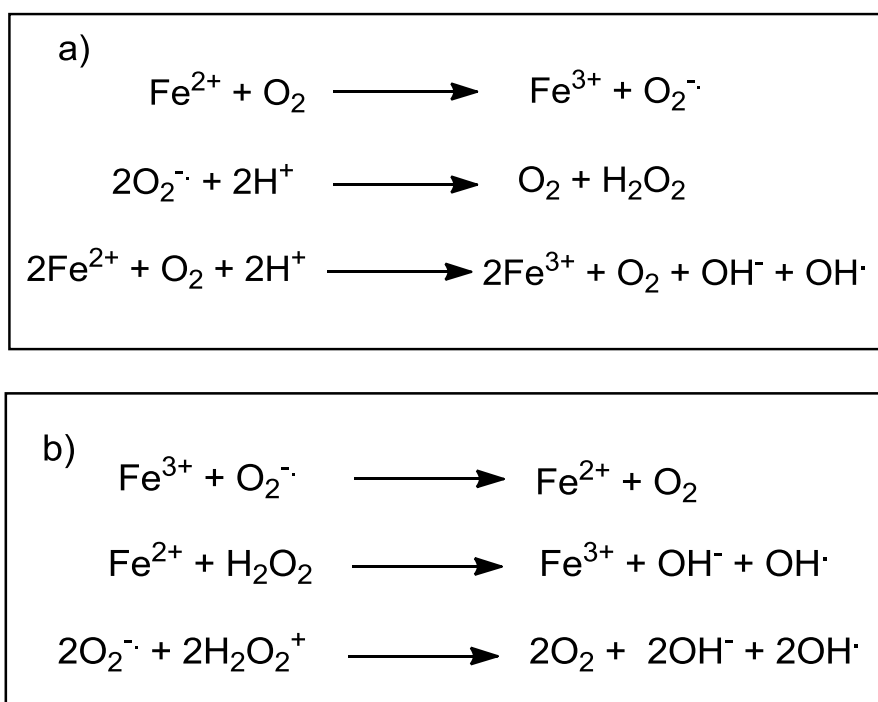


Figura 2: a) Formação de radicais livres através da reação de Fenton; b) formação de radicais livres através da reação de *Haber-Weiss*; Fe^{2+} : ferro bivalente; Fe^{3+} : ferro trivalente; O_2 oxigênio singlete; OH^- $\text{OH}^{\cdot}$: radicais hidroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio.

Diversos estímulos exógenos podem também atuar como agentes que induzem um aumento na produção de pró-oxidantes, tais como, radiações ultravioletas, álcool e poluentes como ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre, e na fumaça do cigarro onde se estima que haja aproximadamente cinco mil compostos tóxicos, incluindo oxidantes potentes tais como, acroleína, peróxido de nitrogênio, ânion superóxido além de radicais orgânicos (CAVALCANTE E BRUIN, 2009).

O desequilíbrio entre a geração e a neutralização dos radicais livres nos sistemas biológicos, proveniente da redução da ação dos antioxidantes ou do aumento da geração de espécies radicalares, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões em diversas moléculas e estruturas celulares, podendo resultar na morte celular, este estado pode ser definido como estresse oxidativo, onde ocorre um desequilíbrio favorável entre as concentrações de espécies pró-oxidantes em relação aos níveis de antioxidantes (ROVER-JUNIOR *et al.* 2001).

Embora as ERO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo (FLOYD, 1990; HATHERILL *et al.*, 1991). Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante (DROGE, 2002; OKTYABRSKY e SMIRNOVA, 2007).

3.2 Efeitos danosos das ERO

Espécies reativas quando não devidamente neutralizadas podem colocar em risco a integridade celular por meio de processos de oxidação de biomoléculas, podendo comprometer processos biológicos importantes que podem levar à inativação enzimática, mutações no DNA e ruptura de membranas lipídicas.

Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, no aumento da aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e podem desencadear processos que possam induzir à morte celular (CERQUEIRA *et al.*, 2007), levando a estados fisiopatológicos relacionados com doenças como câncer, Parkinson, Alzheimer e acelerando doenças auto-imunes como a artrite reumatóide, visto que estas apresentam uma estreita relação com estresse oxidativo (FUSCO *et al.*, 2009; TERASHIMA *et al.*, 2012, FILIPPINI *et al.*, 2008).

A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo de lipídios, podendo levar a quadros de aterosclerose, podendo causar trombose, infarto e acidente vascular cerebral.

3.3. Mecanismo de proteção do organismo

Em sistemas biológicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidoredutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. As proteções conhecidas do organismo contra as ERO abrangem a proteção enzimática ou por micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta (BARREIROS e DAVID, 2006).

As enzimas superóxido desmutase (SOD), realizam a catalisada reação de destruição do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ (Figuras 1 e 4) convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. A enzima catalase atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (Figura 4) (BABIOR, 1997).

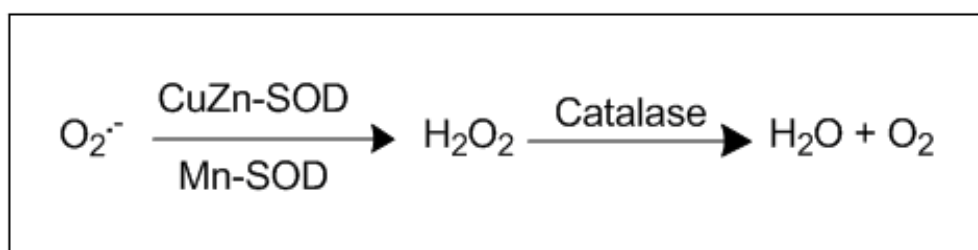


Figura 3: Neutralização do ânion superóxido, através das enzimas superóxido desmutase e a subsequente ação da catalase na conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. O_2 : oxigênio singlete; $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; Mn-SOD: manganês-superóxido-desmutase; CuZn-SOD: cobre-zinco-Superóxido-Desmutase.

Outro sistema é composto pela Glutathiona (GSH/GSSG) em conjunto com duas enzimas, a glutathiona redutase (GR) e a glutathiona peroxidase (GPx). Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 5). Sendo que a glutathiona opera em ciclos entre sua

forma reduzida (GSH) e sua forma oxidada (GSSG) (forma dimerizada da GSH) (BABIOR, 1997).

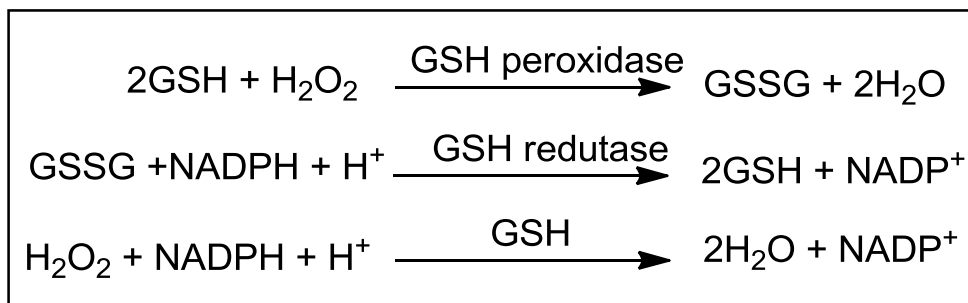


Figura 4: Ação da glutathione na conversão do peróxido de hidrogênio em água; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; H_2O : água; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Além dos antioxidantes citados, a vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro.

A vitamina C, ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO, porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada ou quando exposta a metal, levando à lipoperoxidação. Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tióis, entre eles a N-acetilcisteína, mercaptopropionilglicina e diversos outros de origem exógena podem agir em organismos que apresentem desequilíbrio entre agentes pró- e antioxidantes, seja por quadros de desordem metabólica ou estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Diversas metodologias podem ser aplicadas para avaliação do potencial antioxidante de materiais vegetais e outras substâncias, as metodologias utilizadas nesse estudo são baseadas em formação ou degradação de compostos de modo que o grau de intensidade dessas reações pode ser mensurado, uma vez que estas apresentam espectro de cor visível como

exemplos a capacidade de neutralizar o radical livre DPPH e de impedir a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Outro princípio que será utilizado será a capacidade de absorção e dispersão de luz que pode ser observado no teste de diclorofluoresceína que tem como objetivo medir níveis de peróxido de hidrogênio em sistemas envolvidos por membranas lipídicas.

3.4 Família Euphorbiaceae e gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae, pertence à ordem Malpighiales (APGIII, 2009), possui aproximadamente 8000 espécies, constituindo a sexta maior família depois das Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Rubiaceae (MATOS apud LIMA, 2006).

Constitui a segunda família mais representativa da Caatinga em número de espécies, superada apenas por Fabaceae (SAMPAIO, 1995). No Brasil, está representada por 70 gêneros e aproximadamente 1000 espécies de hábitos variados e presentes em todos os tipos vegetacionais (SOUZA E LORENZI, 2005).

O estudo mais completo sobre euforbiáceas foi o realizado por Müller, 1874, no qual além de analisar as amostras das suas coletas, verificou também materiais recolhidos durante a missão de Von Martius e de outros renomados botânicos como Gardner, Freire Allemão, Pohl e Riedel, que percorreram as mais diversas regiões do país chegando, inclusive, a outros países da América do Sul.

O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae perdendo apenas para o gênero *Fabacea*, pertence à subfamília Crotonoideae e à tribo Crotoneae (BRAGA, 1976) e possui mais de 1300 espécies. Dessas, cerca de 350 ocorrem no Brasil e 52 na região nordeste (CORDEIRO e CARNEIRO-TORRES, 2006). O nome do gênero "*Croton*," vem do grego "carrapato", devido à semelhança das sementes de algumas espécies com esse inseto (BABILI *et al.*, 2006). É largamente distribuído em regiões quentes da terra, menos frequentemente em regiões temperadas e raramente em regiões frias.

(HELUAN *et al.*, 2000). Segundo Linnaeus(1753), é constituído por plantas de hábito arbóreo ou arbustivo, raramente se apresenta como subarbustos, monóicas ou dióicas, látex claro ou avermelhado, muitas vezes escassos ou aparentemente ausentes; indumento de pêlos estrelados, folhas alternadas, raramente opostas ou quase verticuladas; estípulas presentes ou ausentes; pecíolo com ou sem glândulas apicais emparelhadas; margem inteira ou denticulada, muitas vezes com glândulas; venação penada ou palmada e inflorescência terminal ou axilar; as sementes geralmente são lisas, com endosperma abundante, carnuda, larga e cotilédones achatados.

Matos (2011) publicou um importante levantamento sobre diversos aspectos químicos referentes a espécies nativas de *Croton*. Este relato aponta que em geral, os óleos voláteis obtidos de espécies de *Croton* brasileiras, apresentam predominância de monoterpenos e sesquiterpenos em sua constituição, com exceção de *C. zehntneri*, na qual podem ser predominantes os fenilpropanóides.

Não foi possível estabelecer um padrão para os flavonóides, apesar de alguns já terem sido isolados como a retusina, paquipodol, rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), campferol-3-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-(2-O-D-apiofuranosil)-rutinosídeo, campferol-3-O-(6-O-*p*-Cumaroil)-glicosídeo, vitexina, isovitexina. *Croton* poderia ser caracterizado pela presença de glicosídeos de flavonóis e suas agliconas, como quercetina e campferol, que são comuns em tecidos vegetais, assim como de agliconas altamente metoxiladas, como artemetina ou penduletina.

Triterpenos pentacíclicos e esteróides foram isolados de *Croton* como estigmasterol, β -sitosterol, ergasterol-5 α -8 α -endoperóxido, lupeol, betulina, β -sitosterol ácidoacetil-aleurítico, β -sitosterol-O-glicosídeo, estigmasterol e campesterol.

No gênero *Croton* são típicos os alcalóides benzilisoquinolínicos, (Figura z), derivados de tirosina, encontrados em Magnoliales, Ranunculales e Laurales. Em uma pioneira revisão da química de *Croton*, Farnsworth *et al.*, (1969) já indicavam grande diversidade de alcalóides como a julocrotina, muscicapinas A, B e C, e a magnoflorina.

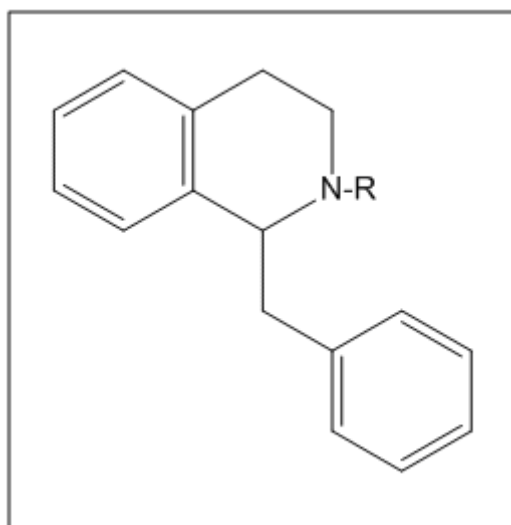


Figura 5: esqueleto base de alcalóides benzilisoquinolínicos; Fonte: adaptado de DIAS *et al* 2003.

Esse levantamento mostra a grande diversidade de substâncias presentes em plantas desse gênero muitas delas apresentando atividades biológicas importantes já investigadas.

3.5. *Croton campestris*

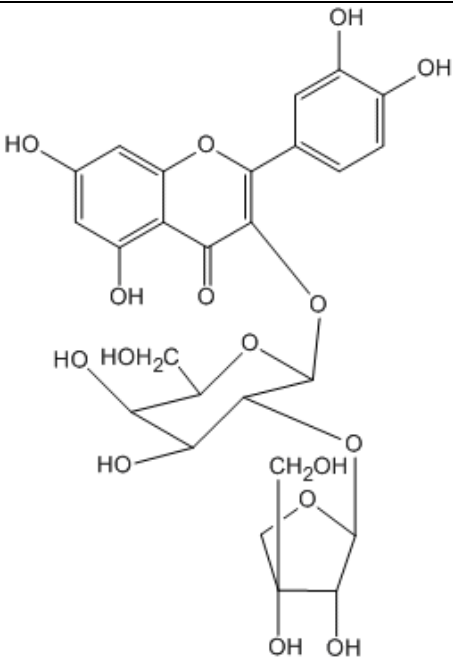
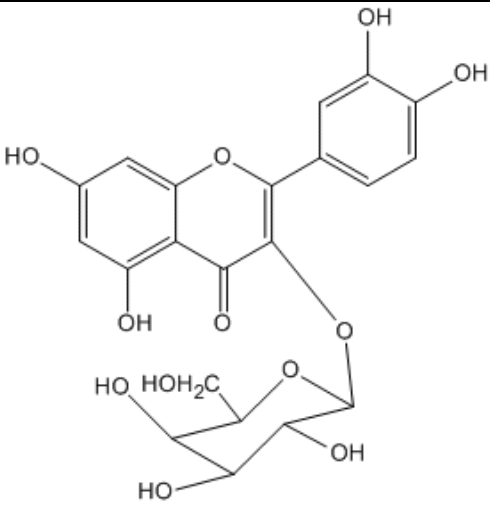
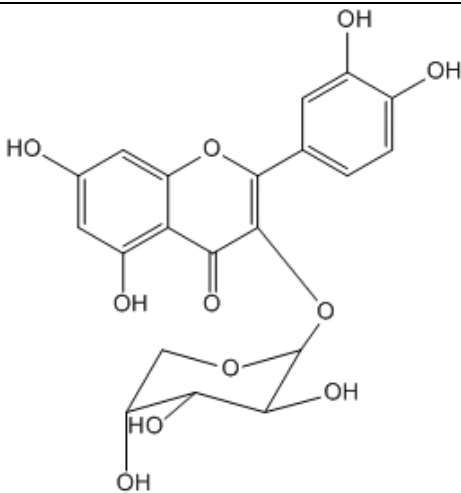
Espécie amplamente distribuída no Brasil, ocorrendo nas regiões Centro-oeste (DF, GO, MS), Nordeste (AL, BA, CE, PE, PI, PB, RN), Sul (PR, RS) e Sudeste (ES, MG, RJ, SP) (LIMA ePIRANI2003). É encontrada desde áreas com altitudes mais elevadas (aproximadamente 1346 m), até o nível do mar, em regiões com vegetação aberta como cerrado, também ocorrendo em campos rupestres, mata ciliar, campo limpo, campo sujo e caatinga. É conhecida popularmente como “velame-do-campo”, “velame-do-mato” ou simplesmente “velame”(SÁTIRO eROQUE,2008; SILVAet al., 2010).Nameicina popular é utilizado como potente purgativo, para o tratamento da sífilis (PIO CORRÊA, 1984), e também em doenças

inflamatórias, parasitárias(RIBEIRO PRATA *et al*, 1993) e no tratamento de afecções da bile (PENNA, 1930; GRANGEPÈRE, 1983).

É um arbusto de aproximadamente 1,0 m de altura (Figura 6), com tricomas estrelados alvo-amarelados, folhas membranáceas, discolores, lâmina foliar elíptica, 2,0-4,0×0,5-1,5 cm, ápice agudo, margem esparsamente denteada, base cuneada, face adaxial pubescente, enegrecida, face abaxial pubescente, glauca; pecíolo 0,2-0,6 cm compr., pubescente; estípulas inconspícuas na junção do pecíolo com a lâmina foliar, glandulares. Inflorescências 2,0-3,0 cm de comprimento, racemosas, bracteadas, brácteas com aproximadamente 1,0mm de comprimento, elípticas a ovadas, ápice agudo, pubescentes. Flores estaminadas com cerca de 2,5 mm de comprimento, pediceladas, pedicelo pubescente, dialissépalas, sépalas elípticas, ápice arredondado, internamente vilosas na base, externamente pubescentes, dialipétalas, pétalas espatuladas, ápice levemente retuso, densamente vilosas na base; estames 15, filetes com aproximadamente 2,0 mm de comprimento, vilosos na base. Flores pistiladas, sésseis, dialissépalas, sépalas elípticas, ápice agudo, internamente vilosas na base, externamente pubescentes; ovário globóide, densamente pubescente; estiletes bífidos, livres, pubescentes até a ramificação. A rugosidadedas sementes é uma característica importante nadelimitação da espécie (SÁTIRO e ROQUE,2008;).

Algumas substâncias já foram isoladas a partir de extratos de folhas de *C. campestris*, como os flavonóides *O*-glicosilados de *C. campestris*: 3-*O*- β -D-apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil quercetina, 3-*O*- β -D-galactopiranosil quecetina (hiperina), 3-*O*- α -L-arabinopiranosil quercetina (guaijaverina) e 3-*O*- α -L-ramnopiranosil quercetina (quercitrina) (SANTOS *et al.*, 2005). Das raízes desta espécie foram isolados três diterpenos com estruturas consideradas inéditas, chamados de: velamolona, velamona e acetato develamolona sobre os quais não foram encontrados trabalhos posteriores (BABILI *et al.*, 1998).

Estrutura dos compostos	Nomenclatura
-------------------------	--------------

	3-O-β-D-apiofuranosil-(1• "2)-galactopiranosil quercetina
	3-O-β-D-galactopiranosil quercetina(hiperina)
	3-O-α-L-arabinopiranosil quercetina(guaijaverina)

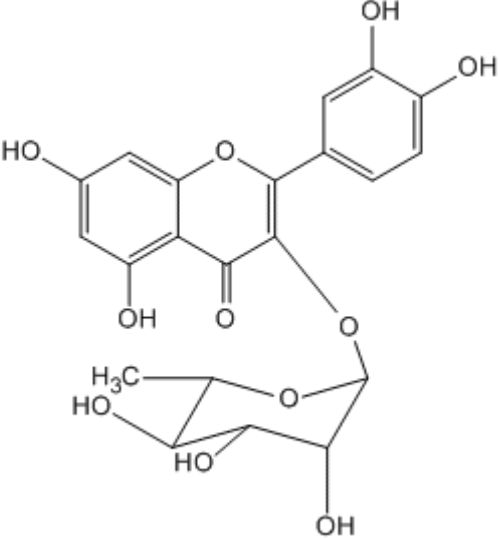
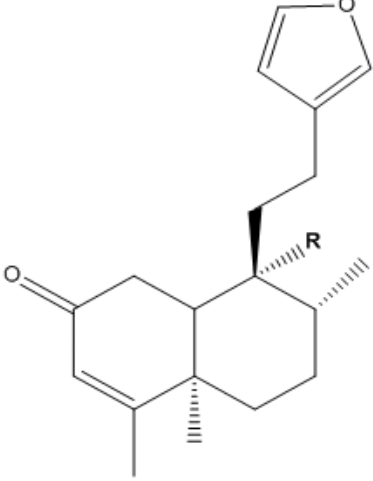
	3-O-α-L-ramnopyranosil quercetina(quercitrina)
	1 R = Me (velamona) 2 R = CH₂OH (velamolona) 3 R = CH₂OAc (acetato de velamolona)

Tabela 1. Estrutura de compostos isolados de *C.campestris*; Fonte: SANTOS *et al.*, 2005, BABILI *et al.*, 1998.

Trabalhos anteriores demonstraram atividade moluscicida do extrato diclorometano das raízes e frações da mesma espécie (BABILI *et al.*, 2006), atividade antimicrobiana de extratos e óleo essencial frente à linhagem fúngica *Candida albicans*, e cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas (BABILI *et al.*, 2009). Foi demonstrada a capacidade sinérgica de interação com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e a norfloxacin (MATIAS *et al.*, 2010^a; MATIAS *et al.*, 2010^b; MATIAS *et al.*, 2010^c; COUTINHO *et al.*, 2011; BRITO-JUNIOR *et al.*, 2011). Brito Junior (2010) indicou que o extrato hidroalcolico das folhas de *croton campestris* apresenta baixa toxicidade quando administrada por via oral e intraperitoneal, e atividade gastroprotetora.



Figura 6: Partes aéreas de *C. campestris*; a) detalhes do arbusto; b) frutos e sementes; c) disposição dos frutos; d) arbusto inteiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Súmula metodológica

As folhas (1220 g), galhos (3485 g), e raízes (490 g) de *Croton campestris* foram coletadas no período de abril de 2011 na Vila Padre Cícero ("Palmeirinha"), zona rural ao norte da cidade de Juazeiro do Norte, estado do Ceará, Brasil, sob as coordenadas 7°08'40.75"S, 39°19'45.79"O. Foi preparada exsicata do material coletado e depositada sob número de registro 5364 no Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri-URCA.

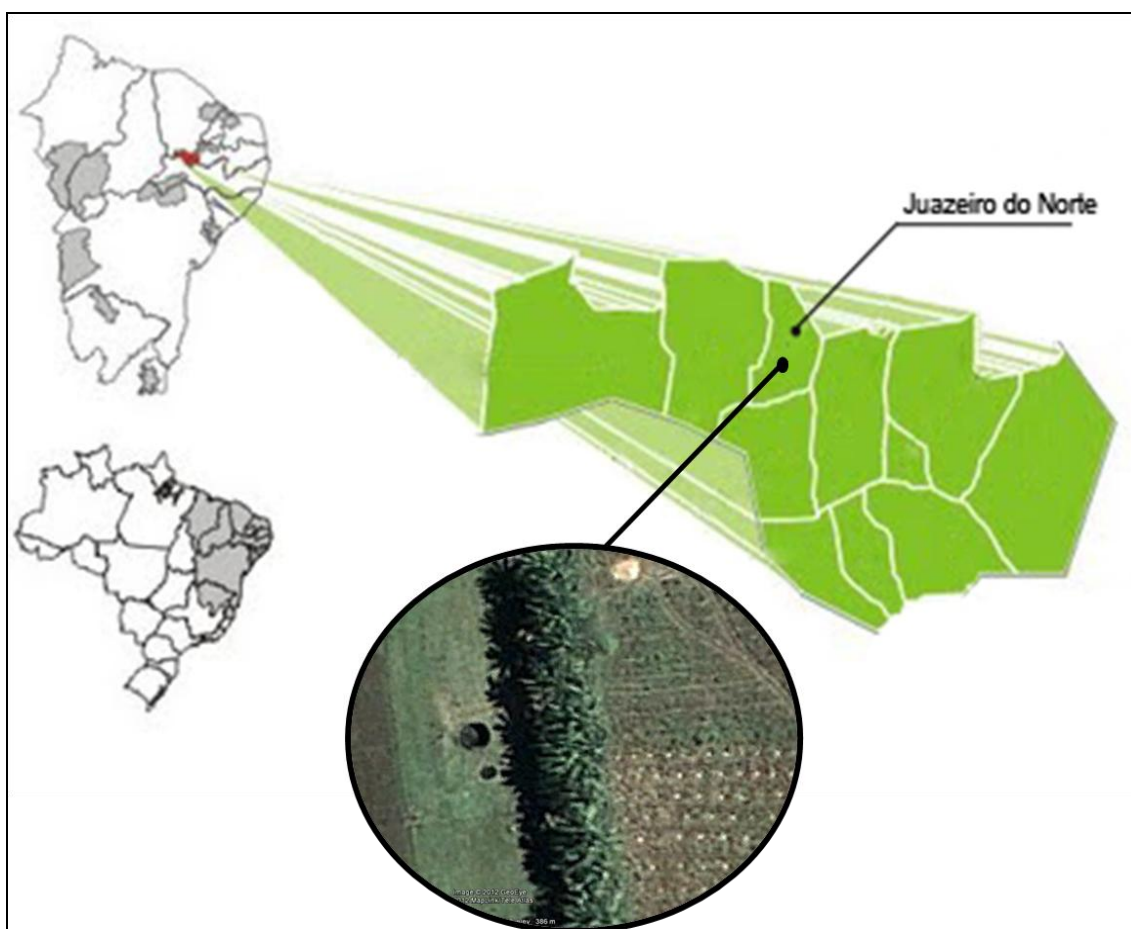


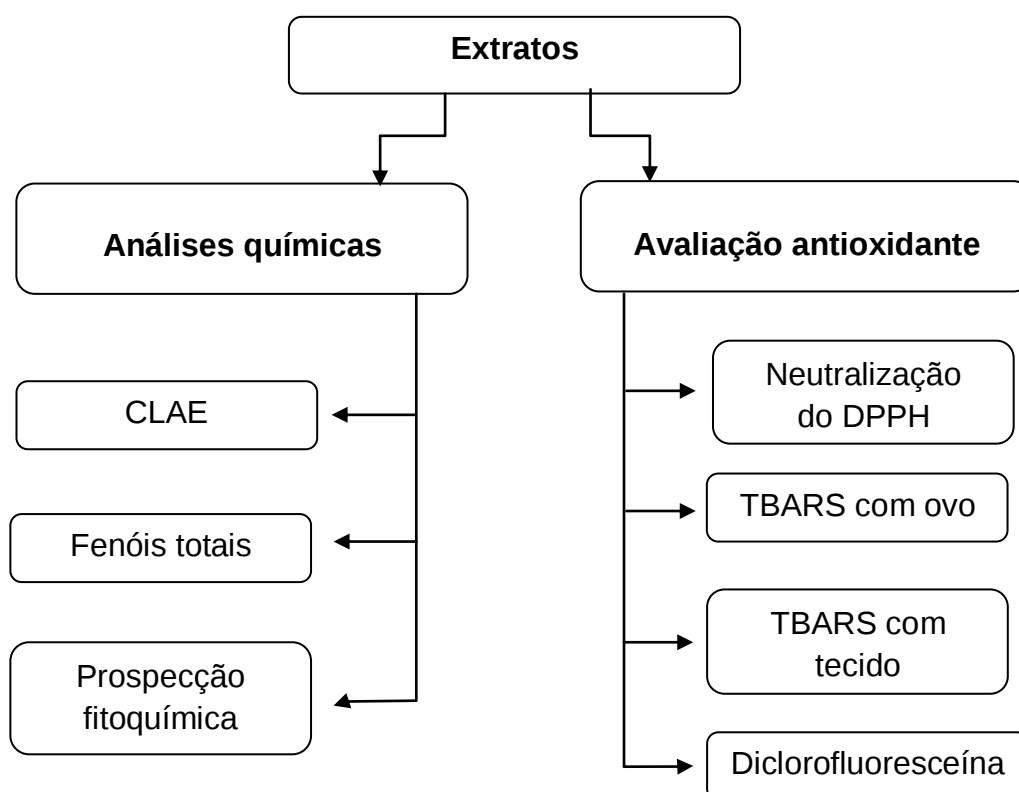
Figura 7: Local de coleta do material de estudo. (Fonte: adaptado de <http://blogdocrato.blogspot.com.br>)

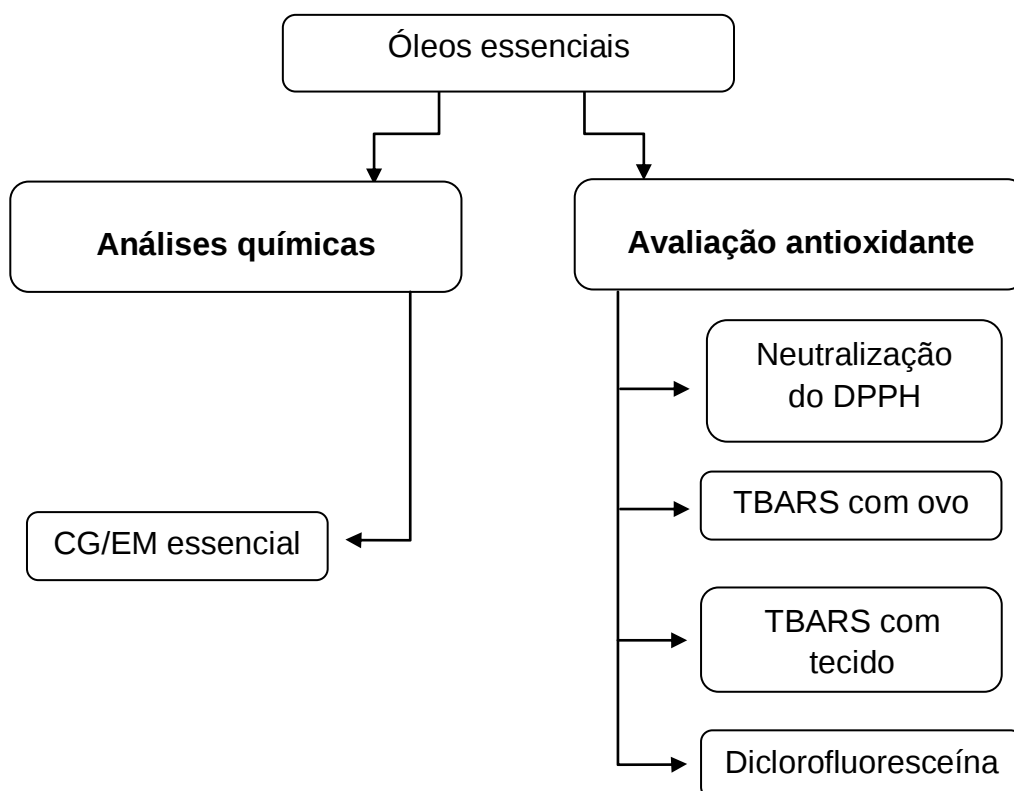
Dos materiais vegetais selecionados extraiu-se:

- Óleo essencial das folhas de *Croton campestris* (OEFCC)
- Óleo essencial dos galhos de *Croton campestris* (OEGCC)
- Extrato etanólico das folhas de *Croton campestris* (EEFCC)
- Extrato etanólico dos galhos de *Croton campestris* (EEGCC)
- Extrato etanólico das raízes de *Croton campestris* (EERCC)

A organização dos testes aos quais os extratos e óleos essenciais foram submetidos seguiu a ordem proposta pela figura 10.

Figura 8: Organização dos testes aos quais os materiais foram submetidos.





*O OEFCC (óleo essência das folhas de *Croton campestris*) não foi submetido a essa metodologia; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; CG/EM: Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de Massa; DPPH: 1-1-difenil-2-picrilhidrazil; TBARS: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*.

4.2. Preparação dos extratos

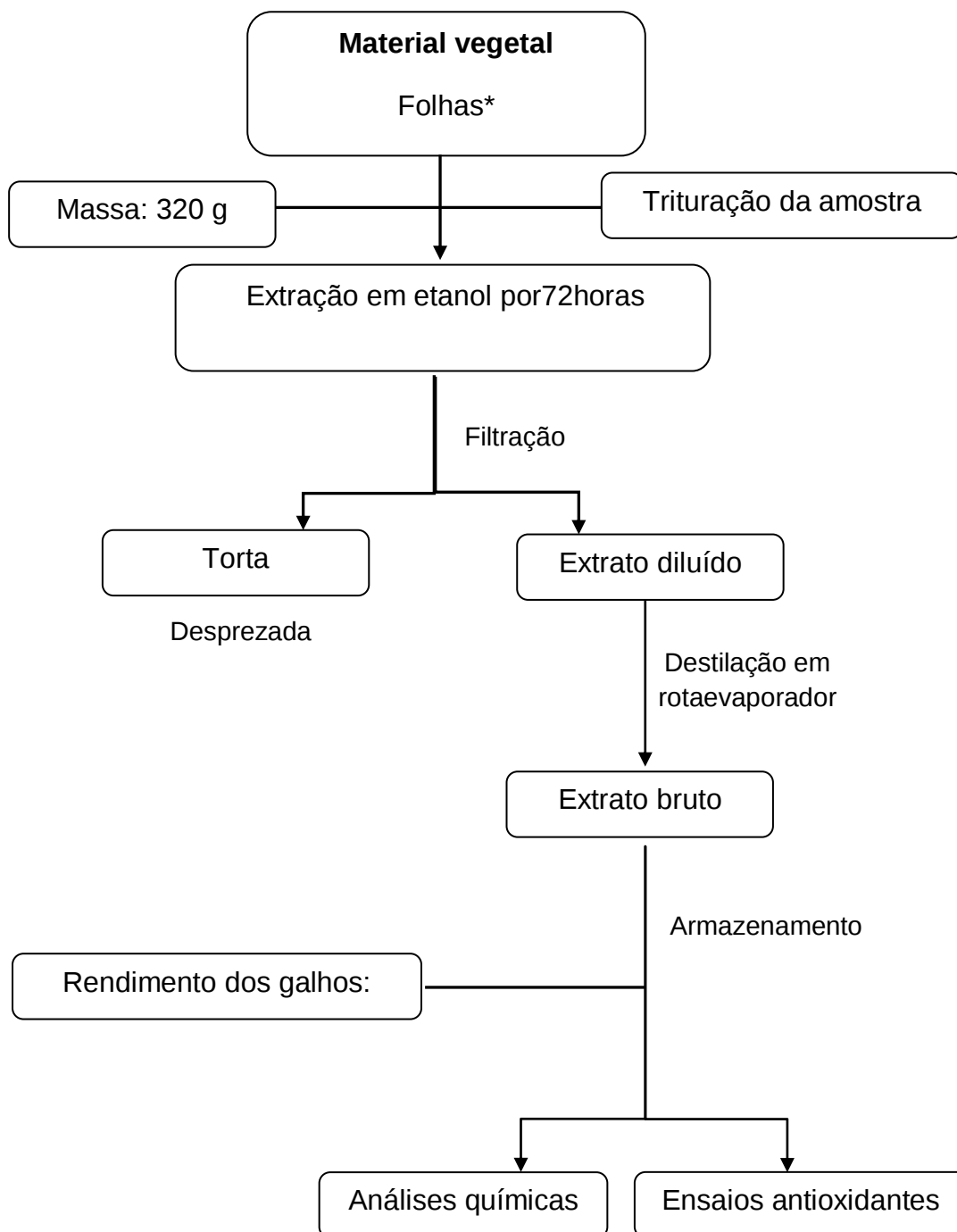
Os materiais coletados foram selecionados separadamente (folhas – 320g; galhos – 785g; raízes – 490g) e secos à temperatura ambiente e, em seguida, foram triturados, para aumento da superfície de contato, e submersos separadamente em etanol P.A. para extração prolongada a frio por um período de aproximadamente 72 horas, segundo a metodologia descrita por Matos (1988). Os extratos foram submetidos a filtrações, para retirada da torta e impurezas menores, e submetidos à destilação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada entre 70-80°C, com posterior retirada do excedente etanólico em banho-maria.

Os rendimentos para cada extrato: extrato etanólico das folhas (EEFCC), extrato etanólico dos galhos (EEGCC) e extrato etanólico das raízes (EERCC), foram calculados com base no peso seco dos extratos em relação ao peso do material antes de ser submetido à extração, determinando assim, os percentuais de 8,82%, 8,60% e 11,47%, para folhas, galhos e raízes respectivamente. Os materiais foram acondicionados e mantidos à temperatura ambiente até o momento das análises. (Figura 8)..

4.3. Obtenção dos óleos essenciais

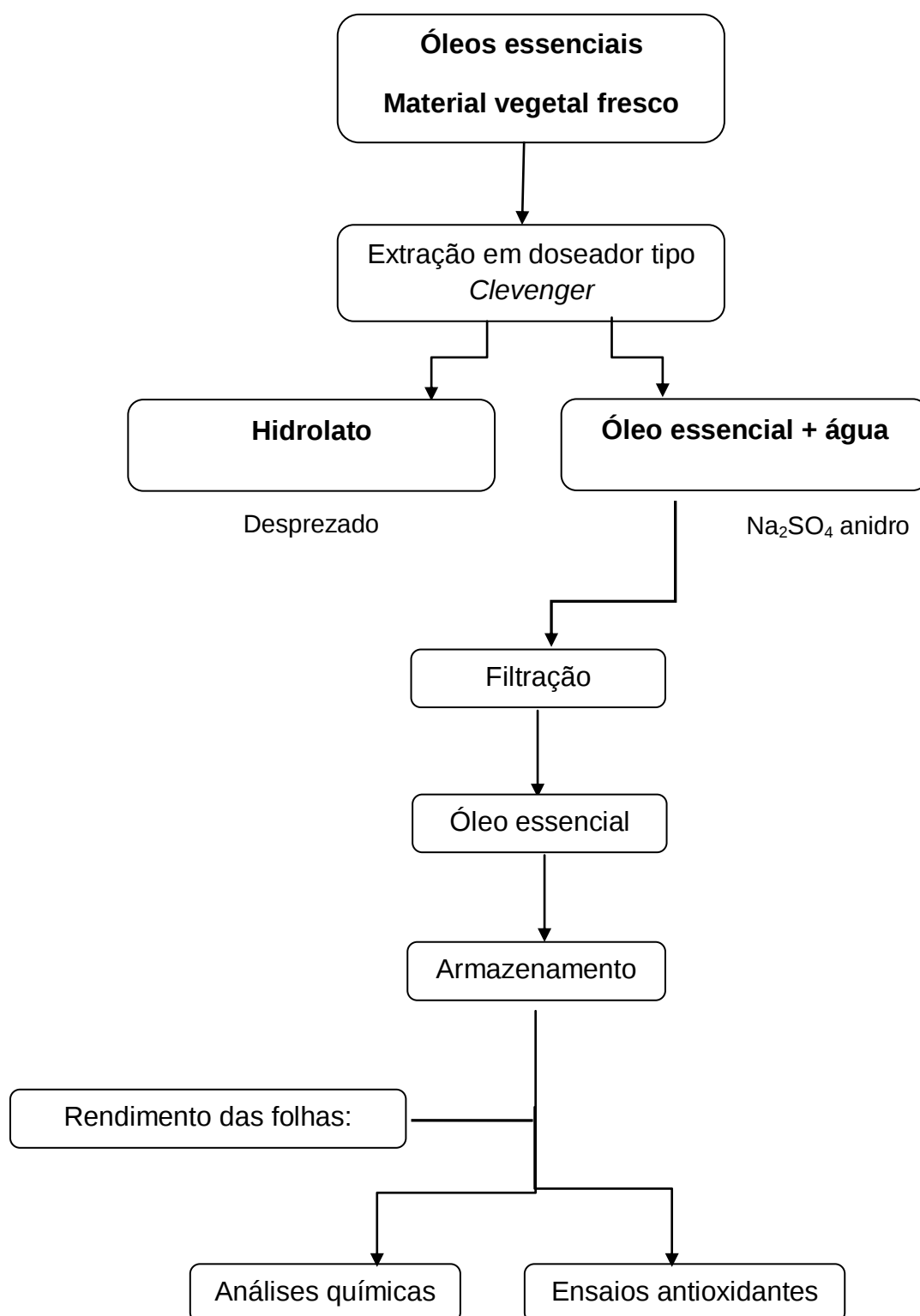
Amostras de folhas (900 g) e galhos (2.700 g), ainda frescos, foram selecionadas, trituradas e separadas em balões de vidro de 5,0 L juntamente com 2,5 L de água destilada cada e aquecidos até ebulição por 2 horas sendo submetidos ao processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado (GOTTlieb, 1960). Foram obtidos dois óleos: óleo essencial das folhas de *C. campestris* (OEFCC) e o óleo essencial dos galhos de *C. campestris* (OEGCC). Os rendimentos foram calculados com base no peso de cada óleo em relação ao peso do material submetido à extração. Os óleos essenciais foram posteriormente secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e mantidos em vidros âmbar sob refrigeração a $\pm 4^\circ\text{C}$ até o momento das análises (Figura 9). não foram realizados experimentos utilizando óleo essencial das raízes devido ao baixíssimo rendimento apresentado por estas inviabilizando as análises..

Figura 9: Obtenção dos extratos etanólicos brutos das folhas, galhos e raízes de *C. campestris*.



* O mesmo procedimento foi realizado para os galhos (785 g) e para as raízes (490 g).

Figura 10: Obtenção dos óleos essenciais das folhas e galhos de *C. campestris*.



*O mesmo procedimento foi realizado para os galhos (2.700 g).

4.4. Análises químicas

4.4.1. Prospeção fitoquímica

A avaliação fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia de Matos (1997). Os testes foram baseados na observação visual da mudança colorimétrica e/ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos nas soluções dos extratos.

4.4.2. Determinação de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada através da reação de concentrações pré-determinadas dos extratos juntamente com 1,25 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* a uma concentração de 10%, seguido da adição de 1,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. As soluções foram incubadas a 45°C por um período de 15 minutos, e as absorbâncias foram mensuradas a 765 nm. O ácido gálico (AG) foi utilizado como padrão de comparação de composto fenólico (SINGLETON *et al.*, 1999). A média das leituras dos testes foi utilizada e os resultados expressos em microgramas de AG por miligrama de extrato.

4.4.3. Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrômetro de Massa (CG/EM)

As análises da composição química dos óleos essenciais foram realizadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) *Hewlett-Packard*, Modelo 5971 usando-se coluna capilar apolar DB-1, de sílica modificada (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm), carregado por gás hélio, com velocidade de fluxo 0,8 mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor e do detector foram 250°C e 200°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 35°C para 180°C com aumento de

4°C/min e, em seguida, de 180°C para 250°C com aumento de 10°C/min. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30 - 450 *m/z*.

Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com a base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro (Wiley, 229) e outras duas bibliotecas, utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (ALENCAR *et al.*, 1984; ALENCAR *et al.*, 1990), bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (STENHAGEN e ABRAHAMSON; MCLAFFERTY, 1974; ADAMS, 2001). Foram calculadas as quantidades de cada substância de acordo com a área sobre a curva.

4.4.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.4.4.1. Química, aparelhos e procedimentos gerais

Todos os reagentes utilizados foram de pureza com grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico, foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina, rutina e campferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada utilizando o sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT com duas bombas alternadas ligadas ao degaseificador DGU 20A5 com o integrador CBM 20^a, UV-VIS com detector DAD (diodo) SPD-M20A e Software LC solução 1,22 SP1.

4.4.4.2. Quantificação de compostos por CLAE

A Análise cromatográfica com fase reversa foi realizada utilizando colunas C₁₈ (4,6 mm x 250 mm) com partículas medindo 5µm de diâmetro. A fase

móvel continha uma solução de água e 2% de ácido acético (A) e metanol (B), com composição do gradiente de 5% de B nos primeiros 2 minutos mudando para a obtenção de 25%, 40%, 50%, 60%, 70% e 100% de B nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 80 minutos, respectivamente, segundo metodologia descrita por Laghari *et al.* (2011), com algumas adaptações. Os extratos etanólicos das folhas, galhos e raízes de *C. campestris* foram dissolvidos em etanol na concentração de 2,4 mg/mL. A presença de seis compostos fenólicos foi investigada: os ácidos gálico, clorogênico e cafeico e os flavonóides quercetina, rutina e campferol. A identificação desses compostos foi realizada pelo método do padrão pelo qual é realizada a comparação dos seus tempos de retenção e através do espectro de absorção UV comparando-os à compostos de padrão comercial. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min, injetando um volume de 40 µL e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico, 325 nm para o ácido cafeico e para o ácido clorogênico, e 365 nm para quercetina, rutina e campferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas por membrana (Millipore) com poros de 0,45µm, e desgaseificadas por ultrassom antes de serem utilizadas.

As soluções padrões de referência foram preparadas na fase móvel do CLAE a um intervalo de concentração entre 0,020 – 0,200 mg/mL para campferol, quercetina e rutina; e 0,050 – 0,250 mg/mL para os ácidos gálico, cafeico e clorogênico. Os picos de cromatograma foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 400 nm). Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 10523x + 1478.8$ ($r = 0.9999$); ácido cafeico: $Y = 12765x + 1381.7$ ($r = 0.9995$); rutina: $Y = 12691 - 1165.0$ ($r = 0.9998$); quercetina: $Y = 13495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$) e campferol: $Y = 15692x - 1218.1$ ($r = 0.9997$). Todas as avaliações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

4.5. Atividade antioxidante

4.5.1. Reagentes

Tris-HCl, ácido tiobarbitúrico (TBA), 1-1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), catequina, ácido gálico e malondialdeído bis-(dismetil acetato) (MDA) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Sulfato ferroso (Fe_2SO_4), ácido ascórbico e ácido acético, foram obtidos da empresa Merck (Rio de Janeiro, Brasil). A água foi purificada utilizando o sistema Milli-Qplus da Millipore (Milford, MA, EUA). A membrana do filtro (PRFE 0,45 mm) foi adquirida da Waters Co. (Miliford, MA, EUA). Todos os produtos químicos de laboratório utilizados neste estudo foram de pureza analítica.

4.5.2. Animais

Ratos Wistar machos (3,5 – 3,9 meses de idade e pesando entre 270-320 g) foram mantidos em grupos de 3-4 por gaiola com acesso contínuo a comida e água, e mantidos em sala com temperatura controlada ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) e com ciclo claro/escuro de 12/12h com as luzes acesas às 7:00h da manhã. Os animais foram mantidos, utilizados e o material biológico foi descartado de acordo com as Normas e Procedimentos de Biossegurança e Bioética (BAZZANO, 2006) o projeto foi aprovado pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri protocolo nº 12/2012.

4.5.3. Sequestro do radical DPPH (Difenil-Picril-Hidrazil)

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando o método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), descrito por Mensor *et al.* (2001). O radical DPPH apresenta em sua forma

instável a coloração lilás, e quando neutralizado torna-se incolor (Figura 11). O princípio dessa técnica consiste em verificar se há ou não neutralização com base nas absorbâncias das soluções de DPPH e dos materiais.

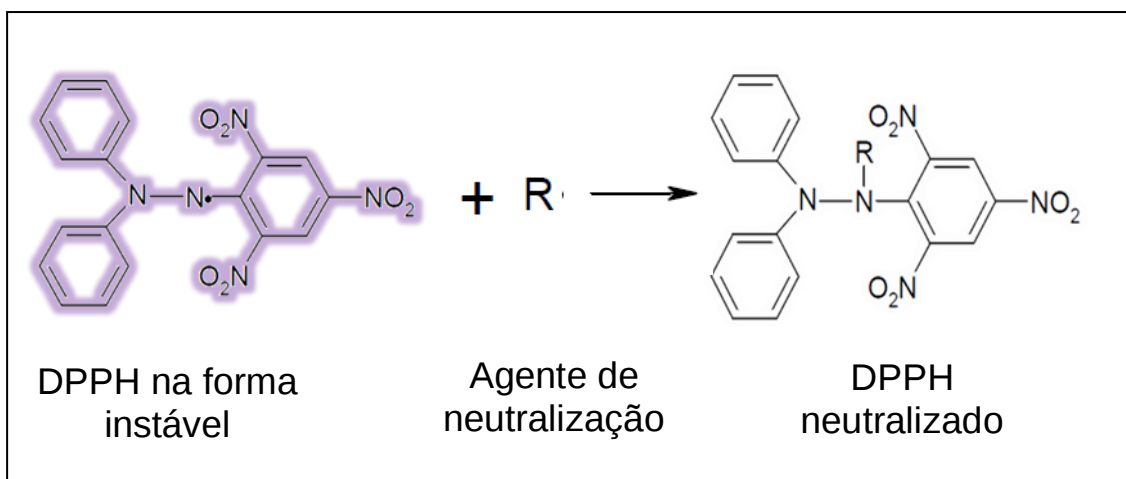


Figura 11: Reação de neutralização do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).

Nesse método é preparada uma solução de 0,3 mmol de DPPH em etanol. As amostras para testes foram preparadas adicionando-se 100 μ L da solução DPPH em 100 μ L de soluções das amostras de extratos e óleos essenciais que foram diluídos em etanol P.A. nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL, em triplicata. Como controle negativo foi utilizado 100 μ L de DPPH e 100 μ L de etanol. No controle positivo utilizou-se ácido ascórbico nas mesmas concentrações das amostras testadas, uma vez que, essas apresentam reconhecida ação antioxidante. A reação ocorreu no escuro à temperatura ambiente durante 30 min, a absorvância será lida com auxílio de um Espectrofotômetro de Ultravioleta (UV) a 518 nm, sendo a atividade antioxidante convertida em porcentagem. Com base nos dados obtidos será realizado o cálculo para determinação da capacidade de inibir 50% do DPPH (CI_{50}) em μ g/mL.

4.5.4. TBARS(Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Ao ocorrer danos à camada lipídica há a produção de diversos subprodutos, entre eles espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico como o malondialdeído (MDA) (Figura 12). A metodologia utilizada nessa investigação usa como parâmetro a leitura de absorbâncias das soluções de extratos ou óleos e fosfolipídios com ácido tiobarbitúrico, uma vez que essa solução apresenta coloração visível na faixa da cor rosa (532 nm). Todos os testes foram acompanhados de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de MDA para realizar o cálculo do fator de correção dos testes.

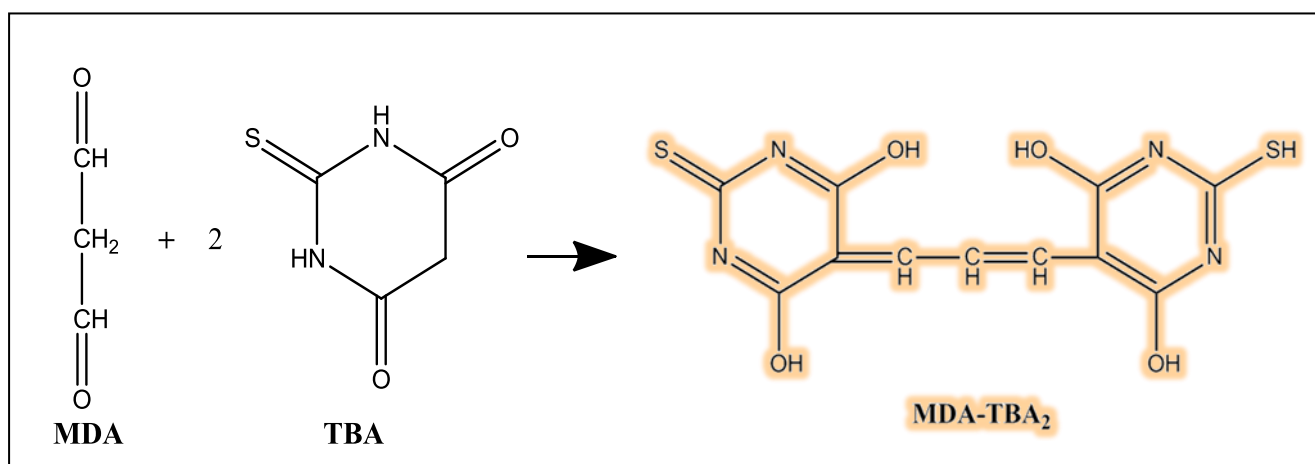


Figura 12: Reação de formação do complexo MDA-TBA; MDA: Malondialdeído; TBA: Thiobarbituric Acid.

4.5.5. Preparação do fosfolipídio de ovo

Foi preparada uma solução de gema de ovo (Solução (3:2) hexano:álcool isopropílico) na proporção de 1g para 10mL. Essa solução foi filtrada e rotaevaporada até a obtenção de resíduo seco. Para ensaio TBARS solubilizou-se 0,05g do resíduo em 10mL de água.

4.5.5.1. TBARS com fosfolipídio de ovo

A produção de TBARS foi determinada utilizando um método modificado de Sabir e Rocha (2008). Os homogeneizados obtidos com fosfolipídeo de ovo e diferentes concentrações do óleo essencial em conjunto com um volume adequado de água deionizada (volume total de 500 μ L), foram pré-incubados a 37 °C durante 1h na presença ou ausência de ferro como agente indutor de peroxidação lipídica. A reação de cor foi realizada pela adição, após a pré-incubação, de 500 μ L de tampão ácido acético e 500 μ L de TBA 0,6% dissolvido em água. As misturas de reação, incluindo uma série de diluições de 0,03mm MDA padrão, foram incubadas a 97 °C por 1h, e devido turbidez da reação, realizou-se uma partição com butanol. A leitura da absorbância foi realizada após o resfriamento dos tubos utilizando a fase butanólica em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm.

4.5.6. Preparação de fosfolipídio de tecido

Os ratos foram sacrificados e o tecido hepático foi rapidamente colocado em gelo. Os tecidos foram homogeneizados imediatamente em solução tampão 100 mM Tris HCl, pH7,5 (10/01 w/v). O homogeneizado foi centrifugado por 10 min para produzir uma pastilha que foi descartada e um sobrenadante de baixa velocidade (S1) utilizado para os ensaios de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) (PUNTE *et al.*, 2007).

4.5.6.1. TBARS com tecido

A produção de TBARS foi determinada utilizando um método modificado de Ohkawa *et al.* (1979). Os homogeneizados e diferentes concentrações do extrato da planta foram pré-incubados a 37°C durante 1h em conjunto com um volume adequado de água deionizada para um volume total de 300 μ L na presença ou ausência de ferro como agente indutor de peroxidação lipídica. A

reação de cor foi realizada pela adição de 200, 500 e 500µL de dodecil sulfato de sódio 8,1% (SDS), ácido acético (pH 3,4) e 0,6% TBA, respectivamente, para cada um dos tubos. As misturas de reações, incluindo os da série de diluições de 0,03mm MDA padrão, foram incubadas a 97°C por 1h. A leitura da absorbância foi realizada após o resfriamento dos tubos em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm.

4.5.7. Diclorofluoresceína

A DCFH-DA é de-esterificada no interior das células por esterases endógenas para ácido livre ionizado, 2,7-diclorofluoresceína. Esta é oxidada para 2,7-diclorofluoresceína fluorescente (DCF) por hidroperóxidos, de acordo com a Figura 13 (HEMPEL *et al.*, 1999). Ou seja, a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado no interior da mitocôndria.

4.5.7.1. Isolamento de mitocôndrias

Mitocôndrias de fígado de rato Wistar foram isoladas como descritas anteriormente por Brustovetsky e Dubinsky (2000), com algumas modificações. Após eutanásia por decapitação, os fígados foram rapidamente removidos (máximo 1 minuto após o sacrifício). O tecido foi então triturado com o auxílio de tesoura cirúrgica, e em seguida homogeneizado com auxílio de um *Potter-vehjem* com pistão de vidro, e imediatamente submersos em tampão de isolamento “I” gelado, contendo manitol 225mM, sacarose 75mM, Kp-EGTA 1mM, albumina de soro bovino 0,1%, e Kp-HEPES 10mM, pH 7.2.

A suspensão resultante foi centrifugada por 7 min a 2000 X g em centrífuga tipo Hitachi CR 21E. Após a primeira centrifugação o sobrenadante é recentrifugado por 10 min a 12,000 X g. O sedimentado foi ressuspenso em “tampão de isolamento II” contendo manitol 225mM, sacarose 75mM, Kp-EGTA 1mM, e Kp-HEPES 10 mM, pH 7,2, e recentrifugado a 12,000 X g por 10 min.

O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspenso em tampão de isolamento II sem EGTA, a uma concentração de proteína entre 30–40 mg/mL.

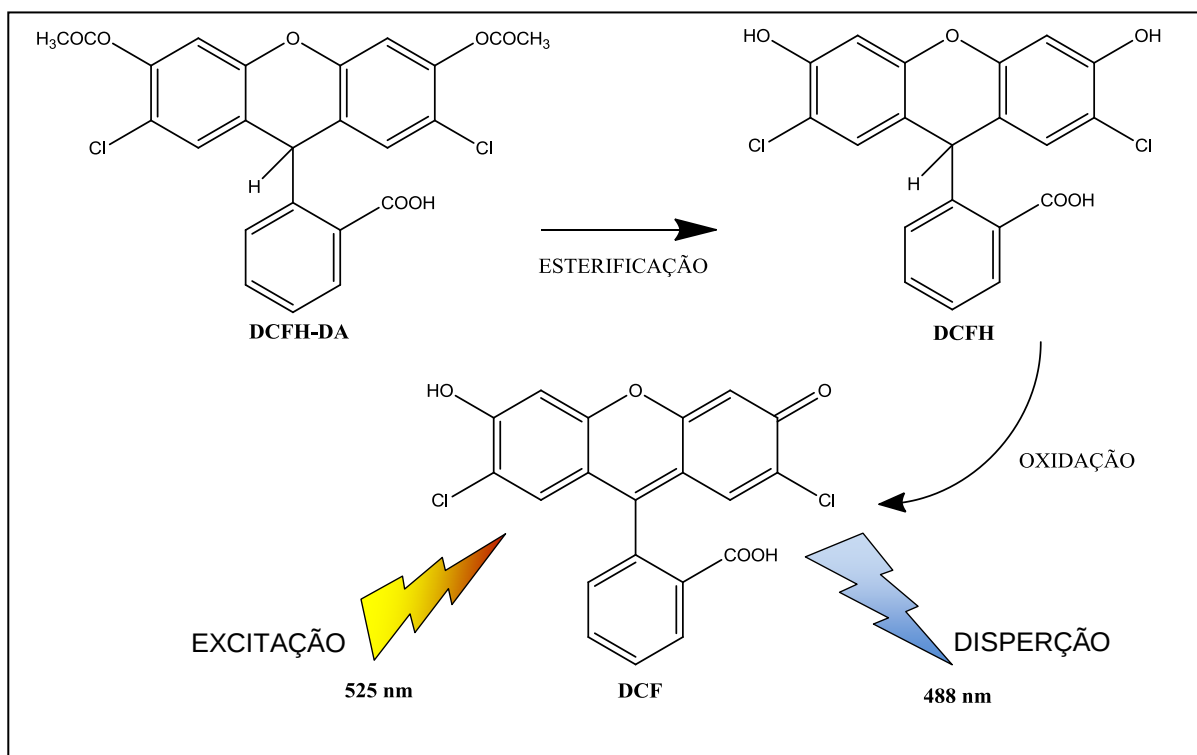


Figura 13: Etapas da reação de oxidação da DCF-DA para formação de DCF; DCF-DA: Diclorofluoresceína diacetilada; DCFH: Diclorofluoresceína; DCF: Diclorofluoresceína fluorescente.

De acordo com Hempel *et al.*, (1999), a oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado no interior da mitocôndria.

A geração mitocondrial de ERO foi determinada espectrofluorimetricamente utilizando a permeabilidade da membrana ao corante fluorescente aoDCF-DA (GARCIA-RUIZ *et al.*, 1997). A fluorescência foi ajustada a 488 nm para excitação, 525 nm para emissão, com largura da fenda de 1,5nm. Como agente indutor do aumento da peroxidação lipídica foi utilizado peróxido de hidrogênio, e diversas concentrações dos extratos foram verificados quanto à inibição desse processo.

4.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o programa ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls ou Tukey, por comparação múltipla quando apropriado com valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Análises químicas

5.1.1. Prospeção fitoquímica

A análise dos dados referentes à prospecção fitoquímica, tanto das folhas quanto dos galhos e das raízes, revelaram a presença de algumas classes de metabólitos secundários (Tabela 1), como flavonóides, taninos e alcalóides. Estudo descrito por Matias^c*et al.* (2010), identificou além das classes supracitadas, a presença de compostos terpênicos em extratos metanólicos e hexânicos de *C. campestris*.

Estes compostos são considerados substâncias bioativas que podem apresentar diversos efeitos como interferir na resposta inflamatória bem como auxiliar no processo de cura de feridas (SANTOS*et al.*, 2007; ALCARAZ*et al.*, 2004).

5.1.2. Concentração de fenóis totais

A concentração de fenóis totais para os extratos das folhas e galhos apresentaram-se semelhantes (Tabela 2), sendo estatisticamente diferentes quando relacionados ao extrato das raízes, apesar de ter sido utilizado o mesmo método de extração e dos rendimentos serem semelhantes.

Estudos indicam que compostos polifenólicos como ácido cafeico, flavonóides e derivados destes apresentam diversas propriedades entre elas uma forte correlação com atividade antioxidante (HEIM *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2002; KUMAZAWA*et al.* 2004). Em Gregoris e Stevanato 2010 foi demonstrado, que apesar de não ser específico em geral, extratos que apresentam uma alta concentração de fenóis também demonstram bons resultados na neutralização do DPPH, e na inibição da peroxidação lipídica.

Tabela 2: Classes de metabólitos identificados.

Extratos	Metabólitos													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
EEFCC	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
EEGCC	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
EERCC	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

1= taninos pirrogálicos; 2 = taninos flobabênicos; 3 = antocianinas; 4 = antocianidinas; 5 flavonas; 6 = flavonóis; 7 = xantonas; 8 = chalconas; 9 = auronas; 10 = flavononóis; 11 = leucoantocianidinas; 12 = catequinas; 13 = flavononas; 14 = alcalóides; + = presença – = ausência; EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*; EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*.

Tabela 3: Determinação de compostos fenólicos em extratos etanólicos de *C. campestris*.

Extrato etanólico	Fenóis (µg AG/mg extrato)
	mean ± SEM
EEFCC	6,04 ± 0,51
EEGCC	6,63 ± 1,81
EERCC	26,17 ± 3,88

Dados mostram médias ± DP, valores médios de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata; EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*; EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*.

5.1.3. Análise por CLAE-DAD

A impressão dos dados por CLAE dos extratos etanólicos das folhas, galhos e raízes de *C. campestris*, revelou a presença do ácido gálico (tR = 17,83 min; pico 1), ácido clorogênico (tR = 28,14 min; pico2), ácido cafeico (tR = 34,09 min; pico 3), rutina (tR = 42,11 min; pico 4), quercetina (tR = 49,78 min; pico 5) e campferol (tR = 58,96 min; pico 6) (Figura 14).

A concentração de cada uma das substâncias encontradas demonstrou que o EEFCF apresenta uma quantidade significativamente mais alta de rutina em relação aos demais extratos, assim como quantidades mais baixas de quercetina e campferol, os compostos fenólicos apresentaram quantidades semelhantes para todos os extratos (Tabela 3).

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via do acetato e chiquimato, as etapas que desencadeiam a formação dos flavonóides iniciam-se com o metabolismo de fenilpropanoides (DÔRES, 2007), os metabólitos identificados nos extratos de *C. campestris* estão presentes nessa via indicando uma possível rota para suas produções neste vegetal (Figura 15).

O ácido clorogênico é derivado do ácido cafeico e juntamente ao ácido gálico são considerados como uns dos principais antioxidantes encontrados nos vegetais, assim como os alguns flavonóides suas rotas biossintéticas são derivadas de uma das vias do chiquimato (LEAL, 2006; DEWICK e HASLAM, 1969). As estruturas dos compostos identificados estão representadas no esquema da Figura 16.

A química do gênero *Croton* tem sido bastante explorada e os estudos efetuados têm conduzido a identificação de alcalóides em diversas partes das plantas como raízes e cascas (RANDAU, 2004; BITTNER *et al.*, 1997). A presença de flavonóides foi identificada em algumas espécies do gênero, como em *Croton zambezicus*, onde cinco flavonóides C-glicosilados foram isolados (WAGNER *et al.*, 1970): dois derivados da quercetina eterificados isolados de

Croton schiedeana (GUERRERO *et al.*, 2002) e tilirosideo de *Croton gnaphalii* (LENCINA *et al.*, 2001).

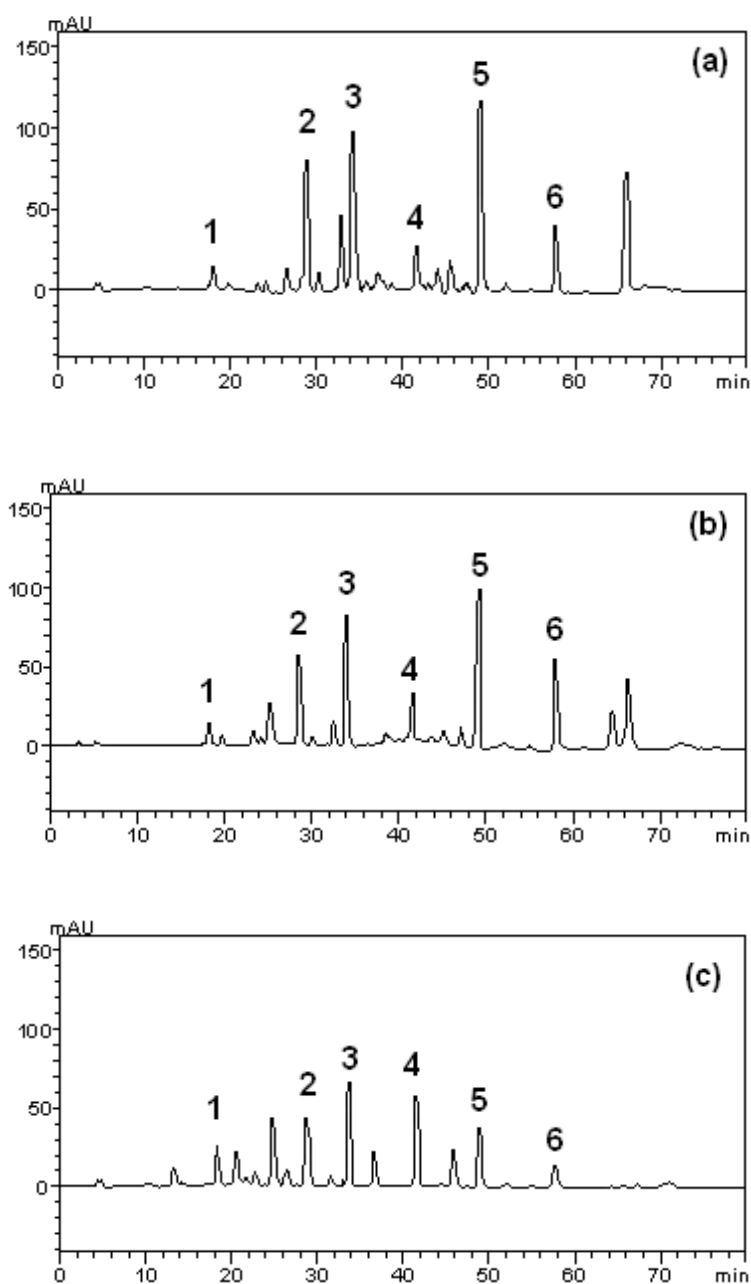


Figura 14 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência de *C. campestris*. Extrato das raízes (a), extrato dos galhos (b) e extrato das folhas (c), a faixa de detecção UV foi a 325nm. Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), rutina (pico 4), quercetina (pico 5) e campferol (pico 6). Condições cromatográficas descritas na sessão de métodos.

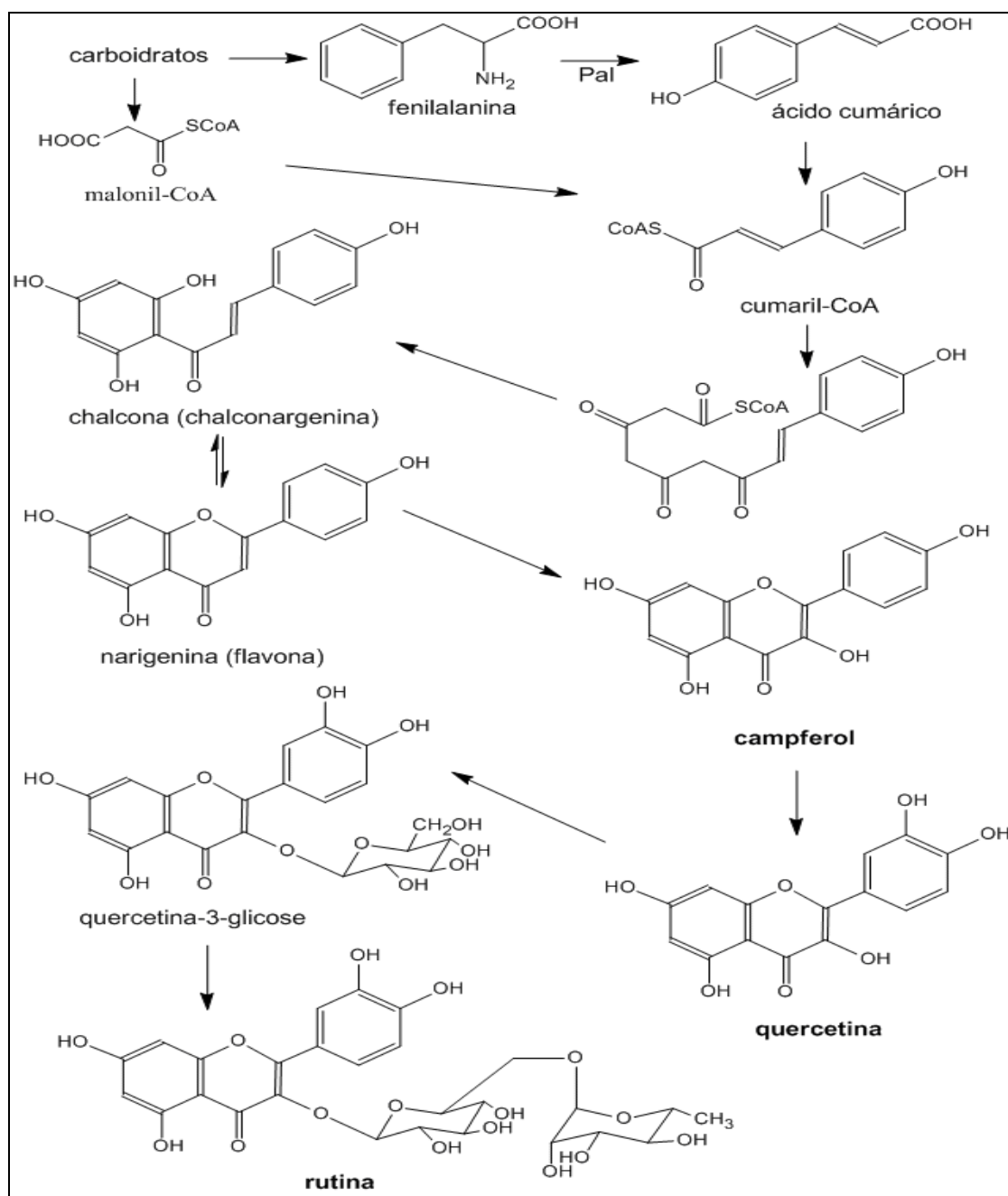


Figura 15 – Rota de biossíntese dos flavonóides encontrados nos extratos de *C. campestris*. A fenilalanina é transformada pela PAL (phenylalanine ammonia lyase) em ácido cinâmico que sofre hidroxilação formando o ácido cumárico que se une a três moléculas de malonato, ativados por acetil coenzima A (Acetil -CoA), formando respectivamente Cumaril CoA e malonil-CoA, que se condensam em estrutura ativada que servirá de substrato para a ação da enzima chalcona sintase, originando os flavonóides como o campferol e

quercetina e subsequente formação de rutina pela adição de moléculas de açúcar; Fonte: adaptado de DÔRES, 2007.

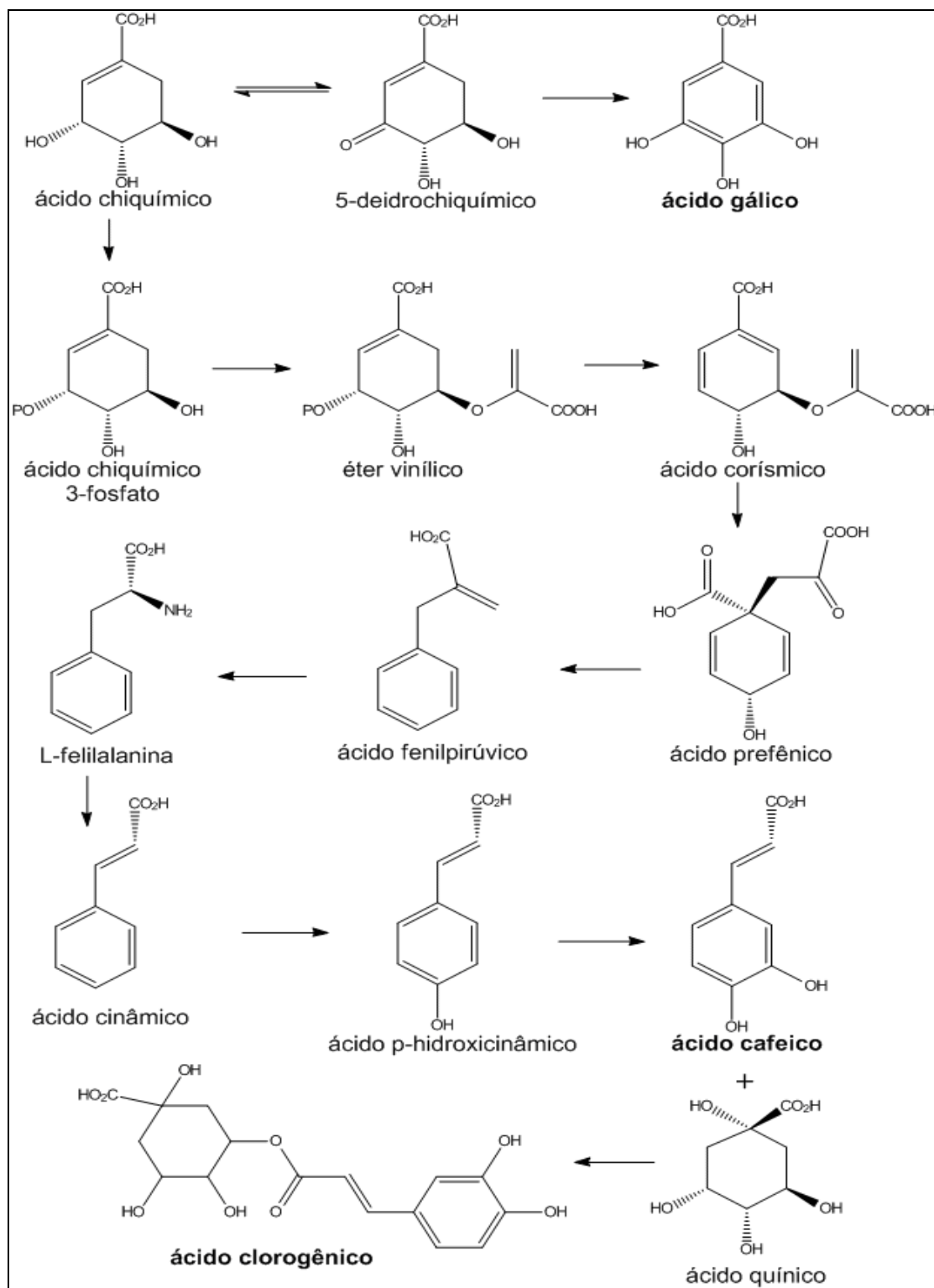


Figura 16 – Via do chiquimato para a produção dos ácidos fenólicos, nessa via o ácido cinâmico é um dos intermediários na biossíntese do ácido cafeico e clorogênico, sofre sucessivas hidroxilações e metilações, de onde provém uma série de ácidos. Esta rota tem como ponto em comum com a rota dos

flavonóides esquematizada na figura 15 a fenilalanina, no entanto, seu destino nesta rota é distinto. Fonte: adaptado de LEAL, 2006; DEWICK e HASLAM, 1969.

Tabela 4 – Composição de ácidos fenólicos e flavonóides de *C. campestris*.

Compostos	EERCC		EEGCC		EEFCC	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
Ácido gálico	5,03 ± 0,01 a	0,50	4,97 ± 0,03 a	0,49	7,47 ± 0,08 a	0,75
Ácido clorogênico	19,34 ± 0,01 b	1,93	16,86 ± 0,02 b	1,68	12,38 ± 0,15 b	1,24
Ácido cafeico	23,01 ± 0,17 c	2,30	20,18 ± 0,11 c	2,01	17,51 ± 0,02 c	1,75
Rutina	7,37 ± 0,13 a	0,73	7,49 ± 0,06 a	0,74	15,93 ± 0,07 d	1,59
Quercetina	32,64 ± 0,06 d	3,26	24,38 ± 0,07 d	2,43	11,04 ± 0,02 b	1,10
Campferol	11,09 ± 0,05 e	1,10	16,52 ± 0,01 e	1,65	6,05 ± 0,03 a	0,61

Os resultados são expressos como média ± desvios-padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$. EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*; EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*.

5.1.4. Análise por CG/EM

Os óleos essenciais obtiveram rendimento de 0,04% e 0,02% para folhas e galhos, respectivamente, sendo que o primeiro apresentou coloração amarelo-clara e o segundo apresentou tonalidade verde, ambos com aromas fortes e distintos. A análise por CG/EM demonstrou que os óleos apresentam composição diversa, com a identificação de 48 constituintes diferentes, representando um total de 95,7% e 92,9%, para OEFCC e OEGCC respectivamente. Desses, 28 componentes são comuns aos dois óleos. Ambos os óleos apresentaram apenas monoterpenos e sesquiterpenos, sendo os sesquiterpenos responsáveis pelas maiores concentrações, com 67,6% e 67,8% para OEFCC e OEGCC, respectivamente.

Os monoterpenos que se apresentaram em maior concentração foram limoneno e o terpinen-4-ol para o OEFCC e OEGCC respectivamente. Os compostos majoritários para o OEFCC foram os sesquiterpenos β -cariofileno (17,0%) e o biciclogermacreno (16,2%). Para o OEGCC também houve predominância do biciclogermacreno (11,3%) como constituinte majoritário, juntamente com o espatulenol (14,7%) (Figura 17).

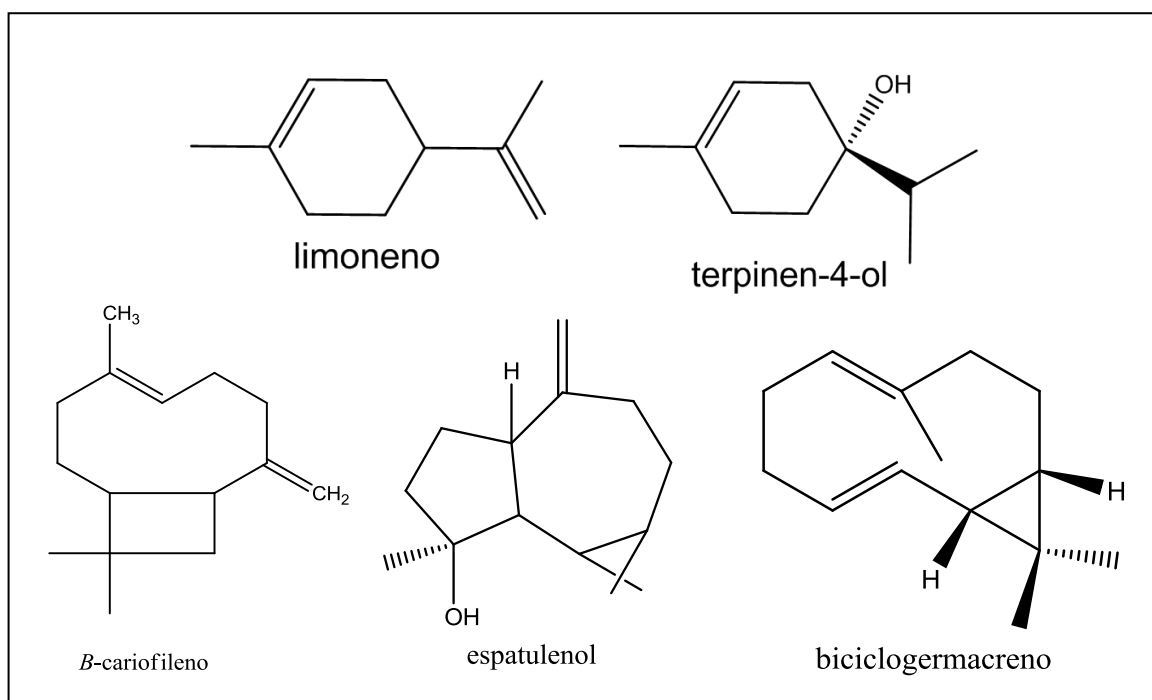


Figura 17: Fórmula estrutural dos monoterpenos e sesquiterpenos majoritários presentes nos óleos essenciais de *C. campestris*.

Estes terpenos já foram identificados em óleos essenciais obtidos das folhas e cascas de outras espécies de *Croton*, como β -cariofileno, apresentando-se como constituinte majoritário ou em concentrações significativas, podendo ser considerado um marcador para o gênero em *C. enrhamnifolius*, *C. var. heliotropiifolius*, *C. pulegioides* e *C. rhamnifolius var. heliotropiifolius*, no qual o β -cariofileno apresentou uma concentração de 20,82% e o espatulenol de 16,37 % para o óleo essencial extraído das folhas (NEVES e CAMARA, 2012).

Biciclogermacreno é um sesquiterpeno encontrado como o componente principal em muitos óleos essenciais que apresentam atividades antibacteriana (SHAFAGHAT, 2011), antioxidante e larvícida (COSTA *et al.*, 2011), antiespasmódico, antivirais e atividade analgésica local (BELÁ *et al.*, 2012).

Babili *et al.* (2009) demonstraram que o óleo essencial das folhas de *C. campestris* apresentou atividade antimicrobiana mostrando-se eficaz frente à cepas de bactérias como *Staphylococcus aureus*, e *Enterococcus hirae*, assim como frente ao fungo *Candida albicans*, indicando o potencial biológico desse óleo.

Tabela 5: Composição química dos OEFCC E OEGCC.

Ordem	Componentes	IR ^a	Composição (%)	
			OEFCC	OEGCC
1	α -pineno	768	0,8	0,3
2	camfeno	781	-	0,3
3	sabineno	971	1,4	-
4	β -pineno	972	-	4,2
5	1-octeu-3-ol	980	0,4	-
6	mirceno	989	0,6	0,4
7	α -felandreno	1001	-	0,6
8	α -terpineno	1014	-	0,3
9	ρ -cineno	1022	1,9	1,7
10	limoneno	1027	9,7 [#]	3,8
11	γ -terpineno	1057	5,2	1,1
12	<i>cis</i> -sabineno	1065	-	0,4
13	terpinoleno	1085	0,9	-
14	linalol	1098	2,8	0,4
15	ρ -menth-2-eu-1-ol	1118	-	0,3
16	<i>L</i> -cânfora	1138	-	0,9
17	(-)-borneol	1162	1,3	1,1
18	terpinen-4-ol	1175	1,0	6,3 [#]
19	α -terpineol	1188	1,1	0,9
20	bornilo-acetato	1281	1,0	1,0
21	2-undecanona	1292	-	1,1
% monoterpenos		-	28,1	25,1
22	α -elemeno	1334	1,1	2,7
23	α -copaeno	1370	0,4	1,5
24	β -elemeno	1387	1,8	2,2
25	α -gurjuneno	1390	-	0,6
25	β -cariofileno	1413	17,0*	8,2
27	bergamoteno (α - <i>trans</i>)	1431	-	0,4
28	α -guaiano	1436	-	0,5

29	aromadendreno	1445	2,2	1,4
30	α -humuleno	1452	0,5	0,9
31	germacreno-D	1473	3,7	3,3
32	α -curcumeno	1481	-	0,7
33	biciclogermacreno	1492	16,2*	11,3*
34	germacreno-A	1495	0,9	0,5
35	α -amorfeno	1507	1,5	1,2
36	γ -cadineno	1517	1,4	1,5
37	elemol	1544	0,6	1,0
38	(+)-espatulenol	1570	3,6	14,7*
39	globulol	1576	2,5	0,7
40	viridiflorol	1589	1,2	0,5
41	guaiol	1592	1,3	1,1
42	torreiol	1596	-	1,2
43	cedrol	1605	1,8	-
44	eudesmol	1611	0,5	0,7
45	murolo-4,10(14)-dien-1- β -ol	1626	-	6,4
46	epi- α -cadinol	1638	6,6	1,0
47	α -cadinol	1648	2,8	1,3
48	bulnesol	1662	-	2,3
% sesquiterpenos		-	67,6	67,8
TOTAL			95,7	92,9

^a : Índices de retenção relativa (valores da literatura), [#]monoterpenos em maior concentração, * sesquiterpenos em maior concentração.

5.2. Atividade antioxidante

5.2.1. DPPH

Os extratos demonstraram capacidade de neutralizar o radical livre DPPH, (Figura 18), o que não foi evidenciado para os óleos essenciais. As concentrações para CI_{50} indicaram melhor resultado para o EE FCC com concentração de $7,105 \pm 3,515 \mu\text{g/mL}$, próximo ao determinado para o ácido ascórbico com $2,094 \pm 4,214 \mu\text{g/mL}$. Não foi possível calcular a CI_{50} dos óleos essenciais (Tabela 5).

A capacidade de neutralizar radicais livres foi anteriormente demonstrada em frações acetato de etila obtidos do extrato aquoso-metanólico das folhas de *Croton zambesicus*, processos cromatográficos aplicados levaram ao isolamento da quercetina-3-O- β -6''(p-coumaroil) glucopiranosideo-3'-metil eter, helicrisosideo-3'-metil eter, juntamente com campferol-3-O- β -6''(p-coumaroil) glucopiranosideo, tilirosideo e apigenina-6-C-glucosideo, isovitexina, todos apresentaram a capacidade de neutralizar o radical DPPH (ADEROGBA et al., 2011). *Apocyni veneti folium* também apresenta em sua composição química os flavonóides quercetina, rutina e campferol, sendo considerados possíveis responsáveis pela ação (YAN et al., 2011).

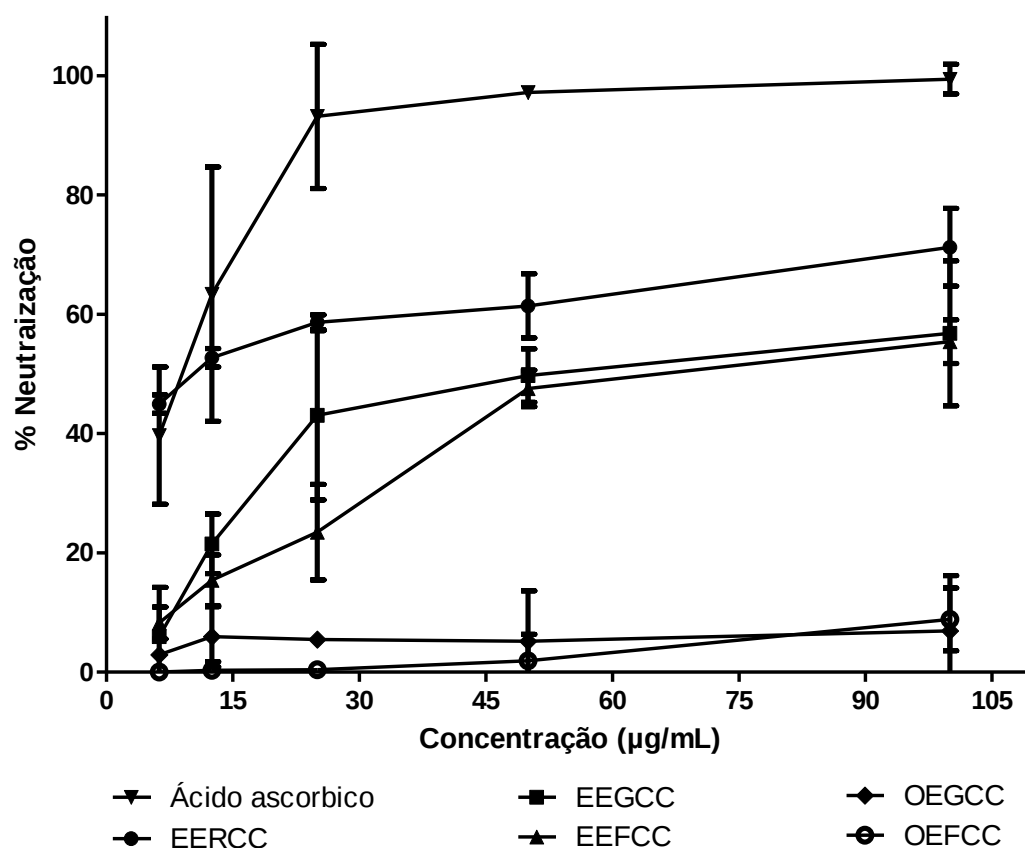


Figura 18. Efeitos de diferentes concentrações dos extratos etanólicos e óleos essenciais de *C. campestris* frente ao radical DPPH. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição e ácido ascórbico utilizado como controle positivo. Dados mostram médias $\pm$ DP valores médios de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata. EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*; EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*; OEFCC: Óleo Essencial das Folhas de *Croton campestris*; OEGCC: Óleo Essencial dos Galhos de *Croton campestris*.

Tabela 6: Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) valores obtidos por meio da reação dos extratos com o radical livre DPPH.

Amostras	Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido ascórbico	$2,094 \pm 4,214$
EERCC	$26,92 \pm 4,047$
EEFCC	$7,105 \pm 3,515$
EEGCC	$46,53 \pm 10,24$
OEFCC	ND*
OEGCC	ND*

ND: não detectado, * não foi possível realizar cálculo para determinar a Cl_{50} . EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*; EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*

5.2.2. TBARS com fosfolipídio de ovo

A inibição do processo de peroxidação lipídica utilizando fosfolipídio de ovo apresentou indício de redução quanto aos níveis basais para os extratos das folhas e raízes, contudo, esta redução não foi considerada significativa em nenhum dos casos. A mesma tendência não foi observada para os óleos essenciais e EEGCC.

Houve inibição significativa com $p > 0,01$ para o EERCC e $p > 0,05$ para os demais materiais na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, quando induzido estresse oxidativo com auxílio de Fe^{2+} (Figura 19). Os EERCC e EEFCC apresentaram, ainda, atividade na concentração de $40 \mu\text{g/mL}$.

Os óleos essenciais apresetaram perfil semelhante, ambos reduzindo significativamente ($p>0,05$) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em estresse induzido por ferro (Figura 20)

Sabir e Rocha (2008) determinaram a atividade antioxidante de *Phyllanthus niruri* (Euforbiaceae), utilizando diversas metodologias, entre elas, TBARS com fosfolipídio de ovo, nesse estudo foi induzido estresse oxidativo com ferro e nitroprussiato de sódio separadamente. Nas duas situações foram observadas reduções significativas da produção de MDA ($p>0,05$) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de extratos aquosos e metanólicos, sendo que os melhores resultados foram observados em relação ao ferro.

Figura19: Propriedade antioxidante de diferentes extratos de *C. campestris*: (a)EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*; (b) EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; (c) EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de ovo foi determinada quer na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experimentos independentes efetuadas em triplicata. * $p < 0,05$ vs Fe^{2+} induzido; ** $p < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido.

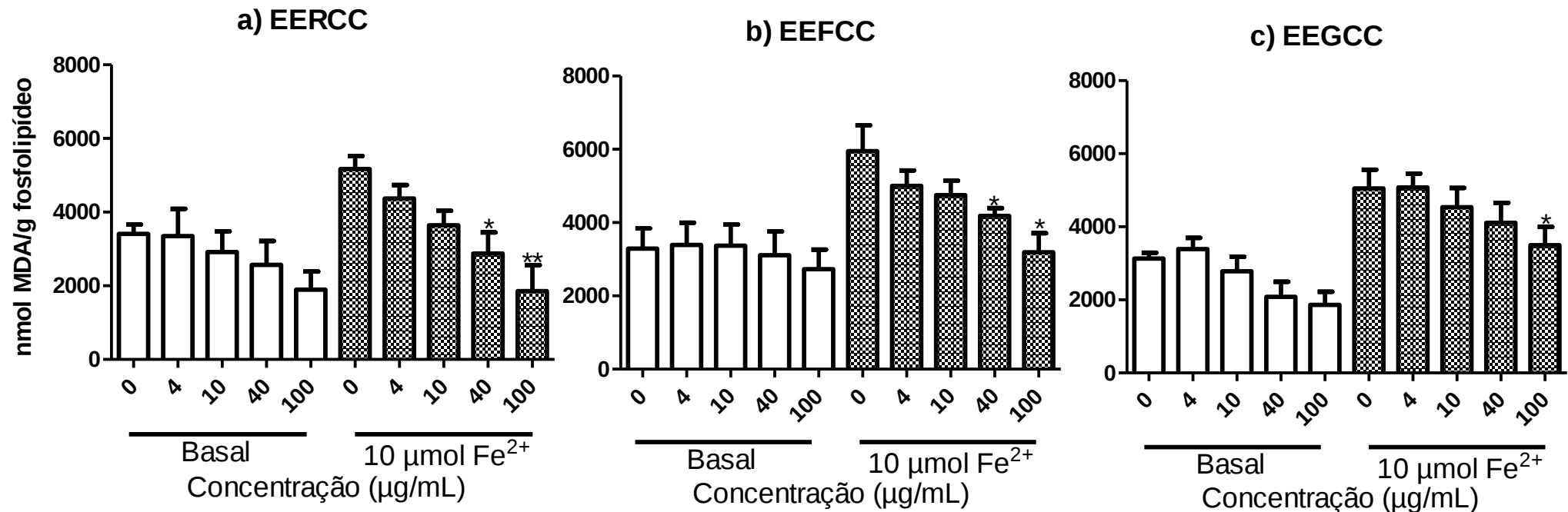
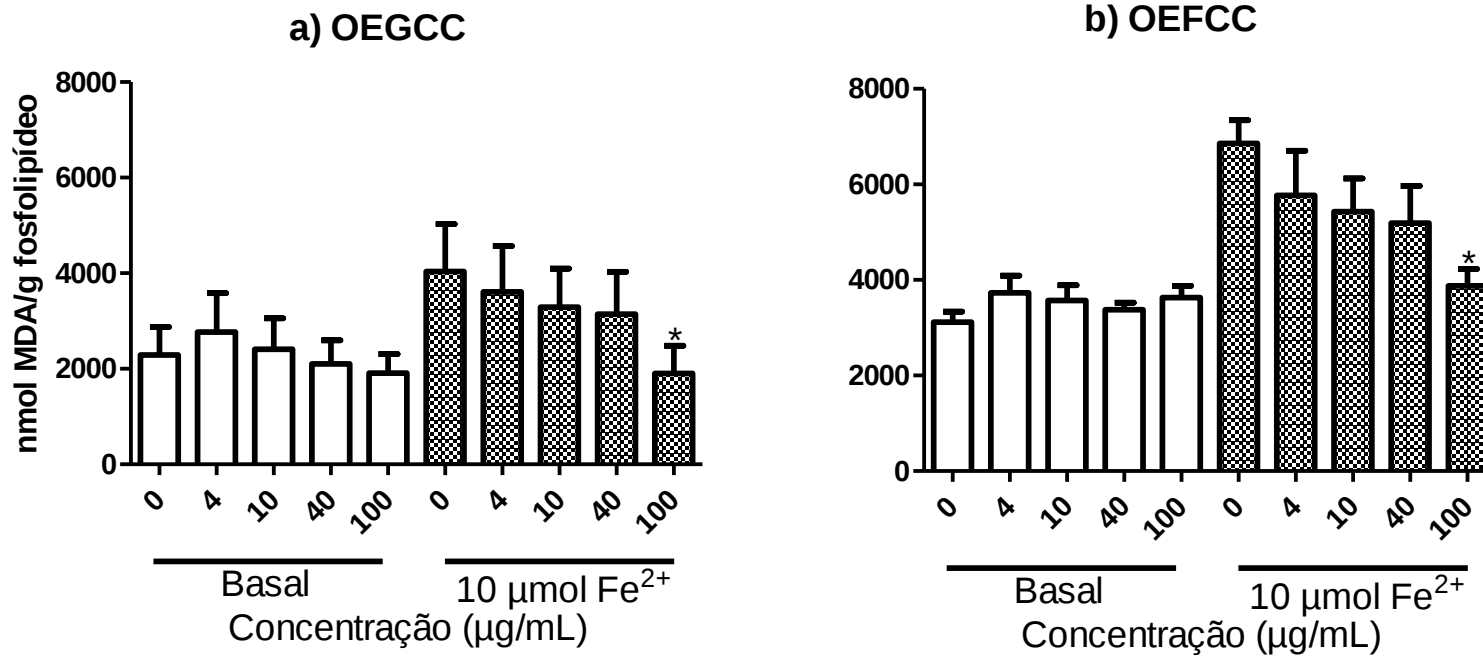


Figura 20: Propriedade antioxidante de diferentes óleos de *C. campestris*: (a) OEGCC: Óleo Essencial dos Galhos de *Croton campestris*; (b) OEFCC: Óleo Essencial das Folhas de *Crton campestris*. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de ovo foi determinada quer na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experimentos independentes efetuadas em triplicata. * $p < 0,05$ vs Fe^{2+} induzido; ** $p < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido.



5.2.3. TBARS com tecido

Quando verificada a capacidade antioxidante utilizando o método de TBARS em tecido, os extratos apresentaram um indicativo de redução em relação aos níveis basais, porém nenhum dos materiais nas concentrações testadas apresentou valores significativos. Já na análise em estresse induzido por ferro, os extratos das folhas e galhos apresentaram redução significativa em relação ao nível basal em todas as concentrações com $p < 0,001$ nas maiores concentrações, e $p < 0,01$ na concentração mais baixa. O extrato das raízes não apresentou atividade na menor concentração (4 $\mu\text{g/mL}$), porém nas demais concentrações os valores mostraram significância com $p < 0,001$ (Figura 21).

Existe uma correlação entre, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico como marcador da peroxidação lipídica e agentes que causam danos ao DNA (CHEN, WU e HUANG, 2005). O aumento na produção de TBARS na presença de ferro sugere que o acúmulo desse metal nos tecidos podem causar danos e estar associado a doenças como, quadro de hepatotoxicidade, cirrose, cardiopatias, atrofia e distrofia do pâncreas e lesões cerebrais (WHITTAKER, BERLETT; STADTMAN, 1997). Sabir e Rocha (2008) sugerem que o chá de plantas com a capacidade de inibir o estresse oxidativo em meios com sobrecarga de ferro podem ser úteis no tratamento de doenças decorrentes desse desequilíbrio.

O OEFCC demonstrou os melhores resultados, em condições de indução de estresse oxidativo com ferro no qual houve redução significativa com $p < 0,001$ para as concentrações de 100 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e com $p < 0,01$ na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. O OEGCC apresentou perfil semelhante com redução significativa da produção de TBARS em condições de estresse induzido por ferro com $p > 0,05$ nas concentrações de 100 e 40 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22).

A habilidade de coordenação de alguns óleos essenciais sobre o íon Fe^{2+} também é considerado um parâmetro importante nas propriedades medicinais dos mesmos uma vez que íons metálicos reduzidos aceleram os

processos peroxidativos sobre o organismo (YAMAUC HI et al., 1988; GONÇALVES; BATTISTIN, 2009).

Uma análise química do óleo essencial de *Mentha piperita* revelou a presença de alfa-pineno, beta-pineno, sabineno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol, *cis*-ocimeno, beta-cariofileno, germacreno-D e carvona, entre outros, a eles foi atribuída à capacidade quelante do ferro apresentada pelo óleo (GONÇALVES e BATTISTIN, 2009). Esse comportamento apresentado por alguns óleos essenciais pode indicar uma das vias de inibição da peroxidação lipídica no teste realizado, uma vez que não foi observada neutralização do radical livre DPPH e também não foi observada redução nas concentrações avaliadas em relação aos níveis basais, em contraste com os resultados significativos demonstrados na presença do ferro.

Morais et al.(2006) demonstraram efetiva atividade antioxidante de óleos essenciais das folhas de três outras espécies de *Croton* que também ocorrem na região nordeste do Brasil e são comumente utilizados na terapêutica popular da região: *C. zenhtneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides*. Nos ensaios realizados com essas espécies foi utilizada como método de avaliação a produção de TBARS com tecido e a concentração de 100 µg/mL demonstrou resultados significativos.

O MDA é um sinalizador biológico, sendo considerado um dos muitos precursores responsáveis por desencadear quadros de inflamação em tecidos (ZHOU et al, 2006; HILL et al,1998); a capacidade de inibição da peroxidação lipídica apresentada pode ser um indicativo de que a planta possui atividade antiinflamatória justificando o uso popular para esse fim (RIBEIRO-PRATA et al, 1993). Brito-Junior (2010) demonstrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Croton campestris* possui atividade gastroprotetora em modelos de lesão gástrica aguda induzida por diversos veículos como etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina, assim como potencializou a atividade gastroprotetora da capsaicina.

Figura 21: Propriedade antioxidante de diferentes extratos de *C. campestris*: (a) EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*; (b) EEFCC: Extrato Etanólico das Folhas de *Croton campestris*; (c) EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em homogeneizados de fígado de rato foi determinada na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experimentos independentes realizadas em triplicata. * $p < 0,05$ vs Fe^{2+} induzido TBARS; ** $p < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido TBARS, * $p < 0,05$ vs basal.

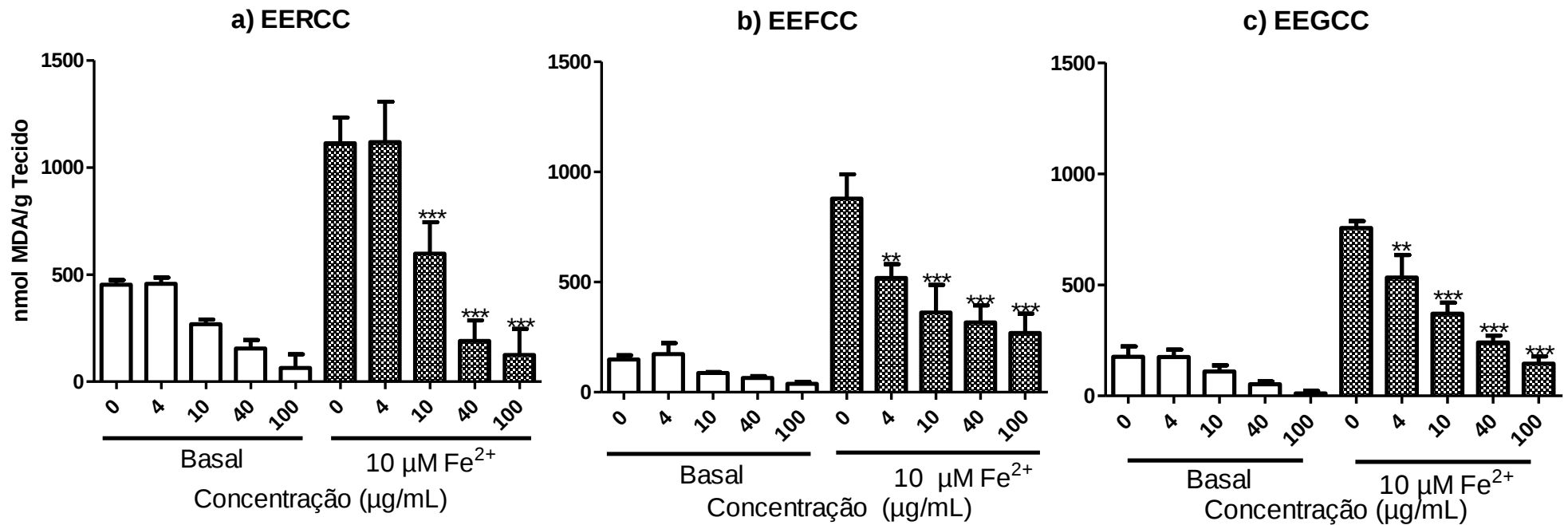
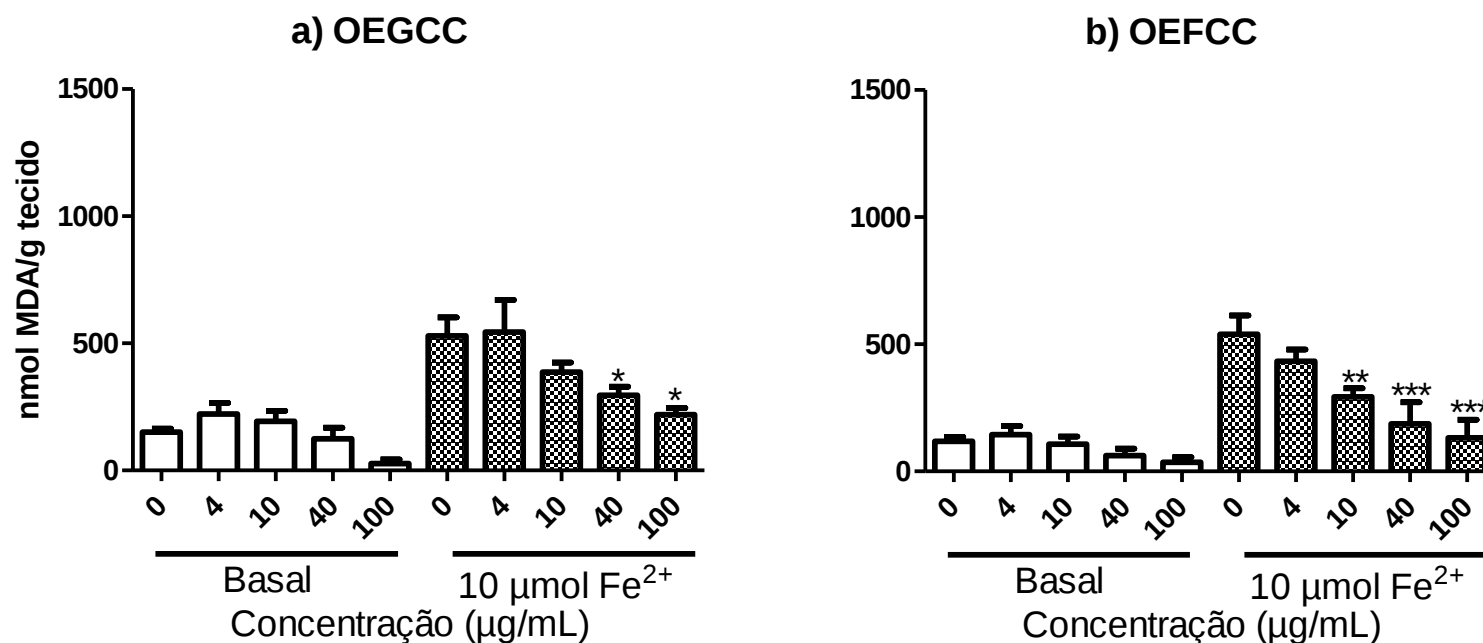


Figura 22: Propriedade antioxidante de diferentes óleos de *C. campestris*: (a) OEGCC: Óleo Essencial dos Galhos de *Croton campestris*; (b) OEFCC: Óleo Essencial das Folhas de *Crton campestris*. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em homogeneizados de fígado de rato foi determinada na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média $\pm$ SEM de 3 a 4 experimentos independentes realizadas em triplicata. *** $p < 0,001$ vs Fe^{2+} induzido TBARS; ** $p < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido TBARS, * $p < 0,05$ vs basal.



5.2.4. Diclorofluoresceína

O extrato das folhas apresentou resultados significativos na inibição do estresse oxidativo mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 200 à 25 µg/mL com $p < 0,001$, e com $p < 0,05$ na concentração mais baixa de 12,5 µg/mL (Figura 23). Entre os extratos os melhores resultados foram demonstrados para o extrato dos galhos, com redução significativa quando comparado ao controle com $p < 0,001$ e redução com $p < 0,05$ em relação a produção basal mesmo nas condições de estresse (Figura 24).

Apesar de possuir a maior concentração de fenóis totais, o extrato etanólico das raízes apresentou comportamento diferente dos demais materiais nesse ensaio, ainda que os resultados sejam significativos, demonstrando atividade com $p < 0,001$ para as concentrações de 200 e 100 µg/mL, e $p < 0,01$ para a concentração de 50 µg/mL. A concentração mais baixa de 25 µg/mL não apresentou significância. O OEGCC também apresentou capacidade de inibir o estresse induzido por H_2O_2 na concentração de 100 µg/mL com $p > 0,05$, apresentando comportamento dose-dependente assim como os extratos, no entanto as demais concentrações não apresentaram resultados significativos.

Essa análise reforça que os extratos etanólicos e óleos essenciais de *C.campestris* exercem atividade antioxidante agindo mesmo a nível mitocondrial e indica que essa espécie apresenta real potencial terapêutico.

Figura 23: A Propriedade antioxidante de diferentes extratos de *C. campestris*: (a) EERCC: Extrato Etanólico das Raízes de *Croton campestris*; (b) EEFCC: Extrato Etanólico das folhas de *Croton campestris*. Oxidação da DCFDA (diclorofluoresceína diacetilada) em mitocôndrias do fígado de ratos. Os valores de 3 a 4 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ vs H_2O_2 oxidação induzida, ** $p < 0,01$ vs H_2O_2 oxidação induzida, * $p < 0,05$ vs H_2O_2 oxidação, # $p < 0,05$ vs oxidação basal.

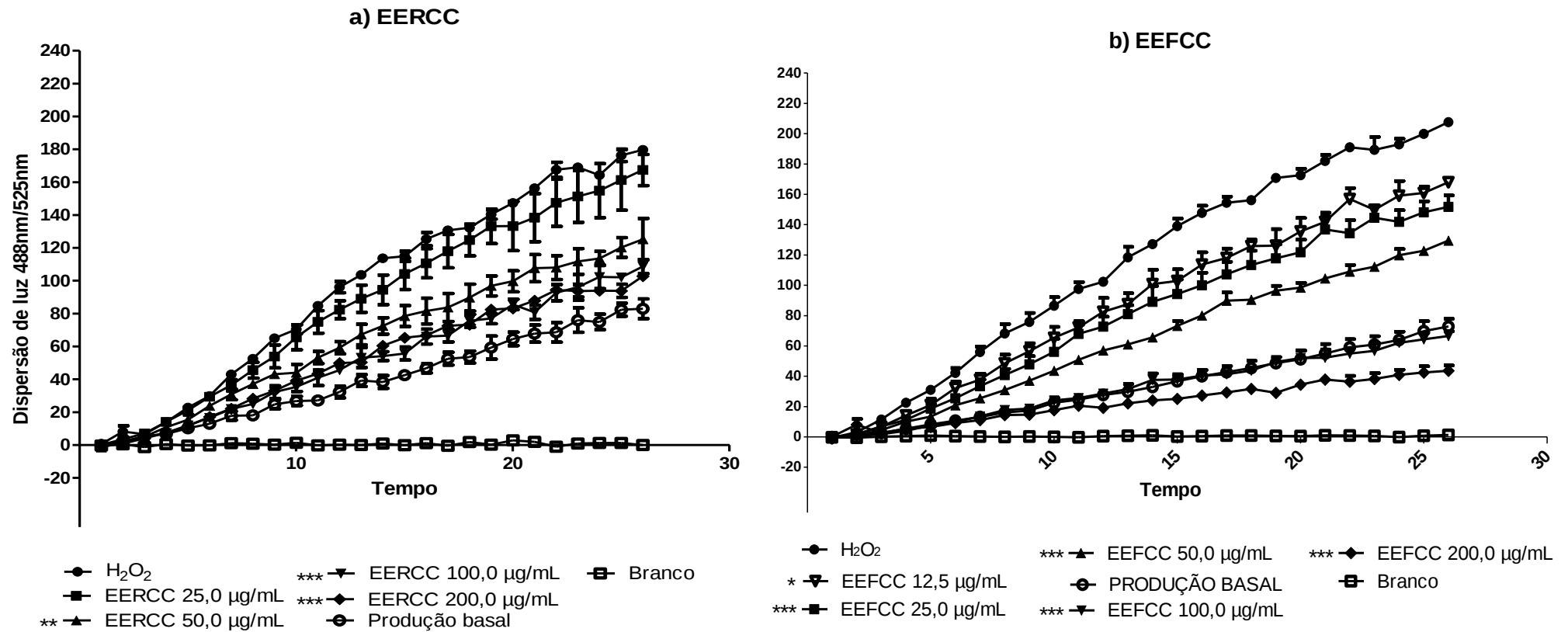
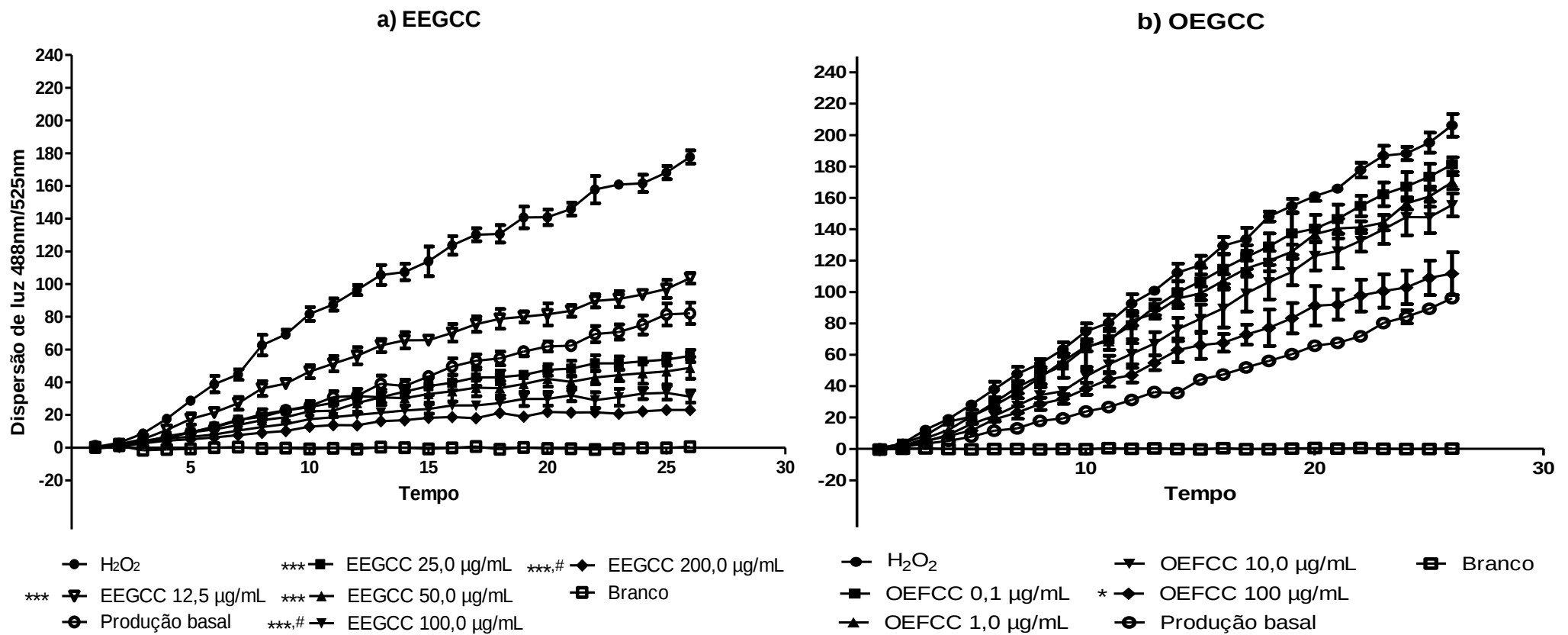


Figura 24: A Propriedade antioxidante dos diferentes extratos de *C. campestris*: (a) EEGCC: Extrato Etanólico dos Galhos de *Croton campestris*; (b) OEGCC: Óleo Essencial dos Galhos de *Croton campestris*. Oxidação da DCFDA (diclorofluoresceína diacetilada) em mitocôndrias do fígado de ratos. Os valores de 3 a 4 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ vs H_2O_2 oxidação induzida, ** $p < 0,01$ vs H_2O_2 oxidação induzida, * $p < 0,05$ vs H_2O_2 oxidação, # $p < 0,05$ vs oxidação basal.



CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O estudo químico de *C. campestris* permitiu a obtenção de óleos essenciais tanto das folhas quanto dos galhos com características distintas, como cor e aroma.
- A elucidação da composição química demonstrou que os óleos apresentam composição diversa com componentes comuns aos dois óleos.
- Ambos os óleos apresentaram constituição formada apenas por monoterpenos e sesquiterpenos. Os compostos majoritários foram β -cariofileno, biciclogermacreno e espatulenol.
- A prospecção fitoquímica dos extratos revelou a presença de algumas classes de metabólitos secundários como flavonóides, taninos e alcalóides.
- A quantificação de fenóis demonstrou que as quantidades de fenóis divergiram significativamente entre o extrato das raízes e os demais.
- A análise por CLAE dos extratos revelou a presença de flavonóides (quercetina, rutina e campferol) e de compostos fenólicos (ácido gálico, clorogênico e cafeico) com concentrações estatisticamente diferentes.
- Os extratos obtidos demonstraram a capacidade de neutralizar o radical livre DPPH, com melhor CI_{50} para o extrato etanólico das folhas, sendo essa atividade não evidenciada para os óleos essenciais.
- Utilizando fosfolípido de ovo, nenhum dos materiais testados apresentou redução significativa em níveis basais. Porém, no ensaio de estresse induzido, todos apresentaram redução significativa na maior concentração.

- Utilizando tecido, nenhum dos materiais testados apresentou redução significativa em níveis basais, mas em estresse induzido, os extratos apresentaram resultados significativos mesmo nas menores concentrações.
- O OEFCC se mostrou mais eficiente que o OEGCC no teste de TBARS com tecido, em estado de estresse induzido, apresentando resultados mais significativos em concentrações menores.
- Todos os materiais apresentaram capacidade de impedir o estresse oxidativo mitocondrial induzido por peróxido de hidrogênio, sendo o melhor resultado para o extrato etanólico dos galhos, o qual foi capaz de reduzir a concentração do peróxido para níveis significativamente menores que o nível basal.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

- Estudos posteriores podem indicar o mecanismo de ação pelo qual os extratos e óleos essenciais de *C. campestris* exercem atividade antioxidante indicada neste trabalho.
- Todos os foram realizados *in vitro* sendo necessário verificar se os resultados seriam reprodutíveis em testes *in vivo*.
- É possível correlacionar o estresse oxidativo com diversas doenças como câncer, *Alzheimer* e *Parkinson* sendo um passo importante a verificação se materiais obtidos de *C. campestris* se mostram eficientes no tratamento destas doenças.
- O potencial apresentado por *C. campestris* pode, com o aprofundamento dos estudos e elucidação dos princípios ativos, gerar um novo fitofármaco.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. *Carol Stream*, Illinois: **Allured Publishing Corporation**, 2001.

ADEROGBA M. A., MCGAW L. J., BEZABIH M., ABEGAZ B. M., Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. **Nat Prod Res.**25(13):1224-33, 2011.

ALCARAZ, M. J.; CARVALHO, J. C. T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios In: CARVALHO, J. C. T. (Org.) Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: **Tecmed**. Cap.6, p. 79-100. 2004.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**161: 105-121. 2009.

AUST S. D., MILLER D. M., ROLE O. F., Iron in oxygen radical generation and reactions. IN PROBST G. S., VODICNIK M. J., DORATO M. A. (EDS): *New horizons in molecular toxicology: a symposium*. Lilly Research Laboratories *Symposium/Molecular Toxycology*; May, 29-34. 1991.

BABILI F.E.L.; FABRE N.; MOULIS C.; FOURASTE I.; Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Fitoterapia** v. 77, p 384–387, 2006.

BABILI FE, MOULIS C, BOM M, RESPAUD MJ, FOURASTÉ I.; Three furano diterpenes from the bark of *Croton campestris*. **Phytochemistry**, 48: 165-169. 1998.

BABILI, F.E., MOULIS, C., BESSIERE, J. M., ROQUES, C., HADDIOUI, L., Essential oil leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, Its Secretory Elements, and Its Biological Activity. **Journal of Essential Oil Research**. 21, 272-275. 2009.

BABIOR, B. M.; Superoxide: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30, 141-145, 1997.

BARREIROS A. L. B. S., DAVID J. M., Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo **Quim. Nova**, v 29, 113-123, 2006.

BAZZANO, F.C.O. Aspectos éticos da pesquisa científica, p. 149-180. In: SILVA, J.V. et al. Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa. 1ª Ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BELÁ, H., PARTHA, M., MALEK, K., VIVEK, P., GALIN, T., DAVID, A.W., JÜRG, G., PÁL, P., β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. **Free Radical Biology & Medicine**. 52, 1325-1333, 2012.

BITTNER M, SILVA M, AQUEVEQUE P, KUFER J, JAKUPOVIC J, MURILLO R.; Alkaloids and other constituents from *Croton chilensis*. **Bol Soc Chil Quim**. v42, p 223-228, 1997.

BRAGA R., Plantas do Nordeste do Ceará, Escola Superior de Agricultura de Mossoró. 3. Ed. Fortaleza, 1976.

BRUSTOVETSKY, N.; Dubinsky, J. M.; Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. **J. Neurosci.** v 20; p 103–113, 2000.

CAVALCANTE A. G. M., BRUIN P. F. C., O papel do estresse oxidativo na DPOC: Conceitos atuais e perspectivas. **J. Bras. Pneumol.** Vol. 35 nº 12 São Paulo Dec. 2009.

CERQUEIRA F. M., MEDEIROS M. H. G., AUGUSTO., Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 441-449, 2007.

CHEN, H. J., WU, C. F., HUANG, J. L., Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: Correlation with cigarettesmoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. **Toxicology Letters**, 155, 403–4102. 2005.

CORDEIRO I., CARNEIRO-TORRES D.; Euphorbiaceae in: checklist das plantas do Nordeste brasileiro: angiospermas e gimnospermas. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 71-74, 2006.

CORRÊA M.P.; Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1975.

COSTA, E.V., DUTRA, L.M., JESUS, H.C., NOGUEIRA, P.C., MORAES, V.R., SALVADOR, M.J., CAVALCANTI, S.C., SANTOS, R.L., PRATA, A.P., Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Nat. Prod. Commun.** 6(6), 907-912. 2011.

COUTINHO H. D. M.; MATIAS E. F. F.; SANTOS K. K. A.; SANTOS F. A. V.; MORAIS-BRAGA M. F. B.; SOUZA T. M.; ANDRADE J. C.; SOBRAL C. E.; TINTINHO S. R.; GUEDES G. M. M.; Vivyanne S. Falcão-Silva², José P. Siqueira-Júnior, José G.M. Costa., Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. **Biomédica**, 31, 608-612, 2011.

CRONQUIST, D.C., An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, 1981.

DAIBER A., Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1797, 897–906, 2010.

DEWICK P.M., HASLAM E., Phenol biosynthesis in higher plants, **Biochem J.** V 113, p 537-542, 1969.

DIAS, C.S.; SILVA, I.G.; CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J.M. Isolamento e identificação de novos alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**, p 62-63, 2003.

DÔRES R. G. R., Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth). Tese de doutorado, Universidade federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

DROGE W: Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82(1): 47-95, 2002.

FARNSWORTH N.R., BLOMSTER R.N., MESSMER W.M., KING J.C., PERSINOS G.J., WILKES J.D.; A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. *Lloydia* 32: 1-28. 1969.

FERREIRA A. L. A., MATSUBARA L. S., Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med**, Brasil; 43(1): 61-8, 1997.

FILIPPIN L. I., VERCELINO R., MARRONI N. P., XAVIER R. M., Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n.1, p. 17-24, jan/fev, 2008.

FLOYD R. A., Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J**; 4: 2.587-97. 1990.

FUSCO D., COLLOCA G. L. O., MONACO M. R., CESARI M., Effects of antioxidant supplementation on the aging process. **Clin Interv Aging**,2:377–387, 2009.

GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; AND FERNANDEZ-CHECA, J. C.; Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J. Biol. Chem.** V. 272; pg 11369–11377; 1997.

GONÇALVES R. S., BATTISTIN A., Potentiometry as electrochemical method for determination of chelating ability of essential oils for reduced ion. I – studies with *Mentha* essential oils. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.39-43, 2009.

GOTTLIEB, O. R. Modified distillation trap. **Chemist Analyst**, v. 49, n. 1, p. 114-116, 1960.

GRANGEPÈRE A.; Plantes médicinales de la flore amazonienne. **Poconéol** no. 1;1983.

GREGORIS E., STEVANATO R., Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian própolis. **Food and Chemical Toxicology**,48, 76–82, 2010.

GUERRERO M.F., PUEBLA P., CARRÓN R, MARTIN M.L., ROMÁN L.S.; Quercetin 3,4-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schleacht. **J Pharm Pharmacol**, 54: p: 1373-1378. 2002.

HALLIWEL B., GUTTERIDGE J. C. M.; Free Radicals in Biology and Medicine. 3.ed. Londres: **Oxford University Press**, 1999.19.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C., Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**; 246: 501-14. 1986.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**,186: 1-85. 1990.

HATHERILL J.R., TILL G. O., WARD P. A., Mechanisms of oxidantinduced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**; 32: 351-8. 1991.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J., Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationship. **J. Nutr. Biochem.** 13, 572–584. 2002.

HELUANI C.S., CATALAN C.A.N., HERNÁNDEZ L.R., TAPIA E.B., NATAN P.J.; Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. **J Nat Prod**, 63: p: 222-225. 2000.

HEMPEL S.L.; BUETTNER G.R.; O'MALLEY Y.Q.; WESSELS D.A.; FLAHERTY DM; Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2,7- dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med**;V.27; pg 146–159, 1999.

HILL G. E., MILLER J. A., BAXTER T., KLASSEN L. W., DURYEE M. L., TUMA D. J., GEOFFREY M. Thiele Association of malondialdehyde–acetaldehyde (MAA) adducted proteins with atherosclerotic-induced vascular inflammatory injury, **Atherosclerosis**, 141, 107–116, 1998.

JUNIOR F. E. B., MATIAS E. F. F., OLIVEIRA D. R., RAMOS A. G. B., FERNANDES C. N., SOUZA H. H. F., LACERDA NETO L. J., PEREIRA A. O. B., ARARUNA M. K. A., SANTOS F. A. V., COUTINHO H. D. M., COSTA J. G. M., KERNTORPF M. R., MENEZES I. R. A., Modulatory antibiotic activity and chemical composition of hydroalcoholic extract of *Croton campestris* **Journal of Medicinal Plants Research**, Vol. 5(18), pp. 4400-4404, 16 September, 2011

JUNIOR, F. E. B., Bioprospecção farmacológica de plantas medicinais do nordeste brasileiro: Avaliação da atividade gastroprotetora e antimicrobiana do *Croton campestris* A.St.-Hill (Velame do campo), dissertação de mestrado, Universidade Regional do Cariri – URCA, cdd: 615.323, 2010.

KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T., Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chem.** 84, 329–339. 2004.

LAGHARI, A.H, MEMON, S., NELOFAR, A., KHAN, K.M., YASMIN, A.; Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. **Food Chem.** 126, 1850–1855. 2011.

LEAL C.P.S.; Isolamento e quantificação de marcadores químicos de *Centella asiática* L. E *Cynara scolymus*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, 2006.

LENCINA C., PIRES V.S., GOSMANN G., TAKETA A.T.C., SCHENKEL E.P.; Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* Bail. **Rev Bras Farmacogn**, 11: p: 89-94. 2001.

LIMA, L.R. & PIRANI, J.R. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 21: 299-344. 2003.

LINNAEUS, Sp. Pl. 2: 1004. 1753

MATIAS^a, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.. Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenaceae*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 294-298, 2010.

MATIAS^b, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.. Light-enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris* A, *Ocimum gratissimum* L and *Cordia verbenaceae* DC). **Asian Biomedicine** Vol. 4 No. 1 February; 183-186, 2010.

MATIAS^c, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.. Phytochemical Prospection and Modulation of Aminoglycoside Antibiotic Activity by *Croton campestris* A. **Chemotherapy**; 57:305–309. 2011.

MATOS L. M. M., Química de espécies nativas de croton I (euphorbiacea) tese de dissertação, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2011

MATOS L.M.M. Química de espécies nativas de croton I (euphorbiacea) tese de dissertação apoud LIMA, LR. 2006. Estudos taxonômicos em croton seção lamprocroton (Müll. Arg.) Pax. (Euphorbiaceae). (Tese de doutorado). Instituto de biociências, Universidade de São Paulo

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC, 1988.

MATOS, F.J.A., Introdução à fitoquímica experimental. UFC, Edições. p. 44-46, 1997.

MENSOR L.L.; MENEZES F.S.; LEITAO G.G.; REIS A.S.; DOS SANTOS T.C.; COUBE C.S.; LEITAO S.G.; Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, 15: 127-130, 2001.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J.H. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Quimica Nova**, 29:907-910. 2006.

MÜLLER, A., Euphorbiaceae. In: Martius, C. f. p. von (ed.). Flora Brasiliensis, enumeration plantarum in Brasilia. **Monachii**, 1847-1850 v. 11, part. 2, p. 1-751, 1874.

NADOUR M.; MICHAUD P.; MOULTI-MATI F.; Antioxidant activities of poluphenols extracted from olive (*olea europea*) of chamlal variety. **Appl Biochem Biotechmol**. Published online, 2012.

NEVES I. A., CAMARAC. A. G., Volatile Constituents of Two Croton Species from Caatinga Biome of Pernambuco – Brasil, **Rec. Nat. Prod.** 6:2(2012) 161-165

OHKAWA, H., OHISHI, N., &YAGI, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, 351–358. 1979.

OKTYABRSKY ON, SMIRNOVA GV: Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry**(Mosc) 72(2): 132-45, 2007

PENNA M.; Dicionário brasileiro das plantas medicinais. Plantas brasileiras, 2ªed; p. 120. 1930.

PEREIRA R.M.; FACHINETTO R.; PRESTES A.S.; PUNTEL R.L.; SANTOS DA SILVA G. N.; HEINZMANN B.M.; BOSCHETTI T.K.; ATHAYDE M.L.; BURGER M.E.; MOREL A.F.; MORSCH V.M.; ROCHA J.B.T.; Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochem Res.** V.34, pg :973–983, 2009.

PIO CORRÊA M.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. P 399. 1984.

PUNTEL R.L., ROOS D.H., GROTTTO D., GARCIA S.C., NOGUEIRA C.W., ROCHA J.B.; Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. **Life Sciences**, 81, 51–62. 2007.

RANDAU, K. P.; FLORENCIO, D. C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14:89-96. 2004.

RIBEIRO-PRATA E. M., SOUZA-BRITO, A. R., PAULO, M. Q. Isolamento do princípio ativo de *Croton campestris* St. Hil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 2, p. 36-41, 1993.

ROVER-JÚNIOR, L., HÖEHR N. F., VELLASCO, A. P., KUBOTA, L. T., Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo, **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 112-119, 2001.

RUSSO, A., LONGO, R., VANELLA, A., Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapie**. 73, 21–29. 2002.

SABIR S. M., ROCHA J. B. T., Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, 111, 845–851, 2008.

SAMPAIO, E. V. S .B., Overview of the Brazilian caatinga. *In* Seasonally dry tropical forest (Bullock, S.H., Mooney H.A. & E. Medina, eds.). **Cambridge University Press**, Cambridge, p.35-63. 1995.

SANTOS P. M. L., SCHRIPSEMA J., KUSTER R. M., Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae) **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 15(4): 321-325, Out./Dez. 2005

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P.; Taninos. In Coordenação: SIMÕES, C. M. O. *et al. Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6^a Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

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

SHAFAGHAT, A., Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in north-west Iran. **Nat. Prod. Commun.** 6(9), 1351-1352. 2011.

SHAHWAR D., SHAFIQ-UR-REHMAN, AHMAD N., ULLAH S., RAZA M. A., Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae, **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9(7), pp. 1086-1096, 15 February, 2010.

SILVA C. G., HERDEIRO R. S., MATHIAS C. J., PANEK A. D., SILVEIRA C. S., RODRIGUES V. P., RENNÓ M. N., FALCÃO D. Q., CERQUEIRA D. M., MINTO A. B. M., NOGUEIRA F. L. P., QUARESMA C. H., SILVA J. F. M., MENEZES F. S., ELEUTHERIO E. C. A.; Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, 52, 229-233, 2005.

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

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Method. Enzymol.** 299, 152–178.1999.

SOUSA C.M.M.; SILVA H.S.; VIEIRA-JR. G.M.; AYRES M.C.C; COSTA C.L.S.; ARAÚJO D.S.; CAVALCANTE L.C.D.; BARROS E.D.S.; ARAÚJO P.B.M.; BRANDÃO M.S.; CHAVES M.H.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H., Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Botânica sistemática**. Inst. Plantarum. 640 p. 2005.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. Registry of Mass Spectra Data Base. Washington DC: **Government Printing Office**, 1974.

SUN J.; SHAO-FANG L.; CHU-SHU Z.; LI-NA Y.; JIE B.; FENG Z.; QING-LI Y.; Chemical composition and antioxidant activities of *Brussonetia papyfera* fruits. **Plos One**, V 7, pg 1-8, 2012

TERASHIMA M., KAKUNO Y., KITANO N., MATSUOKA C., MURASE M., TOGO N., WATANABE R., MATSUMURA S., Antioxidant activity of flavonoids valuated with myoglobin method, **Plant Cell Rep**, 31:291–298, 2012.

WAGNER H., HÖRHAMMER L., KIRALY I.C.; Flavon-C-glykoside in *Croton zambezicus*. **Phytochemistry** 9: p: 897. 1970.

WHITTAKER, B. S., BERLETT, E. R., STADTMAN, R. R., Protein oxidation in aging diseases and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, 272, 20313–20316. 1997.

YAMAUCHI R., TATSUMI Y., ASANO M., KATO K., UENO Y., Effect of Metal Salts and Fructose on the Autoxidation of Methyl Linoleate in Emulsions. **Agricultural and Biology Chemistry**, v. 52, n. 3, p 849-850, 1988.

YAN S.H.; ZHAO Y.Y.; ZENG H.S.; ZHANG Y; LIN R.C.; SUN W.J.; Chemical composition and antioxidant activities of extracts from Apocyni Veneti Folium. **Nat Prod Res.** 2011.

ZHOU, Y.H., YU, J. P., LIU, Y. F., TENG, X. J., MING, M., PENG, L., PING, A., LIU, S. Q., YU, H. G., Effects of Ginkgo biloba Extract on Inflammatory Mediators (SOD,MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-Induced Colitis in Rats, **Hindawi Publishing Corporation**, V 2006, P 1–9, 2006.