



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

IZA MIRANDA MELO PAULO

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Crescentia cujete* L.
(BIGNONIACEAE)**

PETROLINA

2016

IZA MIRANDA MELO PAULO

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Crescentia cujete* L.
(BIGNONIACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, como exigência para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Orientador: Profa. Dra. Xirley Pereira Nunes.

Área de Concentração: Química e Atividade biológica.

PETROLINA

2016

P331e Paulo, Iza Miranda Melo
Estudo químico e biológico de *Crescentia cujete* L.
(Bignoniaceae) / Iza Miranda Melo Paulo - Petrolina, 2016.
xix 195 f.: il.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do
Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco,
Campus Petrolina, Petrolina- PE, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Xirley Pereira Nunes.

1. Estudo fitoquímico 2. Atividade biológica. 3. *Crescentia
cujete*. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São
Francisco.

CDD 581.634

IZA MIRANDA MELO PAULO

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Crescentia cujete* L.
(BIGNONIACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, como exigência para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Aprovada em: 02 de Março de 2016.

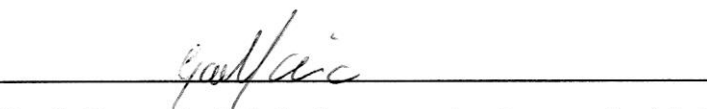
Banca Examinadora



Prof. Dra. Xirley Pereira Nunes
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Orientadora



Prof. Dra. Larissa Araújo Rolim
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Examinador Interno



Prof. Dra. Gabriela Lemos de Azevedo Maia
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Examinador Externo

A Deus, único merecedor de toda honra e toda glória;
e ao meu esposo, Vitor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter proporcionado a mim a oportunidade de fazer esse mestrado, ter me dado força e sabedoria para cumprir meus objetivos diante das dificuldades passadas, e pela segurança em todas as idas e vindas em viagens semanais.

Ao meu esposo, Vitor Paulo, por ter suportado a minha ausência durante praticamente todas as semanas desses dois últimos anos, e também por ter me apoiado, me incentivado e também pela paciência nos momentos de preocupação e estresse. Sem o seu apoio, não seria possível concretizar esse meu sonho!

Aos meus pais, Creuza e João, e ao meu irmão e cunhada, Igor e Márcia, por todo o incentivo que vocês sempre me deram para não parar de estudar e por estarem sempre ao meu lado, mesmo que eu não pudesse ir vê-los com frequência.

A minha orientadora, Prof. Dra. Xirley Pereira Nunes, pela confiança e oportunidade dada a mim em realizar esse trabalho, pela paciência, pelos ensinamentos e conselhos, e pela tão agradável amizade e bons momentos de convivência que passamos.

Ao Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida pelo incentivo desde o início do mestrado, principalmente na escolha da planta e preparação do extrato, e também pelos ensinamentos nas aulas que contribuíram para a minha formação.

À Prof. Dra. Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo pela sua disposição nos momentos de dúvidas com a elucidação dos espectros de RMN e também por suas palavras otimistas.

À Prof. Dra. Larissa Araújo Rolim pela disponibilidade, por toda atenção, pela imensa ajuda no experimento realizado em CLAE-DAD e também por ter aceitado participar da banca de avaliação e trazer as suas contribuições a este trabalho.

À Prof. Gabriela Lemos de Azevedo Maia por aceitar participar da banca de avaliação deste trabalho.

À Vicente Carlos de Oliveira Costa (UFPB) pela obtenção dos espectros de RMN, pela atenção e boa vontade em ajudar com a elucidação estrutural das substâncias.

Ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa e suas orientandas, especialmente Isamara e Naiane, pela ajuda e disponibilidade com os testes da atividade antibacteriana.

Ao Prof. Dr. José Alves de Siqueira Filho e a equipe do CRAD pela identificação do material vegetal e produção da exsicata.

A todos os professores do PPGRNSA por todos os ensinamentos passados no decorrer das disciplinas ministradas e também fora da sala de aula.

À Sandra Kelle Souza Macêdo, Amanda Leite Guimarães e Tamires Almeida, pela ajuda com a realização dos experimentos e apoio técnico no laboratório, e ainda, não menos importante, a amizade que construímos durante esse tempo, que vou levar pra sempre comigo.

Às alunas de Iniciação Científica, Juliana Leles, Sirley Sharliny e Karina Duarte, “meus braços direitos”, fiéis companheiras, que ajudaram diretamente em praticamente todos os experimentos no laboratório, e pela amizade, risadas, conversas que tornaram os momentos no laboratório mais prazerosos.

Aos alunos da CAFMA, em especial Emanuella e Vinícius, pela grande ajuda com os experimentos realizados em CLAE-DAD.

Aos colegas de turma Inaiara, Alice, Hállison, Cristiane, Silvio, Cárita, João Marcel e Herbert, pelo companheirismo durante toda essa jornada, estudos, ajudas, ansiedades, conversas, risadas, discussões, viagens a congressos, enfim, tudo que pudemos compartilhar.

À Inaiara, pela companhia sempre, desde o início das aulas, esteve sempre ao meu lado me ajudando, conversando, e compartilhando as preocupações passadas.

Ao Prof. Anilson José de Souza e ao Prof. Airton Cavalcanti, meus mestres da Graduação, por serem meus principais incentivadores, desde a graduação, a que eu entrasse no universo da pesquisa e fizesse o mestrado.

Aos meus tios, Sirênio, Ilza e Mauricélia, e também aos meus primos, que me acolheram de todo o coração em sua residência durante todo esse tempo.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

De um modo geral, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. É com muita satisfação que desenvolvi essa dissertação de mestrado!

“Do meu telescópio, eu via Deus caminhar! A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta”.

Isaac Newton

RESUMO

Entre as inúmeras espécies vegetais do bioma Caatinga, encontra-se a *Crescentia cujete* L., da família Bignoniaceae, conhecida no nordeste como coité ou árvore de cabaça, muito utilizada na medicina popular para combater a hipertensão, diabetes, problemas urinários, tosses, anemias e distúrbios estomacais. O presente trabalho realizou um estudo químico com as folhas de *Crescentia cujete* L. e avaliou o potencial biológico *in vitro* do extrato e frações obtidas. O material vegetal foi coletado na região do Vale do São Francisco e obtido o extrato etanólico bruto (Cc-EEB) que foi particionado resultando em quatro frações (Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH). O estudo fitoquímico empregou técnicas cromatográficas para traçar um perfil químico, isolar e purificar compostos bioativos do Cc-EEB e frações, sendo as atividades biológicas avaliadas segundo metodologia preconizada pela literatura com o extrato e frações, avaliando a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) e no sistema β -caroteno/ácido linoleico; atividade fotoprotetora através de método espectrofotométrico; e a atividade antibacteriana, calculando a concentração bactericida mínima (CBM). A triagem fitoquímica qualitativa indicou forte presença de mono, sesqui e diterpenos, lignanas e derivados antracênicos, e ainda presença de triterpenos, cumarinas, saponinas, compostos fenólicos, naftoquinonas e alcaloides. A quantificação do teor de fenóis e flavonoides totais mostrou que Cc-EEB e as frações Cc-CHCl₃ e Cc-AcOEt possuem maior concentração de constituintes fenólicos. Através de métodos cromatográficos foram isolados e identificados dois compostos por ressonância magnética nuclear (RMN), sendo a mistura de esteroides estigmasterol com β -sitosterol, e o ácido 4-hidroxibenzoico. Foi proposto uma estrutura para uma terceira substância como sendo o ácido vanílico. A avaliação da atividade antioxidante mostrou melhor resultado no sistema β -caroteno/ácido linoleico apresentado pelas frações Cc-CHCl₃ e Cc-AcOEt. Na avaliação da atividade fotoprotetora, foi observado que os extratos e frações não foram eficazes em absorver a radiação UVB, apenas UVC e UVA pela fração Cc-CHCl₃, resultando assim em valores de FPS abaixo de 6 como indicado pela ANVISA, sendo o maior valor apresentado pelo Cc-EEB com $4,909 \pm 0,123$. Na avaliação da atividade antibacteriana os extratos e frações foram mais sensíveis às bactérias Gram-positivas, com menor CBM de 1,56 mg/mL contra *S. aureus* 6538, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*. Uma análise em CLAE-DAD permitiu obter a impressão digital da espécie e estabelecer as melhores condições para otimização do cromatograma (fluxo 1,2 mL/min e tempo de gradiente de 50 min). As atividades biológicas apresentadas pelas amostras testadas estão relacionadas aos compostos identificados na triagem, na quantificação de fenóis e flavonoides totais e nos compostos isolados. Desta forma, o estudo realizado contribuiu com os conhecimentos químicos e biológicos de *C. cujete*, principalmente o perfil cromatográfico em CLAE-DAD e a atividade fotoprotetora, inéditos para a espécie.

Palavras-chave: Cabaça; Caatinga; Fitoquímica; CLAE-DAD; Fotoprotetora; Antibacteriana.

ABSTRACT

Among the numerous plant species of the Caatinga biome, is the *Crescentia cujete* L., the Bignoniaceae family, known in the northeast as Coité or calabash tree, widely used in folk medicine to combat high blood pressure, diabetes, urinary problems, coughs, anemia and stomach disorders. The present work conducted chemical study of the leaves of *Crescentia cujete* L. and assess the biological potential in vitro extract and fractions obtained. The plant material was collected in the region of Vale do São Francisco and obtained the ethanol extract (Cc-EEB) which was partitioned resulting in four fractions (Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH). The phytochemical study employed chromatographic techniques to chart a chemical profile, isolation and purification of bioactive compounds of Cc-EEB and fractions, and biological activities were evaluated according to the methodology recommended by the literature with the extract and fractions, evaluating the antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenging method and β -carotene/linoleic acid system; photoprotective activity by spectrophotometric method; and the antibacterial activity by calculating the minimum bactericidal concentration (MBC). Qualitative phytochemical screening indicated a strong presence of mono, sesqui and diterpene, lignans and antracênicos derivatives, and also the presence of triterpenes, coumarins, saponins, phenolic compounds, naphthoquinones and alkaloids. The quantification of total phenolic and flavonoid content showed that CC-EEB and fractions Cc-CHCl₃ and Cc-AcOEt contain higher concentrations of phenolic constituents. Using chromatographic methods were two compounds isolated and identified by nuclear magnetic resonance (NMR), the mixture of steroid stigmasterol and β -sitosterol, and 4-hydroxybenzoic acid. A structure has been proposed for a third substance as being the vanillic acid. The evaluation of the antioxidant activity showed the best result in β -carotene/linoleic acid system presented by fractions Cc-CHCl₃ and Cc-AcOEt. In evaluating the fotoproteroa activity, it was observed that the extracts and fractions were not effective in absorbing UVB radiation, only UVC and UVA by the fraction Cc-CHCl₃, resulting in SPF values below 6 as indicated by ANVISA, the largest value shown by the fraction Cc-EEB with $4,909 \pm 0,123$. In evaluating the antibacterial activity of the extracts and fractions were more sensitive to Gram-positive bacteria, a lower MBC 1.56 mg/mL against *S. aureus* 6538, *S. epidermidis* and *K. pneumoniae*. An analysis in HPLC-DAD allowed to obtain a fingerprint of the specie and to establish the best conditions for optimization of the chromatogram (flow 1.2 mL/min and 50 min gradient time). The biological activities provided by the tested sampled are related to compounds identified in phytochemical screening, quantification of phenols and total flavonoids and isolated compounds. Thus, the study contributed chemical and biological knowledge of *C. cujete*, primarily in the fingerprint HPLC-DAD and photoprotective activity, unpublished for the specie.

Keywords: Cabaça; Caatinga; Phytochemistry; HPLC-DAD; Photoprotective; Antibacterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Crescentia cujete</i> L.	23
Figura 2 - Estrutura básica dos iridoídeos e sua numeração.....	29
Figura 3 - (A) Foto de <i>C. cujete</i> ; (B) Galho e folhas; (C) Flor; (D) Fruto; (F) Corte vertical do fruto.....	35
Figura 4 - Estrutura química básica dos ácidos fenólicos.....	50
Figura 5. Representação esquemática das vias gerais de metabolismo dos ácidos clorogênicos.....	51
Figura 6 - Unidades de isopreno das quais derivam os terpenos.....	52
Figura 7 - Resumo da biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato.....	53
Figura 8 - Estrutura básica dos esteróides.....	53
Figura 9 - Desprotonação do ácido gálico, gerando ânions fenolato.....	56
Figura 10 - Complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl ₃)	57
Figura 11 - Equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador	60
Figura 12 - Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....	65
Figura 13 - Estrutura do β-caroteno (A) e do ácido linoleico (B).....	66
Figura 14 - Exsicata de <i>C. cujete</i> depositada no HVASF.....	72
Figura 15 - Absorção espectrofotométrica na faixa de 260 a 400 nm de Cc-EEB e frações das folhas de <i>C. cujete</i>	99
Figura 16 - Fator de proteção solar (FPS) in vitro do extrato e frações de <i>C. cujete</i>	100
Figura 17 - Espectro de RMN ¹ H de CC-01 (500 MHz, CDCl ₃).....	108
Figura 18 - Expansão do espectro de RMN ¹ H de CC-01 (δ _H 0,60-1,30) (500 MHz, CDCl ₃).....	109

Figura 19 - Expansão do espectro de RMN ^1H de CC-01 (δ_{H} 3,30-5,50) (500 MHz, CDCl_3). A: Estigmasterol; B: β -sitosterol.....	110
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C de CC-01 (125 MHz, CDCl_3).....	111
Figura 21 - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ de CC-01 (δ_{C} 8,0-60,0) (125 MHz, CDCl_3).....	112
Figura 22 - Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ de CC-01 (δ_{C} 60,0-145,0) (125 MHz, CDCl_3).....	113
Figura 23 - Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz). A: Estigmasterol; B: β -sitosterol.....	114
Figura 24 - Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_{C} 10,0-60,0 e δ_{H} 0,50-1,30. A: Estigmasterol; B: β -sitosterol.....	115
Figura 25 - Estrutura química de Cc-01.....	106
Figura 26 - Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_{C} 110,0-155,0 e δ_{H} 0,50-5,60 e correlações no estigmasterol.....	116
Figura 27 - Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_{C} 0,0-90 e δ_{H} 0,0-3,0 e correlações no estigmasterol.....	117
Figura 28. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz) e correlações no estigmasterol.....	118
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H de Cc-02 (CD_3OD , 200 MHz).....	123
Figura 30 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ de Cc-02 (CD_3OD , 50 MHz).....	124
Figura 31 - Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ δ_{C} 111-140 de Cc-02 (CD_3OD , 50 MHz).....	124
Figura 32 - Estrutura de Cc-02 identificada como o ácido 4-hidroxibenzoico.....	121
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H de Cc-03 (CD_3OD , 200 MHz).....	126
Figura 34 - Estrutura proposta para Cc-03: ácido vanílico.....	125
Figura 35 - Perfil cromatográfico de <i>C. kujete</i> obtido em CLAE-DAD (fluxo 1,2 mL/min; tempo de corrida 50 min).....	127
Figura 36 - Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial realizado.....	128

Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta.....	129
Figura 38 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos.....	130
Figura 39 - Espectro de UV e tempo de retenção dos picos majoritários apresentados no perfil cromatográfico por CLAE-DAD.....	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Gêneros de Bignoniaceae registrados para o Brasil (em destaque, o gênero da espécie em estudo)	28
Quadro 2 - Atividades biológicas dos extratos e frações de <i>C. alata</i>	31
Quadro 3 - Constituintes químicos encontrados em <i>C. alata</i>	33-34
Quadro 4 - Atividades biológicas dos extratos e frações de <i>C. cujete</i>	36-37
Quadro 5 - Constituintes químicos encontrados em <i>C. cujete</i>	38-45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de eluição e reveladores utilizados na triagem fitoquímica de <i>C. kujete</i> para as classes específicas de metabólitos secundários.....	75
Tabela 2 - Valores de EE (λ) x I (λ) previamente determinados para o cálculo do FPS.....	80
Tabela 3 - Frações obtidas na CC da fração clorofórmica e sistema de solventes utilizados.....	84
Tabela 4 - Frações obtidas na CC da fração reunida 441-449 (fração AcOEt) e sistema de solventes utilizados.....	86
Tabela 5 - Sistema de eluição e gradiente da fase móvel da análise realizada em CLAE-DAD.....	88
Tabela 6 - Planejamento fatorial utilizado no perfil cromatográfico de <i>C. kujete</i>	89
Tabela 7. Padrões analíticos de flavonoides utilizados na análise por CLAE-DAD.....	90
Tabela 8 - Triagem fitoquímica preliminar do extrato e frações de <i>C. kujete</i>	93
Tabela 9 - Teor de fenóis e flavonoides totais do extrato e frações particionadas das folhas de <i>C. kujete</i>	95
Tabela 10 - Atividade antioxidante in vitro do extrato e frações de <i>C. kujete</i>	96
Tabela 11 - Valores do FPS in vitro do extrato e frações de <i>C. kujete</i>	100
Tabela 12 - Atividade antibacteriana in vitro determinada pela CBM do extrato e frações de <i>C. kujete</i>	102
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Cc-01 referentes ao estigmasterol comparado com dados da literatura (RMN ^1H 400 MHz / RMN ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) (KOJIMA et al., 1990).....	119
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Cc-01 referentes ao β -sitosterol comparado com dados da literatura (RMN ^1H 400 MHz / RMN ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) (KOJIMA et al., 1990).....	120
Tabela 15 - Dados espectrais de RMN ^1H (δ_{H} , CD_3OD , 200 MHz) e RMN ^{13}C (δ_{C} , CD_3OD , 50 MHz) de Cc-02 e dados comparativos da literatura (RMN ^1H 500 MHz, CD_3OD /RMN ^{13}C 125 MHz, CD_3OD) (YOSHIOKA et al., 2004).....	123
Tabela 16 - Dados espectrais de RMN ^1H (δ_{H} , CD_3OD , 200 MHz) e RMN ^{13}C (δ_{C} , CD_3OD , 50 MHz) de Cc-03 e dados comparativos da literatura (RMN ^1H 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_6$ /RMN ^{13}C 126 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_6$) (COLOMBO et al., 2004)....	126

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>C. cujete</i>	74
Fluxograma 2 - Procedimento cromatográfico da fração clorofórmica e obtenção da CC-01.....	83
Fluxograma 3 - Procedimento cromatográfico da fração acetato de etila e obtenção da CC-02 e Cc-03.....	85
Fluxograma 4 - Frações obtidas do extrato etanólico bruto de <i>C. cujete</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA - Porcentagem da atividade antioxidante

AcOEt - Acetato de etila

AlCl₃ - cloreto de alumínio

ATCC - American Type Culture Collection

BHA - Butilhidroxi-anisol

BHT - Butilhidroxi-tolueno

Cc-AcOEt - Fração acetato de etila

Cc-CHCl₃ - Fração clorofórmica

Cc-EEB - Extrato etanólico bruto

Cc-Hex - Fração hexânica

Cc-MeOH - Fração metanólica

CC - Cromatografia em Coluna

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDA - Camada Delgada Analítica

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl₃ - Clorofórmio deuterado

CD₃OD - Metanol deuterado

CE₅₀ - Concentração Eficiente em 50%

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjos de diodos

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute

CLV - Cromatografia Líquida à Vácuo (pressão reduzida)

CBM - Concentração Bactericida Mínima

COSY - Espectroscopia de correlação homonuclear de hidrogênio (Correlated Spectroscopy)

DEPT Q - Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer with retention of Quaternaries

DME - Dose mínima eritematosa na pele quando desprotegida

DPPH• - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG - Equivalente de Ácido Gálico
EE - Efeito Eritemogênico da Radiação do Comprimento de Onda
EqC - Equivalente de Catequina
FHRC - Função Hierárquica de Resposta Cromatográfica
FPS - Fator de Proteção Solar
HMBC - Correlação heteronuclear de múltiplas ligações (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC - Correlação heteronuclear quântica simples (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
J - Constante de acoplamento
MH caldo - Caldo Müller-Hinton
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada da ANVISA
RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
SD - Desvio padrão (standard deviation)
TFA - Ácido trifluoracético
TSA - Tryptic soy agar
UV - Ultravioleta
UV-Vis - Ultravioleta-visível
UVA - Radiações ultravioleta A
UVB - Radiações ultravioleta B
UVC - Radiações ultravioleta C
Vis - Luz visível
 δ (delta) - Deslocamento químico em ppm
 $\lambda_{\text{máx}}$ - Comprimento de onda máximo

OBS.: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho que não constam nesta relação, encontram-se descritas no decorrer do texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
3.1 Família Bignoniaceae	28
3.2 Gênero <i>Crescentia</i> L.	31
3.3 <i>Crescentia cujete</i> L.	35
3.4 Compostos químicos do metabolismo das plantas	47
3.4.1 Compostos fenólicos	49
3.4.2 Terpenos e esteróis	53
3.5 Análise de princípios ativos naturais	55
3.5.1 Métodos espectrofotométricos	56
3.5.2 Isolamento, purificação e identificação de produtos naturais	59
3.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	61
3.6 Atividades biológicas de produtos naturais	63
3.6.1 Atividade antioxidante	63
3.6.2 Atividade antibacteriana	68
3.6.3 Atividade fotoprotetora	69
4. MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1 Coleta e identificação do material botânico	73
4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto de <i>C. cujete</i>	74
4.3 Fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>C. cujete</i>	74
4.4 Triagem fitoquímica preliminar	75
4.5 Métodos para quantificação de fenóis e flavonoides totais	76
4.5.1 Quantificação de fenóis totais	77
4.5.2 Quantificação de flavonoides totais	77
4.6 Avaliação da atividade antioxidante	78
4.6.1 Método sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	78
4.6.2 Método da auto oxidação do β -caroteno	79

4.7 Avaliação da atividade fotoprotetora	80
4.8 Avaliação da atividade antibacteriana.....	82
4.9 Isolamento e purificação de substâncias de <i>C. kujete</i>.....	83
4.9.1 Isolamento dos compostos da fração clorofórmica	83
4.9.2 Isolamento dos compostos da fração acetato de etila.....	85
4.10 Métodos espectrométricos empregados na identificação das substâncias	88
4.11 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	88
4.12 Análise estatística.....	91
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1 Triagem fitoquímica preliminar.....	93
5.2 Quantificação de fenóis totais e flavonoides totais	95
5.3 Atividade antioxidante.....	97
5.4. Atividade fotoprotetora	99
5.5 Atividade antibacteriana.....	103
5.6 Caracterização estrutural das substâncias Cc-01, Cc-02 e Cc-03	105
5.6.1 Elucidação estrutural da substância Cc-01	105
5.6.2 Elucidação estrutural da substância Cc-02	122
5.6.3 Proposta estrutural da substância Cc-03	126
5.7 Perfil cromatográfico de <i>C. kujete</i> por CLAE-DAD	128
6. CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	138
APÊNDICE	153



1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, abrigo em torno de 55 mil espécies de plantas, sendo que muitas dessas são endêmicas e desconhecidas. Entre os elementos que constituem essa biodiversidade, estão as plantas medicinais que são utilizadas em comunidades tradicionais, como remédios caseiros, sendo consideradas a matéria-prima para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Entretanto, dados mostram que apenas cerca de 5% destas plantas têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor são avaliadas sob os aspectos biológicos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; FUMAGALI et al., 2008).

Evolutivamente as plantas tendem a sintetizar compostos, subprodutos do seu metabolismo primário, para diversas aplicações, como atrativos de polinizadores ou inibidores de fitófagos. Os elementos do metabolismo secundário, também chamado de especial, que um dia foram considerados como resíduos ineficazes dos produtos fotossintéticos e respiratórios, hoje ganham reconhecimento e investimentos cada vez maiores para implantação de pesquisas (MONTEIRO et al., 2005).

A fitoquímica estuda os produtos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais, compreendendo as etapas de isolamento, purificação e determinação estrutural destes metabólitos. Este estudo, quando associado a ensaios específicos, permite identificar extratos e frações bioativas e caracterizar as substâncias presentes em uma determinada espécie, responsáveis por esta bioatividade. Desta forma, a fitoquímica possui importância fundamental para o desenvolvimento científico da química de produtos naturais, contribuindo ainda para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas (BRAZ FILHO, 2010).

Os produtos naturais são responsáveis direta ou indiretamente por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica atual e, se for considerado aqueles usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem chega a aproximadamente 70% (CAVALCANTE et al., 2013).

Entre os diversos fatores que têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal, está a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer, falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies (LAGE, 2011).

A biodiversidade brasileira é uma reconhecida fonte de substâncias biologicamente ativas e uma fonte ainda inexplorável de novos fármacos distribuída nos biomas, principalmente Caatinga, Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Neste contexto, estes biomas têm recebido o desenvolvimento de muitas pesquisas de bioprospecção, objetivando uma busca racional de bioprodutos de valor agregado (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A caatinga, um dos maiores patrimônios ecossistêmicos do Brasil, considerada como o principal bioma da região Nordeste, consiste de extensas planícies semiáridas, compreendendo cerca de 10% do território do país, possuindo 40% inserido na Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. É uma floresta seca, verde apenas durante os períodos chuvosos, com arbustos espinhosos e adaptadas a solos mais estéreis, dominado por um dos poucos tipos de vegetação cuja distribuição é totalmente restrita ao Brasil, embora insuficientemente conhecido em termos botânicos. Alguns estudos realizados revelam espécies com grande potencial como forragem, alimentos, medicamentos e madeira (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; SILVA; ALBUQUERQUE, 2005; SIQUEIRA FILHO et al., 2012).

Entre as inúmeras espécies vegetais encontradas na Caatinga, encontra-se a *Crescentia cujete* L., uma espécie pertencente à família Bignoniaceae, amplamente distribuída na região da América do Sul, sendo muito utilizada na medicina popular e conhecida no Brasil pelo nome de “coité”, “cabaça” ou “árvore de cabaça” (Figura 1, p. 23). É uma árvore de pequeno porte (3-5 m de altura), bastante conhecida pela forma esférica de seus frutos, que a incluem entre as plantas ornamentais (EJELONU et al., 2011). *C. cujete* é uma espécie muito encontrada em algumas fazendas do Vale do São Francisco.

É muito utilizada na medicina popular no combate à hipertensão, diabetes, hipertensão problemas urinários, problemas respiratórios, distúrbios estomacais, também como expectorante, antitussígeno, laxante e no tratamento de picadas de cobras venenosas (AZEVEDO et al., 2010; EJELONU et al., 2011; NIELSEN; SLAMET; WEGE, 2009; OTERO et al., 2000; PARVIN et al., 2015).

Tal como muitas outras espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional, *C. cujete* também tem atraído um interesse crescente como fonte de novos compostos biologicamente ativos, podendo fornecer compostos químicos para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos.

Figura 1. *Crescentia cujete* L.



Fonte: HVASF (2015).



2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo químico das folhas de *Crescentia cujete* L. e avaliação do potencial biológico *in vitro* do extrato e frações obtidas.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato etanólico bruto e diferentes frações das folhas de *C. cujete* L.;
- Traçar o perfil químico do extrato e frações por meio da triagem fitoquímica e teor de fenóis e flavonoides totais;
- Isolar e purificar metabólitos secundários presentes nas folhas de *Crescentia cujete* L., através de técnicas cromatográficas;
- Identificar e/ou elucidar as estruturas dos constituintes químicos isolados através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional);
- Obter a impressão digital da espécie por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de diodos (CLAE-DAD);
- Avaliar o potencial antioxidante, fotoprotetor e antibacteriano *in vitro* do extrato e frações obtidas de *C. cujete* L.



3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Família Bignoniaceae

As Bignoniaceae são eudicotiledôneas da ordem Lamiales, constituída por 82 gêneros e 825 espécies de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras (LOHMANN; ULLOA, 2007). Está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente da América do Sul e da África, com poucas espécies em climas temperados (GENTRY, 1980; JUDD et al., 2009).

A classificação mais recente da família reconhece sete das oito tribos propostas anteriormente por Gentry (1980): Bignonieae, Coleeae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Oroxyleae, Tecomeae e Tourrettieae (FISCHER et al., 2004). Apenas as tribos Tecomeae, Bignonieae, Crescentieae ocorrem no Brasil (VON POSER et al., 2000). As espécies são geralmente distinguidas pelo seu hábito e estrutura do fruto: Tecomeae tem frutos deiscentes, perpendicular ao septo, e um hábito arborescente; Bignonieae tem frutos deiscentes, paralelo ao septo e todas as espécies são trepadeiras; Crescentieae tem frutos indeiscentes, e as espécies são árvores ou arbustos (BARROSO, 1986; CRONQUIST, 1981; SANDWICH; HUNT, 1974).

São plantas muito utilizadas para diversos fins, tais como na horticultura, obtenção de tintas, na construção civil, carpintaria e construção de instrumentos musicais devido à natureza rígida da madeira, em planejamento urbano como plantas ornamentais devido a beleza de suas florações, que têm nos ipês o exemplo mais conhecido no paisagismo urbano (LORENZI, 1988; MARTIN et al., 2007). São também muito utilizadas na medicina popular, como por exemplo, a aplicação de preparações da casca de várias espécies de *Tabebuia* para a cura de câncer, um dos usos mais populares das Bignoniaceae (GENTRY, 1992; OGUNDIPE; WUJEK, 2004)

No Brasil, plantas desta família ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, podendo ser encontradas na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e região Amazônica (LORENZI, 1988). São registradas para o Brasil 406 espécies e 33 gêneros, descritos no Quadro 1 (p. 28) (LOHMANN, 2015).

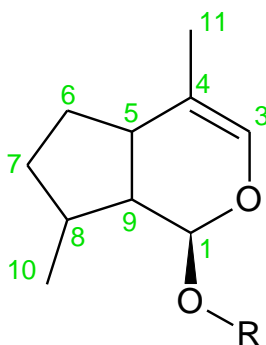
Quadro 1. Gêneros de Bignoniaceae registrados para o Brasil (em destaque, o gênero da espécie em estudo).

1. <i>Adenocalymma</i>	12. <i>Godmania</i>	23. <i>Pleonotoma</i>
2. <i>Amphilophium</i>	13. <i>Handroanthus</i>	24. <i>Pyrostegia</i>
3. <i>Anemopaegma</i>	14. <i>Jacaranda</i>	25. <i>Sparattosperma</i>
4. <i>Bignonia</i>	15. <i>Lundia</i>	26. <i>Spathodea</i>
5. <i>Callichlamys</i>	16. <i>Manaosella</i>	27. <i>Stizophyllum</i>
6. <i>Crescentia</i>	17. <i>Mansoa</i>	28. <i>Tabebuia</i>
7. <i>Cuspidaria</i>	18. <i>Martinella</i>	29. <i>Tanaecium</i>
8. <i>Cybistax</i>	19. <i>Neojobertia</i>	30. <i>Tecoma</i>
9. <i>Digomphia</i>	20. <i>Pachyptera</i>	31. <i>Tynanthus</i>
10. <i>Dolichandra</i>	21. <i>Paratecoma</i>	32. <i>Xylophragma</i>
11. <i>Fridericia</i>	22. <i>Perianthomega</i>	33. <i>Zeyheria</i>

Fonte: Elaborado pela autora, com informações de LOHMANN (2015).

O perfil químico de Bignoniaceae é diversificado. A biossíntese dos seus metabólitos secundários baseia-se, principalmente, na via do ácido acético, o que está de acordo com o seu posicionamento entre as angiospermas mais derivadas (CIPRIANI et al., 2012). A família destaca-se tanto pelos números de ocorrência quanto pela diversificação de terpenos, sendo registrados para essa família esteróis, triterpenos pentacíclicos, diterpenos, monoterpenos não iridoídicos e iridoides, considerados como marcadores taxonômicos para a família.

Os iridoides são metabólitos secundários que demonstram funções de defesa. São monoterpenoides com um esqueleto ciclopentano-[C]-pirano (Figura 2, p. 29), consistindo de dez, nove, ou raramente oito átomos de carbono, e dividem-se em iridoides carbocíclicos e seco-iridoides, ocorrendo comumente na forma glicosilada (SANTOS; KAPLAN, 2001). Em Bignoniaceae, são mais comuns na tribo Tecomeae, estando na forma descarboxilados ou C-4 formilados; na tribo Bignonieae são muito menos comuns e, quando presentes, eles são C-4 carboxilados, com exceção do gênero *Dolichandra*; já nas tribos Eccremocarpeae e Crescentieae até agora foram encontrados apenas iridoides descarboxilados (VON POSER et al., 2000).

Figura 2. Estrutura básica dos iridoides e sua numeração.

Fonte: Santos e Kaplan (2001). R = H ou glucose

As quinonas, principalmente naftoquinonas e antraquinonas, são a segunda classe de metabólitos secundários de maior ocorrência em Bignoniaceae, tendo como principal exemplo o lapachol, muito conhecido por suas propriedades anticancerígenas. As principais ocorrências de flavonoides na família concentram-se entre os de esqueleto regular tais como flavonas, flavonóis e di-hidroflavonas, não havendo ocorrência de tipos mais especializados, como por exemplo isoflavonoides e neoflavonoides. São também encontrados em alguns gêneros alcaloides, taninos, compostos fenólicos e saponinas (CIPRIANI et al., 2012; CHOUDHURY et al., 2011).

As atividades biológicas exercidas pela família estão relacionadas aos seus metabólitos secundários presentes em cada espécie, sendo principalmente anti-inflamatória, antidiurética, antimicrobiana, antioxidante, antidiarreica e antitumoral (CHOUDHURY et al., 2011).

Em um estudo feito com a espécie *Oroxylum indicum* foram isolados os flavonoides crisina, ortoxileno e baicaleína que são descritos como responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, antidiurética, antifúngica e antibacteriana (MAITREYI et al., 2008). Duas porções aglicona dos glicosídeos isocumarina, quatro iridoides glicosídicos, duas ligninas glicosídicas e oito glicosídeos fenólicos foram isolados da casca de *Tabebuia impetiginosa*, conhecidos por apresentarem atividade antioxidante. A atividade antitumoral apresentada por algumas espécies de Bignoniaceae estão relacionadas principalmente a presença das naftoquinonas, como por exemplo o lapachol (CHOUDHURY et al., 2011).

3.2 Gênero *Crescentia* L.

O gênero *Crescentia* L. possui de seis a sete espécies restritas à América tropical do México, do Brasil e das Índias Ocidentais (ELIAS; PRANCE, 1978; MADHUKAR; SRIVASTAVA; DUBEY, 2013; MIERS, 1868). São plantas bastante cultivadas devido ao seu valor ornamental, principalmente em razão da forma de seus frutos (MADHUKAR; SRIVASTAVA; DUBEY, 2013). Algumas espécies são muito conhecidas, sendo elas a *Crescentia cujete* L., amplamente cultivada em toda a região neotropical desde os tempos pré-históricos, *C. alata* H. B. K. que ocorre desde o México até a Costa Rica, *C. amazonica* Ducke na Amazônia e no alto do rio Orinoco, e ainda três outras espécies de *Crescentia* que são endêmicas para as Índias Ocidentais (ELIAS; PRANCE, 1978).

Do ponto de vista botânico as espécies de *Crescentia* são pequenas árvores de 5 a 10 m de altura, com folhas alternadas, flores verde amarelada, cálice bipartido, corola tubular, ovário unilocular com muitos óvulos, frutos em forma de uma baga, duro, ovoide ou globosa com muitas sementes (MADHUKAR; SRIVASTAVA; DUBEY, 2013).

No Brasil os frutos são utilizados na medicina popular para problemas respiratórios e de pele, cicatrização de feridas, repelente de insetos, anemia e também como abortiva (BRITO; SENNA-VALLE, 2011; MONTEIRO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011); as folhas são utilizadas para dor na coluna, problemas renais e diabetes através de infusão ou maceração (ANDRADE et al., 2012; VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014).

Estudos fitoquímicos e de atividades biológicas realizados com espécies do gênero são escassos. Em levantamento bibliográfico realizado no ano de 2015, nos bancos de dados Scielo, Pubmed, Periódico Capes, Lilacs, Embase, Dare, Cochrane Library, Scopus e Science Direct, foram encontrados estudos biológicos, bem como químicos, de apenas duas espécies do gênero *Crescentia*, sendo a *Crescentia alata* Kunt e *Crescentia cujete* L., concluindo assim que estudos sobre o gênero ainda são escassos. No Quadro 2 (p. 31) estão descritos os estudos realizados com *C. alata*, e na seção seguinte (p. 34) estão especificados os estudos realizados com *C. cujete*, espécie em estudo.

Quadro 2. Atividades biológicas dos extratos e frações de *C. alata*.

Extrato	Parte da Planta	Atividade Biológica	Referência
Metanólico	Folhas	Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> e citotóxica	AUTORE et al., 2001
Metanólico	Frutos	Atividade antioxidante	CUEVAS-JUARÉZ et al., 2014
Hexânico e clorofórmico	Frutos	Atividade antibacteriana	PÍO-LEÓN et al., 2013
Metanólico	Cascas	Ação espasmolítica <i>in vitro</i>	RODRIGUEZ-LOPEZ; SALAZAR; ESTRADA, 2003
Hexânico, clorofórmico e metanólico	Frutos	Atividade antibacteriana	ROJAS et al., 2001
Metanólico	Frutos	Atividade larvicida	VALLADARES-CISNEROS et al., 2014

Fonte: Elaborada pela autora.

De um modo geral, entre as principais atividades biológicas descritas para espécies desse gênero, destaca-se a atividade antibacteriana. Foram testados extratos hexânicos, clorofórmicos e metanólicos das duas espécies, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no qual o extrato metanólico e o clorofórmico apresentaram maior atividade contra bactérias Gram-positivas, enquanto que o extrato hexânico foi mais ativo contra bactérias Gram-negativas (BINUTU, 1997; PÍO-LEÓN et al., 2013; ROJAS et al., 2001). O extrato clorofórmico ainda inibiu a levedura *Candida albicans* (ROJAS et al., 2001).

Outra atividade bastante reportada e realizada com as duas espécies é a citotóxica, testada contra *Artemia salina* L., o mosquito *Aedes aegypti*, e ainda contra a linha celular de macrófagos J774.A1 (ASSIS et al., 2009; AUTORE et al. 2001; COE et al, 2012; ESPITIA-BAENA et al., 2011). Os resultados mostraram que o extrato das folhas de *C. alata* foi letal para as larvas de *A. salina*, mas não mostrou efeito citotóxico

significativo na linha celular de macrófagos J774.A1. Já o extrato dos frutos das duas espécies não produziram efeitos tóxicos em larvas de *A. aegypti* e de *A. salina*.

Os frutos de *C. alata* também foram testados como biocidas contra o inseto *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith., utilizando o extrato metanólico (VALLADARES-CISNEROS et al., 2014). Foi observado que quatro frações produziram mortalidade de 40 a 80%, devido principalmente aos iridoides, que são os principais constituintes de *C. alata*, mostrando que *C. alata* possui potencial para ser considerada como uma fonte de bioinsecticidas no controle de *S. frugiperda*.

As cascas do caule de *C. alata* foram estudadas por Rodriguez-Lopez, Salazar e Estrada (2003) para a atividade espasmolítica sobre as contrações espontâneas em íleo isolado de rato, não apresentando atividade satisfatória. Com o mesmo extrato das cascas testou-se a atividade antioxidante comparando o resultado com a atividade demonstrada pelo alcaloide papaverina, também não apresentando atividade de acordo com este parâmetro.

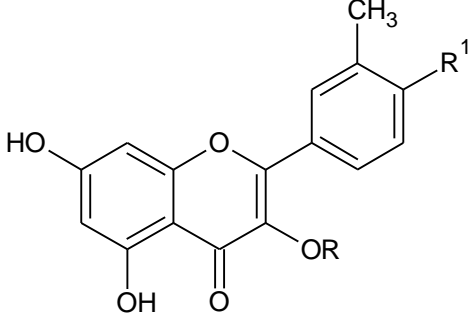
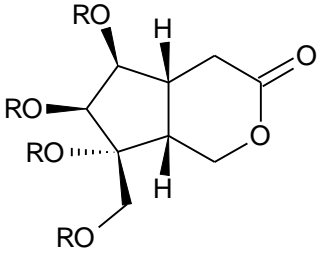
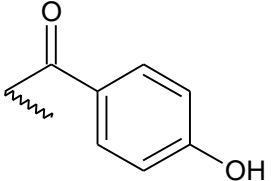
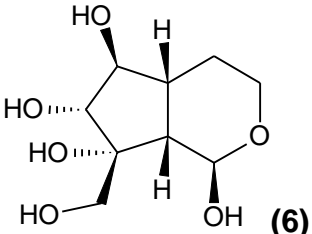
O extrato metanólico das folhas de *C. alata* foi avaliado para atividade anti-inflamatória *in vivo* sobre edema de pata de rato induzido por carragenina, e mostrou exercer significativa atividade anti-inflamatória para a dose mais elevada testada (500 mg/kg) (AUTORE et al., 2001).

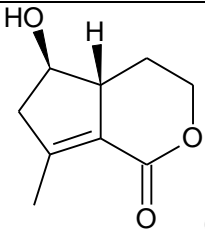
Os estudos químicos encontrados mostram que foram isolados neste gênero flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, principalmente iridoides, naftoquinonas, esteroides e glicosídeos (AGARWAL; POPLI, 1992; AUTORE et al., 2001; BINUTU, 1997; HELTZEL et al., 1993a; HELTZEL et al., 1993b; KANEKO et al, 1998; KANEKO et al, 1997; NIELSEN; SLAMET; WEGE, 2009; VALLADARES; RIOS, 2007; VALLADARES-CISNEROS et al., 2014; WANG et al., 2010). Os compostos isolados de *C. alata*, uma das duas espécies de *Crescentia* encontradas no levantamento bibliográfico, estão descritos na Quadro 3 (p. 33-34).

Do extrato metanólico das folhas de *C. alata* foram isolados três flavonoides, sendo dois glicosilados, sendo que um deles, o kaempferol, mostrou atividade anti-inflamatória *in vitro* na proteção induzida pela endotoxina em macrófagos J774.A1 que inibem diretamente a via L-arginina-NO (AUTORE et al., 2001). Foram isolados também quatro terpenos da classe dos iridoides, utilizando o extrato metanólico dos frutos maduros, considerados como os principais constituintes da espécie e os

responsáveis pela atividade larvica contra *S. frugiperda* (VALLADARES-CISNEROS et al., 2014).

Quadro 3. Constituintes químicos encontrados em *C. alata*.

Estrutura	Nome	Referência
 <p>(1) R = α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosil ; R¹ = OH</p> <p>(2) R = α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosil ; R¹ = H</p> <p>(3) R = H ; R¹ = H</p>	<p>(1) quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosídeo</p> <p>(2) kaempferol 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosídeo</p> <p>(3) kaempferol</p>	<p>AUTORE et al., 2001</p>
 <p>(4) R = H</p>  <p>(5) R =</p>  <p>(6)</p>	<p>(4) 6β,7β,8α,10-tetrahidroxi-<i>cis</i>-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona</p> <p>(5) 6β,7β,8α,10-tetra-<i>p</i>-hidroxibenzoil-<i>cis</i>-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona</p> <p>(6) 1β,6β,7α,8α,10-pentahidroxi-<i>cis</i>-2-oxabicyclo[4.3.0]nonana</p>	<p>VALLADARES; RIOS, 2007</p>

Estrutura	Nome	Referência
 <p style="text-align: right;">(7)</p>	<p>(7) 6β-hidroxi-2-oxabicyclo[4.3.0]Δ⁸⁻⁹-nonen-1-ona</p>	

Fonte: Elaborado pela autora.

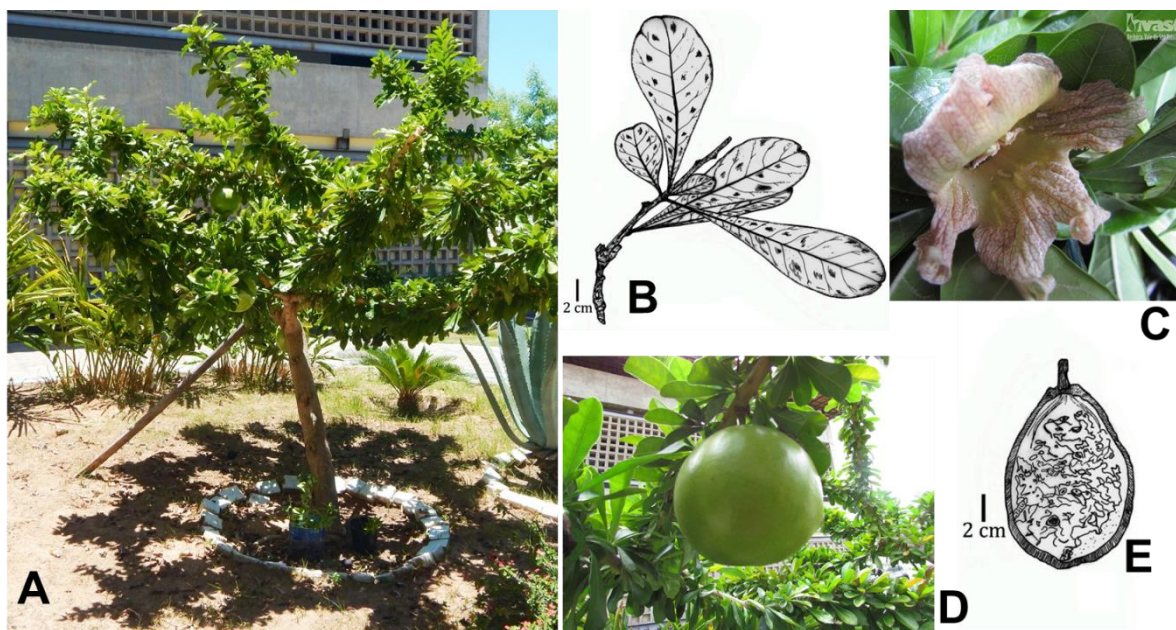
3.3 *Crescentia cujete* L.

Crescentia cujete L. (Bignoniaceae), é uma espécie originária da América Tropical, amplamente distribuída na região dos trópicos, incluindo a América do Sul, América Central, norte da África e Sul da Ásia (BURGER; GENTRY, 2000). No Brasil é conhecida popularmente como “coité”, “cabaça”, “árvore de cabaça” ou “cuieira”, ocorrendo desde a Amazônia até a região sudeste, podendo ser encontrada no Nordeste do Brasil, principalmente na Caatinga (AZEVEDO et al., 2010; PEREIRA et al., 2015a).

É uma árvore de pequeno porte (6-10 m de altura), com uma grande coroa de ramos longos e cobertos com conjuntos de folhas elípticas simples, sésseis, agrupados no ânodos, de nervura central, flores tubulares, esbranquiçadas verde, de 4-7 cm de diâmetro, suportadas pelos troncos ou galhos maiores, tendo frutos esféricos ou ovais (globoso) de até 25 cm de diâmetro, com epicarpo verde, flexível e endocarpo lenhoso e resistente (Figura 3, p. 35) (MADHUKAR; SRIVASTAVA; DUBEY, 2013; PARVIN et al., 2015).

C. cujete é utilizada para diversos fins. Os frutos secos são comumente usados na confecção de tigelas, recipientes e utensílios domésticos após a remoção da polpa, e ainda tinturas e chocalhos musicais, plantadas em jardins, atuam como cercas-vivas e como plantas ornamentais, destacando que a seiva é utilizada como inseticida para pragas; as sementes fornecem um óleo fixo semelhante ao do amendoim e do azeite de oliva (ARANGO-ULLOA et al. 2009; MADHUKAR; SRIVASTAVA; DUBEY, 2013; SOUZA; LORENZI, 2005).

Figura 3. (A) Foto de *C. cujete*; (B) Galho e folhas; (C) Flor; (D) Fruto; (E) Corte vertical do fruto.



Fonte: (A) A autora; (B) e (E) Madhukar, Srivastava e Dubey (2013); (C) e (D) HVASF (2015).

Do ponto de vista etnofarmacológico, o chá é muito utilizado na medicina popular no Brasil e em vários outros países, principalmente para combater a hipertensão, diabetes, problemas urinários, tosses, anemias, e o efeito hemorrágico de picadas de cobras venenosas (AZEVEDO et al., 2010; OTERO et al., 2000). O chá dos frutos são utilizados para problemas respiratórios, como asma, e também como expectorante, antitussígeno, laxante e para distúrbios estomacais; a polpa dos frutos, quando verde, é corrosiva e usada ainda no tratamento de doenças respiratórias, e, quando madura, é abortiva; a casca é usada para diarreia e na limpeza de feridas; as folhas trituradas, por outro lado, são utilizadas para o tratamento de hipertensão e também como cataplasma para dores de cabeça (EJELONU et al., 2011; NIELSEN; SLAMET; WEGE, 2009; PARVIN et al., 2015). A decocção das raízes são utilizadas no tratamento de amebíase (BERMUDEZ; VELÁZQUEZ, 2002).

Diante de sua importância na medicina popular, a espécie foi alvo de alguns estudos fitoquímicos anteriores a fim de comprovar seus usos terapêuticos. Os ensaios biológicos realizados estão descritos no Quadro 4 (p. 36-37).

Quadro 4. Atividades biológicas dos extratos e frações de *C. cujete*.

Extrato	Parte da Planta	Atividade Biológica	Referência
-	Polpa do fruto	Atividade citotóxica	ASSIS et al., 2009
Extratos hexânico, clorofórmico e metanólico	Raiz	Atividade antibacteriana	BINUTU, 1997
Metanólico	Folhas e cascas do caule	Atividade antibacteriana	BINUTU; LAJUBUTU, 1994
Não determinado	Folhas e cascas do caule	Atividade antibacteriana	CHAUHAN; CHAUHAN, 2012
Aquoso	Folhas	Atividade citotóxica	COE et al., 2012
Etanólico e frações: éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e aquosa	Folhas e cascas do caule	Atividade antioxidante	DAS et al., 2014
Metanólico	Partes aéreas	Atividade antioxidante e citotóxica	DAVID et al., 2007
Etanólico	Fruto	Atividade citotóxica e genotóxica	ESPITIA-BAENA et al., 2011
Aquoso	Fruto	Atividade antioxidante	LIZCANO et al., 2010
Etanólico	Folhas	Atividade antibacteriana	MAHBUB et al., 2011
Etanólico	Fruto	Atividade antiofídica	OTERO et al., 2000
Etanólico	Folhas e cascas do caule	Atividade anti-inflamatória e antibacteriana	PARVIN et al., 2015
Etanólico e fração acetato de etila	Fruto	Atividade citotóxica	PEREIRA et al., 2015a

Extrato	Parte da Planta	Atividade Biológica	Referência
Etanólico	Fruto	Atividade antiofídica de cobra <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	SHASTRY et al., 2012

Fonte: elaborado pela autora.

As folhas, cascas do caule e a raiz de *C. cujete* apresentaram notável atividade antibacteriana, principalmente o extrato clorofórmico da raiz contra bactérias Gram Positivas (CHAUHAN; CHAUHAN, 2012; BINUTU, 1997; PARVIN et al., 2015). O extrato da casca do caule demonstrou melhor atividade do que o extrato das folhas, estando relacionada com os constituintes químicos presentes, considerando ainda que alguns organismos foram seletivamente mais sensíveis para um extrato do que para o outro (BINUTU; LAJUBUTU, 1994).

A atividade citotóxica também foi avaliada frente a larvas de *Artemia salina* L., *Aedes aegypti* L. em estágios III e IV, e células de *Allium cepa* L. (COE et al, 2012; ESPITIA-BAENA et al., 2011). Os extrato aquoso e o extrato etanólico dos frutos não apresentou toxicidade aguda em nenhum dos sistemas biológicos testados ($CE_{50} = 4382$, não considerado letal para extratos de plantas). Também foi avaliada a citotoxicidade sobre a inibição da germinação de sementes e o desenvolvimento das plantas invasoras *Senna obtusifolia* L. e *Mimosa pudica* Mill., demonstrando excelente resultado em baixas concentrações do extrato (PEREIRA et al., 2015a). Um trabalho feito por Assis e colaboradores (2009) estudou a toxicidade dos frutos em ruminantes para investigar a suposição de abortos em bovinos relatados em uma comunidade. A polpa do fruto foi administrada a um caprino em uma dose única de 40mg/kg e a uma cabra prenhe, que recebeu, diariamente, 5g/kg por 84 dias. Após o período de administração, o caprino não apresentou nenhum sinal clínico de intoxicação, porém, a cabra pariu um cabrito morto e outro vivo que nasceu debilitado e morreu antes de completar 24 horas, sugerindo assim que a planta é abortiva em ruminantes.

A atividade antioxidante das folhas, cascas do caule e frutos de *C. cujete* foram testadas através dos métodos do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder redutor férrico (PRF), capacidade antioxidante equivalente do Trolox (CAET), e pela capacidade de absorção do radical oxigênio (CARO) (DAS et al., 2014;

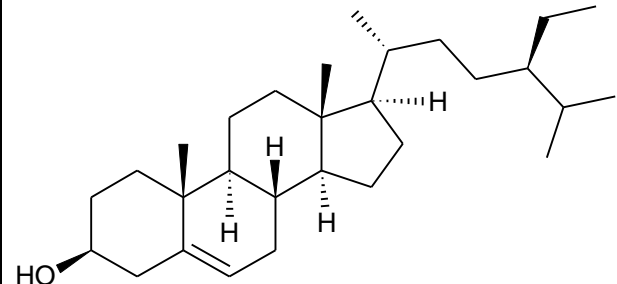
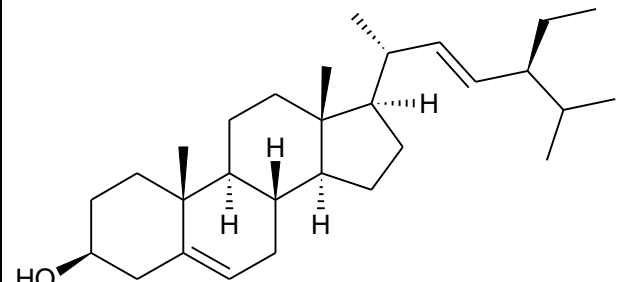
LIZCANO et al., 2010). As folhas mostraram possuir significativas propriedades de eliminação de radicais livres pelos métodos do DPPH e PRF. Entretanto, para os métodos CAET e CARO, o extrato dos frutos não apresentou atividade.

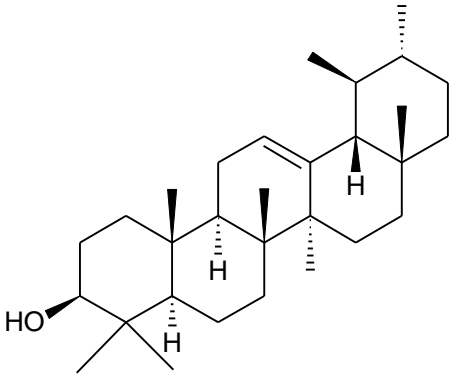
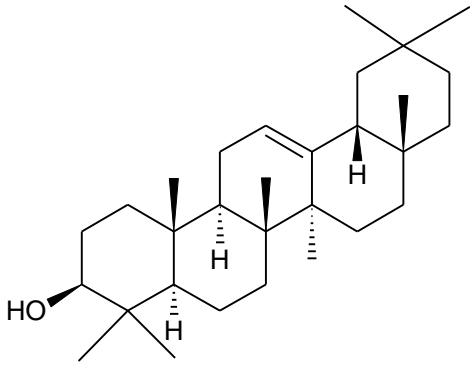
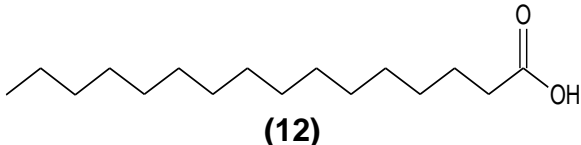
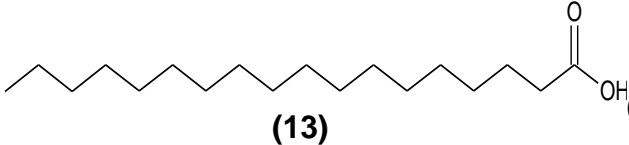
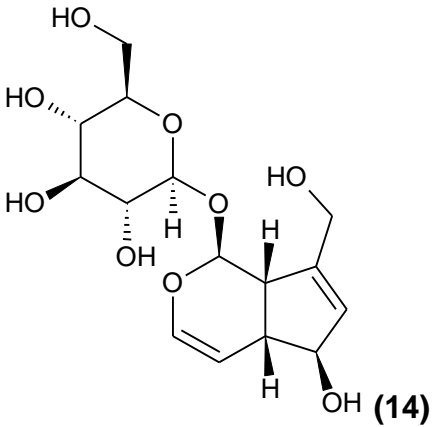
Outra atividade avaliada foi a capacidade de neutralizar efeito hemorrágico de picadas de cobras venenosas, utilizando o extrato etanólico dos frutos de *C. cujete*, frente o veneno das serpentes *Vipera russelli* e *Bothrops atrox*, sendo ativo apenas na neutralização do veneno de *V. russelli* (OTERO et al., 2000; SHASTRY et al., 2012).

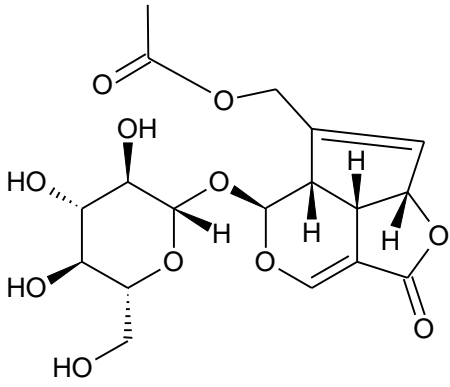
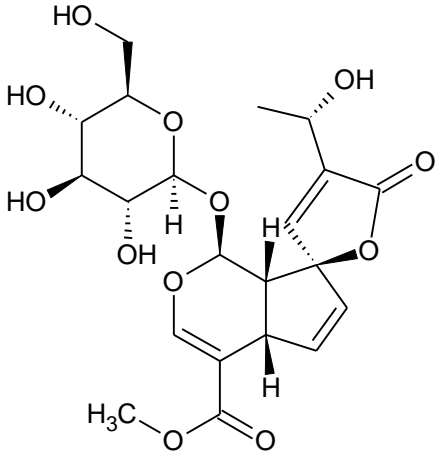
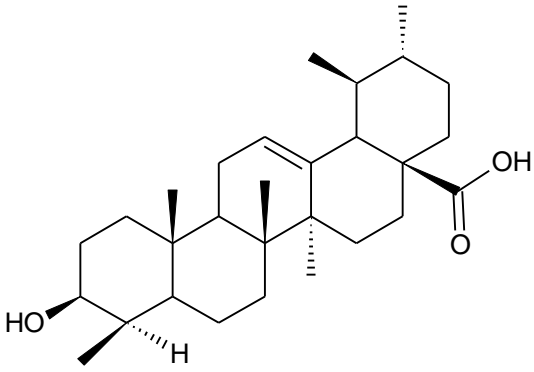
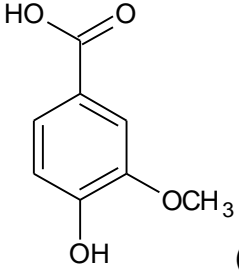
As folhas e as cascas do caule de *C. cujete* foram avaliadas ainda para a atividade anti-inflamatória através do método *in vitro* de estabilização de glóbulos vermelhos do sangue humano (HRBC, sigla em inglês), no qual foi observado grande potencial para estabilização da membrana (PARVIN et al., 2015).

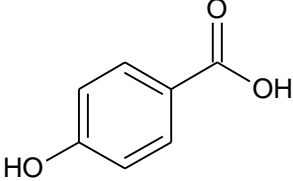
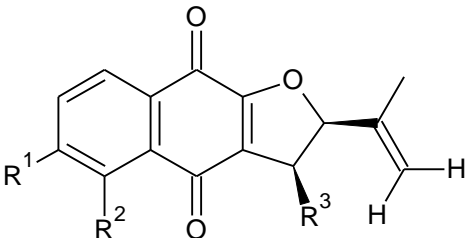
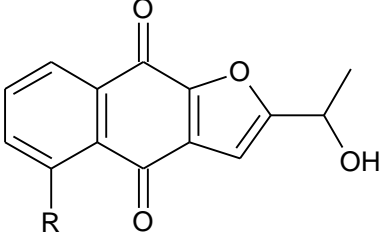
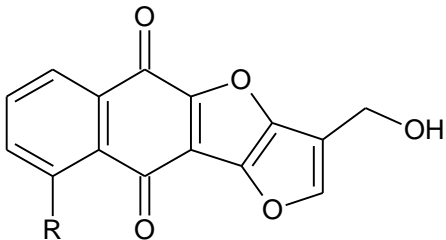
Do ponto de vista químico, alguns compostos já foram isolados, em sua maioria, dos frutos, e identificados através de técnicas espectrométricas. No Quadro 5 (p. 38-45) estão descritos as estruturas químicas e seus respectivos nomes dos metabólitos secundários encontrados em *C. cujete*.

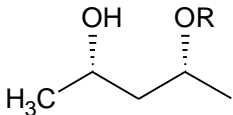
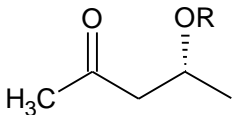
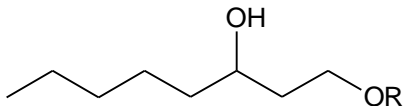
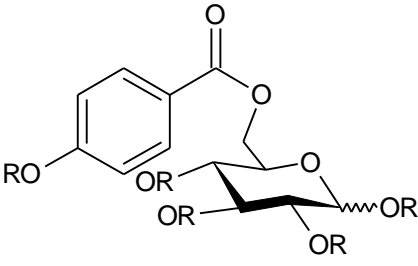
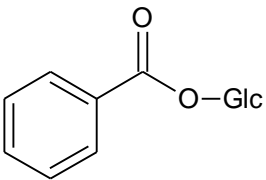
Quadro 5. Constituintes químicos encontrados em *C. cujete*.

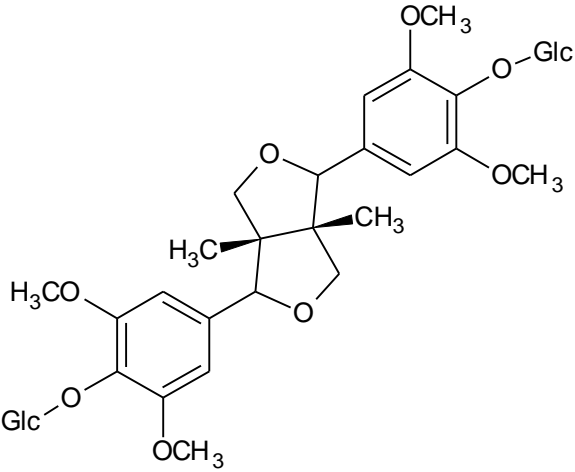
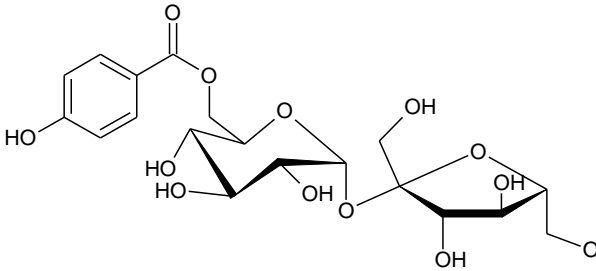
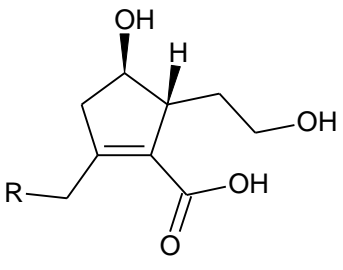
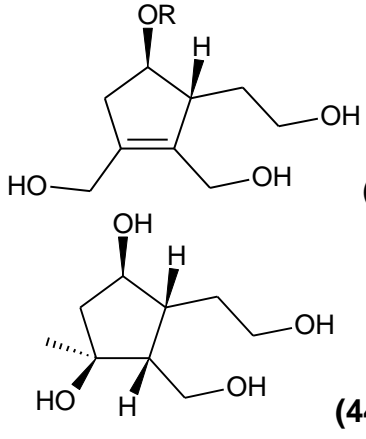
Estrutura	Nome	Referência
 <p>(8)</p>	(8) β -sitosterol	AGARWAL; POPLI, 1992
 <p>(9)</p>	(9) Stigmasterol	

Estrutura	Nome	Referência
 <p>(10)</p>	(10) α -amirina	
 <p>(11)</p>	(11) β -amirina	
 <p>(12)</p>	(12) Ácido palmítico	
 <p>(13)</p>	(13) Ácido esteárico	
 <p>(14)</p>	(14) Aucubina	

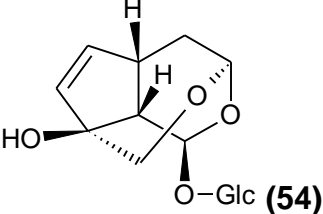
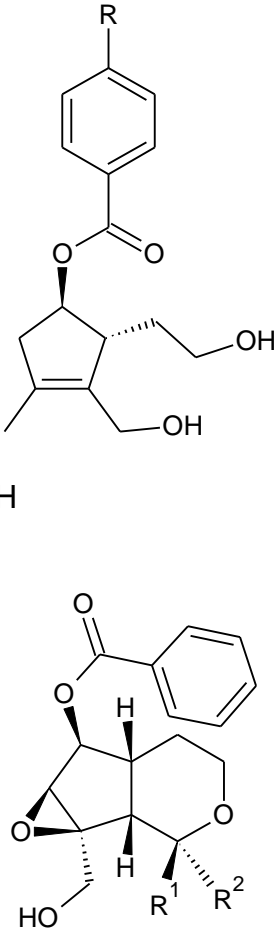
Estrutura	Nome	Referência
 <p>(15)</p>	(15) Asperulosida	
 <p>(16)</p>	(16) Plumierida	
 <p>(17)</p>	(8) β -sitosterol (p. 38) (17) Ácido ursólico	BINUTU, 1997
 <p>(18)</p>	(18) Ácido vanílico	

Estrutura	Nome	Referência
 <p style="text-align: right;">(19)</p>	<p>(19) Ácido 4-hidroxibenzoico</p>	
 <p>(20) R¹ = R² = OMe; R³ = OH (21) R¹ = R² = OMe; R³ = H (22) R¹ = R³ = H; R² = OMe (25) R¹ = R³ = R² = H (26) R¹ = R³ = H; R² = OH</p>  <p>(23) R = H (24) R = OH</p>	<p>(20) (2S,3S)-3-hidroxi-5,6-dimetoxidehidroiso-α-lapachona (21) (2R)-5,6-dimetoxidehidroiso-α-lapachona (22) (2R)-5-metoxidehidroiso-α-lapachona (25) 2-isopropenilnafto[2,3-β]furan-4,9-diona (26) 5-hidroxidehidroiso-α-lapachona</p> <p>(23) 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-β]furan-4,9-diona (24) 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-β]furan-4,9-diona</p>	<p>HELTZEL et al., 1993a</p>
 <p>(27) R = H (28) R = OH</p>	<p>(27) 3-hidroxi metilfuro[3,2β]nafto[2-3d]furan-5,10-diona (28) 9-hidroxi-3-hidroxi metilfuro[3,2β]nafto[2-3d]furan-5,10-diona</p>	<p>HELTZEL et al., 1993b; NIELSEN; SLAMET; WEGE, 2009</p>

Estrutura	Nome	Referência
 <p>(29) R = Glc (30) R = Glc⁶—Glc (31) R = Glc⁶—Xyl</p>	<p>(29) 2<i>R</i>,4<i>S</i>)-2-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-2,4-pentanediol (30) 2<i>R</i>,4<i>S</i>)-2-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil-2,4-pentanediol (31) 2<i>R</i>,4<i>S</i>)-2-<i>O</i>-β-D-xilopiransil-(1→6)-β-D-glucopiranosil-2,4-pentanediol</p>	KANEKO et al., 1998
 <p>(32) R = Glc (33) R = Glc⁶—Glc</p>	<p>(32) (<i>R</i>)-4-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-4-hidroxi-2-pentanona (33) (<i>R</i>)-4-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil-4-hidroxi-2-pentanona</p>	
 <p>(39) R=Glc (34) R = Glc²—Api (35) R = Glc⁶—Glc</p>	<p>(39) (<i>R</i>)-1-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-1,3-octanediol (34) (<i>R</i>)-1-<i>O</i>-β-D-apiofuranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil-1,3-octanediol (35) (<i>R</i>)-1-<i>O</i>-β-D-Glucopiranosil-(1→6)-β-D-Glucopiranosil-1,3-octanediol</p>	
 <p>(36)</p>	<p>(36) 6-<i>O</i>-(<i>p</i>-hidroxibenzoil)-D-Glucose</p>	
 <p>(38)</p>	<p>(38) β-D-glucopiranosil benzoato</p>	

Estrutura	Nome	Referência
 <p data-bbox="507 772 571 817">(37)</p>	<p data-bbox="869 705 1141 750">(37) Acantosideo D</p>	
 <p data-bbox="507 1153 571 1198">(40)</p>	<p data-bbox="869 1108 1204 1220">(40) β-D-fructofuranosil 6-O-(p-hidroxibenzoil)-α-D-glucopiranosideo</p>	
 <p data-bbox="598 1467 774 1556">(41) R = H (42) R = OH</p>	<p data-bbox="869 1288 1157 1332">(14) Aucubina (p.39)</p> <p data-bbox="869 1467 1125 1556">(41) Crescentina I (42) Crescentina I</p>	<p data-bbox="1252 1288 1428 1366">KANEKO et al., 1997</p>
 <p data-bbox="686 1758 750 1803">(43)</p> <p data-bbox="662 1971 726 2016">(44)</p>	<p data-bbox="869 1736 1220 1814">(43) 6-O-(p-hidroxibenzoil)-eucomiol</p> <p data-bbox="869 1948 1141 1993">(44) Crescentina IV</p>	

Estrutura	Nome	Referência
	<p>(45) 6-<i>O-p</i>-hidroxibenzoil-6-epiaucubina (46) Agnusideo</p>	
<p>(45) R¹ = α-<i>p</i>-OHBz, R² = H (46) R¹ = βOH, R² = <i>p</i>-OHBz</p>		
	<p>(47) 5,7-bisdeoxicinanchosideo</p>	
	<p>(48) Ajugol (49) 6-<i>O-p</i>-hidroxibenzoilajugol</p>	
<p>(48) R = H (49) R = <i>p</i>-OHBz</p>		
	<p>(50) Ningpogenina (51) Ningpogenina-10-<i>O</i>-β-D-glucopiranosideo</p>	
<p>(50) R = H (51) R = Glc</p>		
	<p>(52) 3,4-dehidroningpogenina (53) 3,4-dehidroningpogenina-10-<i>O</i>-β-D-Glucopiranosideo</p>	
<p>(52) R = H (53) R = Glc</p>		

Estrutura	Nome	Referência
	(54) Crescentosideo C	
 <p data-bbox="240 1077 416 1149">(55) R = OH (56) R = H</p> <p data-bbox="240 1570 544 1641">(57) R¹ = OH; R² = H (58) R¹ = H; R² = OH</p>	<p data-bbox="866 600 1134 674">(50) Ningpogenina (p. 45)</p> <p data-bbox="866 1043 1121 1223">(55) 6-<i>O-p</i>-hidroxibenzoil-10-deoxieucomiol (56) 6-<i>O</i>-benzoil-10-deoxieucomiol</p> <p data-bbox="866 1518 1201 1664">(57) e (58) 6-<i>O</i>-benzoil-dihidrocatalpolgenina (mistura dos dois compostos)</p>	WANG et al., 2010

Fonte: elaborado pela autora.

As furanonaftoquinonas e furofuranonaftoquinonas (Quadro 5, p. 41, fig. 20 a 26) foram isoladas do extrato MeCOEt das cascas do caule, e testadas para a atividade seletiva contra a levedura geneticamente modificada rad 52 RS322YK, baseado na resposta diferencial de cepas de reparo do DNA (HELTZEL et al., 1993a).

Os compostos 20-22, bem como os 27-28 demonstraram serem bioativos, com habilidade em reparar danos no DNA deficiente.

O ácido vanílico (18) e o ácido 4-hidroxibenzoico (19), isolados da fase clorofórmica, são indicados como os principais responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada pela fração (BINUTU, 1997). Percebe-se também que há uma clara correlação existente entre a atividade antioxidante apresentada e conteúdo de fenólicos da planta (DAS et al., 2014).

Em um estudo feito por Coe e colaboradores (2012) não foram encontrados alcaloides na espécie. Entretanto, a eficácia de *C. cujete* nas atividades biológicas descritas anteriormente é devido à presença de outros tipos de metabolitos secundários, tais como os triterpenos da classe dos iridoides, flavonoides, glicosídeos, fenóis, saponinas, esteroides e taninos (COE et al., 2012).

Apesar de já existirem estudos realizados com a espécie, percebe-se que nenhum foi realizado no Brasil. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), apesar da existência de um controle genético na produção dos metabólitos secundários, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, pois eles representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, de forma que a sazonalidade, o ritmo circadiano, o estágio de desenvolvimento da planta, a temperatura, a disponibilidade hídrica e de nutrientes, a incidência de radiação ultravioleta, a altitude, e ainda a poluição atmosférica, podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais. Portanto, um estudo realizado com um exemplar de *C. cujete* no Brasil, e principalmente na caatinga que apresenta condições ambientais específicas, pode demonstrar resultados significativos que complementem os conhecimentos já existentes.

3.4 Compostos químicos do metabolismo das plantas

Por trás da beleza da natureza esconde-se uma guerra surda pela sobrevivência dos mais aptos. As plantas para sobreviver e evoluir têm que competir por espaço e se defender do ataque de herbívoros e patógenos, em geral. Neste embate de milhões de anos, as plantas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas. (FERREIRA; PINTO, 2010).

A vida dos organismos vivos é assegurada e controlada pelas transformações químicas realizadas por metabolismos primário e secundário, mais especializado, que garantem ao ser vivo passar pelas etapas de nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento, doenças e morte (BRAZ FILHO, 2010).

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas que ocorre nas células vivas, direcionadas por enzimas específicas, estabelecendo, assim, rotas metabólicas de maneira a aproveitar os nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O metabolismo primário está associado aos processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, sendo incluídas as macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) resultantes da absorção do carbono, nitrogênio e da energia, que controlam a formação, manutenção e reprodução das plantas (GARCÍA; CARRIL, 2009; GARCEZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011). Entretanto, muitas organelas sintetizam compostos orgânicos que não estão diretamente ligados ao crescimento e/ou desenvolvimento do organismo, porém, conferem vantagens relacionadas, principalmente, à fecundidade e à sobrevivência, provenientes do metabolismo secundário (GARCEZ et al., 2013).

Os compostos resultantes do metabolismo secundário têm sido sumariamente definidos como pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total disponível na planta, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicos (FUMAGALI et al., 2008). São moléculas instáveis cuja atividade depende das suas estruturas, além das propriedades químicas e físicas (OLIVEIRA et al., 2011).

Os compostos do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial são específicos das espécies e estabelecem a competência para a guerra química dos ajustes necessários à convivência e sobrevivência ambiental, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas (BRAZ FILHO, 2010; FUMAGALI et al., 2008).

Estes compostos participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, ou seja, as interações entre a planta e seu ecossistema exercendo, por exemplo, o papel de fagoinibidores contra

herbívoros, atuam também em processos de polinização pela produção de substâncias que atraem os agentes vivos deste processo e agentes dispersores de sementes (BRAZ FILHO, 2010; MONTEIRO et al., 2005). Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (FUMAGALI et al., 2008).

Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana, principalmente por possuir características potencialmente benéficas na prevenção de doenças e proteção da estabilidade do genoma, agindo como antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A síntese destes compostos, suas propriedades e seu conteúdo total, bem como as proporções relativas, podem ser alterados por variações temporais e espaciais (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (SIMÕES et al, 2010). O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados deles; terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008).

A classificação desses compostos é feita de acordo com a sua rota biossintética. As três famílias de moléculas geralmente consideradas como as principais são os compostos fenólicos, terpênicos e esteroides, e os alcaloides (FUMAGALI et al., 2008).

3.4.1 Compostos fenólicos

As plantas sintetizam uma grande variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol, um anel aromático com um grupo hidroxila, formando substâncias conhecidas como fenólicos, polifenóis ou fenilpropanoides (GARCÍA;

CARRIL, 2009). Os grupos de compostos fenólicos mais abundantes nos alimentos são os flavonoides, os ácidos fenólicos e as lignanas (SPENCER et al., 2008). Os flavonoides constituem um dos grupos fenólicos de grande importância econômica e com diversas formas estruturais (SIMOES et al., 2010).

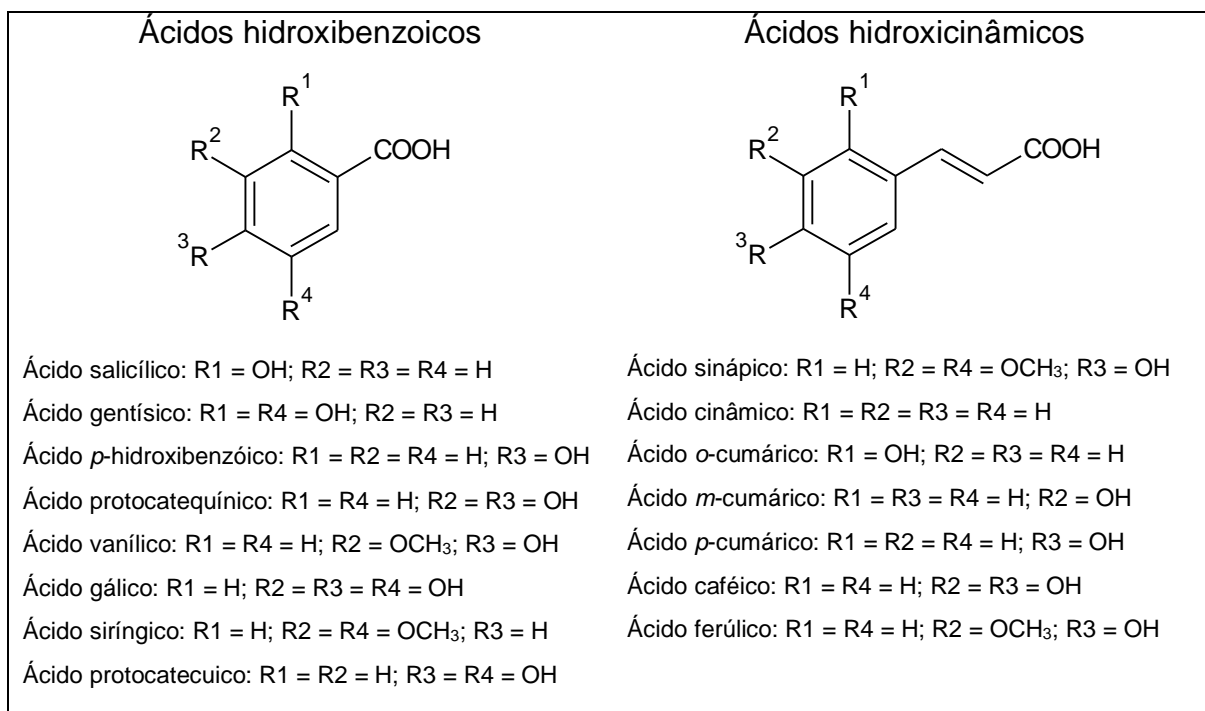
Foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo. Diferentes classes de flavonoides são definidas de acordo com o estado de oxidação da cadeia heterocíclica, sendo eles: antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Um grande número de atividades biológicas estão associados aos flavonoides, principalmente à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas, pois possuem a capacidade de sequestrar radicais livres (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Além disso, esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias (FUMAGALI et al., 2008).

Outro grupo de compostos fenólicos são os ácidos fenólicos, que caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006). Estes ácidos fenólicos podem variar em termos de estrutura, devido à diferença no número e posição dos grupos hidroxilas no anel aromático (KIM et al., 2006).

São divididos em dois grupos: o primeiro é composto pelos ácidos hidroxibenzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6 – C1); o segundo grupo é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6 – C3). Na Figura 4 (p. 50) são mostrados os sete ácidos hidroxicinâmicos mais comumente encontrados no reino vegetal (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os ácidos hidroxibenzoicos, como o ácido gálico e o ácido protocatecuico, são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos, razão pela qual eles não são atualmente considerados de grande interesse nutricional (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Figura 4. Estrutura química básica dos ácidos fenólicos.

Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006

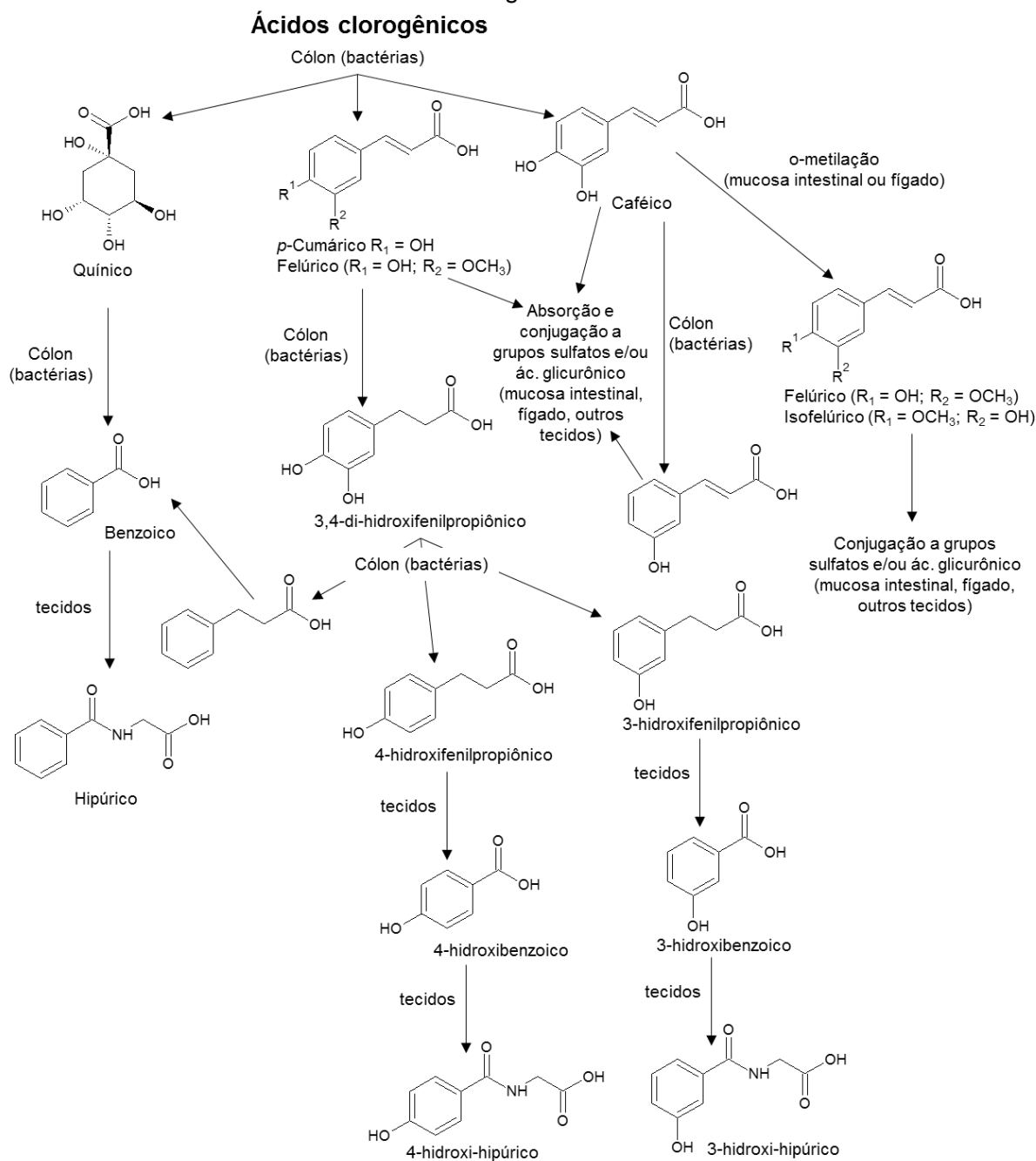
Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas, cereais, entre outros. Consistem principalmente do ácido cumárico, caféico e ferúlico, que raramente são encontrados na forma livre. As formas de ligação são derivados glicosilados ou ésteres do ácido quínico, xiquímico ou tartárico. O ácido caféico e quínico se combinam para formar o ácido clorogênico, o qual se encontra em muitos tipos de frutas e em concentrações elevadas no café (um único copo pode conter até 350 mg de ácido clorogênico). Exemplos desta classe de compostos são o ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico que, na maioria dos alimentos, se encontram esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados (D'ARCHIVIO et al., 2007; RAMALHO; JORGE, 2006)

Como um grupo, estes compostos naturais atuam como fortes antioxidantes contra os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), a principal causa de muitas doenças humanas crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (KIM et al., 2006).

A origem dos ácidos fenólicos está relacionada aos metabólitos formados durante a metabolização dos ácidos clorogênicos, comuns ao metabolismo de flavonoides, os quais têm sua estrutura clivada pela microflora colônica (Figura 5, p.

51). Os ácidos clorogênicos (CGAs) são formados pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos *trans*-cinâmicos: o ácido caféico (3,4-dihidroxicinâmico), o ferúlico (3-metoxi, 4-hidrôxi), sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidrôxi) ou o *p*-cumárico (4-hidrôxi) (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Figura 5. Representação esquemática das vias gerais de metabolismo dos ácidos clorogênicos.



Fonte: Adaptado de Oliveira e Bastos (2011).

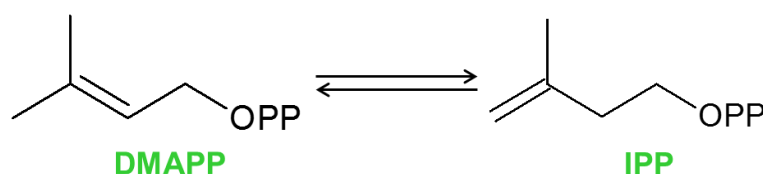
3.4.2 Terpenos e esteróis

Os terpenoides, ou terpenos, são um dos mais numerosos grupos (mais de 40.000 moléculas diferentes) de metabólitos secundários, com uma ampla variedade de compostos (GARCÍA; CARRIL, 2009).

O grupo dos terpenos inclui hormônios (giberelinas e ácido abscísico), carotenoides (carotenos e xantofilas), esteróis (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de esteróis (glicosídeos cardíacos), látex e óleos essenciais (proporcionam o cheiro e sabor característico de plantas) (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Normalmente, são insolúveis em água e todos são derivados do pirofosfato de isopentilalila (IPP) e do seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), também chamados de unidades de isopreno (Figura 6, p. 52). São formados a partir da união de unidades de isopreno através de ligações cabeça-cauda, sendo que a quantidade de unidades de isopreno classificam os terpenos em: monoterpenos, com 10 C contendo duas unidades de isopreno; sesquiterpenos, com 15 C contendo três unidades de isopreno; diterpenos, com 20 C contendo quatro unidades de isopreno; triterpenos, contendo 30 C, tetraterpenos, contendo 40 C, e fala-se ainda em politerpenos quando contêm mais de 8 unidades de isopreno (PETERSEN, 2006).

Figura 6. Unidades de isopreno das quais derivam os terpenos.

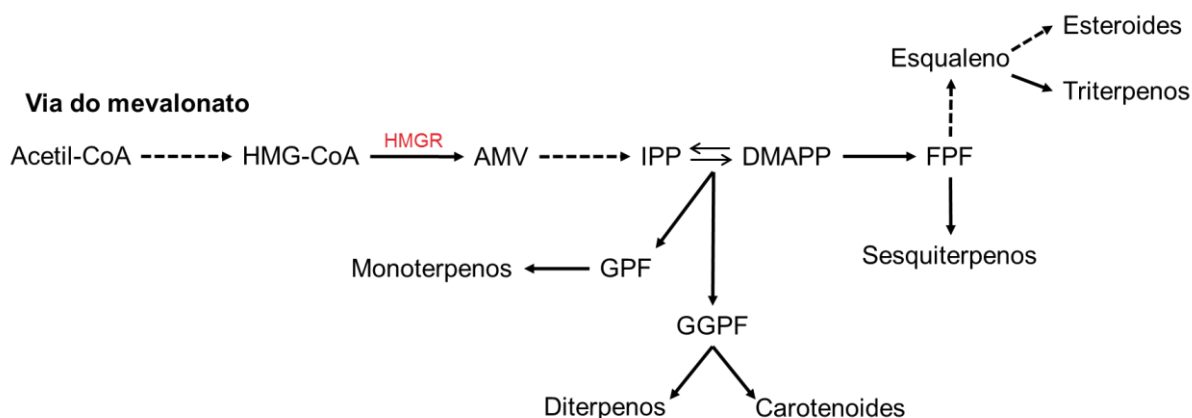


Fonte: adaptado de PETERSEN (2006). Abreviações: DMAPP: pirofosfato de dimetilalila; IPP: pirofosfato de isopentilalila.

A principal via para formação dos terpenos é a via do mevalonato, produzido a partir da condensação da Acetil-CoA, levando à formação de unidades de C5, o pirofosfato de isopentilalila (IPP) e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), base da biossíntese dos terpenos. IPP e DMAPP são utilizados em reações de condensação por prenil transferases para produzir prenil difosfatos maiores, tais como o geranyl pirofosfato (GPF) precursor dos monoterpenos, o farnesil pirofosfato (FPF) precursor dos sesquiterpenos e o geranylgeranyl pirofosfato (GGPF) precursor dos diterpenos e carotenóide C40. A condensação de duas unidades de FPF produzem o

esqualeno, precursor dos triterpenos e esteróis. Porém, triterpenos são formados da ciclização do esqualeno enquanto que, os esteroides são originados dos triterpenos com esqueleto cicloartenol (AHARONI; JONGSMA; BOUWMEESTER, 2005; SIMÕES et al., 2010) (Figura 7, p. 53).

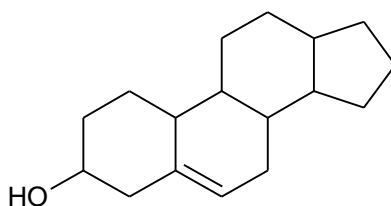
Figura 7. Resumo da biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato.



Fonte: Adaptado de Aharoni, Jongsma e Bouwmeester (2005). Abreviações: Acetil-CoA: Acetilcoenzima A; AMV: ácido mevalônico; DMAPP: pirofosfato de dimetilalila; FPF: farnesil pirofosfato; GGPF: geranylgeranyl pirofosfato; GPF: geranyl pirofosfato; HMG-CoA: hidroximetilglutaril CoA; HMGR: HMG-CoA redutase; IPP: pirofosfato de isopentilalila.

Os fitoesteróis, ou esteroides vegetais, outra família de metabólitos secundários são compostos de 28 ou 29 carbonos, diferindo do colesterol (27 carbonos) pela presença de uma ramificação metila ou etila adicional na cadeia carbônica (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Formam uma classe de lipídios que tem uma estrutura básica de átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si, com um grupo hidroxila (OH) na terceira posição (ROCHA, 2008) (Figura 8, p. 53). Já foram identificados mais de 250 moléculas de fitoesteróis diferentes, sendo os mais abundantes o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (MARANGONI; POLI, 2010).

Figura 8. Estrutura básica dos esteroides.



Fonte: Rocha (2008).

A biossíntese dos fitoesteróis ocorre através da via metabólica que tem início na redução da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) ao mevalonato. A biossíntese destes compostos compartilha as mesmas reações observadas para a síntese dos terpenóides, uma vez que o triterpenóide escaleno é um intermediário comum nas duas vias metabólicas (BREDA, 2010). Quimicamente, os fitoesteróis são subdivididos, em três grupos, de acordo com a sua estrutura química e biossíntese: esteróis 4-desmetil, a subclasse mais abundante, esteróis 4 α - monometil e esteróis 4,4-dimetil (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

Os fitoesteróis também podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de insaturações, o que os subdivide em esteróis ou estanóis, respectivamente. Quanto à origem, os estanóis têm distribuição natural pouco observada, sendo, portanto, obtidos a partir do processo de hidrogenação dos esteróis ou por síntese (BREDA, 2010).

A estrutura diversificada dos esteróis parecem ser a resposta da evolução para a adaptação da planta a grandes variações de temperatura (DUFOURC, 2008). Sua grande similaridade com o colesterol confere aos fitoesteróis a capacidade de atuar na diminuição da absorção do colesterol no intestino delgado por um mecanismo de competição com consequente aumento na excreção fecal do colesterol (ROCHA, 2008).

A função primária dos fitoesteróis está relacionada à sua capacidade de interferir na fluidez da membrana vegetal e na sua permeabilidade à água (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008). Além disso, também são responsáveis pela estabilização da membrana, assim como apresentam um papel importante na sua rigidez, uma vez que esta mostra-se dependente da relação esteróis/fosfolipídeos. Podem-se citar ainda sua ação como hormônios vegetais ou seus precursores (BREDA, 2010).

3.5 Análise de princípios ativos naturais

Os princípios ativos naturais podem ser analisados por diversas técnicas, clássicas ou modernas, algumas delas descritas a seguir.

3.5.1 Métodos espectrofotométricos

A espectrofotometria de absorção na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas na análise de princípios ativos, devido a sua simplicidade, robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (MARQUES et al., 2012). Têm sido desenvolvidos diversos métodos espectrofotométricos para quantificação, principalmente, de compostos fenólicos, baseados em diferentes princípios, e são usados para quantificar fenólicos totais, determinar um composto fenólico específico ou uma classe de fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007).

De acordo com Rocha e Teixeira, (2004) a espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. As medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda obedecem a seguinte equação: $A = \log_1 I_0 = \varepsilon \times b \times c$, onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ε) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra.

3.5.1.1 Quantificação de fenóis totais

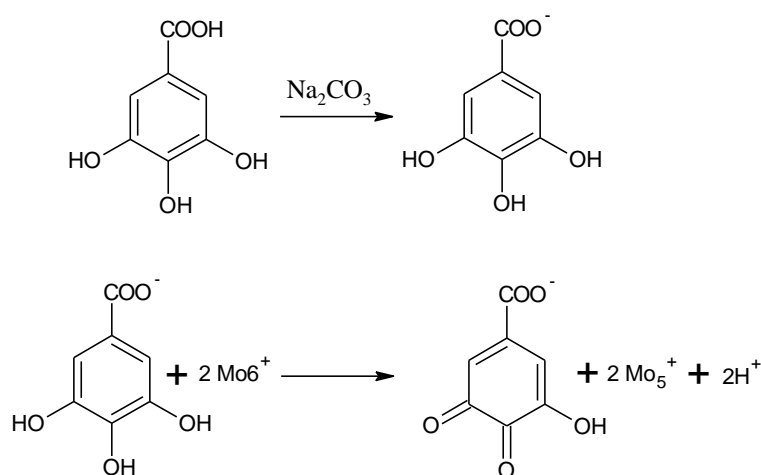
A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizado pelo método que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, o mais extensivamente empregado dentre a variedade de métodos já desenvolvidos (SOUSA et al., 2007). Este método se baseia nas reações de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos, sendo mais sensível à redução pelos fenóis, além de diminuir a tendência à precipitação que pode dificultar a leitura (SILVA et al., 2010; ANGELO; JORGE, 2007).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, em que o molibdênio e tungstênio estão no estado

6+, apresentando cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O reagente na presença de certos agentes redutores, tais como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, em que o estado de oxidação significativo dos metais se situam entre 5 e 6, e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (OLIVEIRA et al., 2009).

As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual, o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (Figura 9, p. 56). O número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada (ANGELO; JORGE, 2007; OLIVEIRA et al., 2009). É necessária a utilização de curva padrão, sendo o padrão mais utilizado o ácido gálico. Por este motivo os resultados são, em geral, expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por peso seco da amostra (SILVA et al., 2010).

Figura 9. Desprotonação do ácido gálico, gerando ânions fenolato.



Fonte: Oliveira et al. (2009).

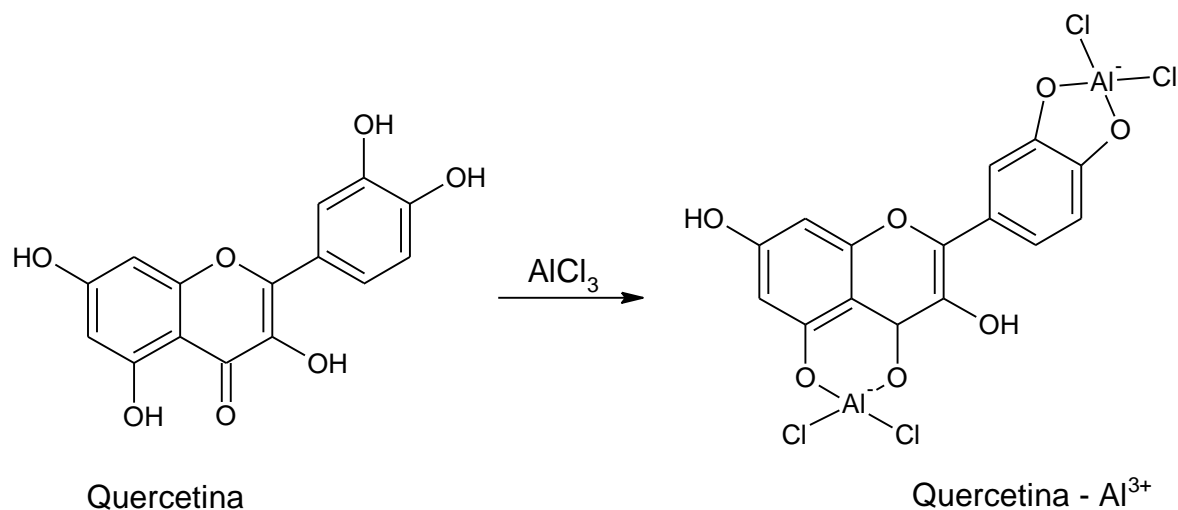
Este método espectrofotométrico não é um método específico, pois reage também com uma variedade de outros compostos, podendo haver ainda interferência resultante de outros componentes químicos presentes no extrato, tal como açúcares ou a redução com o ácido ascórbico (ANGELO; JORGE, 2007).

3.5.1.2 Quantificação de flavonoides totais

A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é também empregada para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais, através do método colorimétrico de complexação com cloreto de alumínio (AlCl_3) (MARQUES et al., 2012).

O método proporciona a obtenção de espectros dos flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos, pois o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides, ocasionando extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (BURIOL et al., 2009; MARQUES et al., 2012). O complexo estável flavonóide- Al^{3+} , tem coloração amarela, e sua intensidade é proporcional à concentração de flavonóide presente na amostra (Figura 10, p. 57) (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

Figura 10. Complexação do flavonóide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl_3).



Fonte: Adaptado de Peixoto Sobrinho et al. (2012).

No entanto, o método produz valores inferiores aos reais, uma vez que as várias classes de flavonoides apresentam variações de absorção na região do comprimento de onda escolhido para análise (BURIOL et al., 2009).

Embora extremamente utilizada, a pouca seletividade tem sido um dos maiores desafios dessa técnica para análise de matrizes complexas como os extratos vegetais,

pois a espectrofotometria direta pode ocasionar sobreposição das bandas, impedindo a absorção do componente de interesse (MARQUES et al., 2012).

3.5.2 Isolamento, purificação e identificação de produtos naturais

Entre os métodos modernos de análise de extratos de produtos naturais, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua versatilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise. No entanto, quando se encontra um solvente adequado para a substância cristalizar, a técnica de recristalização torna-se um dos melhores métodos de purificação (CHOZE, 2013).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (RIBEIRO; NUNES, 2008). De forma geral, a técnica cromatográfica envolve quatro etapas básicas: montagem da coluna ou placa, ou seja, dispor adequadamente a fase estacionária ou suporte e preparação da fase móvel; aplicação da amostra; desenvolvimento, isto é, passagem do solvente escolhido (fase móvel) através da fase estacionária; revelação e visualização, ou seja, localização das diferentes zonas de separação das substâncias e extração dos compostos retidos na fase estacionária (SIMÕES et al., 2010).

De acordo com o modo de separação, pode ser dividida em cromatografia de partição (líquido-líquido), de adsorção (líquido-sólido), troca iônica e exclusão ou filtração molecular (SIMOES et al., 2010).

A cromatografia por adsorção é baseada na adsorção dos compostos de uma solução sobre a fase estacionária sólida constituída por partículas finas de adsorventes polares ou apolares, no qual sendo a amostra analisada mais fortemente atraída pelo adsorvente, será deslocada pela fase móvel de forma mais lenta. Neste caso, a fase estacionária pode ser empacotada em coluna aberta ou fechada, ou estar aplicada em uma superfície plana, como em cromatografia em camada delgada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Na cromatografia de exclusão a fase estacionária é formada por um gel poroso pelo qual as moléculas do soluto atravessam, promovendo uma filtração de acordo com seus tamanhos. As moléculas maiores que não conseguem penetrar nos poros são arrastadas pela fase móvel, as menores ficam presas nos poros e são retidas por mais tempo na coluna. Neste tipo de cromatografia, utilizam-se géis constituídos de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis, como os géis de dextrana, conhecido por Sephadex, vendido com vários graus de ligações cruzadas e propriedades de intumescimento (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (RIBEIRO; NUNES, 2008).

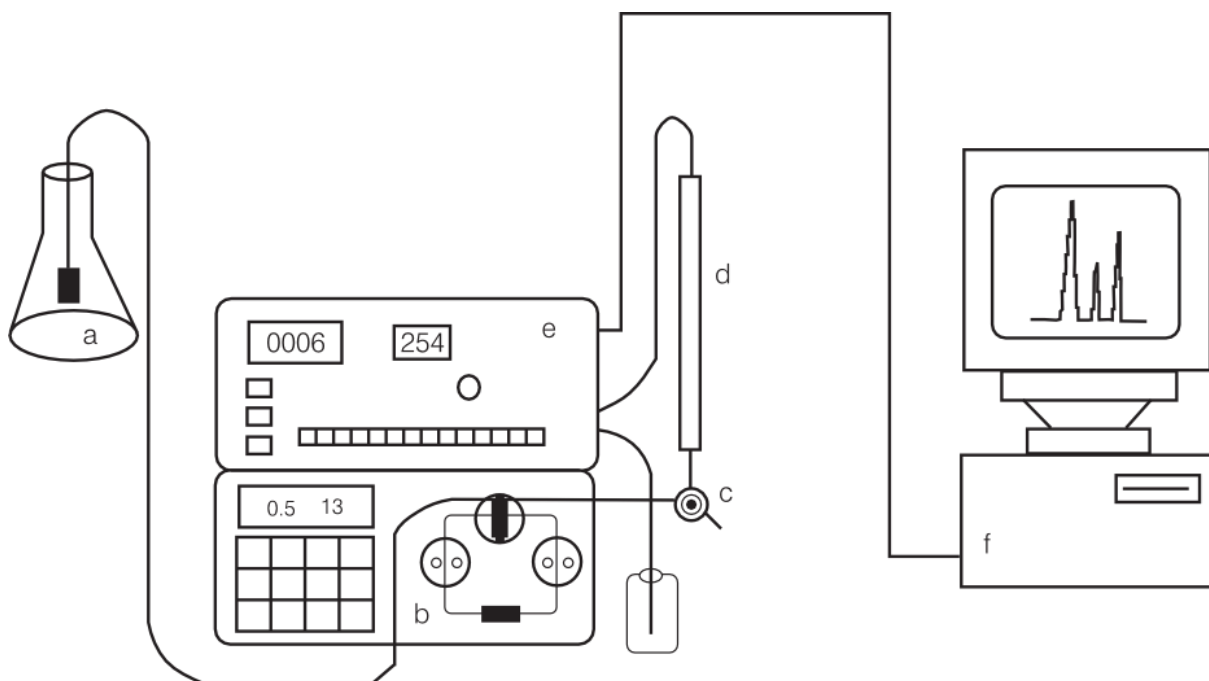
Os compostos isolados por cromatografia podem ser identificados por técnicas espectroscópicas de análise, empregadas atualmente na determinação estrutural, sendo as mais utilizadas a espectrometria de massas, a espectrometria de ultravioleta, no visível e no infravermelho, bem como a ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono 13 (^{13}C) (CHOZE, 2013).

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção de espectros de ressonância, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos de massa ímpar ^1H , ^{13}C , ^{31}P , por exemplo, possam entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C são os mais utilizados e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (CHOZE, 2013).

3.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), uma técnica versátil que possui um grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência, permitindo ser empregada em várias áreas da ciência, como no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações. Nesta técnica, a utilização de suportes com partículas diminutas são responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade (Figura 11, p. 60) (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Figura 11. Equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador.



Fonte: DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998.

Esta técnica emprega colunas, geralmente de aço inoxidável e relativamente pequenas (cerca de 2-5 mm de diâmetro interno e comprimento de 3 a 25 cm), operando em temperaturas que chegam até cerca de 75°C e pressões de até 400 atm. Um detector colocado na saída da coluna permite o registro contínuo da composição do efluente, resultando em um cromatograma. O detector por arranjo de diodos (DAD)

é um tipo de detector de comprimento de onda variável que opera na região do ultravioleta, e torna possíveis análises em diferentes comprimentos de onda simultaneamente, pois possibilitam uma “varredura” na região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, disponibilizando-os mesmo após a análise ter sido realizada (VILA, 2006).

As fases estacionárias, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecilsilano) a mais usada (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

O modo de eluição dos analitos neste método pode ser realizado de dois modos: isocrático, quando a proporção de fase aquosa e de fase orgânica é mantida constante durante toda a análise, e gradiente, nos casos em que a amostra é bastante complexa (muitas substâncias), como nos extratos vegetais, alterando a proporção de fase aquosa e orgânica durante a análise da amostra, e resultando numa melhor separação (VILA, 2006).

Os extratos vegetais tem sido analisados de maneira rotineira por CLAE para a obtenção de perfis cromatográficos (ou *fingerprint*, como também é conhecida) como uma estratégia para a identificação e avaliação da qualidade das plantas utilizadas na medicina, principalmente por fornecer informações importantes quanto ao tipo de constituintes presentes. Os perfis cromatográficos obtidos são normalmente cromatogramas complexos (ou eletroferogramas), e sua aplicação se baseia na comparação de perfis, tendo, por isso, uma demanda rigorosa da resolução e capacidade máxima dos picos no desenvolvimento do processo de separação. No entanto, é realmente difícil separar todos os componentes ativos de plantas medicinais em uma única corrida cromatográfica. Assim, a impressão digital desenvolvida deve apresentar boa seletividade, reprodutibilidade e viabilidade (JI et al., 2005).

A impressão digital de uma planta reflete a complexidade da sua composição química e seu desempenho dependente do grau de eficiência cromatográfica e distribuição dos componentes químicos presentes. Assim, a otimização do método é uma importante etapa para a escolha e avaliação da influência dos parâmetros cromatográficos ideais para a determinação da impressão digital. Esses ensaios podem ser conduzidos empregando-se planejamentos estatísticos com o objetivo de

minimizar perdas e maximizar as respostas de interesse por meio de um menor número de experimentos (PEREIRA et al; 2015b).

3.6 Atividades biológicas de produtos naturais

Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Diversas atividades biológicas já foram descritas para as diferentes classes de produtos naturais, empregando ensaios biológicos capazes de avaliar a atividade desejada, dentre elas se destacam as atividades antioxidante, antibacteriana e fotoprotetora. Tais metodologias apresentam fácil reprodutibilidade e simplicidade do experimento.

3.6.1 Atividade antioxidante

Recentemente, há um aumento no interesse em antioxidantes naturalmente encontrados em vegetais pois estudos demonstram seu poder em atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (DELMONDES et al., 2013).

A transferência de elétrons é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células. O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar dano oxidativo. Radicais livres são todas as espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica conferindo um alto poder de reatividade, podendo causar danos ao organismo por reagir com praticamente qualquer molécula que entra em contato (ALVES et al., 2010 DELMONDES et al., 2013).

A produção de radicais livres ocorre naturalmente como um processo fisiológico. Para combater os radicais livres os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante. Além destes, substâncias com habilidade de

sequestrar radicais livres podem ser obtidas de fontes externas, como alimentos e bebidas. Quando os antioxidantes produzidos pelo corpo são insuficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo, pode ocorrer elevação na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, durante o qual algumas destas espécies reativas podem produzir danos ao organismo em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, irão alterar a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (ALVES et al., 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Outras espécies reativas formadas durante os processos metabólicos são o oxigênio singlete (1O_2), radical alquila (R^{\bullet}), radical alcóxila (RO^{\bullet}), hidroperóxido (ROO), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO$). As EROs podem surgir também de outras fontes, como NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase, auto-oxidação de catecolaminas, aumento dos níveis de angiotensina II e aldosterona, e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Raios-X, ultra-som e luz ultravioleta são fatores físicos que também promovem a formação dessas moléculas reativas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Antioxidante pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas naturais, que, presentes em baixas concentrações podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo. Plantas aromáticas e medicinais são fontes naturais de antioxidantes por produzirem metabólitos secundários (OLIVEIRA et al., 2009). Os antioxidantes são classificados de acordo com o modo de ação, em primários e secundários, podendo ser sequestrantes de radicais livres, de oxigênio e de íons metálicos capazes de catalisar a oxidação lipídica. Os antioxidantes primários reagem com radicais lipídicos de alta energia, para convertê-los a produtos mais estáveis. Já os secundários, conhecidos como preventivos, têm a função de retardar a iniciação da reação em cadeia por quebra dos hidroperóxidos. Esses últimos atuam como um suporte aos antioxidantes endógenos e são obtidos por meio da dieta (DUARTE et al., 2009).

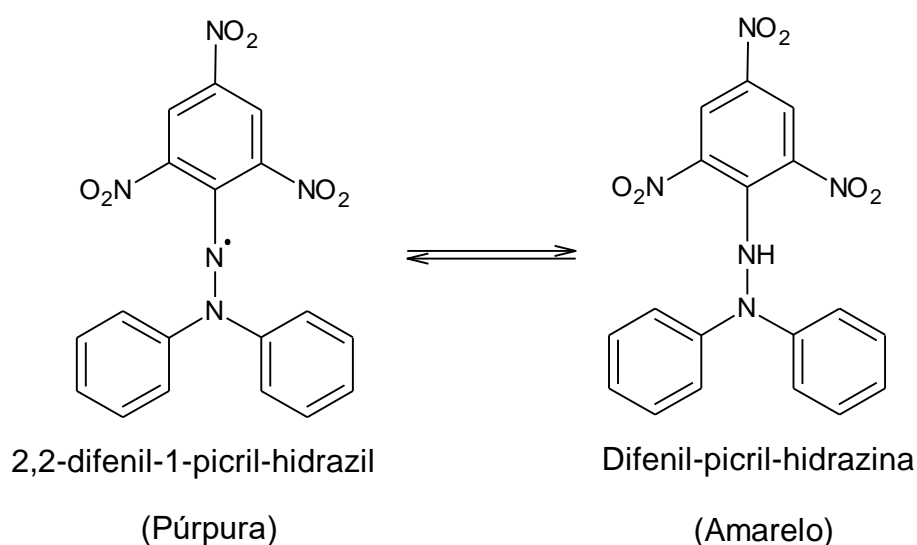
A avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais tem sido realizada pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres *in vitro*

(ALVES et al., 2010). Nesse contexto, estão os métodos colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, entre outros métodos instrumentais. Entre os métodos colorimétricos destacam-se aqueles que relacionam a habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) ou β -caroteno/ácido linoleico (BORGES et al., 2011).

3.6.1.1 Ensaio do Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), um radical livre estável de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 516 nm, e reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogênio. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\cdot$), o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 12, p. 65), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância. (OLIVEIRA et al., 2009)

Figura 12. Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.



Fonte: Nunes et al. (2012).

O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece

lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. O grau de alteração da cor é proporcional à concentração e potência dos antioxidantes. Uma grande diminuição na absorvância da mistura da reação indica uma atividade significativa de eliminação de radicais livres do composto em teste (ALVES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2009).

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis e produtivos para avaliação da atividade antioxidante em sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras como flavonoides e terpenoides (ALVES et al., 2010).

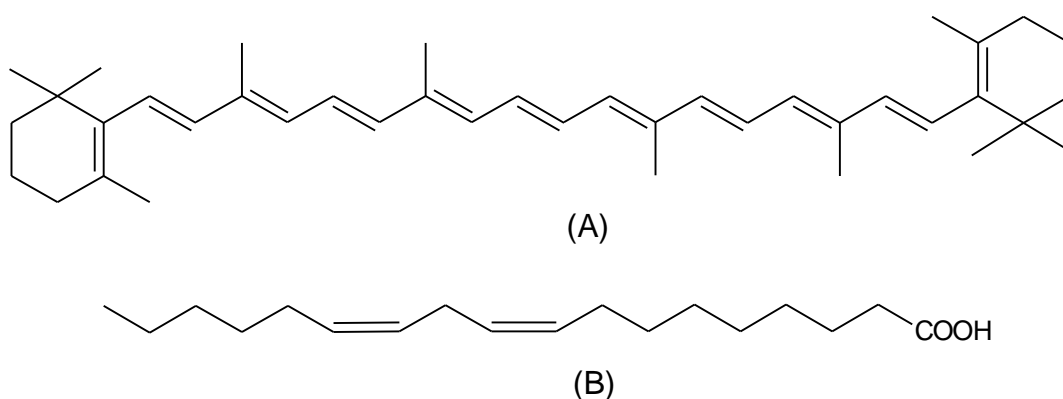
3.6.1.2 Ensaio da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

Outro método utilizado na avaliação da atividade antioxidante é o sistema de auto oxidação do β -caroteno/ácido linoleico (Figura 13, p. 66), que permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (ALVES et al., 2010).

O β -caroteno, mais abundante dos carotenoides, é quase completamente insolúvel em água, mas facilmente solúvel em ambientes hidrofóbicos e solventes pouco polares. Tem sido reportado nos últimos 30 anos que o β -caroteno exibe alta reatividade com eletrófilos e oxidantes, e ele inibe a auto oxidação de lipídios em tecidos biológicos e produtos alimentícios. O sistema de auto oxidação do β -caroteno/ácido linoleico está entre as diversas técnicas utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, pois permite uma rápida seleção de substâncias e/ou

misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas (ALVES et al., 2010).

Figura 13. Estrutura do β -caroteno (A) e do ácido linoleico (B).



Fonte: Alves et al. (2010).

O método de branqueamento do β -caroteno é baseado na perda do cor amarela do β -caroteno, devido à sua reação com os radicais formados pela oxidação de ácido linoleico numa emulsão. A taxa do branqueamento β -caroteno pode ser retardado na presença de antioxidantes (NUNES et al., 2012).

A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno a 470 nm, com leitura imediata e em intervalos de 15 min, por um tempo total de duas horas. Tween-40 é utilizado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura β -caroteno/ácido linoleico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. O resultado pode ser comparado com padrões sintéticos, como butil-hidroxi anisol (BHA), butil-hidroxi tolueno (BHT) e Trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina (ALVES et al., 2010).

Este método é apropriado para amostras de plantas como também de frutas e bebidas. O método da auto oxidação empregando o sistema β -caroteno/ácido linoleico é um teste simples e sensível, e por não utilizar altas temperaturas permite a determinação da atividade antioxidante de substâncias termossensíveis, porém apresenta alguns inconvenientes. A utilização do meio emulsionado, por exemplo, interfere nos valores de absorvância causando baixa reprodutibilidade, e a interação do β -caroteno com o oxigênio proveniente do meio dificulta a interpretação dos resultados. (ALVES et al., 2010; NUNES et al., 2012).

3.6.2 Atividade antibacteriana

A busca de propriedades antibacterianas em extratos de plantas e de substâncias mais específicas tem sido incentivada e intensificada, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornado ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado. Os extratos orgânicos são importantes fontes de compostos com atividade antimicrobiana (ARAÚJO, 2011).

Segundo o Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2003), os testes de sensibilidade a antimicrobianos, são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso e exija uma terapia antimicrobiana, quando for possível prever a sensibilidade deste organismo, podem ser utilizados para verificar a sensibilidade *in vitro* dos microrganismos frente aos agentes antimicrobianos.

Um grande número de bioensaios são utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas. Dentre os testes disponíveis encontram-se o método de difusão em ágar e de diluição em caldo (ARAÚJO, 2011).

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. É conhecido como técnica qualitativa uma vez que apenas demonstra a presença ou ausência de substâncias com atividade antibacteriana (ARAÚJO, 2011; OSTROSKY et al., 2008).

Atualmente, o método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Os procedimentos para determinar a atividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008).

Os agentes antibacterianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ALVES et al., 2008).

Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição. Para determinar a CIM ou a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição. A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL, que se apresenta como um método barato, reproduzível, considerado mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente (ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008).

3.6.3 Atividade fotoprotetora

A exposição à radiação solar excessiva constitui um fator de risco para o surgimento de inúmeras doenças de pele, destacando-se o câncer de pele e o fotoenvelhecimento, os quais são mais prevalentes em indivíduos de pele clara e nas regiões mais próximas do Equador. O Brasil é o país de maior área intertropical e um dos mais ensolarados do planeta. Estes fatores somados à redução da camada de ozônio são um dos responsáveis pelo aumento de casos de câncer de pele no país (CHANG et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2009).

Da energia emitida pelo sol, apenas 7% atinge a superfície da Terra, sendo essenciais para que haja vida em nosso planeta, enquanto que os 93% restantes são retidos pela atmosfera. O espectro solar, por sua vez, em um dia de verão sem nuvens às 12 h é composto por diferentes radiações, sendo, aproximadamente 50% de infravermelho (IV), 5% de ultravioleta (UV) e 45% de luz visível (vis). O corpo humano detecta estas radiações de diferentes formas. Os efeitos da radiação IV são percebidos pelo calor durante o aumento da temperatura, a região do VIS é detectada pelas diferentes cores através do sistema ótico e os raios UV, mais energéticos, promovem reações fotoquímicas na pele humana, possuindo maior impacto sobre a saúde humana (GUARATINI et al., 2009; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

As radiações ultravioleta (UV), extremamente energéticas, são divididas em três tipos. As radiações ultravioleta A (UVA), longas e menos energética, estende-se de 320 a 400 nm e ocorre durante todo o dia, provocando danos mais leves e crônicos, não produzindo eritema, sendo a responsável pelo bronzeamento imediato e de curta duração. Radiações ultravioleta B (UVB), medianas, de 290 a 320 nm, é predominante entre 10 e 14 horas e causa danos agudos, como queimaduras, sendo eritematógena, promovendo o bronzeamento tardio e de longa duração, sendo também responsável pela transformação do ergosterol em vitamina D. Tem-se ainda as radiações ultravioleta C (UVC), curtas e mais energética, que se estende de 200 a 290 nm, é absorvida pela atmosfera, via camada de ozônio. As radiações UVB e UVA, apesar de representarem uma baixa porcentagem da luz solar que atinge a superfície da Terra, são importantes do ponto de vista biológico, pois podem causar o desencadeamento de estresse oxidativo às células (GUARATINI et al., 2009; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014; SOUZA et al; 2005).

Devido ao aumento na incidência do câncer de pele e outras afecções dermatológicas causadas pela radiação ultravioleta (UV) é necessário proteger a pele dos efeitos nocivos. A limitação da exposição solar nos períodos críticos de irradiação, o uso de fotoprotetores e bloqueadores solares e o diagnóstico precoce são mecanismos eficazes de prevenção (CHANG et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2009).

Filtros solares são substâncias capazes de absorver, refletir ou refratar a radiação ultravioleta e assim proteger a pele da exposição direta da luz solar. A atividade biológica de um protetor solar é avaliada por sua habilidade em proteger a pele de eritemas e edemas, reduzir o risco de queimaduras e o risco de carcinoma de células da camada basal e espinhosa. Diferentes extratos de plantas têm sido utilizados em produtos cosméticos como filtros solares, devido à ação fotoprotetora, principalmente, por conter compostos fenólicos, que são capazes de absorver a luz ultravioleta (SOUZA, et al., 2005; VIOLANTE et al., 2009).

A eficácia de uma formulação contendo filtro solar é determinada através do grau de proteção contra eritema ou queimadura solar. A ação fotoprotetora de um filtro solar é medida universalmente através do fator de proteção solar (FPS) (NASCIMENTO et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2014).

FPS é calculado pela razão entre a energia UVB suficiente para a ocorrência da dose mínima eritematosa (DME) na pele fotoprottegida e a pele sem filtro solar. A

DME é a dose de energia capaz de iniciar a produção de eritemas nítidos observados entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação UVB. Os valores de FPS comuns, comerciais, vão de 6 a 50, podendo chegar a 100 para casos específicos, sendo que a forma mais precisa para a avaliação destes valores é em seres humanos. Porém, o ensaio de FPS em humanos deve ser o último estágio em uma bateria de testes de fotoproteção, pois depende da seleção de voluntários, possui alto custo, além de depender também do acompanhamento de técnicos especializados e de médicos (NASCIMENTO et al., 2014).

Primeiramente então, realiza-se métodos de FPS *in vitro* e, dentre os métodos mais utilizados, está o método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur e colaboradores (1986), que se destaca pela boa correlação ao teste *in vivo*, além da agilidade e acessibilidade (NASCIMENTO et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2014).



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Crescentia cujete* foram coletadas na Fazenda Ouro Verde, no município de Casa Nova – BA em maio de 2013. O material botânico foi identificado e confirmado pelo Professor Dr. José Alves de Siqueira Filho, sendo comparado com uma exsicata que está depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sob número de tomo 22603 (Figura 14, p. 72).

Figura 14. Exsicata de *C. cujete* depositada no HVASF.



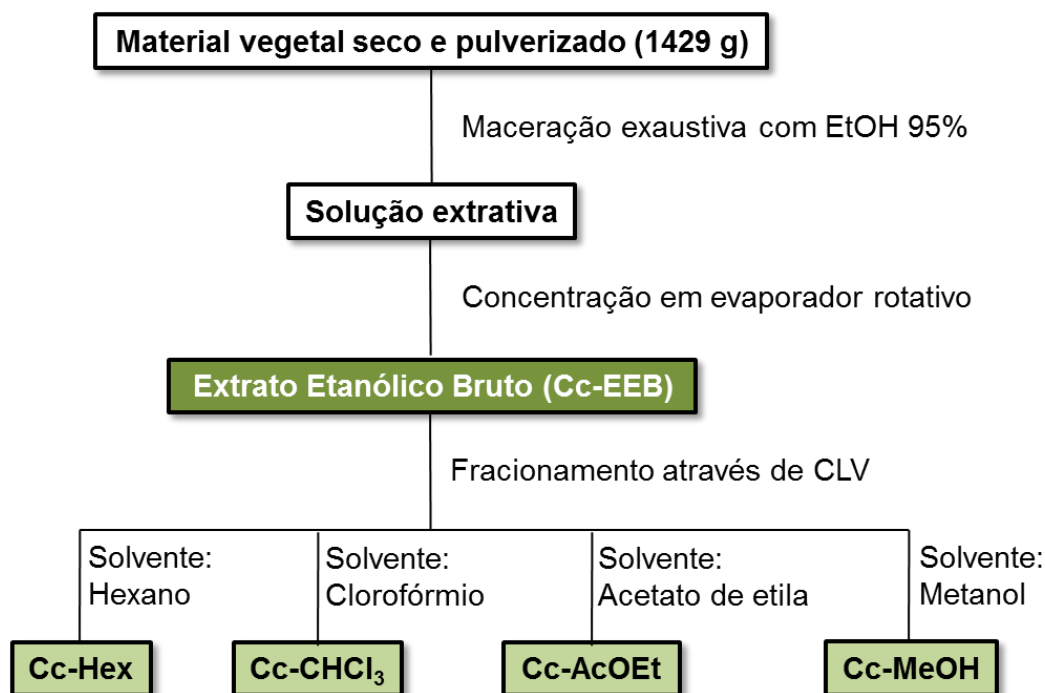
Fonte: A autora.

4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto de *C. cujete*

O material vegetal coletado foi submetido a processo de secagem em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C durante 72 horas. Após completa eliminação da umidade, as folhas foram pulverizadas em moinho mecânico, obtendo 1429 g de material seco e pulverizado. Este material foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um percolador de aço inoxidável, segundo metodologia descrita por Macedo et al. (2015). Foram realizadas três extrações num intervalo de 72 horas entre elas, para garantir a máxima extração dos constituintes químicos. Ao final desse processo, obteve-se uma solução etanólica, que foi então filtrada e o solvente evaporado com auxílio de um evaporador rotativo à pressão reduzida, a temperatura média de 50 °C, fornecendo o extrato etanólico bruto (Cc-EEB) das folhas de *C. cujete*.

4.3 Fracionamento do extrato etanólico bruto de *C. cujete*

Uma alíquota de Cc-EEB foi separada para realização dos testes químicos e biológicos. Todo o restante foi submetido à cromatografia líquida à pressão reduzida (CLV), utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária e como fase móvel os solventes de polaridade crescente hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, de forma exaustiva, de acordo com metodologia descrita por Macedo et al. (2015). As soluções obtidas foram tratadas com Na₂SO₄ anidro e submetidas a filtração sob pressão reduzida. Após esse processo, os solventes foram evaporados em rotaevaporador à pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C, fornecendo quatro frações de acordo com o Fluxograma 1 (p. 74).

Fluxograma 1. Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de *C. cujete*.

Fonte: Elaborado pela autora

4.4 Triagem fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica preliminar foi utilizada para caracterizar de forma qualitativa, a presença das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos e frações obtidas de *C. cujete*, conforme metodologia preconizada por Wagner e Bladt (1996). O método consiste em um exame rápido e superficial através de perfis cromatográficos em camada delgada analítica (CCDA), baseado em reações químicas com reagentes de coloração que exibem características universais para cada classe de metabólitos secundários investigados.

Dessa forma, com o auxílio de tubos capilares, o Cc-EEB e as frações obtidas (Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH) foram aplicados em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ e eluídas com diferentes sistemas de solventes. Após a eluição, as placas foram reveladas com reagentes específicos para cada classe investigada e/ou analisadas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Na Tabela 1 (p. 75) estão descritos os sistemas de solventes utilizados e seus respectivos reveladores de acordo com a classe de metabólito investigado.

Tabela 1. Sistemas de eluição e reveladores utilizados na triagem fitoquímica de *C. cujete* para as classes específicas de metabólitos secundários.

Classe Química	Sistema de Eluição	Reagente Revelador
Alcalóides	Tolueno:acetato de etila:dietilamina (70:20:10, v/v)	Dragendorff
Compostos fenólicos	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26, v/v)	NEU
Cumarinas	Tolueno:éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%, v/v)	KOH etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10, v/v)	KOH etanólico 10%
Lignanas	Cloroformio:metanol:água (70:30:4, v/v)	Vanilina sulfúrica
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno:acetato de etila (93:7, v/v)	Vanilina sulfúrica
Naftoquinanas	Tolueno:ácido fórmico (99:1, v/v)	KOH etanólico 10%
Saponinas	Clorofórmio:ácido acético:metanol:água (100:11:11:26, v/v)	Anisaldeído- sulfúrico
Triterpenos e esteróides	Tolueno:clorofórmio:etanol (40:40:10, v/v)	Liebermann- Burchard

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt (1996).

4.5 Métodos para quantificação de fenóis e flavonoides totais

O perfil químico do teor de fenóis e flavonoides presentes no Cc-EEB e nas frações obtidas foi traçado através de métodos espectrofotométricos, ou colorimétricos, analisando o comprimento de onda absorvido pelas amostras, assim como descrito a seguir.

4.5.1 Quantificação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais do Cc-EEB e frações obtidas de *C. cujete* foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão (ALMEIDA et al., 2011).

Seguindo-se essa metodologia, foi adicionado a cubetas de vidro 3,16 mL de água destilada e 200 µL do reagente Folin–Ciocalteu (Sigma Aldrich). Em seguida, foram adicionados 40 µL de cada solução do Cc-EEB e das frações (Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH) nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 mg/L, em etanol. Após serem misturadas e ficarem em repouso por 6 minutos, foram acrescentados 600 µL de solução saturada aquosa estoque de carbonato de sódio a 20%, homogeneizado e deixado em repouso por mais 2 horas a temperatura de 20°C. Ao final deste processo, foi determinada a absorvância de cada solução em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 765 nm contra o branco e comparada a absorvância *versus* concentração. O branco foi preparado sob as mesmas condições das demais amostras, substituindo-as por água destilada.

A curva de calibração foi construída utilizando soluções de ácido gálico nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 mg/L, em etanol, e submetidas as mesmas condições dos extratos e frações descritos anteriormente.

O teor de compostos fenólicos da amostra foi quantificado a partir da comparação das absorvâncias obtidas, com a equação de reta gerada pela curva de calibração do padrão ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em miligrama de equivalente ácido gálico por grama de extrato ou fração (mg EAG/g).

4.5.2 Quantificação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado através do método colorimétrico descrito por Zhishen e colaboradores (1999), utilizando a (+)-Catequina como padrão.

Inicialmente, preparou-se soluções do padrão e das amostras Cc-EEB, Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 mg/L em metanol. Em cubetas de vidro, 300 µL da solução dos extratos, frações e do

padrão foram misturadas com 1,5 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 90 µL de uma solução de NaNO₂ 5%. Após 6 minutos de reação, 180 µL de uma solução de AlCl₃.H₂O 10% foram adicionados à mistura e deixou-se reagir por mais 5 minutos. Em seguida adicionou-se 600 µL de uma solução de NaOH 1M. Por fim, completou-se o volume com 330 µL de água destilada e homogeneizou-se o sistema.

A absorbância foi medida imediatamente contra o branco em 510 nm, em espectrofotômetro UV-VIS. No branco as amostras foram substituídas por 300 µL de água destilada.

Para a construção da curva de calibração foram usadas soluções do padrão catequina nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 mg/L em metanol e água, e submetidas as mesmas condições do extrato e frações descritos anteriormente. O conteúdo total de flavonoides foi calculado através da equação obtida por regressão linear. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina por grama de extrato ou fração (mg EqC/g). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6 Avaliação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante foi realizado através de dois métodos quantitativos que avaliam diferentemente as substâncias presentes no Cc-EEB e nas frações obtidas de *C. cujete*.

4.6.1 Método sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O primeiro método realizado foi o sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), um método colorimétrico *in vitro*, utilizado com o intuito de avaliar a capacidade dos extratos e frações em sequestrar o radical livre estável DPPH, de acordo com o método de Almeida et al. (2011).

Amostras de soluções estoque (1 mg/mL) do Cc-EEB e das frações obtidas de *C. cujete* foram diluídos até às concentrações finais de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 µg/mL em

etanol. Após a preparação de uma solução de etanol DPPH 50 µg/mL, 1 mL foi adicionado a 2,5 mL das amostras nas diferentes concentrações citadas, em cubetas de vidro, e deixou-se reagir à temperatura ambiente. Após 30 min, os valores de absorvância foram medidos a 518 nm em espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis (SHIMADZU UV 1601) e convertidos em porcentagem da atividade antioxidante (% AA), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% AA = 100 \times \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right)$$

Onde:

$A_{controle}$ = absorvância do controle negativo (DPPH + etanol);

$A_{amostra}$ = absorvância da amostra.

Como branco foram preparadas soluções dos extratos (2,5 mL) e etanol (1,0 mL). Como controle negativo utilizou-se uma solução de DPPH (1,0 mL) com etanol (2,5 mL). Ácido L-(+)-ascórbico, butilhidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) foram utilizados como controle positivo e preparados sob as mesmas condições das amostras. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

Os valores da concentração efetiva (CE_{50}), ou seja, a concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado de 100% (MENSOR et al., 2001) foram obtidos por regressão linear através do programa GraphPad Prism® 5.0.

4.6.2 Método da co-oxidação do β -caroteno

O segundo método utilizado foi baseado na inibição da auto oxidação do β -caroteno, a qual é provocada pela adição de ácido linoleico e aeração do meio, levando à formação do agente oxidante radicalar, de acordo com metodologia de Santana et al. (2012). Este método é baseado na perda de cor amarela do β -caroteno, devido à sua reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico por uma emulsão. A taxa de branqueamento do β -caroteno pode ser desacelerada, na presença de antioxidantes.

Desta forma, 2 mg de β -caroteno cristalino foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio; foram adicionados a 2 mL desta solução, 40 mg de ácido linoleico e 400

mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado a pressão reduzida, em 40 °C e adicionado 100 mL de água destilada. Essa emulsão foi agitada vigorosamente durante dois minutos para provocar aeração do meio.

Os padrões (ácido L-(+)-ascórbico, BHA e BHT), o Cc-EEB e as frações obtidas de *C. cujete* foram preparados em etanol na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, 0,12 mL das soluções dos padrões e amostras foram adicionados a uma cubeta contendo 3,0 mL do meio oxidante. A absorbância foi medida imediatamente a 470 nm num espectrofotômetro UV-VIS (QUIMIS). Após a leitura, as cubetas contendo as amostras foram incubadas em banho de água a 50 °C durante 120 min, quando a absorbância foi medida novamente no mesmo comprimento de onda.

Como controle positivo foram utilizados o ácido L-(+)-ascórbico, BHA e BHT. No controle negativo, os extratos foram substituídos com um volume igual de etanol. A atividade antioxidante (% AA) foi avaliada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% AA = 100 \times \left(1 - \frac{A_0 - A_t}{A_0^0 - A_t^0} \right)$$

Onde:

A_0 = absorbância inicial das amostras e padrões;

A_t = absorbância final das amostras e padrões;

A_0^0 = absorbância inicial do branco;

A_t^0 = absorbância final do branco.

Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante (% AA) e os dados tratados através do programa GraphPad Prism® 5.0. Os testes foram realizados em triplicatas.

4.7 Avaliação da atividade fotoprotetora

A atividade fotoprotetora foi avaliada através da análise da faixa máxima de absorção dos comprimentos de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) e posterior cálculo do fator de proteção solar, para o Cc-EEB e as frações obtidas de *C. cujete*, conforme descrito por Oliveira Júnior et al. (2013).

As amostras foram previamente secas em estufa a 40 °C, logo após, diluídas em etanol absoluto, obtendo-se concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L, e adicionadas a cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Em seguida, foi realizada uma varredura em espectrofotômetro UV-VIS (QUIMS) entre os comprimentos de 260 a 400 nm, com intervalos de 5 nm, para verificar a máxima absorção na região ultravioleta (UVA, UVB e UVC). Para o branco foi utilizado apenas etanol. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Posteriormente foi calculado o Fator de Proteção Solar (FPS) das amostras de acordo com a equação desenvolvido por Mansur et al. (1986):

$$\text{FPS}_{\text{espectrométrico}} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE} (\lambda) \times \text{I} (\lambda) \times \text{Abs} (\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção igual a 10;

EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (nm);

I (λ) = intensidade da radiação solar no comprimento de onda (λ) nm;

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda (nm).

Os valores de EE (λ) \times I (λ) são constantes e foram determinados por Sayre e colaboradores (1979) e estão representados na Tabela 2 (p. 80).

Tabela 2. Valores de EE (λ) \times I (λ) previamente determinados para o cálculo do FPS.

Comprimento de onda (nm)	EE \times I (constantes)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
Total	1.0000

Fonte: Sayre e colaboradores (1979).

4.8 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, baseado no Documento M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012) no Laboratório de Microbiologia do Campus Ciências Agrárias da UNIVASF.

Os testes antibacterianos foram realizados contra cepas de padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz – RJ). São elas: *Staphylococcus aureus* 25923; *Staphylococcus aureus* 6538; MRSA; *Staphylococcus epidermidis* 1228; *Escherichia coli* 32213; *Enterococcus faecalis* 19433; *Salmonella enterica* 0507028; *Klebsiela pneumoniae* 13883.

Primariamente foi preparado o inóculo, no qual as colônias isoladas da placa em Tryptic soy agar (TSA) foram transferidas, com o auxílio de uma alça, para um tubo com solução salina 0,085%, obtendo uma turvação semelhante a 0,5 da escala de Mac Farland. Dessa suspensão, 100µl foram transferidos para um tubo de ensaio com 9,9 mL de caldo Müller-Hinton (MH caldo).

Uma solução de 25 mg/mL de cada amostra do Cc-EEB e das frações obtidas de *C. cujete* foi preparada utilizando uma solução aquosa de etanol a 95% (v/v). Logo após, foram distribuídos 200µL de caldo Müller-Hinton em placas de elisa, seguido da adição de 200µL da solução estoque das amostras ao primeiro poço e, após homogeneização, foi transferido para o segundo poço e assim sucessivamente, obtendo as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6µg/mL. Depois de realizadas as diluições em todos os poços foram adicionados 10 µL da suspensão de bactérias padronizadas como descrito anteriormente. O material foi incubado a 37°C por 24h, em condições de aerobiose. Poços das microplacas foram reservados para adicionar os controles. Utilizou-se como controle positivo solução de caldo Müller-Hinton e a bactéria testada, como controle negativo o caldo Müller-Hinton e como controle do diluente foi utilizado etanol e a bactéria.

Com auxílio de um replicador foi retirada uma alíquota de 10µL do material inoculado e semeado em placas de petri previamente preparadas com Ágar Müller-Hinton, seguindo-se de incubação a 35°C por 24 h, pelo qual foi determinado a concentração bactericida mínima (CBM), ou seja, a menor concentração do extrato

capaz de matar 99,9% ou mais do inoculo bacteriano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9 Isolamento e purificação de substâncias de *C. cujete*

O isolamento das substâncias das frações obtidas de *C. cujete* foi realizado através de cromatografia de adsorção em coluna (CC), utilizando colunas de vidro de tamanhos variados na posição vertical, onde foi adicionado a fase estacionária, a fase móvel e a amostra, empregando como adsorvente sílica gel 60 e como fase móvel solventes orgânicos isolados ou em misturas binárias de acordo com gradiente crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila ou metanol). Também foi realizada CC por exclusão molecular, na qual foi utilizada sephadex LH-20 como fase estacionária e como fase móvel apenas metanol.

As frações obtidas com a CC foram analisadas quanto ao grau de pureza por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60, F₂₅₄, eluídas com os mesmos solventes orgânicos da CC, isolados ou em misturas binárias de acordo com a polaridade. Após a análise, as amostras que apresentavam mesmo perfil cromatográfico foram reunidas.

Para auxiliar na purificação das substâncias isoladas por CC, foi realizada a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando placas de vidro de 20x20 cm, tendo como fase estacionária sílica gel 60, F₂₅₄, aplicada manualmente.

As placas foram reveladas por método físico (não-destrutivo) através de câmara de radiação eletromagnética de comprimento de onda na região de ultravioleta (UV) – 254 nm e 366 nm. Em alguns casos, foi utilizada revelação química com vanilina sulfúrica.

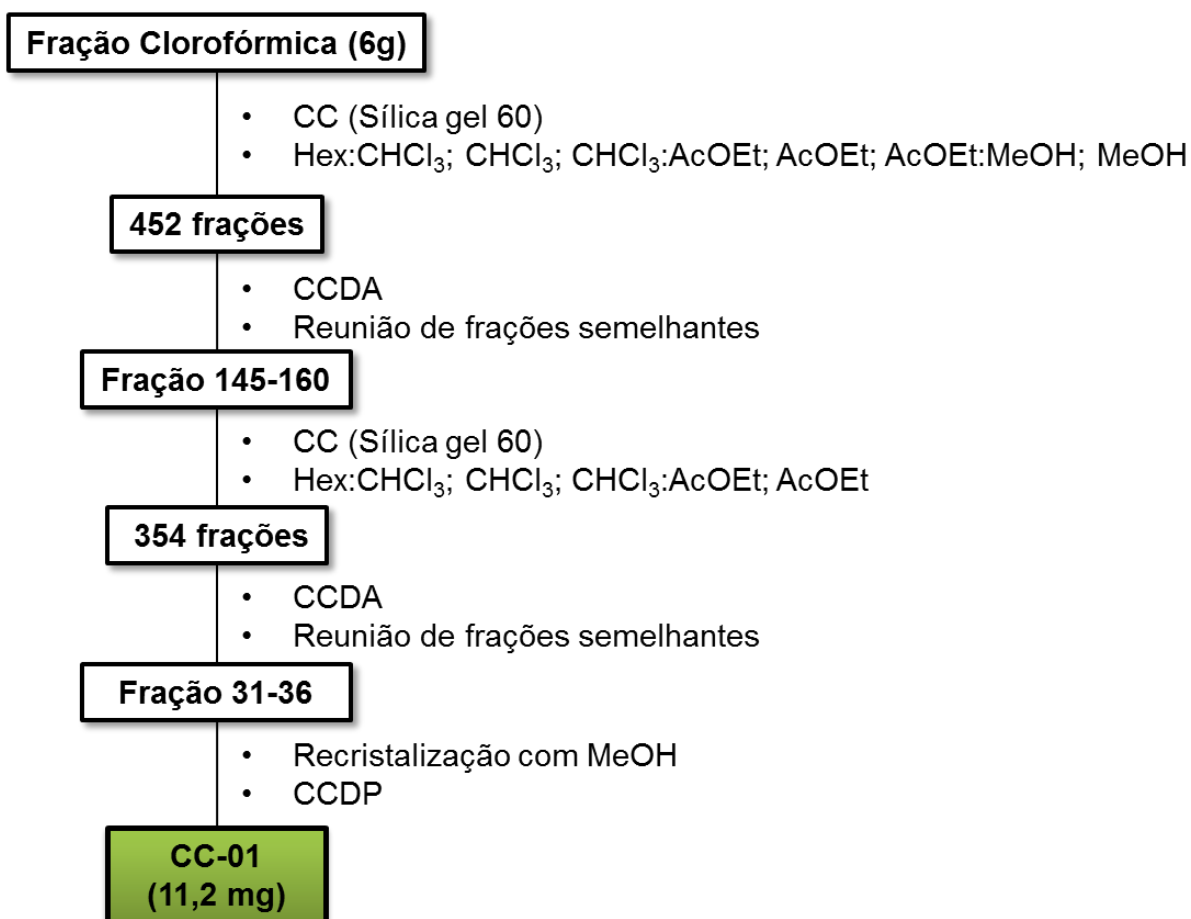
4.9.1 Isolamento dos compostos da fração clorofórmica

A quantidade de 6 g da fração clorofórmica (Cc-CHCl₃) foi submetida a uma CC, utilizando como adsorvente sílica gel 60, e como eluentes os solventes hexano (Hex), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e por último metanol (MeOH),

isolados e em misturas binárias, seguindo ordem crescente de polaridade, que resultou na coleta de 452 frações (Tabela 3, p. 84).

Após a realização da CCDA, foram feitas reuniões das frações cujo aspecto se assemelharam ao observar à luz ultravioleta (Fluxograma 2, p. 83). A fração reunida 145-160 foi submetida a nova CC sob as mesmas condições da CC anterior, da qual obteve-se a fração 31-36 que se apresentou como um pó branco solúvel em clorofórmio, semipurificado. Para purificação, realizou-se com esta fração uma recristalização com metanol, e, ao analisar por CCDA, apresentou duas manchas. Foi então submetida a uma CCDP, resultando na substância 1 (**Cc-01**), um sólido branco, solúvel em clorofórmio, com 11,2 mg. A identificação da substância foi realizada através da técnica espectroscópica de RMN (^1H e ^{13}C uni e bidimensionais).

Fluxograma 2. Procedimento cromatográfico da fração clorofórmica e obtenção da CC-01.



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 3. Frações obtidas na CC da fração clorofórmica e sistema de solventes utilizados.

Frações	Solventes	Proporção (v/v)
1-12		80 : 20
13-50		70 : 30
51-65		60 : 40
66-107	Hex : CHCl ₃	50 : 50
108-141		40 : 60
142-153		30 : 70
154-165		20 : 80
166-178		10 : 90
179-196	CHCl ₃	100
197-204		90 : 10
205-213		80 : 20
214-222		70 : 30
223-238		60 : 40
239-250	CHCl ₃ : AcOEt	50 : 50
251-263		40 : 60
264-274		30 : 70
275-283		20 : 80
284-300		10 : 90
301-317	AcOEt	100
318-452	AcOEt : MeOH	90 : 10

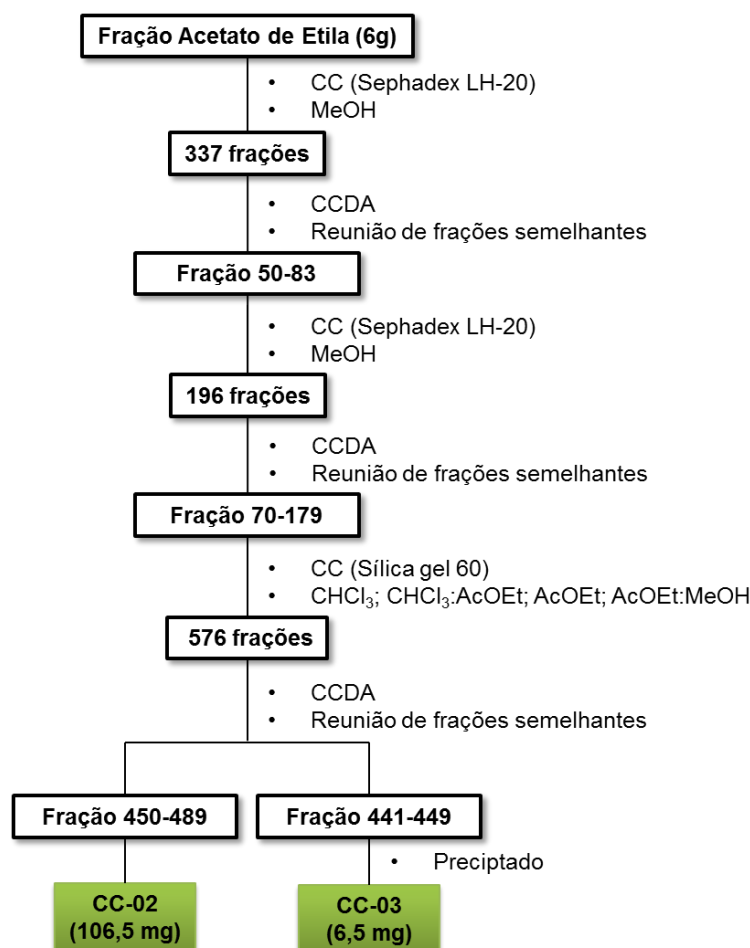
Fonte: elaborado pela autora.

4.9.2 Isolamento dos compostos da fração acetato de etila

Uma alíquota de 6 g da fração acetato de etila foi submetida à coluna cromatográfica (CC) em Sephadex LH-20 como fase estacionária, eluída apenas com metanol, resultando na coleta de 337 frações, sendo reunidas de acordo com semelhança observada por CCDA.

Após reunião das frações, a fração reunida 50-83 foi submetida a nova CC sob as mesmas condições da CC anterior, obtendo 196 frações, reunidas também de acordo com padrão apresentado na análise por CCDA. Após essa reunião, a fração 70-179 passou por uma CC com sílica gel 60 como adsorvente e como eluentes os solventes clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e por último metanol (MeOH), isolados e em misturas binárias, seguindo ordem crescente de polaridade, que resultou na coleta de 576 frações (Tabela 4, p. 86), todas analisadas e reunidas de acordo com semelhança observada por CCDA. A fração reunida 450-489 apresentou-se pura em CCDA, resultando na substância 2 (**Cc-02**, 106,5 mg), e a fração reunida 441-449 apresentou um precipitado, que foi separado do restante da fração, resultando na **Cc-03** (6,5 mg) (Fluxograma 3, p. 85). As substâncias foram enviadas para identificação através da técnica espectroscópica de RMN (^1H e ^{13}C).

Fluxograma 3. Procedimento cromatográfico da fração acetato de etila e obtenção da CC-02 e Cc-03.



Fonte: elaborado pela autora

Tabela 4. Frações obtidas na CC da fração reunida 441-449 (fração AcOEt) e sistema de solventes utilizados.

Frações	Solventes	Proporção (v/v)
1-6	CHCl ₃	100
7-94		97 : 03
95-120		94 : 06
121-208		91 : 09
209-253		88 : 12
254-271		85 : 15
272-345		82 : 18
346-362		79 : 21
363-370		76 : 24
371-377		73 : 27
378-421		70 : 30
422-433		67 : 33
434-447	CHCl ₃ : AcOEt	64 : 36
448-463		61 : 39
464-470		59 : 41
471-476		56 : 44
477-482		53 : 47
483-489		51 : 49
490-501		49 : 51
502-507		46 : 54
508-514		43 : 57
515-520		40 : 60
521-527		30 : 70
528-533		20 : 80
534-539		10 : 90
540-550	AcOEt	100
551-562		97 : 03
563-567	AcOEt : MeOH	95 : 05
568-574		93 : 07
575-576		90 : 10

Fonte: elaborado pela autora.

4.10 Métodos espectrométricos empregados na identificação das substâncias

As substâncias isoladas e purificadas pelos métodos cromatográficos foram enviadas para análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, realizado na Universidade Federal da Paraíba.

O equipamento de RMN utilizado para análise da substância Cc-01 foi um espectrômetro Varian System, operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz e carbono a 125 MHz, sendo a amostra solubilizada em solvente deuterado clorofórmio (CDCl_3).

Os espectros das substâncias Cc-02 e Cc-03 foram obtidos por meio de espectrômetro Varian Mercury, operando na frequência do hidrogênio a 200 MHz e carbono a 50 MHz, sendo as amostras solubilizadas em solvente deuterado metanol (CD_3OD).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), e referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencente à fração não deuterada do solvente CDCl_3 $\delta_{\text{H}} = 7,24$ ppm e CD_3OD $\delta_{\text{H}}=4,88$ e $3,30$ ppm. Para os espectros de RMN de ^{13}C , foi utilizado CDCl_3 : $\delta_{\text{C}} = 77$ ppm, e CD_3OD $\delta_{\text{C}} = 49$ ppm. As multiplicidades dos sinais de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto), *m* (multiplete).

4.11 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) procurou-se obter a impressão digital de *C. cujete*, com base no método adaptado de Ji et al. (2005). As análises foram realizadas pela Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Soluções de 10 mg.mL^{-1} em metanol grau HPLC do Cc-EEB foram injetadas em equipamento de CLAE-DAD Shimadzu® com coluna C18 Restek® (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) a 30°C protegida por pré-coluna Restek® C18 (10 mm x 4 mm, 5 mm). O aparelho estava equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC -

20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0 (Japão).

As amostras foram eluídas com gradientes de fase móvel binária composta por: (A) ácido trifluoracético (TFA) a 0,01%, e (B) constituído por acetonitrila grau HPLC, como descrito na Tabela 5 (p. 88). O sistema foi mantido sob 130 kgf de pressão e volume de injeção de 20 µL, utilizando fluxo de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/min. Para a investigação foi utilizada a faixa de comprimento de onda (λ) 270 nm a 350 nm, por ser a faixa de detecção que abrange a maioria dos metabólitos secundários.

Tabela 5. Sistema de eluição e gradiente da fase móvel da análise realizada em CLAE-DAD.

Tempo (minutos)	Gradiente	
	A	B
0-10	100%	0%
11-20	40%	60%
21-30	100%	0%
0-20	100%	0%
21-30	40%	60%
31-40	100%	0%
0-30	100%	0%
31-40	40%	60%
41-50	100%	0%

Fonte: Elaborado pela autora.

A impressão digital de *C. cujete* foi obtida aplicando como ferramenta estatística de *design* experimental o planejamento fatorial 3^k , onde k é o número de fatores, utilizado para otimizar o processo de extração visando um maior rendimento. Este planejamento busca analisar pontos experimentais dispersos em um domínio, reduzindo o número de experimentos.

O planejamento fatorial aplicado foi de ordem 3^2 , analisando dois fatores em três níveis (fluxo de fase móvel em 0,8; 1,0 e 1,2 mL/min e tempo do gradiente em 30, 40 e 50 minutos), assim como descrito na Tabela 6 (p. 89).

Tabela 6. Planejamento fatorial utilizado na impressão digital de *C. cujete*.

Níveis	Fatores	
	Gradiente (tempo)	Fluxo (mL/min)
+	50 min	0,8
0	40 min	1,0
-	30 min	1,2

Fonte: elaborado pela autora.

A variável dependente escolhida para a análise foi o cálculo da função hierárquica de resposta cromatográfica (FHRC) como descrito por Ji et al (2005), através da seguinte fórmula:

$$FHRC = 1,000,000n + 100,000R_{\min} + (t_m - t_i)$$

Onde:

n = Número de picos no cromatograma;

R_{\min} = Resolução do par menos separado de picos;

t_m = Tempo máximo da análise;

t_i = Tempo de retenção do último pico.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas, gerando assim 27 cromatogramas.

A partir do cromatograma escolhido como a impressão digital de *C. cujete*, foi realizada uma busca pelos compostos químicos detectados, de acordo com 24 padrões analíticos (Sigma Aldrich), 22 de flavonoides (Tabela 7, p. 90) e dois da classe dos terpenos (lupeol e borneol) disponibilizados pela CAFMA, observando o tempo de retenção e as bandas de absorção no UV de cada pico correspondente no cromatograma. Os padrões analíticos foram analisados em CLAE-DAD, e eluídos com gradientes de fase móvel binária composta por: (A) ácido trifluoracético (TFA) a 0,01%, e (B) constituído por acetonitrila grau HPLC, tendo como condição inicial, a eluição de

100% de A por 10 minutos, seguido de um gradiente linear de B 60% por 10 minutos e retorno da condição inicial, 100% de A, por 10 minutos. O sistema foi mantido sob 130 kgf de pressão e volume de injeção de 20 μ L, utilizando fluxo de 1,0 mL/min. Para a investigação foi utilizada a faixa de comprimento de onda (λ) 270 nm.

Tabela 7. Padrões analíticos de flavonoides utilizados na análise por CLAE-DAD.

1. Ácido caféico	9. Catequina	16. Kaempferol
2. Ácido clorogênico	10. Crisina	17. Miricetina
3. Ácido gálico	11. Epicatequina	18. Naringenina
4. Ácido p-cumárico	12. Epigallocatequina	19. Quercetina
5. Ácido protocatequínico	13. Fisetina	20. Quercetina 3- β D-Glucopiranosídeo
6. Ácido tânico	14. Galocatequina	21. Rutina
7. Apigenina	15. Hesperidina	22. Escopoletina
8. Canferitrina		

Fonte: Elaborado pela autora.

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos colorimétricos foram tratados no programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 e expressos como média \pm desvio padrão (DP), considerando valores significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os dados obtidos na análise da CLAE-DAD foram analisados estatisticamente usando os programas OriginLab[®] 8.0 e Statistica[®] 8.0 (StatSoft, USA), aplicando um planejamento fatorial de 3 níveis, 1 bloco e 2 fatores, utilizando a opção *Statistic*, *Industrial Statistics & Six Sigma* e *Experimental design* (DOE) do programa Statistica[®].



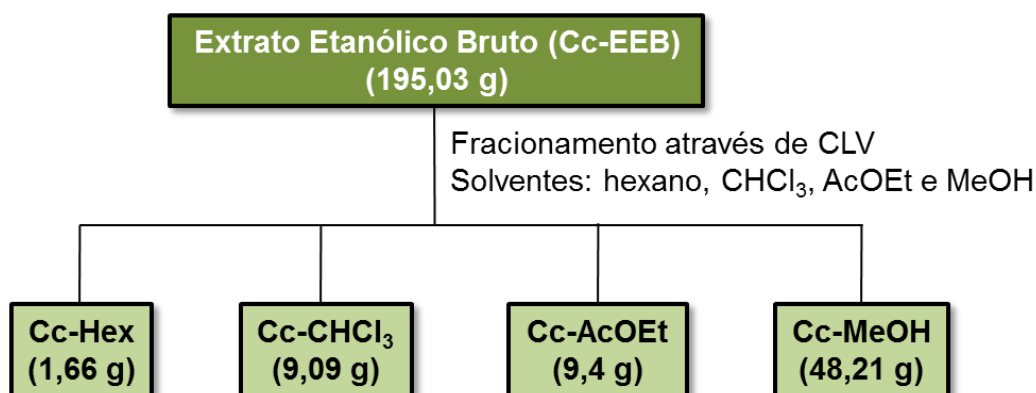
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de *C. cujete*

Após as etapas de secagem, pulverização, maceração e concentração, obteve-se 195,03 g de extrato etanólico bruto (Cc-EEB) das folhas de *C. cujete*, com rendimento de 13%. O Cc-EEB foi submetido ao processo de partição, fornecendo quatro frações (Fluxograma 4, p. 92): hexânica (Cc-Hex), com 1,66 g; clorofórmica (Cc-CHCl₃), com 9,09 g; acetato de etila (Cc-AcOEt), com 9,4 g; metanólica (Cc-MeOH), com 48,21g.

Fluxograma 4. Frações obtidas do extrato etanólico bruto de *C. cujete*.



Fonte: elaborado pela autora.

5.2 Triagem fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica preliminar realizada no presente estudo proporcionou traçar o perfil químico dos compostos presentes nas folhas de *C. cujete*, que indicou a forte presença de substâncias terpênicas, tais como mono, sesqui e diterpenos, e outras das classes das lignanas e derivados antracênicos. Os resultados estão expressos na Tabela 8 (p. 93), e foram obtidos através de análise qualitativa das reações químicas, avaliando a presença dos grupos de metabólitos secundários em termos positivos e negativos, conforme legenda.

Tabela 8. Triagem fitoquímica preliminar do extrato e frações de *C. cujete*.

Classe Química	Cc-EEB	Cc-Hex	Cc-CHCl ₃	Cc-AcOEt	Cc-MeOH
Alcaloides	-	-	++	++	-
Compostos fenólicos	+	+	+	++	+
Cumarinas	-	++	-	-	++
Derivados antracênicos	++	++	-	+	+++
Lignanas	+	+++	-	-	++
Mono, sesqui e diterpenos	+++	+++	+++	++	-
Naftoquinanas	-	+	-	+	+
Saponinas	-	-	-	-	+
Triterpenos e esteróides	+	++	+	+	-

Legenda: (-) ausência do constituinte, (+) presença fracamente positiva, (++) presença moderadamente positiva, (+++) presença fortemente positiva.

Fonte: elaborado pela autora.

Em todas as amostras analisadas observa-se a fraca presença de saponinas e de alcaloides, semelhante ao resultado encontrado por Coe et al. (2012), por Das et al. (2014) e também por Espitia-Baena et al. (2011), que testou a presença de alcaloides empregando três reagentes, mas nenhum mostrou resultado positivo. Os estudos realizados por Das et al. (2014) e por Espitia-Baena et al. (2011) detectaram a presença de esteroides, triterpenos e compostos fenólicos, corroborando com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Entretanto, estudos anteriores realizados com os frutos dessa espécie demonstraram diferenças nas classes de metabólitos secundários detectados na triagem, sendo encontrado forte presença de taninos e alcaloides, testado para três reagentes diferentes (EJELONU et al., 2011; SHASTRY et al., 2012). Tal diferença pode estar relacionada a distribuição dos compostos pelos órgãos vegetais, que podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Além disso, a síntese dos metabólitos secundários é frequentemente afetada por condições ambientais, tais como, sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo, se comparados aos realizados na Nicarágua e Colômbia (COE et al., 2012; ESPITIA-BAENA et al., 2011), países do continente Americano, demonstram haver um padrão nos metabólitos secundários produzidos pela espécie no continente, sendo a presença de flavonoides, esteroides e triterpenos, e ausência de alcaloides. As classes de metabólitos detectadas na espécie de outros continentes apresentam diferenças.

5.3 Quantificação de fenóis totais e flavonoides totais

No teste dos fenóis totais, a equação da curva de calibração do ácido gálico foi expressa por $y = 0,0009x + 0,0066$ com coeficiente de determinação igual a $R^2 = 0,9978$, onde “x” é a concentração de ácido gálico e “y” é absorvância resultante em 756 nm. Para os flavonoides totais a equação da curva de calibração da catequina foi expressa por $y = 0,0022x + 0,0374$ e o coeficiente de determinação igual a $R^2 = 0,9974$.

Os resultados obtidos demonstraram que o conteúdo de fenóis da fração clorofórmica (Cc-CHCl₃) apresentou menor teor, com $7,85 \pm 3,40$ miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAC/g), em comparação a Cc-AcOEt, Cc-EEB e Cc-MeOH, cujos valores significativos do conteúdo fenólico, foram de $115,6 \pm 8,34$, $73,40 \pm 5,13$ e $70,44 \pm 5,56$ mg EAG/g, respectivamente (Tabela 9, p. 96).

O maior teor de flavonoides determinados, assim como observado na Tabela 9 (p. 95), foi apresentado por Cc-CHCl₃, no qual foi quantificado $136,1 \pm 0,01$ mg de equivalente de catequina por grama de amostra (mg EqC/g). O menor valor foi demonstrado por Cc-Hex com $10,1 \pm 0,00$ mg EqC/g

Tabela 9. Teor de fenóis e flavonoides totais do extrato e frações particionadas das folhas de *C. cujete*.

Amostra	Fenóis Totais (mg EAG/g)	Flavonoides Totais (mg EqC/g)
Cc-EEB	73,40±5,13	80,4±0,00
Cc-Hex	23,04±5,70	10,1±0,00
Cc-CHCl ₃	7,85±3,40	136,1±0,01
Cc-AcOEt	115,6±8,34	78,6±0,01
Cc-MeOH	70,44±5,56	43,3±0,01

Fonte: elaborado pela autora.

Comparando o valor encontrado na quantificação dos fenóis totais com o resultado encontrado para os flavonoides totais da fração Cc-CHCl₃ (7,85±3,40 e 136,1±0,01 respectivamente), percebe-se um erro analítico que pode ter ocorrido devido a algumas dificuldades dos métodos empregados. De acordo com Angelo e Jorge (2007) a análise de compostos fenólicos pelos métodos do reagente de Folin-Ciocalteu e complexação com o AlCl₃, descritos no presente estudo, pode ser influenciada pelo padrão utilizado e pela presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas, considerando que os extratos vegetais são compostos de uma mistura complexa de substâncias. Desta forma, algumas modificações no método poderiam acarretar menores erros analíticos.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, onde os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides foram encontrados nas frações clorofórmica e acetato de etila, como também no extrato etanólico bruto (DAS et al., 2014; PARVIN et al., 2015). Entretanto, baixos teores de fenóis e flavonoides foram encontrados na fração aquosa, representando apenas 2,6 % do total da fração (LIZCANO et al., 2010). Infere-se assim, que os melhores solventes para extrair fenóis e flavonoides de *C. cujete* são acetato de etila, clorofórmio e etanol.

Vale ressaltar que os compostos fenólicos e os flavonoides tem sido indicados como os principais contribuintes na eliminação dos radicais livres em vias de oxidação, e ainda demonstram inibir a proliferação e crescimento de microrganismos (DAS et al., 2014; PARVIN et al., 2015).

5.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi diferenciada conforme a polaridade das frações testadas e o modelo experimental. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante estão apresentados na Tabela 10 (p. 96).

No método do sequestro do radical livre DPPH, as frações Cc-AcOEt e Cc-MeOH exibiram atividade antioxidante moderada, com os menores valores CE_{50} $19,07 \pm 3,87$ e $23,92 \pm 1,74$ respectivamente, se comparados com os valores apresentados nos padrões (ácido ascórbico = $2,89 \pm 0,22$; BHA = $6,16 \pm 0,12$; BHT = $9,23 \pm 0,53$).

Tabela 10. Atividade antioxidante *in vitro* do extrato e frações de *C. cujete*.

Amostra	Sequestro de DPPH (CE_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	Inibição da co oxidação do β - caroteno (% AA)
Cc-EEB	64,9 \pm 15	16,88 \pm 0,10
Cc-Hex	45,07 \pm 8,72	7,81 \pm 0,17
Cc-CHCl ₃	103,0 \pm 4,77	36,39 \pm 0,12
Cc-AcOEt	19,07 \pm 3,87	35,49 \pm 0,00
Cc-MeOH	23,92 \pm 1,74	30,94 \pm 0,01
Ácido ascórbico	2,89 \pm 0,22	30,76 \pm 0,02
BHA	6,16 \pm 0,12	57,50 \pm 0,16
BHT	9,23 \pm 0,53	68,12 \pm 0,07

CE_{50} é definido como a concentração suficiente para obter 50% de efeito máximo estimado em 100%. Os valores são apresentados como média \pm SD (n = 3). % AA = percentagem de atividade antioxidante.

Fonte: elaborado pela autora.

Referente à atividade antioxidante no sistema β -caroteno, a fração CcCHCl₃ foi a que apresentou melhor resultado (36,39%), com valores maiores que o padrão ácido ascórbico (30,76%), mas menores para os padrões BHA (57,50%) e BHT (68,12%), seguido das frações Cc-AcOEt e Cc-MeOH, 35,49% e 30,94%, respectivamente. Os valores encontrados entre Cc-CHCl₃ e Cc-AcOEt, e também entre Cc-MeOH e o padrão ácido ascórbico não são significativamente diferentes. Sabe-se que o β -caroteno quando reage com os radicais formados pela oxidação de ácido linoleico

numa emulsão, sofre perda sua cor amarela. De acordo com os resultados apresentados, *C. cujete* tem capacidade de retardar a taxa de branqueamento do β -caroteno, atuando assim com atividade antioxidante satisfatória (ALVES et al., 2010).

O ensaio do sequestro do radical livre DPPH é o método mais amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais e extratos de plantas, pois é sensível o suficiente para detectar princípios ativos em baixas concentrações. O grau de descoloração indica o potencial de sequestro do extrato antioxidante, que se dá devido à capacidade de doação de hidrogênios (DAS et al., 2014). Em um estudo realizado por Das et al. (2014) a fração acetato de etila das folhas de *C. cujete* exibiu uma forte atividade no sequestro do radical DPPH, com $CE_{50} = 8,78$ ug/mL, mais elevada do que a atividade exibida pelo padrão ácido ascórbico ($CE_{50} = 7,68$ ug/mL), e atividade moderada para a fração clorofórmica ($CE_{50} = 15,56$ ug/mL).

Atividade antioxidante moderada também foi encontrado por David et al. (2007) em um estudo realizado com 32 plantas da caatinga, no qual o extrato metanólico das partes aéreas de *C. cujete* apresentou valor de $CE_{50} = 10,3$ mg/mL para o radical DPPH, e 38,3 mg/mL de % AA no ensaio da auto oxidação do β -caroteno. Estes resultados, juntamente com os encontrados neste estudo, sugerem a presença de componentes bioativos específicos nestes extratos e frações, tais como ácidos fenólicos, que podem ser responsáveis pela atividade antioxidante.

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da auto oxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto oxidação (ANGELO; JORGE, 2007; DELMONDES et al., 2013).

A atividade de sequestradora de radicais livres tem sido grandemente influenciada pela composição da amostra, principalmente compostos fenólicos, tais

como flavonoides e ácidos fenólicos, e também compostos da classe dos terpenos, tais como triterpenos e esteroides. A atividade apresentada por estes compostos está relacionada a algumas características estruturais, como no caso dos ácidos fenólicos, por exemplo, no qual a atividade antioxidante depende dos números e posições dos grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila, podendo ser evidenciada com o aumento do grau de hidroxilação (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da presença de radicais livres em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como doenças cardiovasculares e câncer (ANGELO; JORGE, 2007; DELMONDES et al., 2013).

O consumo de folhas de *C. cujete* pode ser benéfico na prevenção de numerosas doenças crônicas relacionadas com o estresse oxidativo. Os compostos detectados na triagem fitoquímica, principalmente os compostos fenólicos e os da classe dos terpenos e esteroides, podem contribuir para a atividade sequestradora de radicais livres, uma vez que estas classes de compostos são conhecidas como captadoras de radicais livres.

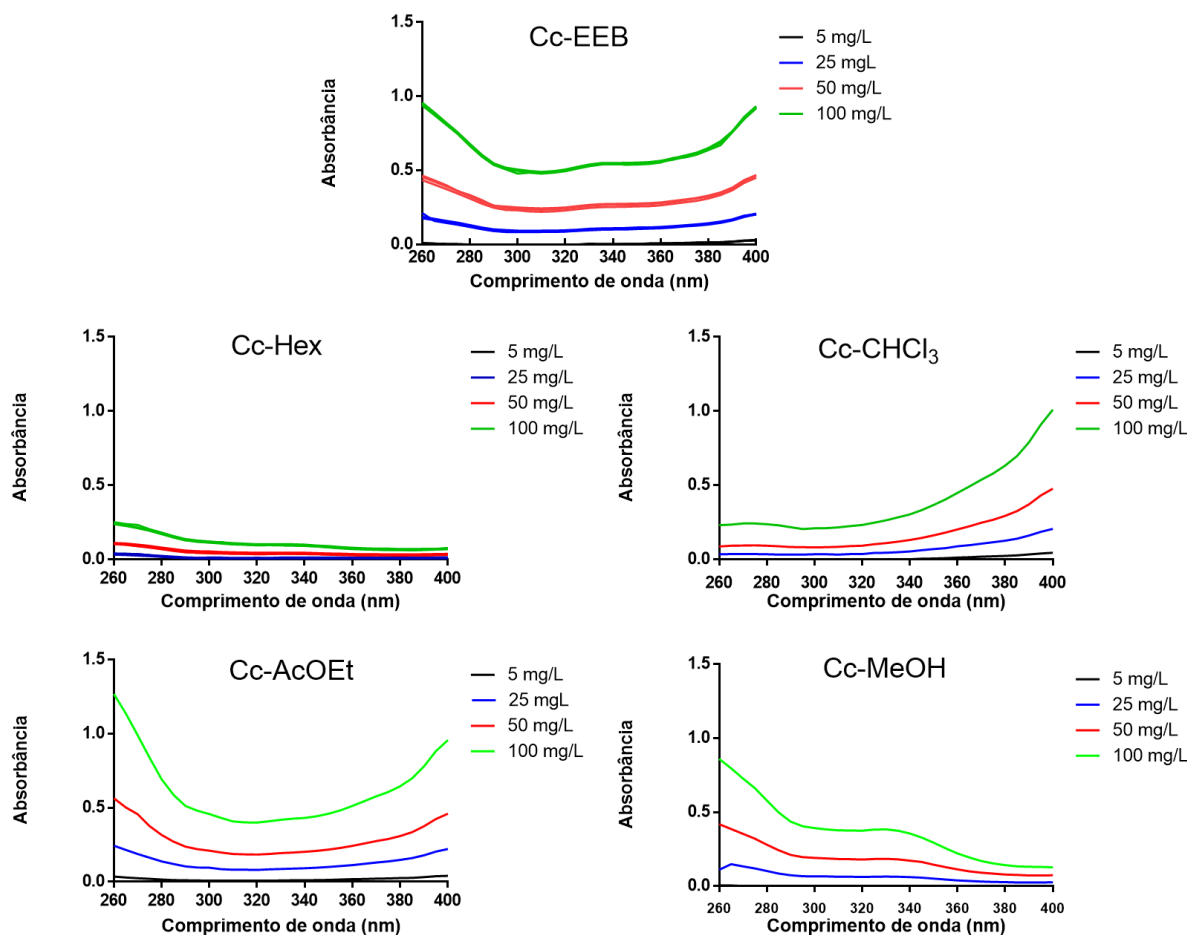
5.5 Atividade fotoprotetora

A partir dos resultados obtidos na quantificação do teor de fenóis e flavonoides totais, foi avaliada a atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato e frações obtidas das folhas de *C. cujete*, considerando que os compostos fenólicos são capazes de absorver a radiação UV (SOUZA, et al., 2005).

Conforme observado no perfil de absorção espectrofotométrica (Figura 15, p. 99), extrato e as frações apresentaram um efeito dose-dependente, no qual o perfil de absorção se manteve dentro da faixa da região UVC (200-290 nm) e UVA (320-400 nm), sendo que nenhuma das amostras absorveu na região UVB (290-320 nm). Apenas a fração Cc-CHCl₃ demonstrou comprimentos de onda máximo na região

UVA, sugerindo uma possível atividade fotoprotetora, e todas as outras amostras se mantiveram na faixa da UVC. A fração Cc-Hex não demonstrou absorção satisfatória.

Figura 15. Absorção espectrofotométrica na faixa de 260 a 400 nm de Cc-EEB e frações das folhas de *C. cujete*.



Fonte: elaborado pela autora.

Os dados obtidos pelo método aplicado revelam que a capacidade fotoprotetora das amostras de *C. cujete*, principalmente da fração Cc-CHCl₃ seguida da Cc-AcOEt, foi diretamente proporcional ao teor de fenóis e flavonoides totais (Tabela 9, p. 95), sendo que Cc-CHCl₃ apresentou o maior teor de flavonoides totais (136,1 mg EqC/g) e Cc-AcOEt maior teor de fenóis totais (115,6±8,34 mg EAG/g).

Além de eliminação de radicais induzidos por UV, os compostos fenólicos podem fornecer efeito protetor contra a radiação UV, agindo como fortes barreiras de absorção de radiação UV (VILA, 2006).

A ação fotoprotetora de um filtro solar é medida universalmente através do fator de proteção solar (FPS), determinada pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986). O FPS é aplicado exclusivamente às radiações UVB, pois estas são as causadoras de eritemas, considerado como a região de maior incidência durante o dia em que as pessoas são expostas por mais tempo. Este fator estabelece o aumento do tempo à exposição solar com o produto fotoprotetor aplicado sem a ocorrência de eritema, ou seja, quanto maior o FPS maior será o tempo permitido para uma exposição segura (NASCIMENTO et al., 2014).

Na Tabela 11 (p. 100) e na Figura 16 (p. 100), pode ser observado que os melhores valores de FPS foram apresentados por Cc-EEB ($4,90 \pm 0,07$) e Cc-AcOEt ($4,354 \pm 0,04$) na concentração de 100 mg/L.

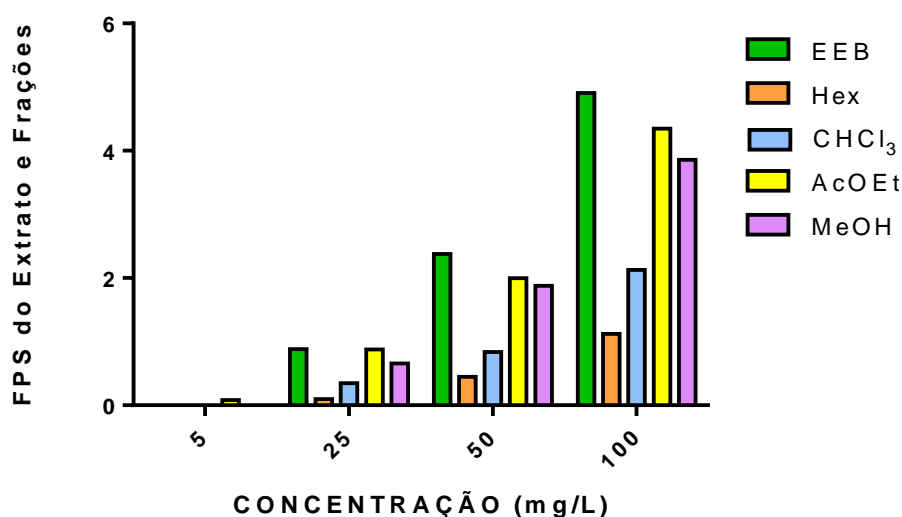
Tabela 11. Valores do FPS *in vitro* do extrato e frações de *C. cujete*.

Amostras	Concentração (100 mg/L)
Cc-EEB	$4,90 \pm 0,12$
Cc-Hex	$1,12 \pm 0,04$
Cc-CHCl ₃	$2,12 \pm 0,05$
Cc-AcOEt	$4,34 \pm 0,07$
Cc-MeOH	$3,85 \pm 0,01$

Os valores são apresentados como média \pm SD (n = 3).

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 16. Fator de proteção solar (FPS) *in vitro* do extrato e frações de *C. cujete*.



Fonte: elaborado pela autora.

O FPS apresentado pelo Cc-EEB e Cc-AcOEt pode ser explicado pela presença de compostos fenólicos e da classe dos terpenos. Em um trabalho desenvolvido por Tundis et al. (2008), no qual foram estudadas as atividades biológicas e farmacológicas dos iridoides, considerados os marcadores taxinômicos da família Bignoniaceae, foi sugerido que a aucubina (Quadro 5, p. 39) pode desempenhar um papel importante no mecanismo de defesa celular contra o fotoenvelhecimento induzido por radiação UV.

A atividade fotoprotetora depende da capacidade de absorção de energia radiante atribuída aos grupos cromóforos, que é proporcional à sua concentração, intervalo de absorção e comprimento de onda onde ocorre absorção máxima (MAILLAN et al., 2005). Diante do exposto, pode-se sugerir que os valores de FPS demonstrados pelas amostras testadas seja decorrente da concentração das moléculas com atividade absorvedora de radiação UV, já que os extratos vegetais são formados por uma mistura complexa de moléculas mais ou menos ativas, trazendo dificuldade para a determinação da absorção máxima (VIOLANTE et al., 2009). Outros trabalhos demonstraram que diferentes produtos vegetais apesar de apresentarem absorção na região UV, não são considerados filtros solares vegetais, tal como a pesquisa desenvolvida por Souza et al. (2005), que estudaram os extratos das flores e folhas da *Achillea millefolium*, planta reconhecida pela presença de flavonoides em sua composição, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios para o preparo de um produto fotoprotetor, uma vez que os comprimentos de onda da máxima absorção apresentados não corresponderam aos comprimentos de onda das radiações ultravioleta A e B.

Entretanto, os extratos naturais que apresentam atividade fotoprotetora podem potencializar o FPS de filtros químicos sintéticos, além de garantir as ações emolientes e adstringentes, e também a diminuição dos custos da produção, considerando que atualmente uma das tendências do mercado de cosméticos é o desenvolvimento de produtos com o uso de recursos naturais (NASCIMENTO et al., 2009; VIOLANTE et al., 2009).

A avaliação da atividade fotoprotetora de *C. cujete* desenvolvida no presente estudo agrega conhecimentos inéditos sobre a planta, já que não há estudos desta atividade com nenhuma espécie do gênero.

5.6 Atividade antibacteriana

Na avaliação da atividade antibacteriana foi observado que houve variação nos resultados de acordo com a polaridade das frações orgânicas e a bactéria testada, como descrito na Tabela 12 (p. 102). A melhor ação bactericida, ou seja, a amostra que foi eficaz em matar as espécies de bactérias, determinadas pela concentração bactericida mínima (CBM), foram apresentados contra *S. aureus* 6538 por Cc-Hex e Cc-AcOEt com CBM 1,56 mg.mL⁻¹, *S. epidermidis* por Cc-EEB e Cc-AcOEt (CBM 1,56 mg/mL), e *K. pneumoniae* com 1,56 mg/mL de Cc-MeOH. Observou-se ainda um efeito dose-dependente nos resultados encontrados.

Tabela 12. Atividade antibacteriana *in vitro* determinada pela CBM do extrato e frações de *C. cujete*. (Os valores estão expressos em mg/mL e indicam até qual concentração a amostra foi efetiva)

Bactérias	Amostras (CBM em mg/mL)				
	Cc-EEB	Cc-Hex	Cc-CHCl ₃	Cc-AcOEt	Cc-MeOH
<i>S. aureus</i> 25923	3,12	3,12	6,25	3,12	3,12
<i>S. aureus</i> 6538	3,12	1,56	3,12	1,56	3,12
MRSA	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12
<i>S. epidermidis</i>	1,56	3,12	3,12	1,56	6,25
<i>E. coli</i> 32213	6,25	6,25	6,25	3,12	3,12
<i>E. faecalis</i>	3,12	3,12	6,25	6,25	6,25
<i>S. enterica</i>	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12
<i>K. pneumoniae</i>	3,12	6,25	6,25	3,12	1,56

Fonte: elaborado pela autora.

Ao se avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais, não há um consenso em relação à concentração ideal para inibição (DUARTE, 2007). Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para extratos vegetais com base nos resultados de CIM e CBM, no qual considera como forte inibição CBM até 500 µg/mL; inibição moderada CBM entre 600 e 1.500 µg/mL; e como fraca inibição CBM acima de 1.600 µg/mL. Desta forma, as atividades apresentadas pelo Cc-EEB e pelas

frações Cc-Hex, Cc-AcOet e Cc-MeOH são consideradas como inibição moderada, pois todas inibiram até a concentração de 1,56 mg/mL.

Porém, esta classificação não pode ser considerada hegemônica pois, de acordo com Peixoto (2009), trata-se de um método subjetivo, já que exclui uma série de fatores que podem interferir no resultado da CBM, como a variabilidade e a disponibilidade dos compostos bioativos presentes, responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.

A atividade apresentada sugere o uso popular desta espécie para combater doenças causadas por bactérias, como a diarreia, disenteria, distúrbios estomacais, infecção urinária, e também relaciona seu uso como laxante e para limpeza de feridas, impedindo assim a proliferação de microrganismos que infeccionem o local (EJELONU et al., 2011; NIELSEN; SLAMET; WEGE, 2009; PARVIN et al., 2015).

As três bactérias que foram suscetíveis às amostras testadas estão relacionadas a doenças infecciosas, corroborando assim com o uso popular da espécie. *S. aureus* é uma bactéria frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis, mas pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras). *S. epidermidis* tem geralmente uma relação benigna com o seu hospedeiro, tem sido proposto inclusive, ter uma função probiótica, impedindo a colonização do hospedeiro por patógenos mais graves, tais como *S. aureus*. No entanto, estudos recentes indicam que a maioria das infecções por estafilococos coagulase-negativos não especificados são devido a *S. epidermidis*. *K. pneumoniae* tem sido apontada como a segunda bactéria mais causadora de infecções urinárias (OTTO, 2009; RODRIGUES; BARROSO, 2011; SANTOS et al., 2007).

Entre os estudos de atividade antibacteriana já realizados com *C. cujete*, alguns resultados são semelhantes. Parvin e colaboradores (2015) estudaram as folhas contra as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa) utilizando o método de difusão em disco, sendo que a fração clorofórmica apresentou melhor atividade antimicrobiana contra os organismos testados.

Em um estudo conduzido por Mahbub e colaboradores (2011), o extrato etanólico das folhas de *C. cujete* mostrou atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus*, e também contra outras bactérias, como *Shigella dysenteriae*, *Bacillus*

cereus, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, mas não mostrou qualquer efeito contra *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi-A* e *Sarcina lutea*. Porém foi detectado que existe uma relação linear entre a dose utilizada e zona de diâmetro da inibição, revelando que o efeito é dependente da dose.

O extrato clorofórmico das cascas da raiz de *C. cujete* também apresentou atividade antibacteriana inibindo a bactéria *S. aureus*, considerando ainda que dois ácidos fenólicos isolados desse extrato (ácido vanílico e o ácido 4-hidroxibenzóico) demonstraram atividade ainda maior quando testados isoladamente (BINUTU, 1997).

Os compostos fenólicos e polifenóis são um dos maiores grupos de metabólitos secundários que denotam uma atividade antimicrobiana, devido à localização e ao número de grupos hidroxila ligados no grupo fenol. Eles causam acidificação no plasma resultando na interrupção da H⁺-ATPase necessária para a síntese de ATP. Diante disso, a atividade antimicrobiana observada tem relação com os constituintes químicos já relatados e isolados a partir os extratos de *C. cujete*, inibindo a proliferação e o crescimento dos organismos que foram suscetíveis, considerando ainda que alguns organismos foram seletivamente mais sensíveis para um extrato do que para os outros (BINUTU; LAJUBUTU, 1994; PARVIN et al., 2015)

Os resultados apresentados demonstram que mais estudos são necessários a fim de isolar e identificar algumas substâncias ativas que podem ser responsáveis pela a atividade antioxidante e explore o mecanismo de ação de *C. cujete*.

5.7 Caracterização estrutural das substâncias Cc-01, Cc-02 e Cc-03

5.7.1 Elucidação estrutural da substância Cc-01

Sucessivos procedimentos cromatográficos em sílica gel da fração clorofórmica e um tratamento por recristalização com metanol forneceram um pó branco, solúvel em clorofórmio, denominado Cc-01 (11,2 mg). Esta substância apresentou fluorescência rosa sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e amarelada no comprimento de onda de 365 nm, com R_f= 0,6 em clorofórmio:acetato de etila (95:5, v/v).

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Cc-01 e suas expansões (Figura 17 e 18, p. 108-109), obtido em CDCl_3 , apresentou um conjunto de sinais na região de δ_{H} 0,50 a 2,50 ppm, indicando a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, característicos de triterpenos e esteroides. Apresentou um multipletto em δ_{H} 3,52 ppm que pode ser atribuído a hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Foi observado também na Figura 19 (p. 110) um dupletto largo em δ_{H} 5,32 ppm ($J= 5,5$ Hz) sugerindo a presença de hidrogênio olefínico de esteroides (H-6), e ainda dois duplos dupletos em δ_{H} 5,12 ppm ($J= 8,5$ e 15 Hz) e δ_{H} 4,98 ppm ($J= 9$ e 15,5 Hz), referentes a hidrogênios olefínicos da estrutura de um estigmasterol (H-22 e H-23). Desta forma, sugeriu-se que a substância em questão trata-se do esteroide estigmasterol.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) (Figuras 20, 21 e 22, p. 111-113) apresentou 29 linhas espectrais e permitiu confirmar a indicação dos espectros de RMN de ^1H . Os sinais em δ_{C} 140,74 ppm e δ_{C} 121,69 ppm foram atribuídos aos carbonos da ligação dupla entre C-5 e C-6. Os sinais exibidos em δ_{C} 138,30 ppm e δ_{C} 129,26 ppm são sinais característicos dos átomos de carbono da ligação dupla entre C-22 e C-23, do estigmasterol. Foi observado ainda um sinal em δ_{C} 71,80 ppm atribuído ao carbono carbinólico C-3, e sinais entre δ_{C} 21,21 e 12,05 ppm, característicos de carbonos de metilas de esteroides.

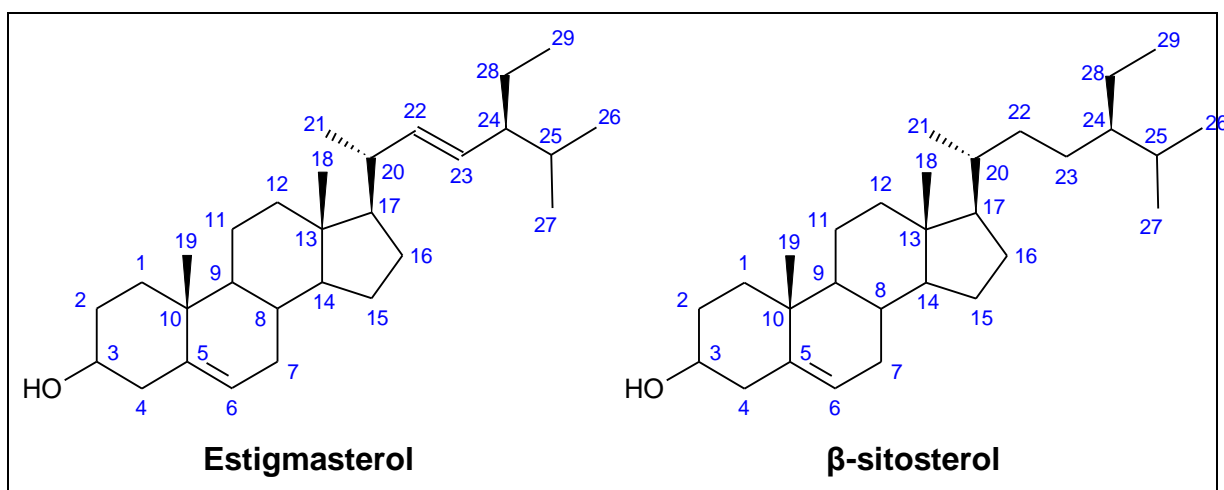
Os valores de RMN ^1H e ^{13}C para todos os hidrogênios e carbonos foram atribuídos com base nos espectros de COSY, HSQC e HMBC, comparando com os dados encontrados na literatura, estando as correlações descritas na Tabela 13 (p. 119).

A expansão do espectro de HSQC (Figura 23, p.114) na região de δ_{H} 3,20 a 5,70 ppm apresentou correlações diretas entre o δ_{H} 3,52 ppm correlacionando com δ_{C} 71,80 ppm; δ_{H} 4,98 ppm e δ_{C} 129,26 ppm; δ_{H} 5,12 ppm e δ_{C} 138,30 ppm; e por fim o δ_{H} 5,32 ppm e δ_{C} 121,69 ppm. A expansão deste espectro na região de δ_{H} 1,30 a 0,55 ppm revelou as correlações entre os carbonos e hidrogênios que constituem as seis metilas em: δ_{H} 0,67 ppm e δ_{C} 12,0 ppm; δ_{H} 0,77 ppm e δ_{C} 18,9 ppm; δ_{H} 0,79 ppm e δ_{C} 12,2 ppm; δ_{H} 0,82 ppm e δ_{C} 21,2 ppm; δ_{H} 0,99 ppm e δ_{C} 19,4 ppm; δ_{H} 1,01 ppm e δ_{C} 21,2 ppm; δ_{H} 1,45 ppm e δ_{C} 31,9 ppm (Figura 24, p. 115).

Observa-se ainda na expansão do espectro HSQC (Figura 24, p. 115) um sinal em δ_{H} 1,23 ppm mostrando forte acoplamento com um sinal não integrado de carbono

em aproximadamente δ_c 29,0 ppm característico do esqueleto do esteroide β -sitosterol (KOJIMA et al., 1990). Desta forma, conclui-se que Cc-01 é constituído de uma mistura entre os esteroides estigmasterol com β -sitosterol (Figura 25, p. 106), este último em menor quantidade de tal forma que prejudica a determinação da sua proporção na mistura. Os valores de RMN ^1H e ^{13}C de β -sitosterol estão descritos na Tabela 14 (p. 120).

Figura 25. Estrutura química de Cc-01.



Fonte: elaborado pela autora

Com as correlações apresentadas no espectro de HMBC (Figura 26, p. 116) entre os hidrogênios δ_H 5,12 ppm (H-22) e 4,98 ppm (H-23) com os carbonos δ_C 138,3 ppm (C-22) e δ_C 129,2 ppm (C-23) foi possível confirmar a posição da ligação dupla presente no estigmasterol. Já os carbonos em δ_C 140,7 ppm (C-5) e δ_C 121,6 ppm (C-6) correlacionaram com os hidrogênios em δ_H 2,26 ppm (H-4) e δ_H 1,08 ppm (H-7), sendo assim possível confirmar a ligação dupla entre 5 e 6, presente nos dois esteroides. Foi possível também confirmar os acoplamentos das metilas assim como demonstrados na Figura 27 (p. 117).

No espectro COSY (Figura 28, p. 118) confirmou-se os acoplamentos entre o δ_H 4,98 ppm (H-23) com δ_H 1,5 ppm (H-24) e δ_H 2,26 ppm (H-4) com δ_H 3,52 ppm (H-3). Foi observado ainda as várias correlações referentes a acoplamentos vicinais entre os hidrogênios metilênicos.

Através da interpretação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura, foi possível confirmar o isolamento da mistura de esteroides β -sitosterol e estigmasterol, relatada por Agarwal e Popli (1992).

Agarwal e Popli (1992) isolaram a mistura de esteroides do extrato de éter de petróleo das folhas, e Binutu (1997) isolou apenas o β -sitosterol das cascas do caule, entretanto nenhum dos trabalhos trazem os dados de identificação das substâncias.

Os esteroides são uma classe comum nas Bignoniaceae, de acordo com o status evolutivo da família (CIPRIANI et al., 2012). De acordo com Galotta e Boaventura (2005) o β -sitosterol apresenta-se, em geral, distribuído em todas as partes das plantas, e apresenta um aumento progressivo da proporção de estigmasterol em relação ao β -sitosterol a partir da raiz em direção ao talo, sendo determinante o grau de incidência de luz na bioconversão do β -sitosterol em estigmasterol na sua distribuição.

Atividades anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antioxidante, antifúngica e anticarcinogênica são comprovadas para o β -sitosterol e estigmasterol, além de serem indicados para diminuir o nível de colesterol LDL (SOTIROUDIS; KYRTOPOULOS, 2008). Diante disso, a atividade antioxidante moderada demonstrada pela fração Cc- CHCl_3 no presente estudo, da qual foi isolada a mistura de esteroides, pode estar relacionada a presença desses compostos na fração.

A ação antiofídica apresentada por *C. cujete* em trabalhos anteriores (OTERO et al., 2000; SHASTRY et al., 2012) pode estar relacionada a presença de β -sitosterol e estigmasterol pois, esses dois esteroides apresentaram 70% de proteção contra o efeito antiletal do veneno da serpente *Bothrops* (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005).

β -sitosterol e estigmasterol foram avaliados quanto a atividade hipoglicemiante. Quando testados individualmente os dois esteroides não mostraram efeitos hipoglicêmicos, mas apresentaram atividade significativa quando misturados, indicando que apenas o sinergismo entre β -sitosterol e estigmasterol pode apresentar atividade hipoglicemiante (JAMALUDDIN; MOHAMED; LAJIS, 1994)

Figura 17. Espectro de RMN ¹H de CC-01 (500 MHz, CDCl₃).

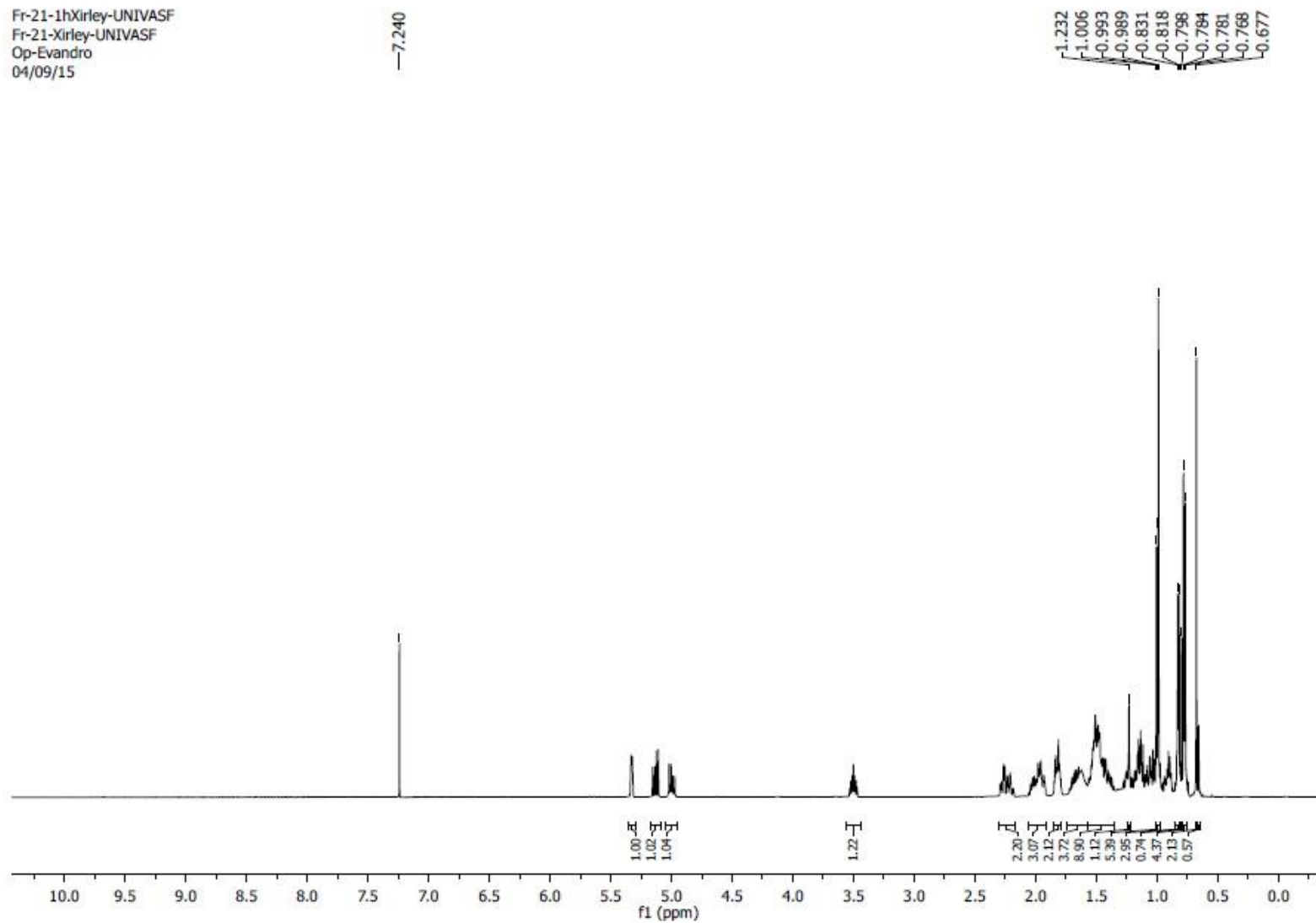


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^1H de CC-01 (δ_{H} 0,60-1,30) (500 MHz, CDCl_3).

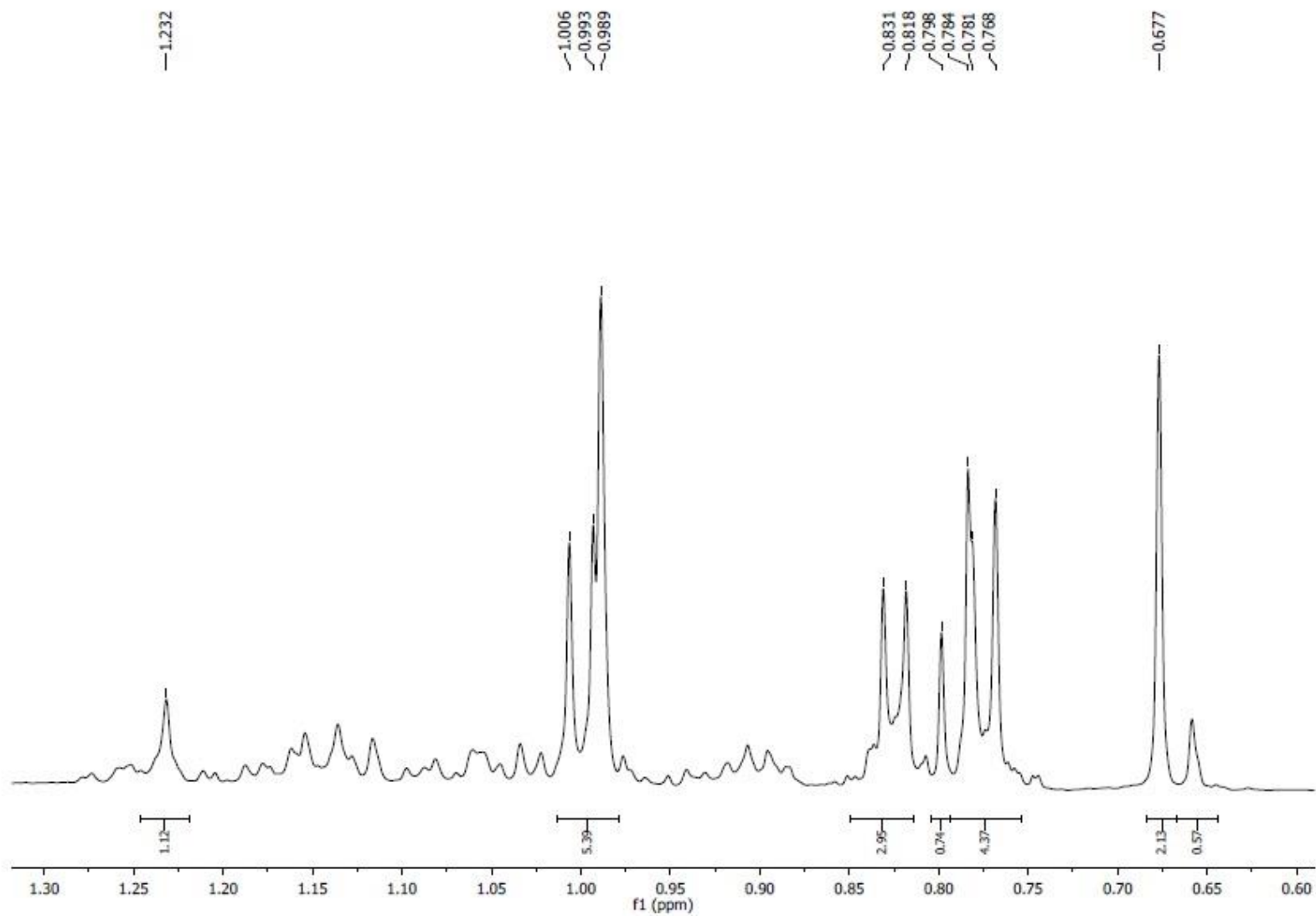


Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^1H de CC-01 (δ_{H} 3,30-5,50) (500 MHz, CDCl_3). A: Estigmasterol; B: β -sitosterol.

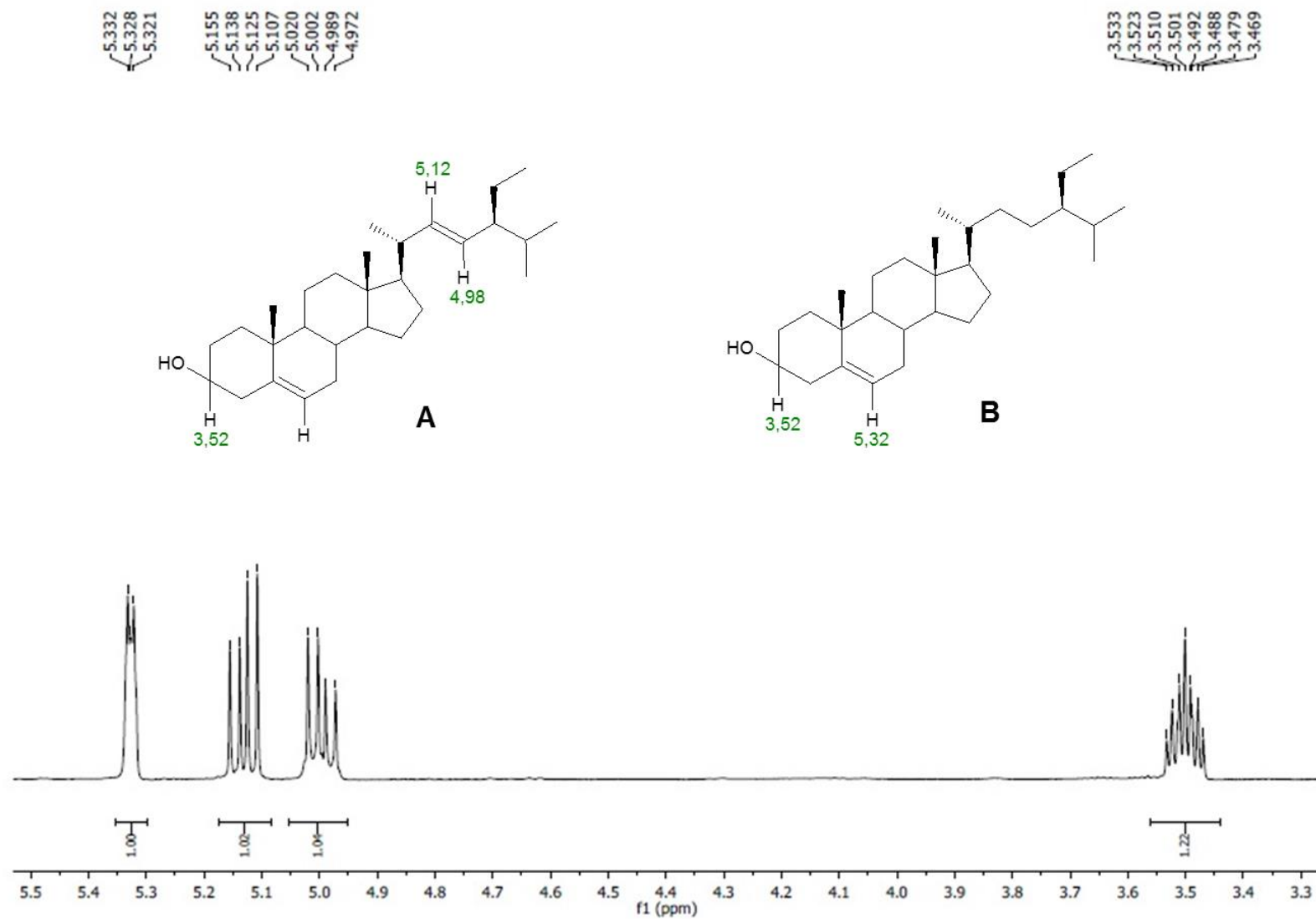


Figura 20. Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ de CC-01 (125 MHz, CDCl_3).

Fr-21-aptXirley-UNIVASF
Fr-21-Xirley-UNIVASF
Op.Evandro
09/09/15

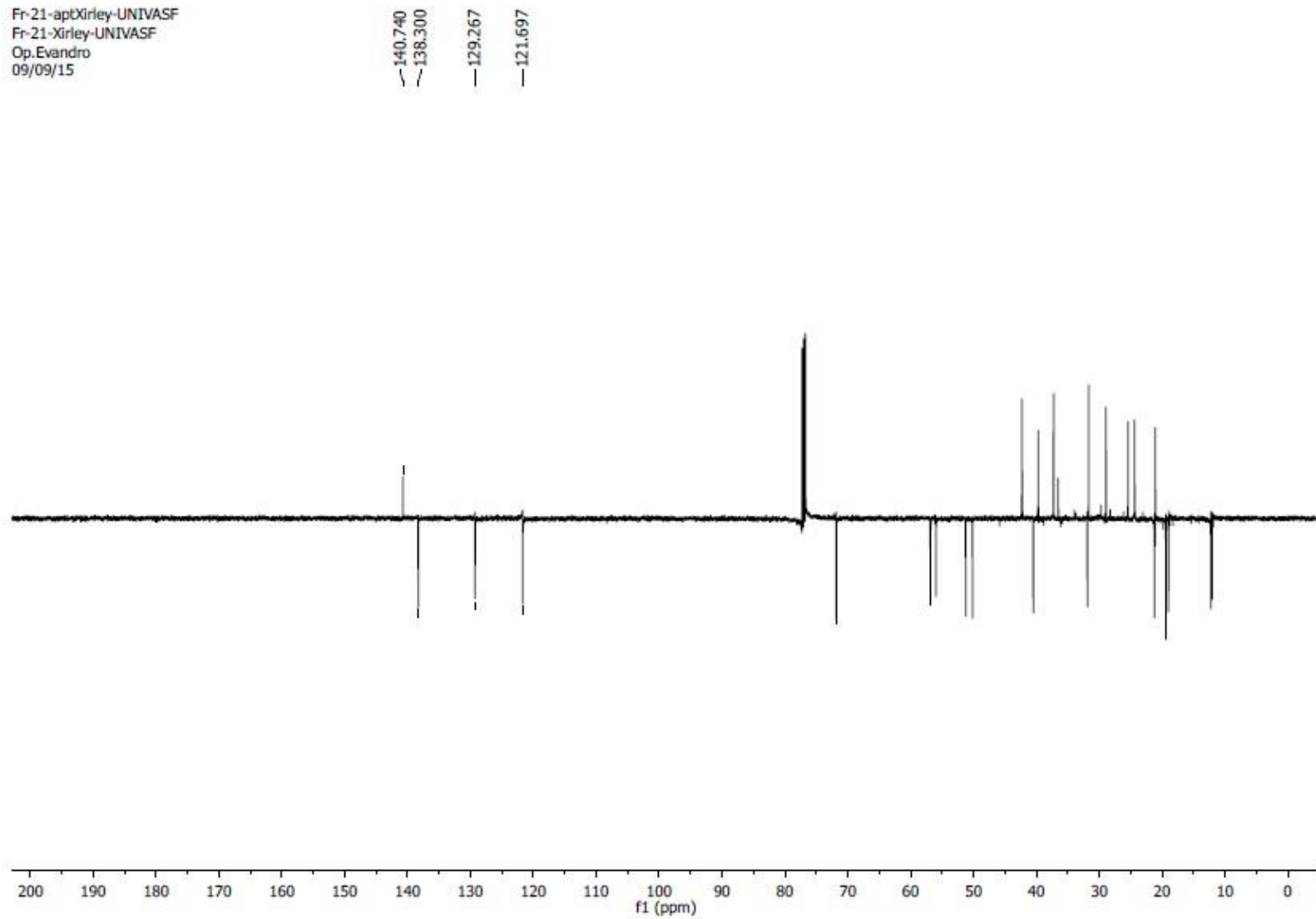


Figura 21. Expansão do espectro de RMN ¹³C/DEPT Q de CC-01 (δ_c 8,0-60,0) (125 MHz, CDCl₃).

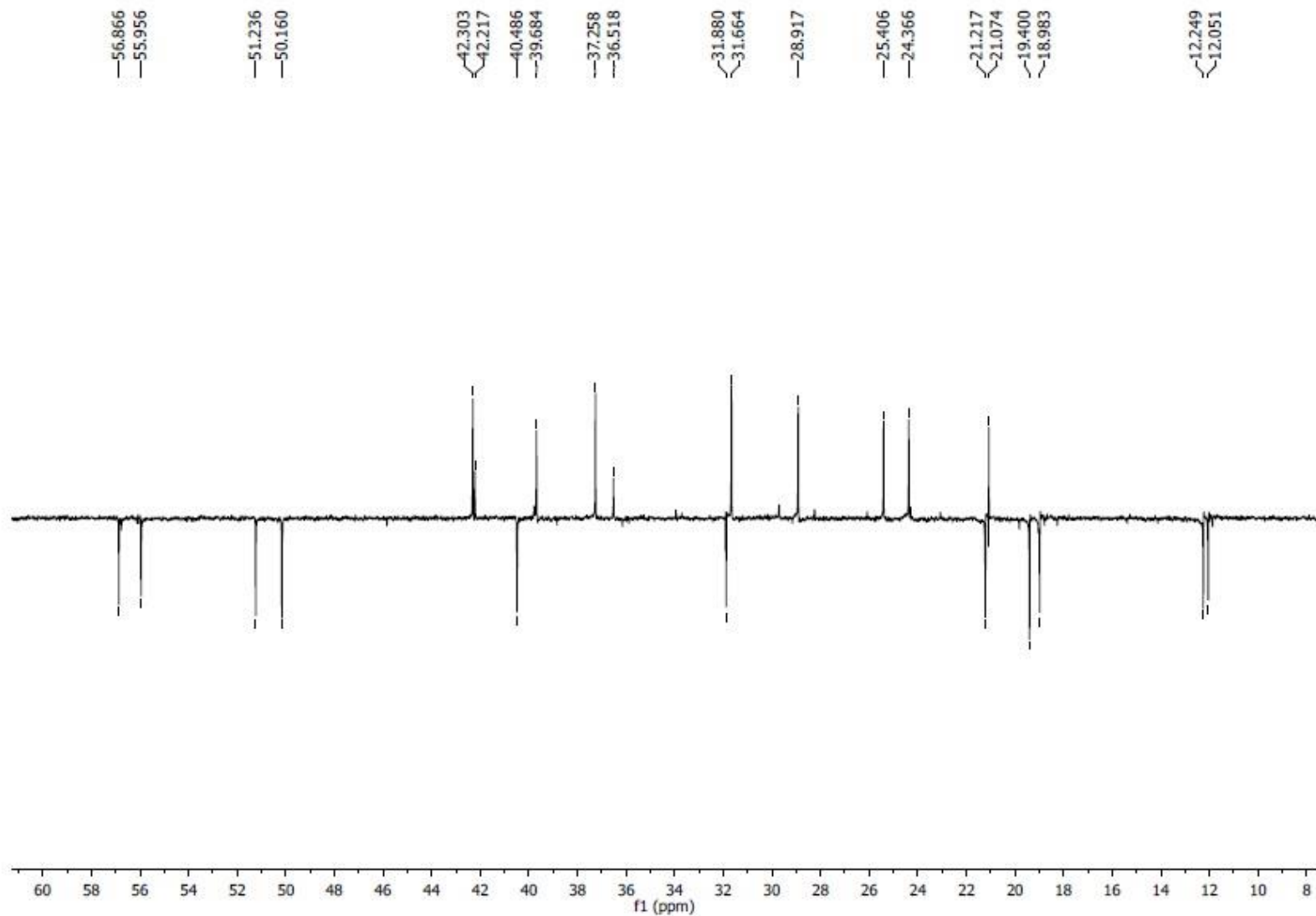


Figura 22. Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ de CC-01 (δ_c 60,0-145,0) (125 MHz, CDCl_3).

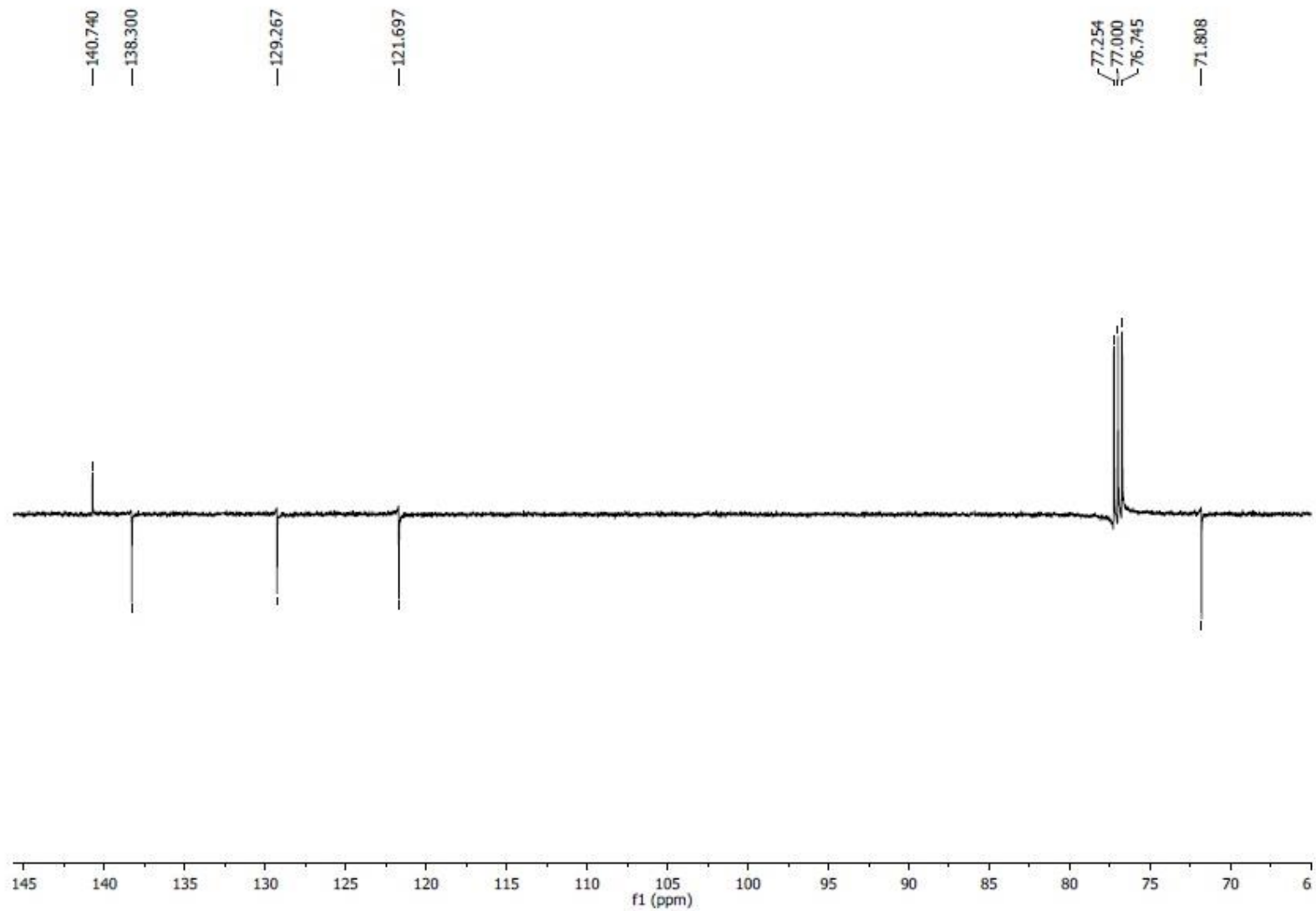


Figura 23. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_{C} 70,0-145,0 e δ_{H} 3,20-5,70. A: Estigmasterol; B: β -sitosterol.

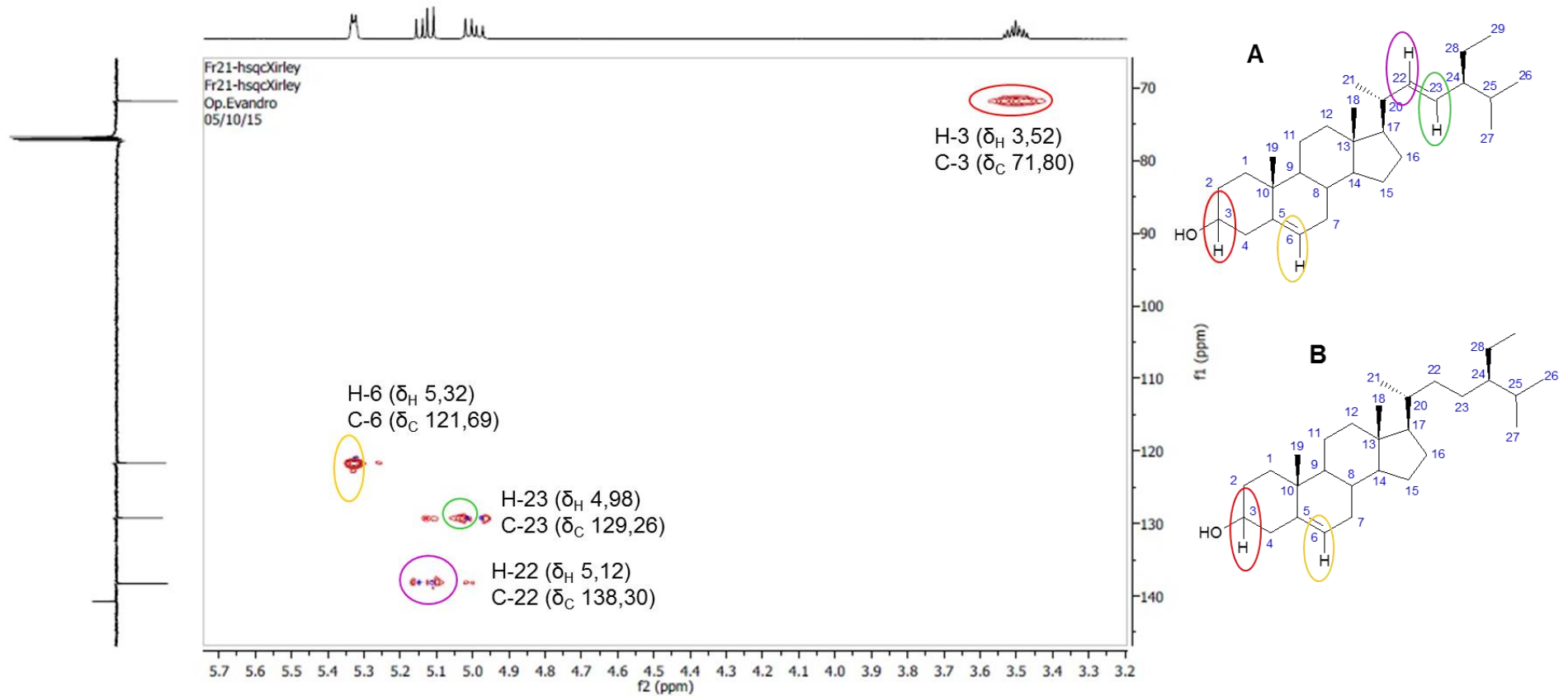


Figura 24. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_c 10,0-60,0 e δ_H 0,50-1,30.
A: Estigmasterol; B: β -sitosterol.

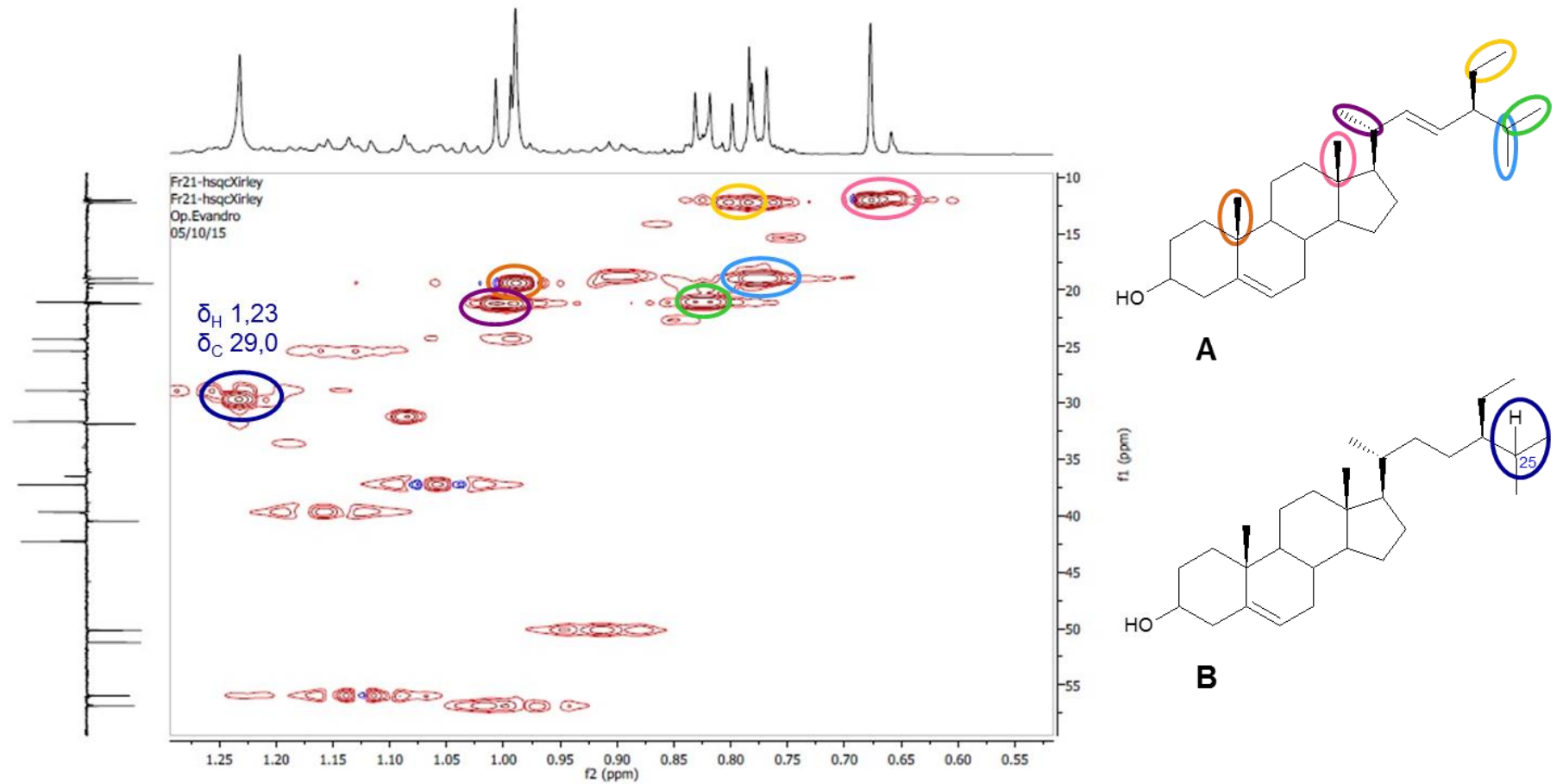


Figura 26. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_c 110,0-155,0 e δ_H 0,50-5,60 e correlações no estigmasterol

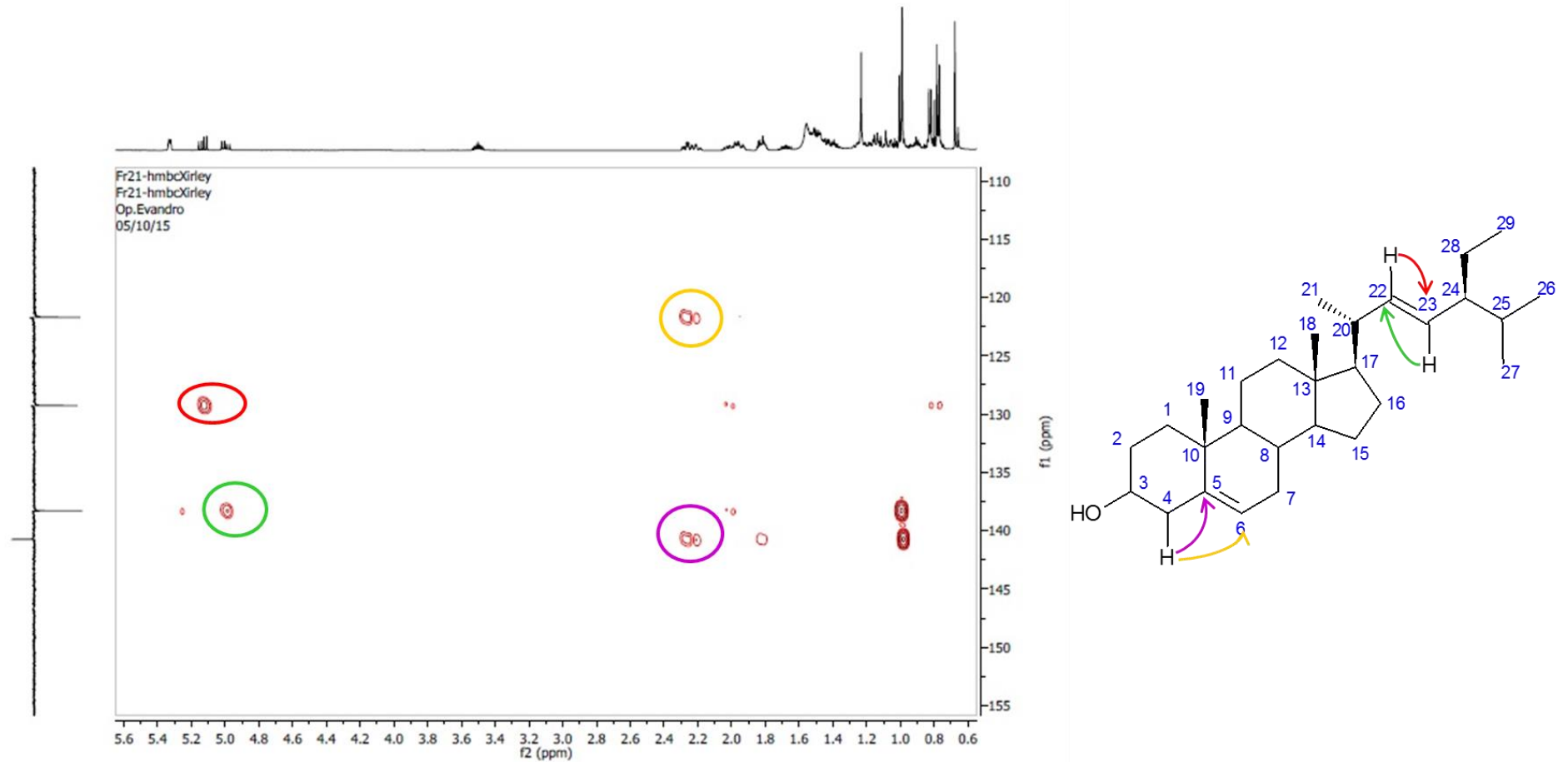


Figura 27. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz) δ_c 0,0-90 e δ_H 0,0-3,0 e correlações no estigmasterol.

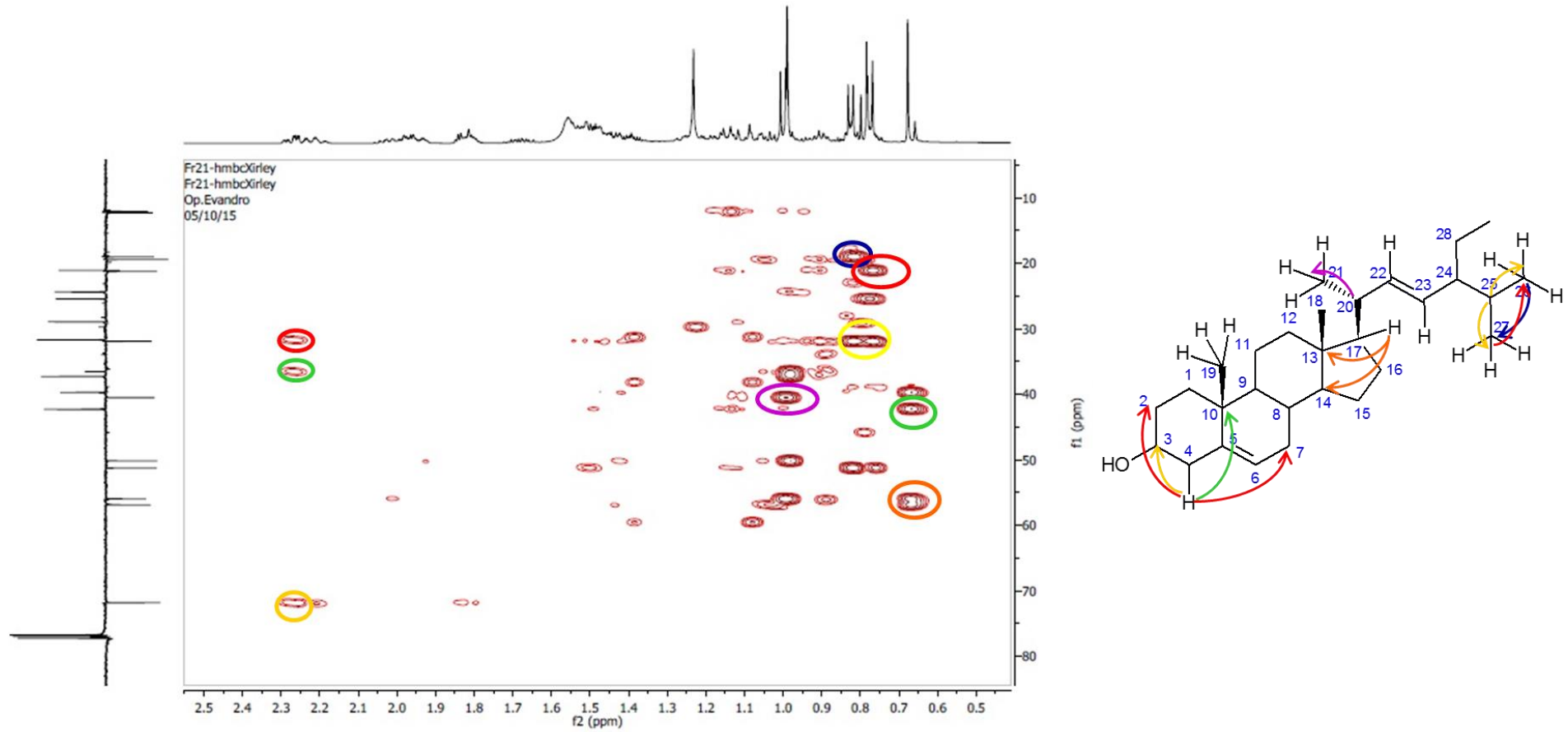


Figura 28. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de Cc-01 (CDCl_3 , 500 MHz) e correlações no estigmasterol.

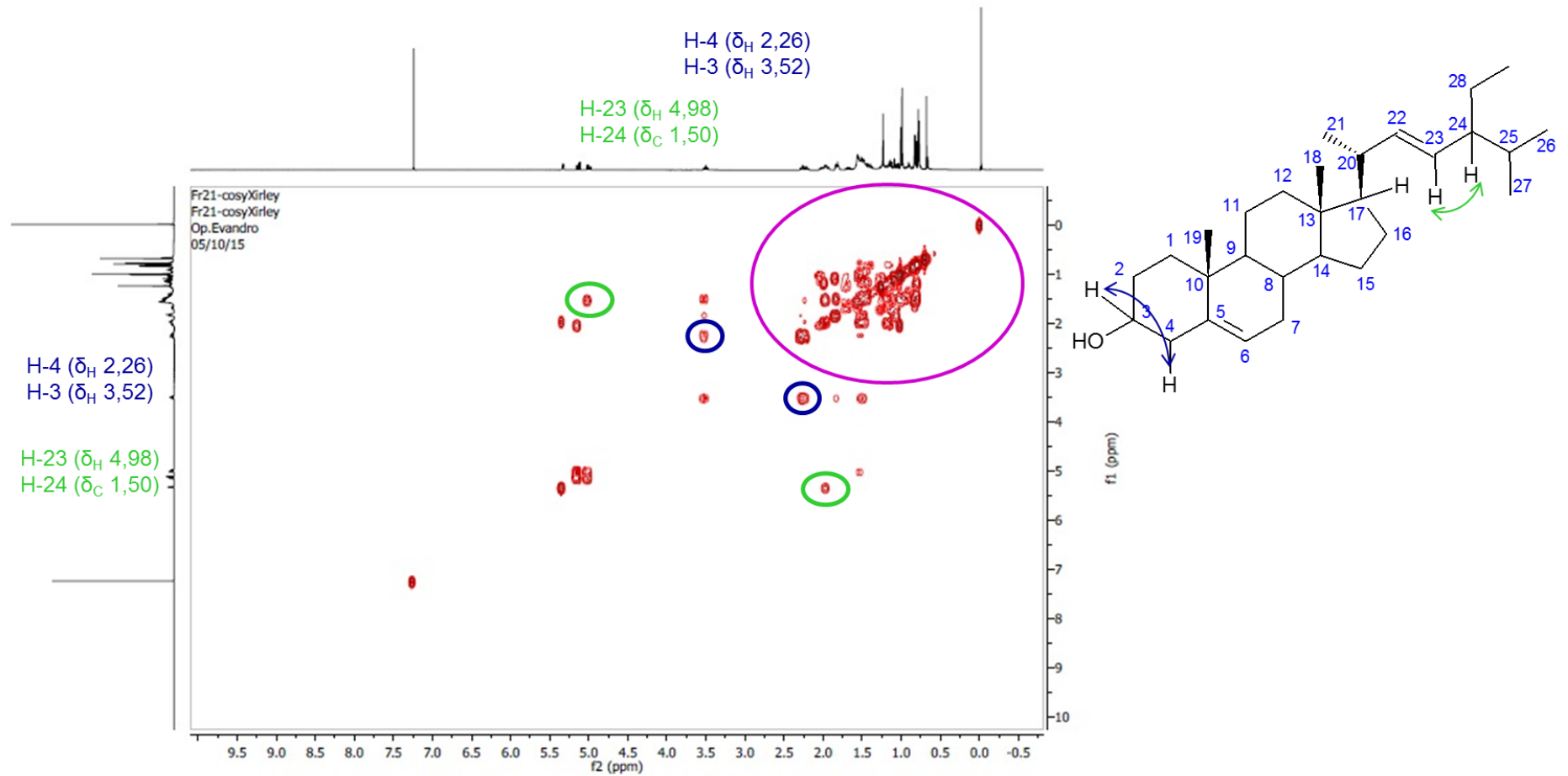


Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Cc-01 referentes ao estigmasterol comparado com dados da literatura (RMN ^1H 400 MHz / RMN ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) (KOJIMA et al., 1990).

Posição	Tipo	δ_{H} CC-01	δ_{C} CC-01	δ_{C} Literatura
C-1	CH_2	1,06 (m)	37,2	37,2
C-2	CH_2	1,08 (m)	31,6	31,6
C-3	CH	3,52 (tdd, $J = 5,0; 11,5; 16$)	71,8	71,8
C-4	CH_2	2,26 (m)	42,3	42,3
C-5	C	-	140,7	140,7
C-6	CH	5,32 (d, $J = 5,5$ Hz)	121,6	121,7
C-7	CH_2	1,08 (m)	31,6	31,9
C-8	CH	1,82 (m)	31,9	31,9
C-9	CH	0,91 (m)	50,1	50,1
C-10	C	-	36,5	36,5
C-11	CH_2	1,42 (m)	21,0	21,1
C-12	CH_2	1,15 (m)	39,7	39,7
C-13	C	-	42,2	42,1
C-14	CH	1,02 (m)	56,8	56,8
C-15	CH_2	1,06 (m)	24,4	24,4
C-16	CH_2	1,26 (m)	28,9	28,9
C-17	CH	1,25 (m)	55,9	55,9
C-18	CH_3	0,67 (s)	12,0	12,0
C-19	CH_3	0,99 (s)	19,4	19,4
C-20	CH	2,03 (m)	40,4	40,5
C-21	CH_3	1,01 (d, $J = 6,5$ Hz)	21,2	21,2
C-22	CH	5,12 (dd, $J = 8,5$ e 15 Hz)	138,3	138,3
C-23	CH	4,98 (dd, $J = 8$ e 15,5 Hz)	129,2	129,2
C-24	CH	1,50 (m)	51,2	51,2
C-25	CH	1,45 (m)	31,8	31,9
C-26	CH_3	0,82 (d, $J = 6,5$ Hz)	21,2	21,1
C-27	CH_3	0,77 (d, $J = 6,5$)	18,9	19,0
C-28	CH_2	1,13 (m)	25,4	25,4
C-29	CH_3	0,79 (d, $J = 7$)	12,2	12,3

Fonte: elaborado pela autora e dados de KOJIMA et al. (1990).

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Cc-01 referentes ao β -sitosterol comparado com dados da literatura (RMN ^1H 400 MHz / RMN ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) (KOJIMA et al., 1990).

Posição	Tipo	δ_{H} CC-01	δ_{C} CC-01	δ_{C} C Literatura
C-1	CH ₂	1,06 (m)	37,2	-
C-2	CH ₂	1,08 (m)	31,6	-
C-3	CH	3,52 (tdd, $J= 5,0; 11,5; 16$)	71,8	-
C-4	CH ₂	2,26 (m)	42,3	-
C-5	C	-	140,7	-
C-6	CH	5,32 (d, $J= 5,5$ Hz)	121,6	-
C-7	CH ₂	1,08 (m)	31,6	-
C-8	CH	1,82 (m)	31,9	-
C-9	CH	0,91 (m)	50,1	-
C-10	C	-	36,5	-
C-11	CH ₂	1,42 (m)	21,0	-
C-12	CH ₂	1,15 (m)	39,7	39,8
C-13	C	-	42,2	42,3
C-14	CH	1,02 (m)	56,8	-
C-15	CH ₂	1,06 (m)	24,4	24,3
C-16	CH ₂	1,26 (m)	28,9	28,2
C-17	CH	1,25 (m)	55,9	56,0
C-18	CH ₃	0,67 (s)	12,0	11,9
C-19	CH ₃	0,99 (s)	19,4	-
C-20	CH	*	36,2	36,1
C-21	CH ₃	1,01 (d, $J= 6,5$ Hz)	18,8	18,8
C-22	CH ₂	0,93 (m)	33,9	33,9
C-23	CH ₂	0,85 (m)	26,1	26,0
C-24	CH	*	*	45,8
C-25	CH	1,23 (s)	29,0	29,1
C-26	CH ₃	0,82 (d, $J= 6,5$ Hz)	19,9	19,8
C-27	CH ₃	0,77 (d, $J= 6,5$)	18,9	-
C-28	CH ₂	1,13 (m)	25,4	23,0
C-29	CH ₃	0,64 (m)	12,0	12,0

Fonte: elaborado pela autora e dados de KOJIMA et al. (1990). *: Sinais não aparecem no espectro de Cc-01.

5.7.2 Elucidação estrutural da substância Cc-02

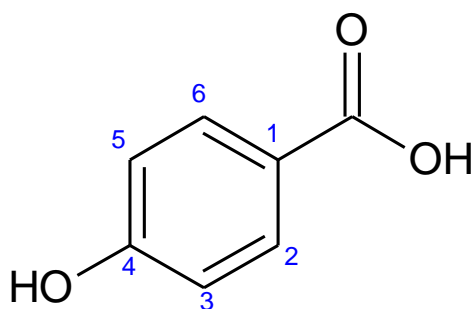
A substância Cc-02 (5,1 mg) foi isolada na forma como um pó amarelo da fração Cc-AcOEt, solúvel em metanol, apresentando fluorescência rosa sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm.

Na análise do espectro de RMN de ^1H da substância (Figura 29, p. 123) apresentou sinais para hidrogênios aromáticos na faixa 6,7 a 8,0 ppm. Observou-se dois dupletos em δ_{H} 6,83 ppm ($J= 8,0$ Hz) e δ_{H} 7,85 ppm ($J= 8,0$ Hz) sugerindo a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído. O duplete δ_{H} 7,85 ppm ($J= 8,0$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-6, mais desprotegidos; já o duplete em δ_{H} 6,83 ppm ($J= 8,0$ Hz) atribuiu-se aos hidrogênios H-3 e H-5. Foi observada ainda a presença de um singleto em δ_{H} 7,54 ppm, referente ao hidrogênio de OH ligado ao C-4.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou cinco sinais na região de carbonos aromáticos, *para*-substituídos. Através do experimento DEPT Q e sua expansão (Figuras 30 e 31, p. 124) foi possível identificar quatro carbonos metilênicos, sendo dois sinais duplicados, em δ_{C} 115,9 ppm (C-3 e C-5) e δ_{C} 133,0 ppm (C-2 e C-6), e dois outros sinais em δ_{C} 122,6 ppm e δ_{C} 163,2 ppm referentes ao C-1 e C-4, respectivamente. Além desses sinais, revelou ainda a presença de um grupo carbonila em δ_{C} 170,1 ppm (C-7).

A partir destes dados foi possível deduzir uma fórmula molecular de $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_3$ (IDH= 4), conduzindo à identificação de Cc-02 como o ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 32, p. 121), confirmado pela comparação com dados da literatura descritos na Tabela 15 (p. 123) (YOSHIOKA et al., 2004).

Figura 32. Estrutura de Cc-02 identificada como o ácido 4-hidroxibenzoico.



O ácido 4-hidroxibenzóico foi isolado de *C. cujete* do extrato metanólico das cascas do caule e apresentou significativa atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *B. subtilis* (CIM= 250 µg/mL para as duas bactérias) (BINUTU, 1997). Comparando com os dados apresentados pelo extrato e frações de *C. cujete* para a atividade antibacteriana, abordada pelo presente estudo, o melhor resultado foi apresentado pela fração Cc-AcOEt, da qual o ácido 4-hidroxibenzóico foi isolado, devendo estar relacionada à presença desse composto na fração.

O ácido 4-hidroxibenzóico é o mais simples dos três componentes da série dos assim chamados ácidos hidroxibenzóicos, tendo sido amplamente demonstrada a ação antioxidante deste tipo de compostos em células em organismos vivos, e especialmente em seres humanos (BRANDÁN et al., 2010). A atividade antioxidante desse e outros ácidos foi comprovada por Tung et al. (2007), indicando que a atividade sequestradora radicais livres dos compostos acontece devido à sua capacidade de dadora de hidrogênio.

A fração Cc-AcOEt, da qual o composto foi isolado, apresentou os melhores resultados da atividade antioxidante pelos dois métodos testados (sequestro do radical livre DPPH e a auto oxidação do β-caroteno), devendo estar relacionada a presença desse e outros ácidos fenólicos na fração.

A atividade fotoprotetora de um extrato vegetal é muito influenciada pela presença, principalmente, de compostos fenólicos (VIOLANTE et al., 2009). Desta forma, sugere-se que o ácido 4-hidroxibenzóico pode ser um dos responsáveis pela atividade demonstrada pela fração Cc-AcOET.

Foi comprovado o efeito hipoglicêmico demonstrado por esse ácido fenólico em ratos normais após a administração oral de 5 mg / kg. Além disso, o composto aumentou os níveis de insulina no soro e conteúdo de glicogênio do fígado em ratos normais (PEUNGVICHA et al., 1998).

Entretanto, o ácido 4-hidroxibenzóico apresentou fitotoxicidade na inibição da germinação de sementes e no crescimento das raízes de plantas (CHEN et al., 2011).

Tabela 15. Dados espectrais de RMN ^1H (δ_{H} , CD_3OD , 200 MHz) e RMN ^{13}C (δ_{C} , CD_3OD , 50 MHz) de Cc-02 e dados comparativos da literatura (YOSHIOKA et al., 2004).

Posição	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
	Cc-02	Literatura	Cc-02	Literatura
1			122,6	122,7
2	7,85 (<i>d</i> ; $J = 8,0$ Hz)	7.87 (<i>d</i> , $J = 8.7$ Hz)	133,1	132,7
3	6,83 (<i>d</i> ; $J = 8,0$ Hz)	6.81 (<i>d</i> , $J = 8.7$ Hz)	115,9	115,7
4			163,2	163,0
5	6,83 (<i>d</i> ; $J = 8,0$ Hz)	6.81 (<i>d</i> , $J = 8.7$ Hz)	115,9	115,7
6	7,85 (<i>d</i> ; $J = 8,0$ Hz)	7.87 (<i>d</i> , $J = 8.7$ Hz)	133,1	132,7
7			170,1	170,0

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H de Cc-02 (CD_3OD , 200 MHz).

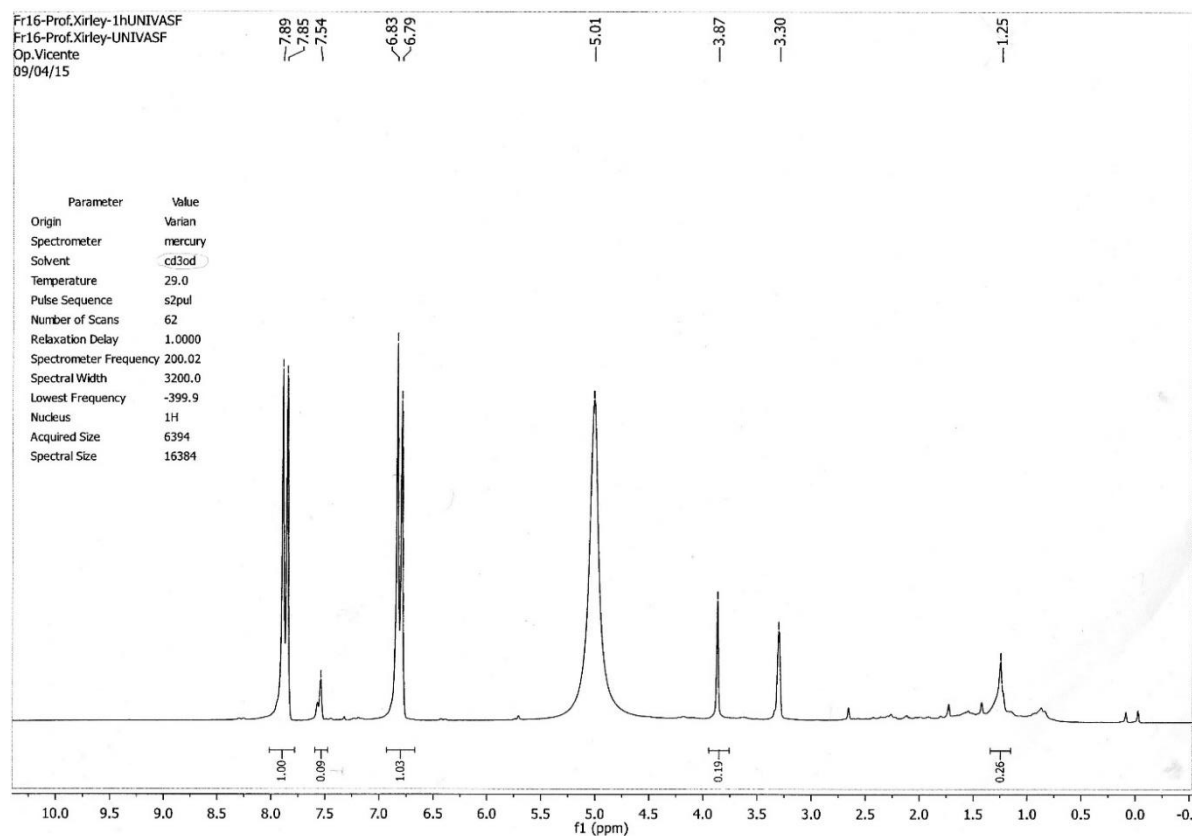


Figura 30. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ de Cc-02 (CD_3OD , 50 MHz).

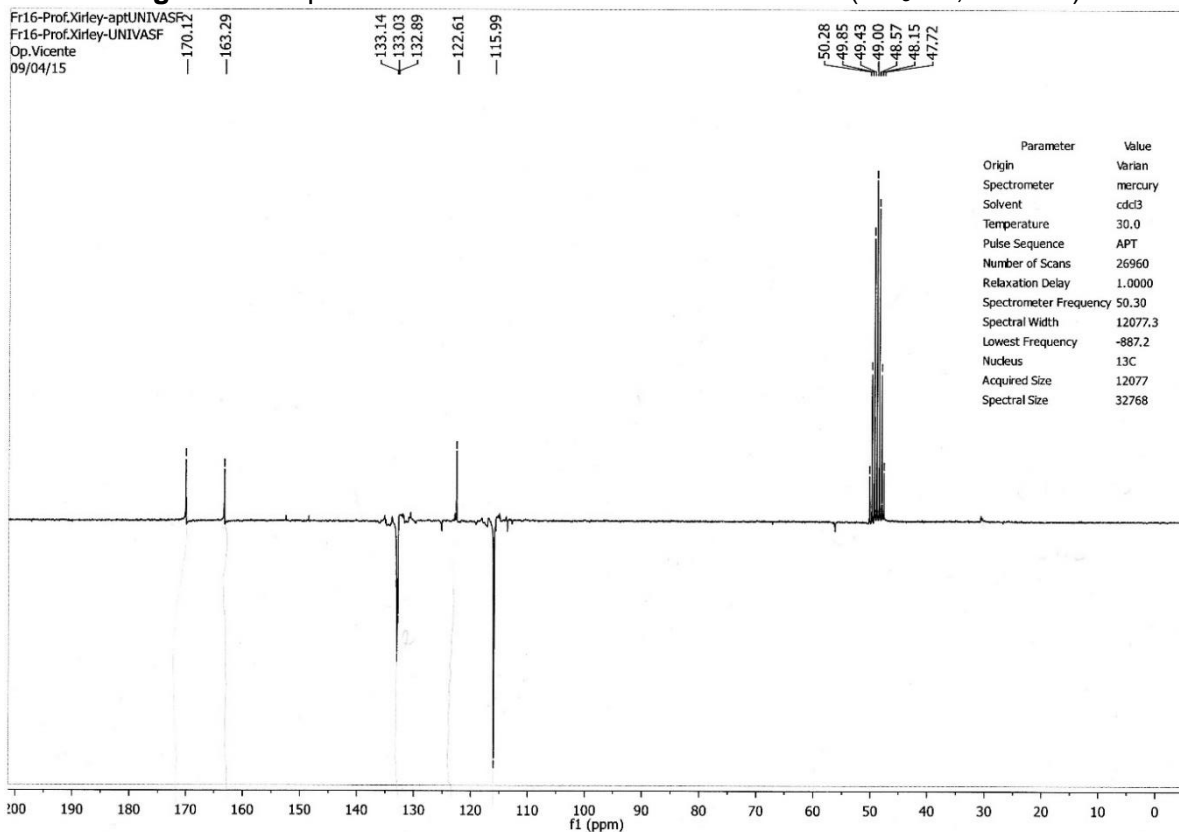
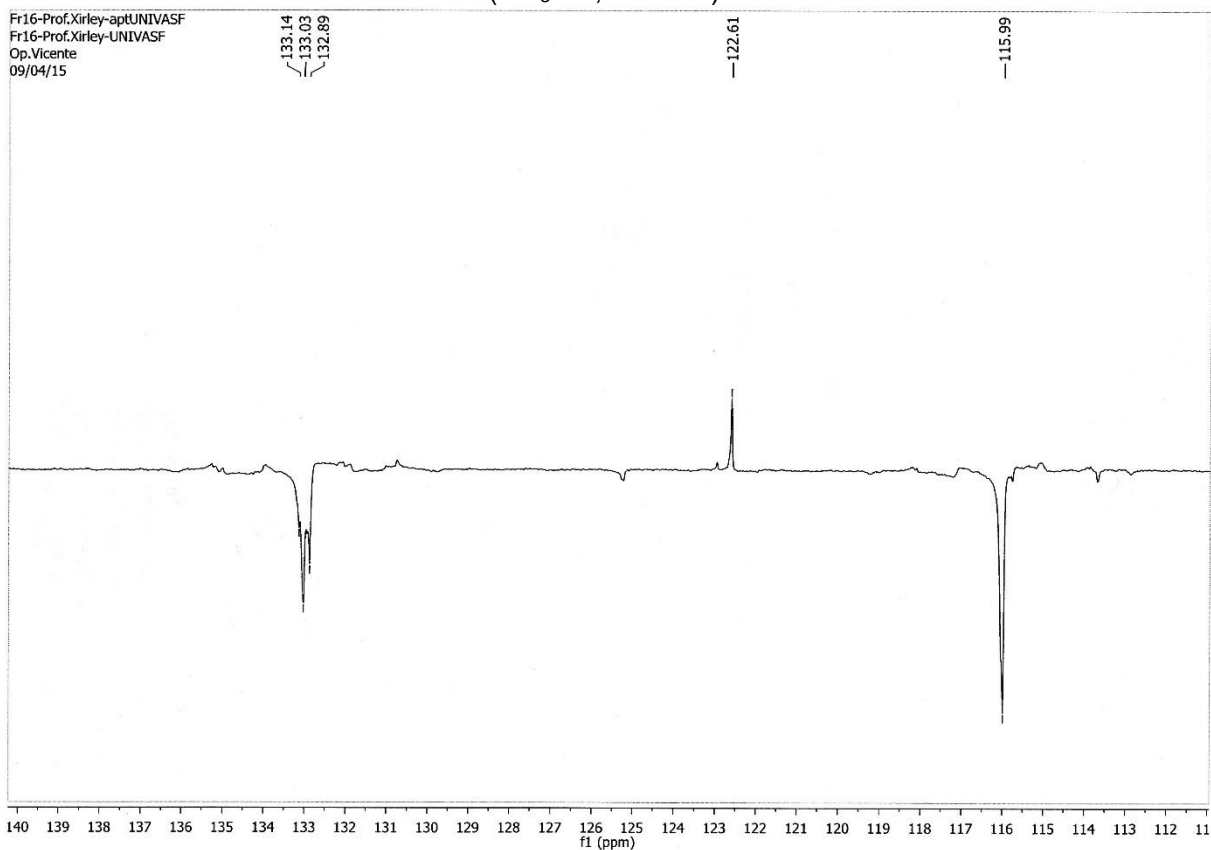


Figura 31. Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT Q}$ δ 111-140 ppm de Cc-02 (CD_3OD , 50 MHz).



5.7.3 Proposta estrutural da substância Cc-03

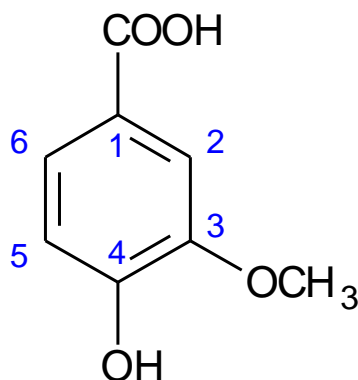
A substância Cc-03 (6,5 mg) apresentou-se como um precipitado sólido em forma de agulhas, de coloração branco amarelada da fração Cc-AcOEt, solúvel em metanol, apresentando fluorescência rosa sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm.

O espectro de RMN ^1H de (200 MHz, CD_3OD , Figura 33, p. 126) apresentou um sinal múltiplo em δ_{H} 7,53-7,56 ppm, correspondentes a dois hidrogênios, os quais, juntamente com um multiplete em δ_{H} 6,83 ppm, foram associados a um anel benzênico tri-substituído, além de um singlete agudo em δ_{H} 3,88 ppm, relacionado a hidrogênios metoxílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou um nível de ruído muito alto, provavelmente devido à baixa quantidade da substância, não sendo possível identificar os valores dos picos correspondentes aos carbonos.

A partir destes dados foi possível propor a identificação de Cc-03 como o ácido vanílico (Figura 34, p. 125) por comparação com dados da literatura, descritos na Tabela 16 (p. 126), sendo a primeira vez que este ácido é relatado para as folhas desta espécie (COLOMBO et al., 2010).

Figura 34. Estrutura proposta para Cc-03: ácido vanílico.



O ácido vanílico foi isolado em *C. cujete* anteriormente através de monitoramento biológico do extrato metanólico das cascas do caule, e mostrou significativa atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *B. subtilis* (CIM= 125 $\mu\text{g/mL}$ e 175 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (BINUTU, 1997). Atividade superior foi demonstrada pela Cc-02 (ácido 4-hidroxibenzoico) isolada da mesma fração e discutida na seção

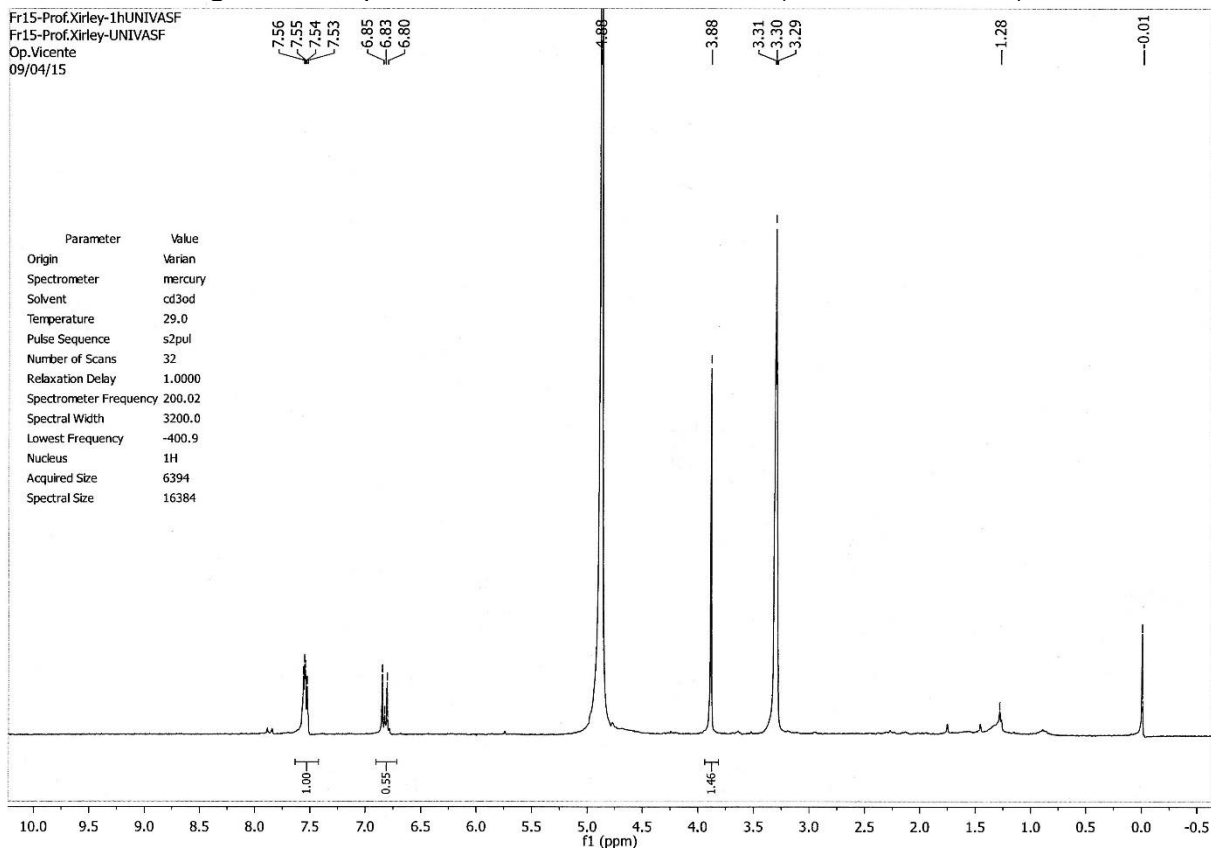
anterior, levando assim à conclusão que a atividade antimicrobiana da fração pode ser proporcionada pela presença de compostos fenólicos.

Tabela 16. Dados espectrais de RMN ^1H (δ_{H} , CD_3OD , 200 MHz) e RMN ^{13}C (δ_{C} , CD_3OD , 50 MHz) de Cc-03 e dados comparativos da literatura (COLOMBO et al., 2010).

Posição	δ_{H} Cc-02	δ_{H} Literatura
1	-	-
2	7,55	7.57 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz)
3	-	-
4	-	-
5	6,83	6.82 (<i>d</i> , $J = 8.0$ Hz)
6	7,55	7,54 (<i>dd</i> ; $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)
OCH_3	3,88 (s)	3,89 (s)

Fonte: elaborado pela autora.

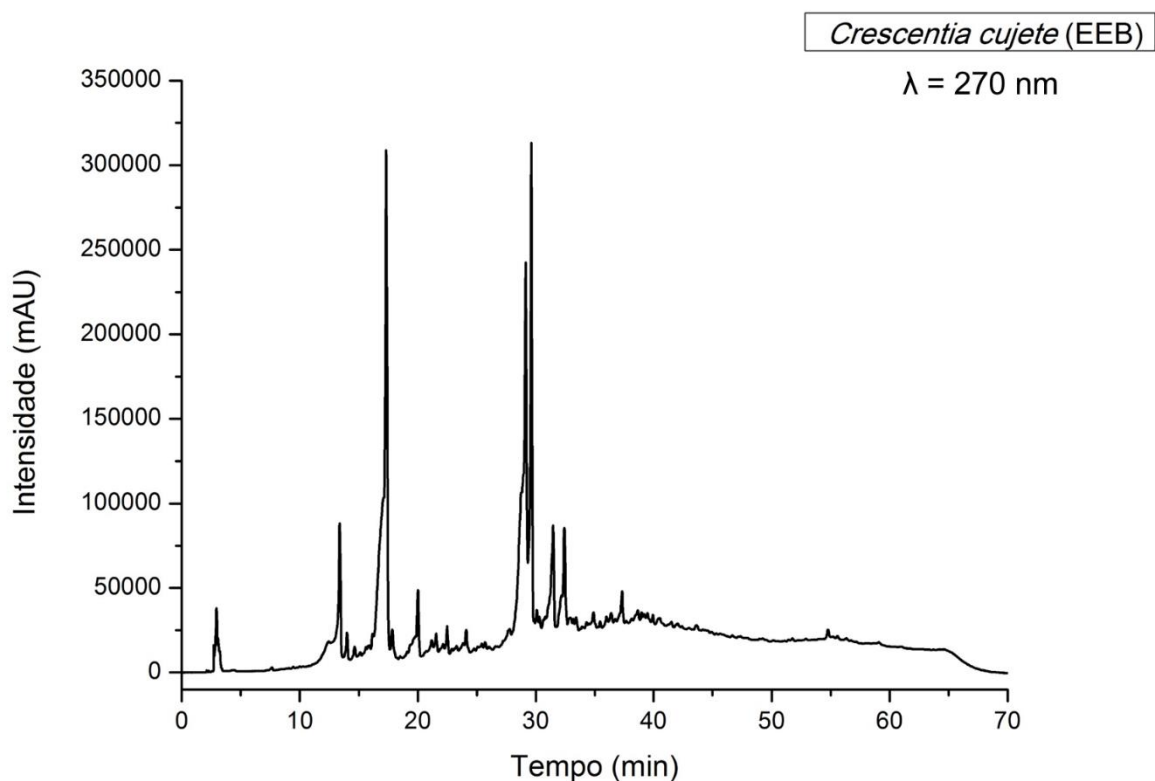
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H de Cc-03 (CD_3OD , 200 MHz).



5.8 Impressão digital de *C. cujete* por CLAE-DAD

No total foram avaliados 9 métodos cromatográficos, identificados de 1 a 9, todos realizados em triplicatas. De acordo com os parâmetros de avaliação o melhor método foi o 9 (fluxo 1,2 mL/min e tempo de gradiente de 50 min) que apresentou o maior valor no cálculo da função hierárquica de resposta cromatográfica (FHCR), com 143,001,262.5 (Figura 35, p. 127). De acordo com o observado na impressão digital, o Cc-EEB demonstra uma composição complexa com vários picos em diferentes tempos de absorção, apresentando picos mais pronunciados entre 10 e 40 minutos.

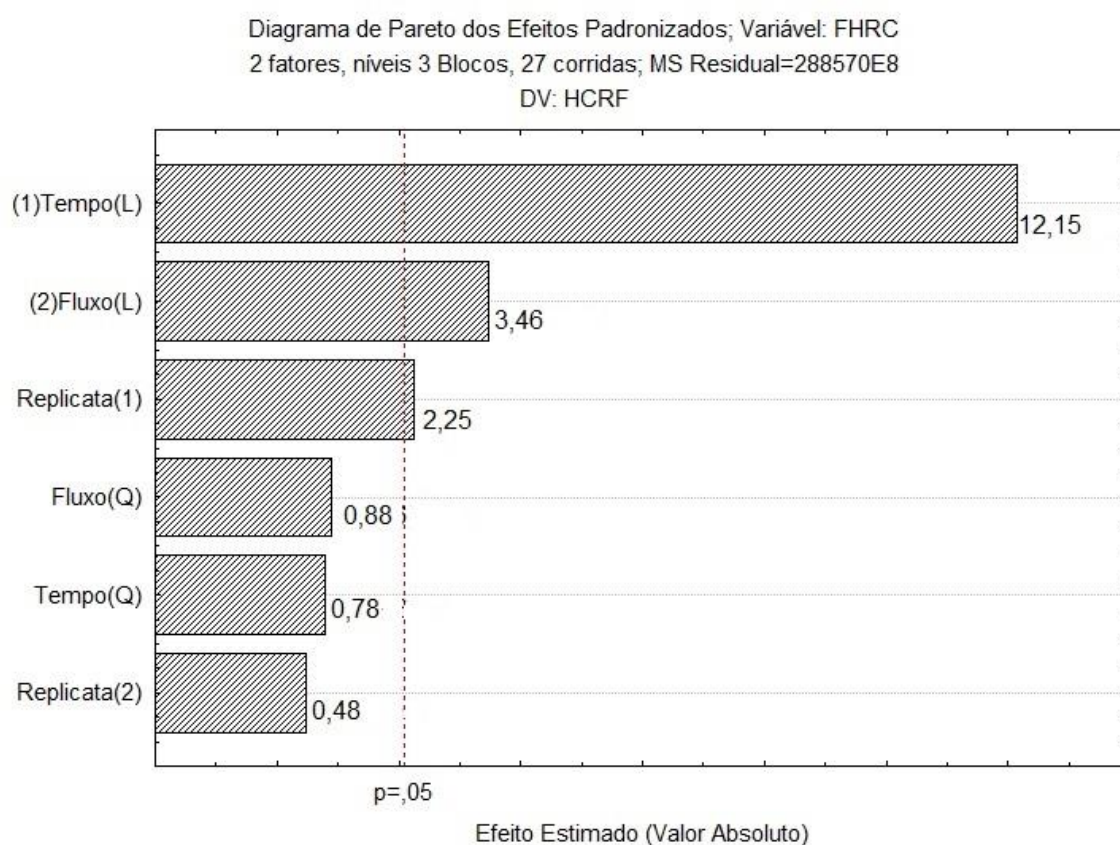
Figura 35. Impressão digital de *C. cujete* obtido em CLAE-DAD (fluxo 1,2 mL/min; tempo de corrida 50 min).



Os resultados são melhor observados a partir da análise estatística realizada graficamente onde é possível observar os fatores que influenciaram a melhor separação cromatográfica. Os resultados da análise fatorial para determinar a influência das variáveis independentes: fluxo e tempo em três níveis (30, 40 e 50 min) estão representados no diagrama de Pareto dos efeitos principais, no gráfico de superfície de resposta e no gráfico de probabilidade normal dos resíduos.

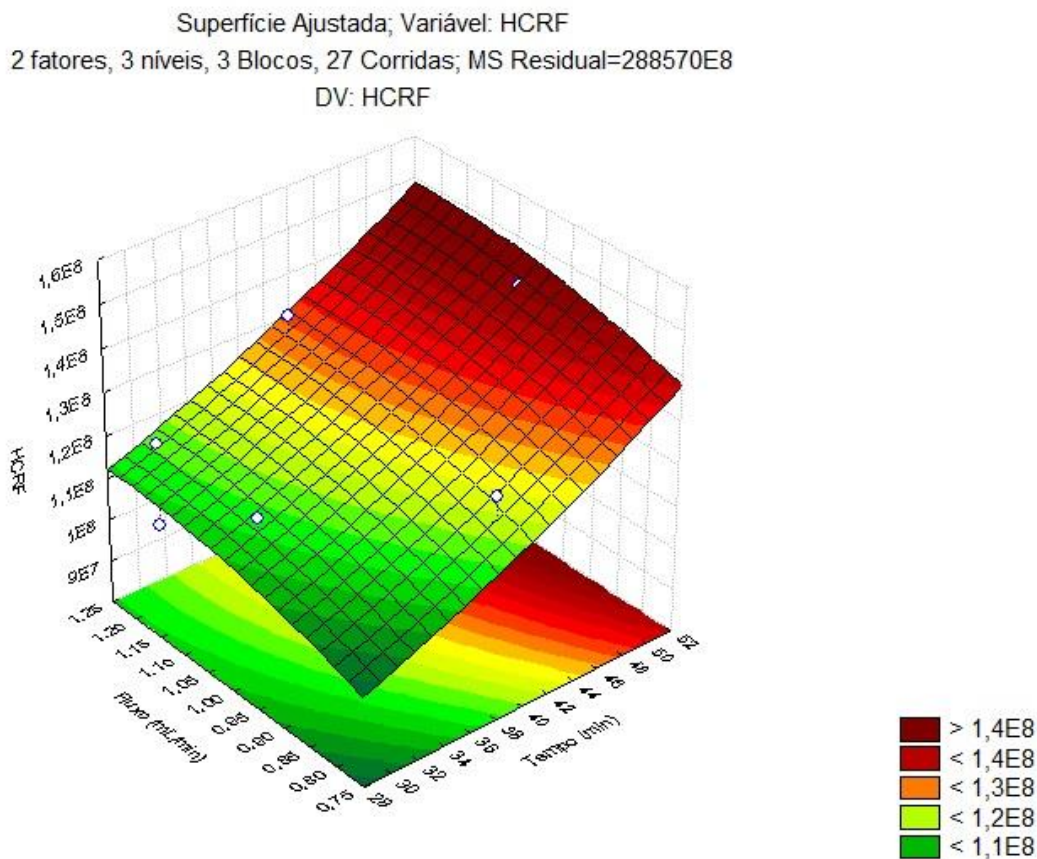
O diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes, sendo que os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória ($p= 0,05$) devem ser considerados como significativo no modelo matemático (Figura 36, p. 128) (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Desta forma, o método de otimização revelou importância estatística para os termos lineares de ambas as variáveis independentes, principalmente o tempo da análise, mostrando ser o principal fator para obtenção da impressão digital de *C. cujete*. Entre os termos quadráticos, nenhuma das variáveis foram estatisticamente significativas.

Figura 36. Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial realizado.



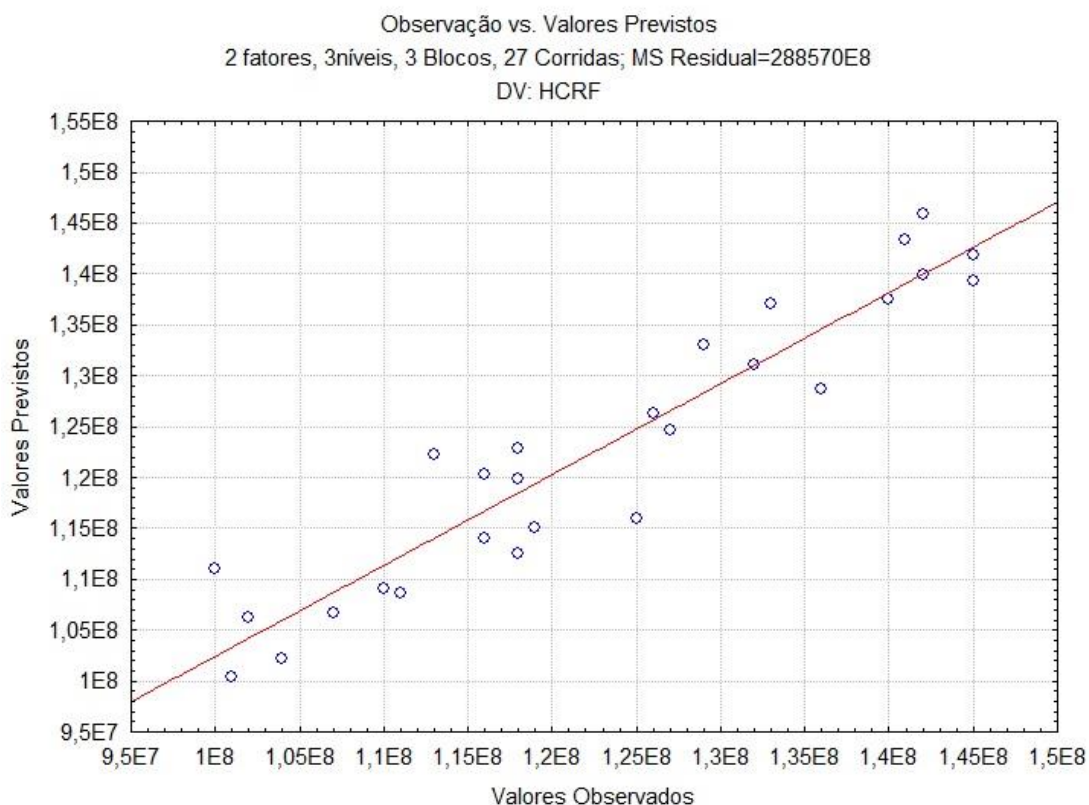
Legenda: L = termo linear; Q = termo quadrático.

O gráfico da superfície de resposta mostra o plano envolvendo as variáveis, no qual os locais mais escuros demonstram os fatores que mais influenciam no FHCR, como observado na Figura 37 (p. 129). A análise desse gráfico evidenciou que há influência de ambas as variáveis analisadas: com o aumento do fluxo e do tempo de análise, verificou-se aumento na resposta do método (valores de FHCR), mas esse aumento é muito mais pronunciado quando se eleva a o tempo de análise.

Figura 37. Superfície de resposta obtida através da análise fatorial em valores do HCRF.

Ao final de qualquer planejamento se faz necessário verificar a adequação do método matemático obtido e a validade das suposições feitas, que pode ser observado no gráfico de probabilidade normal dos resíduos. De acordo com este gráfico, quanto mais próximos os pontos experimentais estiverem da linha contínua, mais será válida a suposição de normalidade dos resíduos (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Com relação a Figura 38 (p. 130), pode-se dizer que os resíduos seguem uma distribuição normal.

A impressão digital de uma planta medicinal é um cromatograma (ou eletroferograma) representando todos os componentes químicos detectáveis presentes no extrato e sendo separados tanto quanto possível, de modo a identificar e caracterizar a planta medicinal. De forma geral, a impressão digital de um extrato vegetal pode ser considerado representativo da complexidade química dessa amostra, guardadas as devidas ressalvas em relação ao método específico escolhido, bem como as limitações do detector utilizado (PRADO et al., 2012; XU et al., 2006).

Figura 38. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos.

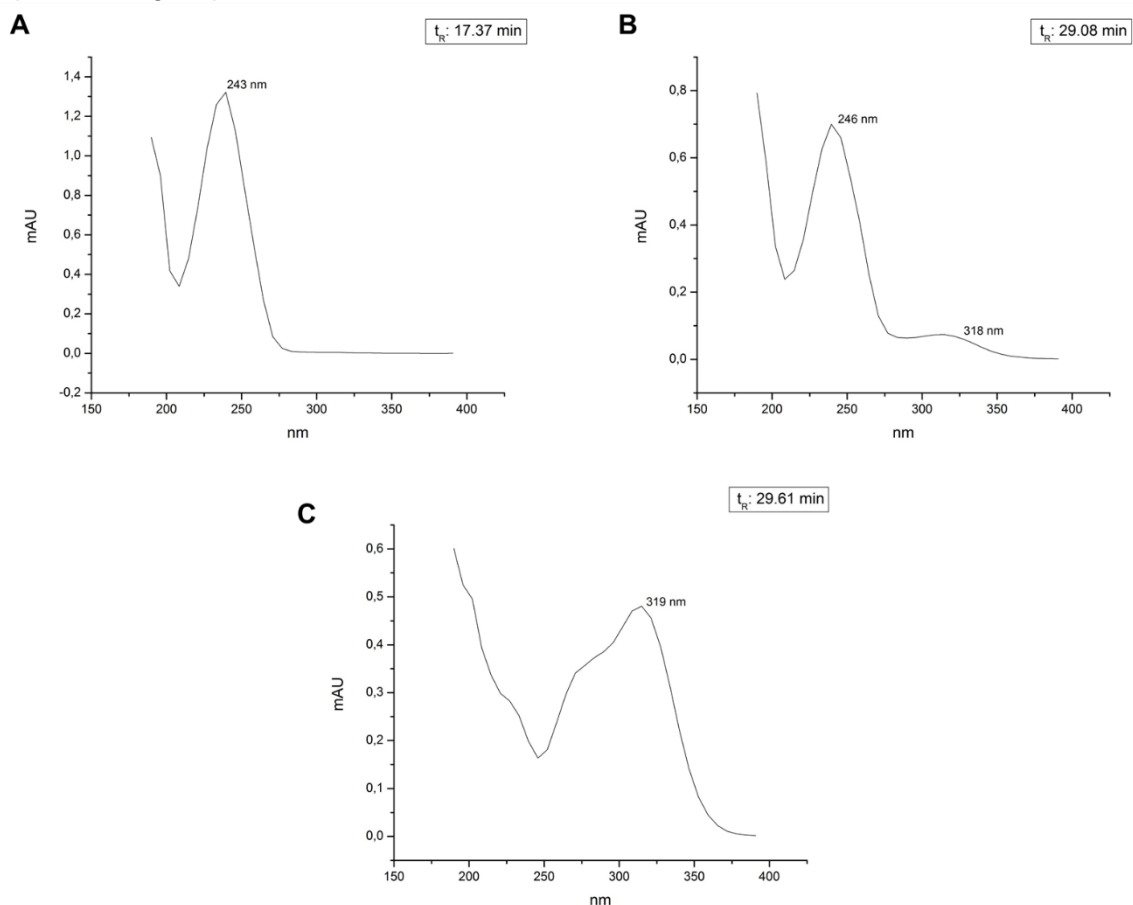
A partir do cromatograma obtido, foi realizado uma busca pelos picos correspondentes aos padrões analíticos disponibilizados pelo CAFMA. Dos 24 padrões analisados, não foi encontrado nenhum pico que correspondesse ao tempo de retenção e região de absorção no UV dos padrões analíticos.

Analisando os maiores picos apresentados na impressão digital, detectado nos tempos de absorção 17.37 min, 29.08 min e 29.61 min, possuem absorção máxima no UV (λ_{\max}) em 243 nm, 246/318 nm, e 319 nm, respectivamente (Figura 39, p. 131).

Os polifenóis absorvem na região do ultravioleta e, tradicionalmente, têm sido analisados por DAD após separação por HPLC. Os compostos polifenólicos são então classificadas com base nos seus índices de retenção e espectros de UV-vis característicos (AABY; EKEBERG; SKREDE, et al., 2007). Os ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico apresentam o λ_{\max} na faixa de 200 a 290 nm, com exceção do ácido genticóico que tem uma absorbância que se estende até 355 nm. Já os derivados do ácido cinâmico têm uma banda adicional de absorção entre 270 e 360 nm, devido a maior extensão de conjugação do sistema cinamoil que suas estruturas possuem de maneira semelhante aos flavonoides (ROBBINS, 2003). Desta forma, pode-se dizer que os picos majoritários são correspondentes a ácidos fenólicos,

principalmente os picos que apresentaram apenas uma região de absorção máxima, indicando a presença de um anel aromático, característico de ácidos fenólicos.

Figura 39. Espectro de UV e tempo de retenção dos picos majoritários apresentados na impressão digital por CLAE-DAD.



Legenda: **A** = t_R : 17.37 min; (λ_{max}): 243nm; **B** = t_R : 29.08 min; (λ_{max}): 246 e 318 nm; **C** = t_R : 29.61 min; (λ_{max}): 319 nm.

A impressões digitais têm sido recentemente aceita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma estratégia para a avaliação da qualidade das plantas medicinais. É muito importante para plantas medicinais porque a proporção da concentração de constituintes de massa podem representar diferentes efeitos terapêuticos. Assim, a impressão digital cromatográfica se apresenta mais válida e eficiente do que os métodos tradicionais de controle de qualidade de fitoterápicos (XU et al., 2006; YANG et al., 2005).

Diversos trabalhos na literatura mencionam o uso de impressões digitais como um método que pode avaliar a relação entre a informação química e as características de cada amostra vegetal, tais como a diferenciação entre espécies botanicamente

semelhantes, a variabilidade entre plantas coletadas em diferentes locais geográficos, sob diferentes condições climáticas e de cultivo. Com a ajuda da impressão digital, a identificação e autenticação de uma planta medicinal pode ser conduzido de forma confiável, mesmo se a qualidade e quantidade dos constituintes sejam desconhecidos. Assim, para avaliar a qualidade de uma planta medicinal, pode-se considerar vários constituintes nos extratos vegetais, em vez de apenas um ou dois marcadores para avaliar a qualidade na abordagem convencional (PRADO et al., 2012; XU et al., 2006).



6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O estudo realizado com as folhas de *C. cujete* foi monitorado primeiramente por análises preliminares da composição química do extrato e frações. A triagem fitoquímica qualitativa traçou o perfil químico dos compostos presentes nas folhas de *C. cujete*, indicando a forte presença de mono, sesqui e diterpenos, e outras das classes das lignanas e derivados antracênicos, e ainda presença moderada de compostos fenólicos, cumarinas, triterpenos e esteroides.

A determinação do teor de fenóis e flavonoides totais mostrou que *C. cujete* contém constituintes fenólicos, com uma concentração maior dessas substâncias nas frações Cc-EEB, Cc-CHCl₃ e Cc-AcOEt.

O estudo fitoquímico das folhas de *C. cujete* resultou no isolamento e identificação da mistura dos esteroides estigmasterol com β -sitosterol proveniente da fração clorofórmica, e do ácido 4-hidroxibenzóico, um ácido fenólico isolado da fração acetato de etila. Um precipitado surgiu após processo cromatográfico de uma amostra da fração acetato de etila, e foi proposto como sendo o ácido vanílico por comparação com dados de RMN ¹H com a literatura.

Os compostos isolados no presente estudo já foram relatados em trabalhos anteriores realizados *C. cujete*, entretanto, é a primeira vez que os ácidos fenólicos citados são isolados das folhas dessa espécie, contribuindo assim com os conhecimentos quimiotaxômicos sobre *C. cujete*.

A avaliação da atividade antioxidante demonstrou que os extratos e frações de *C. cujete* são mais eficazes em prevenir a oxidação de compostos em meios oxidáveis, como o β -caroteno na presença do ácido linoleico, principalmente as frações Cc-CHCl₃ e Cc-AcOEt, e pouco eficientes em sequestrar radicais livres, como o DPPH.

O estudo da atividade fotoprotetora demonstrou que o extrato e frações de *C. cujete* foram capazes de absorver a radiação da região UVA e UVC, não mostrando eficiência em absorver a radiação UVB, região causadora de danos agudos na pele e o alvo de proteção dos produtos cosméticos de acordo com a ANVISA. Assim, os valores de FPS foram pouco significativos tanto para o extrato como para as frações, se comparado aos oferecidos pelos produtos disponíveis no mercado, fazendo-se necessárias altas concentrações para a fotoproteção desejada, que pode possibilitar

a ocorrência de processos alérgicos e elevado custo do produto final. Destaca-se que o ensaio da atividade fotoprotetora é inédito para a espécie.

Na avaliação da atividade antibacteriana o extrato e as frações das folhas de *C. cujete* foram mais sensíveis às bactérias Gram-positivas, apresentando ação antibacteriana moderada contra *S. aureus* 6538 por Cc-Hex e Cc-AcOEt, *S. epidermidis* por Cc-EEB e Cc-AcOEt e frente a *K. pneumoniae* pela fração Cc-MeOH.

Diante dos ensaios biológicos *in vitro* realizados com as folhas de *C. cujete* foi possível observar que os resultados podem estar relacionados aos compostos químicos isolados e identificados pelos testes preliminares, dando base para a realização de estudos subsequentes para avaliação de possíveis atividades anti-inflamatória, citotóxica, antifúngica, entre outras.

A impressão digital obtida pela técnica de CLAE-DAD mostrou que o melhor cromatograma do extrato bruto das folhas de *C. cujete* pode ser obtido com um fluxo de 1,2 mL/min, no tempo de análise de 50 min, empregando como fase móvel um gradiente com ácido trifluoracético (TFA) a 0,01%, e acetonitrila grau HPLC, sendo um experimento realizado de forma inédita para a espécie e de grande importância pois identifica e caracteriza a planta medicinal a partir da representação e separação de todos os componentes químicos detectáveis presentes no extrato. Os três picos majoritários apresentados pelo cromatograma referem-se a ácidos fenólicos de acordo com a análise das absorções no UV.

O estudo químico e biológico das folhas de *C. cujete* que trata o presente estudo, estão de acordo com os resultados demonstrados pela literatura, e contribuem com novos conhecimentos de ensaios inéditos que foram realizados, sendo este o primeiro estudo com a espécie aclimatada na caatinga.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **J Agr Food Chem**, v. 55, n. 11, p. 4395-4406, 2007.

AGARWAL, K.; POPLI, S. P. The constituents of *Crescentia cujete* leaves. **Fitoterapia**, v. 63, p. 476, 1992.

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 594-602, 2005.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J Agr Food Chem**, v.49, p. 4168-4170, 2001.

ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **Int J Pharm Bio Sci**, v. 2, n. 4, p. 367-374, 2011.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANDRADE, S. E. O. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade Várzea Comprida dos Oliveiras, Pombal, Paraíba, Brasil. **Rev Verde Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 46-52, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Rev Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ARANGO-ULLOA, J. et al. Diversity of the calabash tree (*Crescentia cujete* L.) in Colombia. **Agr Syst**, v. 76, n. 3, p. 543-553, 2009.

ARAÚJO, I.S. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Aromáticas que Ocorrem no Estado do Pará**. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Univerisade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

ASSIS, T. S. et al. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesqui Vet Bras**, v. 29, n. 11, p. 919-924, 2009.

AUTORE, G. et al. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. **Life Sci**, v. 70, n. 5, p. 523-534, 2001.

AZEVEDO, C. F. et al. Germinação de sementes de cabaça em diferentes substratos e temperaturas. **Braz J Agr Sci**, v. 5, n. 3, p. 354-357, 2010.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: LTC, v. 3, 1986.

BERMÚDEZ, A.; VELÁZQUEZ, D. Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. **Rev Facultad Farmacia**, v. 44, n. 2, p. 1-6, 2002.

BINUTU, O. A. Phytochemical and antimicrobial studies on *Crescentia cujete*. **Fitoterapia**, v. 68, n. 2, 1997.

BINUTU, O. A.; LAJUBUTU, B. A. Potenciais antimicrobiana de algumas espécies vegetais da família Bignoniaceae. **Afr Med J Med Sci**, v. 23, n. 3, 1994.

BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 12, 2011.

BRANDÁN, S. A. et al. Theoretical and experimental vibrational spectrum study of 4-hydroxybenzoic acid as monomer and dimer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 5, p. 1422-1434, 2010.

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

BREDA, M. C. **Fitoesteróis e os benefícios na prevenção de doenças: uma revisão**. 2010. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BRITO, M.R.; SENNA-VALLE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Act Bot Bras**, v. 25, n. 2, p. 363-372, 2011.

BRUFAU, G.; CANELA, A. M.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, New York, v. 28, n. 4, p. 217-225, 2008.

BURGER, W.; GENTRY, A.H. *Crescentia* Linnaeus. In: BURGER, W. (ed). Flora Costaricensis. **Fieldiana**, vol. 41, p. 118–121, 2000.

BURIOL, L. et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: An alternative to ethanolic extract. **Quím Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003, 260p.

CAVALCANTE, G. M. et al. Atividade antimicrobiana de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Sci Plena**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2013.

CIPRIANI, F. A. et al. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. **Quim Nova**, v. 35, n. 11, p. 2125-2131, 2012.

CHANG, NI-BIN et al. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. **Int J Hyg Env Health**, v.213, n.5, p.359-368, 2010.

CHAUHAN, S.; CHAUHAN, S. V. S. Antimicrobial activity of some plants of Bignoniaceae family. **Plant Med**, v. 4, n. 3, 2012.

CHEN, Y. et al. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. **Applied Soil Ecology**, v. 51, p. 102-110, 2011.

CHOZE, R. **Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas**. 2013. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CHOU DHURY, S. et al. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae - A review. **Assam University J Sci Tech**, v. 7, n. 1, p. 145-150, 2011.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI Document M07-A9. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 6 ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.

COE, F. G. et al. The good and the bad: Alkaloid screening and brineshrimp bioassays of aqueous extracts of 31 medicinal plants of eastern Nicaragua. **Pharm Biol**, v. 50, n. 3, p. 384-392, 2012.

COLLINS, C.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. p. 274-398.

COLOMBO, R. et al. Validated high-performance liquid chromatographic method for the standardisation of *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae, commercial extracts. **Rev Bras Farmacogn**, v. 20, n. 5, p. 781-788, 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia University Press, 1981.

CUEVAS-JUÁREZ, E. et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. **J Funct Foods**, v. 9, p. 78-88, 2014.

D' ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DAS, N. et al. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. **BMC Compl Alt Med**, v. 14, n. 1, p. 45, 2014.

DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Quím Nova Esc**, v. 7, 1998.

DELMONDES, P. H. et al. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Rev Elet Interdiscip**, v. 1, n. 9, 2013.

DUARTE, S. M.S. et al. Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 29, n. 4, p. 703-708, 2009.

DUARTE, M. C. T., 2007. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, p. 1-16, 2007.

DUFOURC, E.J. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 2, p. 133-134, 2008.

DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás.** 2009. 112p. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) - Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, 2009.

EJELONU, B. C. et al. The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). **Afr J Biotechnol**, v. 10, n. 84, p. 19631-19636, 2011.

ELIAS, T.S.; PRANCE, G.T. Nectaries on the fruit of *Crescentia* and other Bignoniaceae. **Brittonia**, v. 30, n. 2, p. 175-181, 1978.

ESPITIA-BAENA, J. E. et al. Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). **Rev Cub Plant Med**, v. 16, n. 4, p. 337-346, 2011.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quim Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829-1829, 2010.

FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. In: KADEREIT, J.W. **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer-Verlag, p. 9-38, 2004.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Quim Nova**, v. 28, n. 4, p. 610-613, 2005.

GARCEZ, W. S. et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Rev Virt Quim**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P.U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología)**, v. 2, n. 3, 2009.

GENTRY, A.H. A synopsis of Bignoniaceae ethnobotany and economic botany. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 53-64, 1992.

GENTRY, A.H. **Bignoniaceae - Part I** (Crescentieae and Tourretieae). Flora Neotropica. Monogr. 25. New York: The New York Botanical Garden, 1980.

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

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Quim Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

HELTZEL, C.E. et al. Bioactive furanonaphthoquinones from *Crescentia cujete*. **J Nat Prod**, v. 56, n. 9, p. 1500-1505, 1993a.

HELTZEL, C. E. et al. Furofuranonaphthoquinones: bioactive compounds with a novel fused ring system from *Crescentia cujete*. **Tetrahedron**, v. 49, n. 31, p. 6757-6762, 1993b.

HVASF. **Ex_22603_Ft_01. 2015**. Disponível em:
<http://www.univasf.edu.br/~hvasf/images/banco_imagens/Ex_22603_Ft_01.jpg>.
Acesso em: 25 Jan. 2015.

JAMALUDDIN, F.; MOHAMED, S.; LAJIS, M. N. Hypoglycaemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of β -sitosterol and stigmasterol. **Food Chem**, v. 49, n. 4, p. 339-345, 1994.

JI, Y.B. et al. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1066, n. 1, p. 97-104, 2005.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KANEKO, T. et al. n-Alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete*. **Phytochem**, v. 47, n. 2, p. 259-263, 1998.

KANEKO, T. et al. Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*. **Phytochem**, v. 46, n. 5, p. 907-910, 1997.

KIM, K. H. et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chem**, v. 95, n. 3, p. 466-473, 2006.

KOJIMA, H. et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochem**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** São Paulo: Atheneu, 2008. 344p.

LIZCANO, L. J. et al. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chem**, v. 119, n. 4, p. 1566-1570, 2010.

LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. In: _____. **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>. Acesso em: 26 Dez. 2015

LOHMANN, L.G.; ULLOA, C.U. Bignoniaceae. In: _____. **Iplants Prototype Checklist.** 2007 Disponível em: <<http://www.ipplants.org/>>. Acesso em: 25 dez. 2015.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras I.** Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1988.

MACEDO, S. K. S. et al. Identification of flavonol glycosides and in vitro photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. **J Med Plant Res**, v. 9, n. 7, p. 207-215, 2015.

MADHUKAR, V.K.; SRIVASTAVA, S.K.; DUBEY, N.K. Revision of Genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae) in India. **Am J Plant Sci**, n. 4, p. 1164-1168, 2013.

MAHBUB, K. R. et al. In Vitro Antibacterial Activity of *Crescentia cujete* and *Moringa oleifera*. **Bangladesh Res Pub J**, v. 5, n. 4, p. 337-43, 2011.

MAILLAN, P. et al. Protecting against UV - induced degradation and enhancing shine. **Cosmetic Toiletries**, v. 120, n. 3, p. 65-71, 2005.

MANSUR, J.S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An Bras Dermatol**, vol. 61, 121-124, 1986.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacol Res**, v. 61, n. 3, p. 193-199, 2010.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Quim Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARTIN, F. et al. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). **Phytochem**, v. 68, n. 9, p. 1307-1311, 2007.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoter Res**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MIERS, J. II. On the Genus *Crescentia*. **Transactions of the Linnean Society of London**, v. 26, n. 1, p. 159-180, 1868.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. **Acta Amaz**, v. 41, n. 2, p. 233-242, 2011.

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

NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Fotoprotetores orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese orgânica. **Rev Virt Quim**, v. 6, n. 2, p. 190-223, 2014.

NASCIMENTO, S. et al. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Rev Bras Farm**, v. 90, n. 4, 2009.

NIELSEN, L.B.; SLAMET, R.; WEGE, D. The synthesis of 3-hydroxymethylfuro [3, 2-b] naphtho [2, 3-d] furan-5, 10-dione, a novel metabolite isolated from *Crescentia cujete*. **Tetrahedron**, v. 65, n. 23, p. 4569-4577, 2009.

NUNES, X. P. et al. **Biological oxidations and antioxidant activity of natural products**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

OGUNDIPE, O. T.; WUJEK, D. E. Foliar anatomy on twelve genera of Bignoniaceae (Lamiales). **Acta Bot Hung**, v. 46, n. 3-4, p. 337-361, 2004.

OLIVEIRA JÚNOR, R.G. et al. In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **J Applied Pharm Sci**, v. 3, n. 1, p. 122-127, 2013.

OLIVEIRA, D.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quim Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, L.M.B. et al. Plantas taníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1967-1974, 2011.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Quim Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OTERO, R. et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **J Ethnopharmacol**, v. 73, n. 1, p. 233-241, 2000.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis—the 'accidental' pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 555-567, 2009.

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

PARVIN, M. S.; DAS, N.; JAHAN, N.; AKHTER, M. A.; NAHAR, L.; ISLAM, M.E. Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. **BMC Res Not**, v. 8, n. 1, p. 412, 2015.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Rev Bras Plantas Med**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

PEIXOTO, R. M. **Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas.** 2009. 129p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2009.

PEREIRA, S. G. et al. Fitotoxicidade da fase orgânica e do composto majoritário obtidos da polpa dos frutos de *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). **Biotemas**, v. 28, n. 4, p. 51-59, 2015a.

PEREIRA, E.C.V. et al. Aplicação de Planejamento Fatorial como Ferramenta para Otimização de Método Analítico por CLAE-DAD para extrato de *Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult. f. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 10., 2015, Petrolina. **Anais eletrônicos...** Petrolina: UNIVASF, 2015b. Disponível em: <http://www.plamevasf.univasf.edu.br/arquivos_anais/tec1279.pdf>. Acesso em 13 Jan. 2016.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J Biotechnol Biodivers**, v. 3, n. 4, 2012.

PEREIRA, S. G. et al. Potencial alelopático do ácido cinâmico isolado de *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). In: Congresso Brasileiro de Química, 51., 2011, São Luís. **Meio ambiente e energia: anais eletrônicos...** São Luís: ABQ, 2011. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/987750>>. Acesso em 26 Dez. 2015.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. 2006. 217 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PEUNGVICHA, P. et al. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. **J Ethnopharm**, v. 62, n. 1, p. 79-84, 1998.

PÍO-LEÓN, J.F. et al. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 4, 2013.

PRADO, V. M. J. et al. Caracterização de chás de genótipos de *Lippia gracilis* schauer através de perfil cromatográfico por CLAE-DAD combinado com análises quimiométricas. **Quim Nova**, v. 35, n. 9, p. 1814-1818, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim Nova**, v. 29, n. 4, p. 755, 2006.

RIBEIRO, N. M.; NUNES, C. R. Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. **Quim Nova Esc**, v. 29, p. 30-37, 2008.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **J Agr Food Chem**, v. 51, n. 2866, 2003.

ROCHA, T. E. S. **Composição de ácidos graxos e de fitoesteróis em frutos de quatro variedades de abacate (*Persea Americana* Mill)**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para Aumento de Sensibilidade em Espectrofotometria UV-Vis. **Quim Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, F. J. B.; BARROSO, A. P. D. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. **Rev Port Saúde Pub**, v. 29, n. 2, p. 123-131, 2011.

RODRIGUEZ-LOPEZ, V.; SALAZAR, L.; ESTRADA, S. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7, p. 725-728, 2003.

ROJAS, G. et al. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. **J Ethnopharm**, v. 74, n. 1, p. 97-101, 2001.

SANDWITH, N.Y.; HUNT, D.R.R. **Flora Ilustrada Catarinense - Bignoniaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974.

SANTANA, C. R. R. et al. Phytochemical Screening, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae). **Int J Sci**, v. 1, 2012.

SANTOS, A. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras Patol Med Lab**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SANTOS, M. I. S.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **J Braz Chem Society**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.

SAYRE, R.M. et al. A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. **Photochem Photobiol**, v. 29, n. 3, p. 559-566, 1979.

SHASTRY, C. S.; MAULIK M.B.; ASWATHANARAYANA B.J. Antivenom activity of ethanolic extract of *Crescentia cujete* fruit. **Int J Phytomed**, v. 4, n. 1, p. 108, 2012.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Act Bot Bras**, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1102p.

SIQUEIRA FILHO, J. A. et al. A Flora das Caatingas. In: SIQUEIRA FILHO, J. A. (Org.). **Flora das Caatingas do Rio São Francisco: História Natural e Conservação**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2012. p. 447-539.

SOTIROUDIS, T. G.; KYRTOPOULOS, S. A. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. **European journal of nutrition**, v. 47, n. 2, p. 69-72, 2008.

SOUSA, C. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 1, p. 36-38, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005, 155 p.

SPENCER, J. P. et al. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **Br J Nutr**, v. 99, n. 01, p. 12-22, 2008.

TUNDIS, R. et al. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 399, 2008.

TUNG, Y. T. et al. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Biores Tech**, v. 98, n. 5, p. 1120-1123, 2007.

VALLADARES-CISNEROS, M.G. et al. Biological Activity of *Crescentia alata* (Lamiales: Bignoniaceae) Fractions on Larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 97, n. 2, p. 770-777, 2014.

VALLADARES M.G.; RIOS, M.Y. Iridoids from *Crescentia alata*. **J Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 100-102, 2007.

VÁSQUEZ, S.P.F; MENDONÇA, M.S; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz**, v. 44, p. 457-472, 2014.

VILA, F. C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VIOLANTE, I. M. et al. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 2A, p. 452-57, 2009.

VON POSER, G. L. et al. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochem Syst Ecol**, v. 28, n. 4, p. 351-366, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2^a ed. New York: Springer, 1996.

WANG, G. et al. New iridoids from the fruits of *Crescentia cujete*. **J Asian Nat Prod Res**, v. 12, n. 9, p. 770-775, 2010.

XU, C. J. et al. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. **J Chromatogr A**, v. 1134, n. 1, p. 253-259, 2006.

YANG, L. W. et al. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection. **J Chromatogr A**, v. 1070, n. 1, p. 35-42, 2005.

YOSHIOKA, T. et al. Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 7-8, p. 509-514, 2004.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.



APÊNDICE

XXIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL

Da Etnofarmacologia à Biotecnologia no Desenvolvimento de Medicamentos à Base de Plantas Medicinais

CERTIFICADO

Certificamos que IZA MIRANDA MELO PAULO participou do(a) XXIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL com carga horária total de 28 horas.

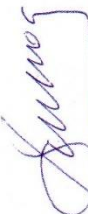
Goiânia, 16 a 19 de setembro de 2014.



Prof. Dr. Elson Alves Costa
Presidente do XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil



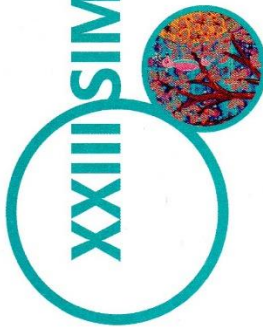
Prof. Dr. Orlando Afonso Valle do Amaral
Reitor da Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Diretor do Instituto de Ciências Biológicas



XXIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL



Da Etnofarmacologia à Biotecnologia no Desenvolvimento de Medicamentos à Base de Plantas Medicinais

CERTIFICADO

Certificamos que IZA MIRANDA MELO PAULO participou do(a) XXIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL apresentando o trabalho com o título "Avaliação da Atividade Antioxidante de *Crescentia cujete* L. (BIGNONIACEAE)" na forma Poster com a participação do(s) co-autor(es) MACEDO, S.K.S., NUNES, X.P., ALMEIDA, J.R.G.S..

Goiânia, 16 a 19 de setembro de 2014.



Prof. Dr. Elson Alves Costa
Presidente do XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil



Prof. Dr. Orlando Afonso Valle do Amaral
Reitor da Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Diretor do Instituto de Ciências Biológicas





Área Temática: 5. Química de produtos naturais.

Avaliação da Atividade Antioxidante de *Crescentia cujete* L. (BIGNONIACEAE)

Paulo, I.M.M.¹, Macedo, S.K.S.¹, Nunes, X.P.¹, Almeida, J.R.G.S.¹.

¹Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, UNIVASF.

Introdução: *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae) é uma espécie muito utilizada na medicina popular na região do Vale do São Francisco, sendo conhecida como “árvore de cabaça”. As plantas medicinais possuem diversos compostos químicos como por exemplo as substâncias antioxidantes, responsáveis por retardarem a velocidade da oxidação de radicais livres que danificam as células e órgãos. Dada a escassez de estudos sobre a espécie, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *Crescentia cujete* L. e das frações obtidas por partição líquido-líquido.

Parte Experimental: A planta foi coletada no município de Casa Nova (BA) no mês de maio de 2013 e depositada no herbário da UNIVASF. Na avaliação da atividade antioxidante através do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foram preparadas soluções do extrato etanólico bruto (EEB), fases e dos padrões ácido ascórbico, butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) em etanol, nas concentrações de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 mg/mL que em seguida reagiram com uma solução de etanol DPPH 50 µg/mL durante 30 min. A absorbância foi medida a 518 nm e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (%AA). Os valores de CE₅₀ foram calculados por regressão linear utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. O teste da inibição da auto-oxidação do β-caroteno (2 mg) foi realizado através da adição de ácido linoléico (40 mg) e Tween 40 (400 mg) com 100 mL de água destilada sob agitação vigorosa para aeração do meio, levando à formação do agente oxidante radicalar. A absorbância foi medida a 470 nm, utilizando-se soluções de 1 mg/mL em EtOH de ácido ascórbico (AA), padrões BHA e BHT, EEB e fases. Os resultados são expressos como porcentagem de atividade antioxidante (% AA). Os testes foram realizados em triplicatas.

Resultados e Discussão: No teste do sequestro do radical livre DPPH, as fases acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH) exibiram atividade antioxidante moderada, com os menores valores CE₅₀ 19,07±3,87 e 23,92±1,74 respectivamente, se comparados com os valores apresentados nos padrões (AA = 2,89±0,22; BHA = 6,16±0,12; BHT = 9,23±0,53). Referente à atividade antioxidante no sistema β-caroteno, a fase acetato de etila (AcOEt) foi a que apresentou melhor resultado (36,39%), com valores maiores que o padrão ácido ascórbico (30,76%), mas menores para os padrões BHA (57,50%) e BHT (68,12%), seguido das fases clorofórmica (35,49%) e metanólica (30,94%). A atividade antioxidante apresentada nos testes pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos.

Conclusão: As fases particionadas de *Crescentia cujete* L. revelaram possuir atividade antioxidante moderada, podendo atuar como sequestrante de radicais livres no tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo.

Apoio Financeiro: FACEPE.

SEMANA FARMACÊUTICA DO VALE DO SÃO FRANCISCO

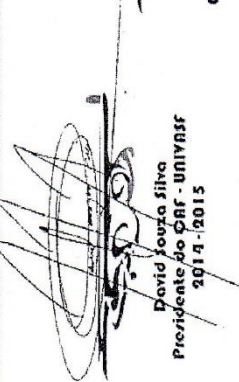
Do Desenvolvimento do Medicamento a Prática Clínica

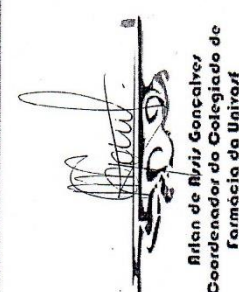
CERTIFICADO

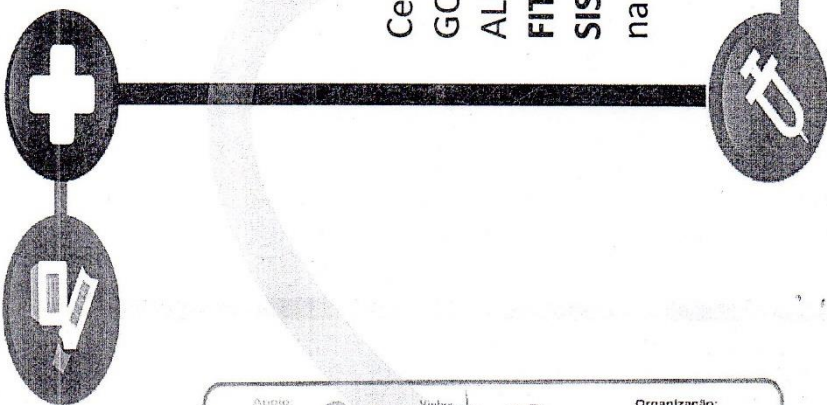
Certificamos que JULIANA LELES SILVA, IZA MIRANDA MELO PAULO, SIRLEY SHARLINY GOMES CAMPOS, KARINA SHAYENE DUARTE DE MORAES, TAMIRES DOS SANTOS ALMEIDA, XIRLEY PEREIRA NUNES apresentaram o trabalho em painel intitulado como **FITOQUÍMICA DE CRESCENTIA CUJETE L. (BIGNONIACEAE): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**, durante a V Semana Farmacêutica do Vale do São Francisco, realizada na Universidade Federal do Vale do São Francisco, nos dias 23 a 26 de Março de 2015.

Petrolina/PE, 25 de Março de 2015.


Larissa B. Rolim
Coordenadora do Evento


David Souza Silva
Presidente do CBF - UNIVASF
2014-2015


Riton de Alencar Gonçalves
Coordenador do Colegiado de Farmácia da Univasf







FITOQUÍMICA DE *CRESCENTIA CUJETE* L. (BIGNONIACEAE): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Juliana Leles Silva¹, Iza Miranda Melo Paulo², Sirley Sharliny Gomes Campos¹, Karina Shayene Duarte de Moraes¹, Tamires dos Santos Almeida¹, Xirley Pereira Nunes^{1,2}

¹Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, Brasil.

²Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, Brasil.

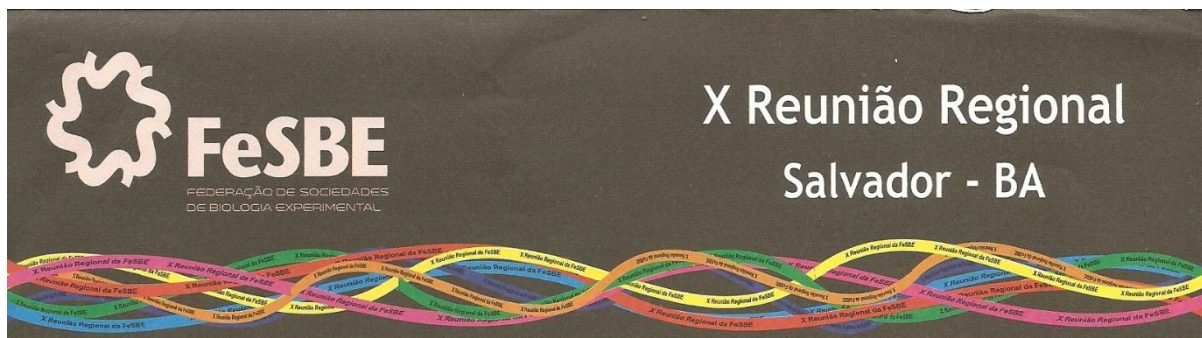
Introdução: A espécie *Crescentia cujete* L. é uma árvore da família Bignoniaceae, amplamente distribuída na região da América do Norte e América do Sul. No Brasil, é uma espécie endêmica, presente em 14 estados brasileiros, mas não encontrada na região Sul. É muito utilizada para ornamentação devido ao formato dos seus frutos, e tem importante papel na medicina popular na região do Vale do São Francisco, onde é conhecida como “árvore de cabaça”, porém poucos estudos fitoquímicos foram feitos com essa planta. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão sistemática da literatura sobre a espécie *Crescentia cujete* L. sobre estudos fitoquímicos e atividade biológica que tenham sido encontradas. **Metodologia:** Foi realizada uma revisão sistemática entre os meses de Outubro e Novembro de 2014 através de um levantamento com artigos publicados até o período da pesquisa, através de consulta aos bancos de dados especializados SCIELO, LILACS, PUBMED e SCOPUS. Foram utilizadas as palavras-chave “crescentia” AND “cujete”, de acordo com a lógica booleana. A seleção dos trabalhos baseou-se no critério da área de interesse Fitoquímica, incluindo artigos publicados em qualquer idioma e artigos com a palavra-chave no título, resumo ou texto



completo. Os artigos resultantes foram analisados manualmente e excluídos estudos pertencentes a outras áreas de conhecimento. **Resultados:** A pesquisa preliminar, sem uso de filtros, identificou 71 artigos, com 6 de SCIELO, 4 de LILACS, 11 de PUBMED e 50 de SCOPUS. No entanto, entre os encontrados, 21 foram indexados em dois ou mais bancos de dados e foram consideradas apenas uma vez, resultando em 50 trabalhos. Após uma triagem dos títulos, resumos e texto completo, 14 artigos foram selecionados, enquanto o restante foi descartado por não pertencer a área de conhecimento de Fitoquímica. Os estudos com *Crescentia cujete* L. utilizaram diversos tipos de extratos, como o aquoso, etanólico, hexânico, metanólico e metil-etil-cetona. As análises fitoquímicas revelaram a presença de fenois, flavonoides, esteroides, terpenos e triterpenos, saponinas, cardenolideos, taninos, glicosídeos, alcalóides e quinonas. Os testes biológicos mostraram que essa espécie possui atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e genotóxica. Alguns metabólitos foram isolados dos frutos e das cascas do caule, sendo eles furanonaftoquinonas, furofuranonaftoquinonas, iridoides e iridoides glicosilados. **Conclusão:** A presente revisão mostrou que existem poucos estudos sobre a espécie *Crescentia cujete* L. com isolamento de substâncias, principalmente das folhas da planta. Destaca-se a necessidade de pesquisas com outras atividades biológicas, avaliações farmacológicas e determinação de mecanismos de ação.

Palavras-chaves: *Crescentia cujete*, Fitoterapia, Revisão sistemática

Apoio: FACEPE, CNPq.



Certificamos que

o trabalho 05.044 intitulado **TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CRESCENTIA CUJETE L. (BIGNONIACEAE)**. Paulo IMM, Silva JL, Moraes KSD, Nunes XP - Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido - UNIVASF, foi apresentado sob a forma de painel na

X Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada de 04 a 06 de junho de 2015, no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, Salvador - BA.


Comissão Organizadora



TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Crescentia cujete* L. (BIGNONIACEAE)

1Paulo, I.M.M.; 2Silva, I.F.; 3Silva, J.L.; 3Campos, S.S.G.; 3Moraes, K.S.D.; 2Costa, M.M.; 1Almeida, J.R.G.S.; 1Nunes, X.P. 1Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, UNIVASF, Petrolina/PE. 2Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido, UNIVASF, Petrolina/PE. 3Colegiado de Ciências Farmacêuticas, UNIVASF, Petrolina/PE.

Introdução: *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae) é uma planta medicinal muito utilizada na região do Vale do São Francisco, popularmente conhecida como “árvore de cabaça”. Estudos anteriores demonstraram que os frutos e as cascas do caule possuem atividade antibacteriana e antioxidante. Contudo, poucos estudos foram desenvolvidos com as folhas da planta até o momento.

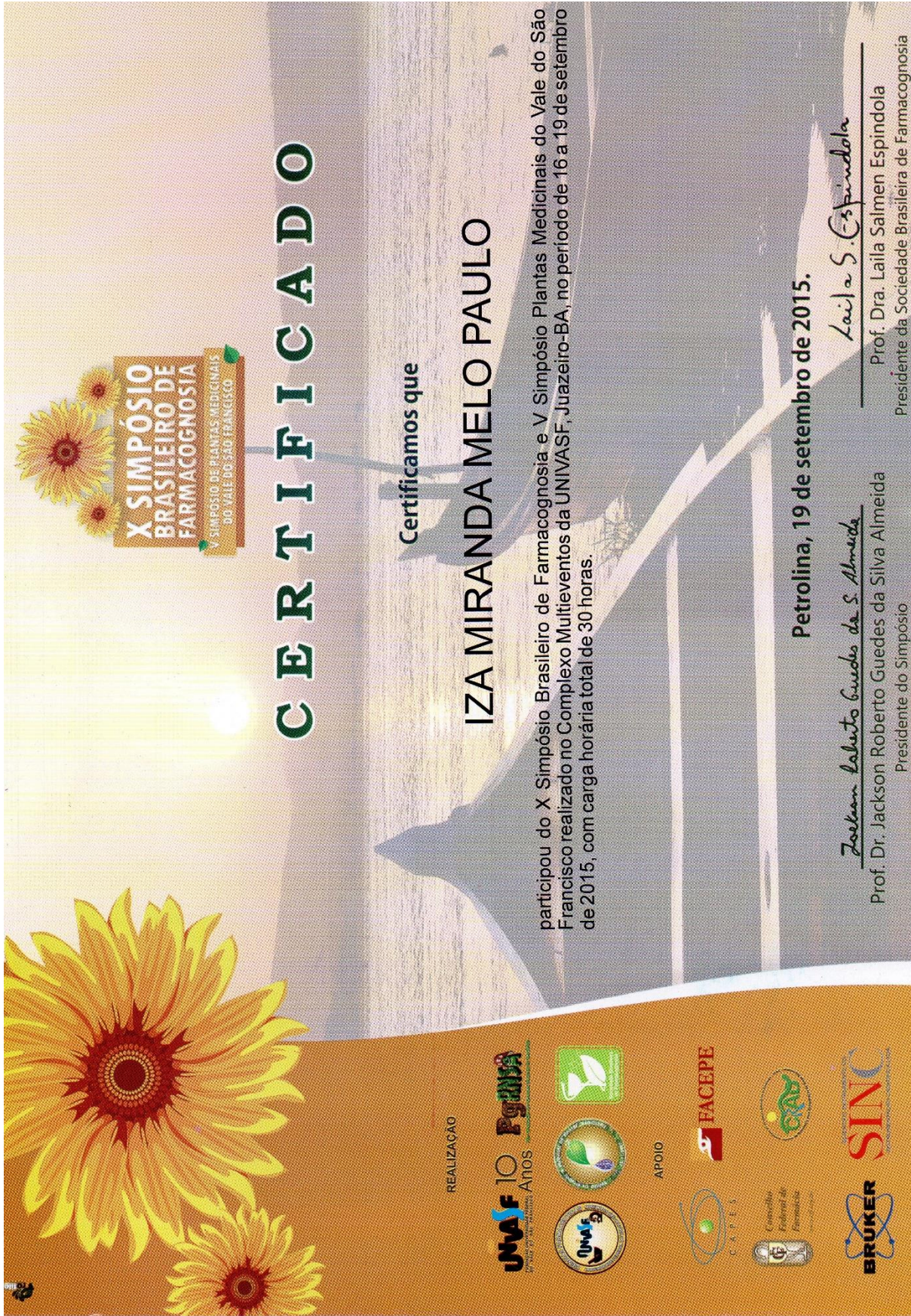
Objetivos: Caracterizar o perfil fitoquímico preliminar e avaliar o potencial antibacteriano do extrato e frações obtidas das folhas de *C. cujete*.

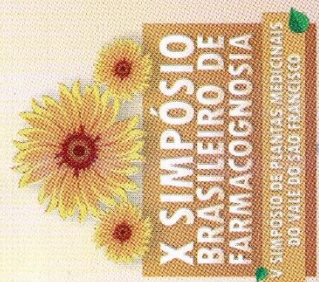
Métodos: As folhas de *C. cujete* foram secas, pulverizadas e submetidas ao processo de maceração com etanol 95%, obtendo o extrato etanólico bruto (Cc-EEB), que foi particionado com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol resultando nas respectivas frações Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH. A triagem fitoquímica foi realizada através de análise por CCDA, empregando sistemas de solventes e reveladores específicos para cada classe de constituinte investigado (alcaloides, derivados antracenos, antraquinonas, cumarinas, compostos fenólicos, saponinos, lignanas, mono, sesqui e diterpenos, naftoquinonas, triterpenos e esteroides). A atividade antibacteriana foi avaliada através da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Cc-EEB e das frações sobre as cepas bacterianas, utilizando o método de ensaio/teste de microdiluição baseado no documento M07-A9 do CLSI. As cepas testadas foram do padrão ATCC: *Staphylococcus aureus* 25923; *Staphylococcus aureus* 6538; MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina); *Staphylococcus epidermidis* 1228; *Escherichia coli* 32213; *Enterococcus faecalis* 19433; *Salmonella enterica* 0507028; *Klebsiella pneumoniae* 13883. As amostras foram ajustadas à concentração de 25.000 µg/mL e submetidas a diluições em série, obtendo-se 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado poços contendo as bactérias em caldo Mueller- Hinton e como controle negativo apenas o caldo. A CBM será definida como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados: Na triagem fitoquímica ambos os extratos revelaram reação fortemente positiva para mono, sesqui e diterpenos, e também para lignanas, derivados antracênicos e antraquinonas. Ainda foram observados alcalóides, compostos fenólicos, cumarinas, e triterpenos e esteroides. A melhor ação bactericida, determinada pela CBM, foi apresentada contra *S. aureus* 6538 por Cc-Hex e Cc-AcOEt, ambos com CBM 1,56 mg.mL⁻¹; *S. epidermidis* 1228 por Cc-EEB e AcOEt, ambos com CBM 1,56 mg.mL⁻¹; e *K. pneumoniae* 13883 por Cc-MeOH com CBM 1,56 mg.mL⁻¹.

Conclusões: O extrato e as frações testadas se mostraram eficientes contra três tipos de bactérias, que podem estar relacionados à presença dos metabólitos secundários identificados na triagem fitoquímica, especialmente da classe dos terpenos.

Apoio Financeiro: Facepe; CNPq; CAPES.





**X SIMPÓSIO
BRASILEIRO DE
FARMACOGNOSIA**
V SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS
DO VALE DO SÃO FRANCISCO

CERTIFICADO

Certificamos que

IZA MIRANDA MELO PAULO


participou do X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e V Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 16 a 19 de setembro de 2015, com carga horária total de 30 horas.

Petrolina, 19 de setembro de 2015.


Joelson Roberto Guedes da S. Almeida
Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Presidente do Simpósio

Laila S. Espindola
Prof. Dra. Laila Salmen Espindola
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

REALIZAÇÃO




UNAF 10 ANOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO



UNIVASF
UNIVERSIDADE DO VALE DO SÃO FRANCISCO

APOIO



FACEPE
SINC
BRUKER

X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA
V SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO

CERTIFICADO

Certificamos que

O trabalho intitulado
QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE *Crescentia cujete* L.

de autoria de
IZA MIRANDA MELO PAULO; JULIANA LELES SILVA; KARINA SHAYENE DUARTE DE MORAES; SIRLEY SHARLINY GOMES CAMPOS; SANDRA KELLE SOUZA MACÊDO; AMANDA LEITE GUIMARÃES; INAIARA DE SOUSA; JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA; JOSÉ ALVES DE SIQUEIRA FILHO; XIRLEY PEREIRA NUNES

foi apresentado no X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e V Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 16 a 19 de setembro de 2015.

Petrolina, 19 de setembro de 2015.

Jackson Roberto Guedes da S. Almeida
Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Presidente do Simpósio

Laila S. Espindola
Prof. Dra. Laila Salmen Espindola
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

REALIZAÇÃO
UNAF 10 ANOS
PqUNSA

APOIO
UNAF
C.A.P.E.S.
FACEPE
C.F.A.B.
BRUKER
SINC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO - UNIVASF

X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia

V Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco – PLAMEVASF

16 a 19 de Setembro de 2015, Juazeiro-BA

QUANTIFICAÇÃO DE FENOIS E FLAVONOIDES TOTAIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE *Crescentia cujete* L.

IZA MIRANDA MELO PAULO¹; JULIANA LELES SILVA²; KARINA SHAYENE DUARTE DE MORAES²; SIRLEY SHARLINY GOMES CAMPOS²; SANDRA KELLE SOUZA MACÊDO¹; AMANDA LEITE GUIMARÃES¹; INAIARA DE SOUSA¹; JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA¹; JOSÉ ALVES DE SIQUEIRA FILHO³; XIRLEY PEREIRA NUNES¹

¹ Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, UNIVASF.

² Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNIVASF.

³ Centro de Referência para a Recuperação em Áreas Degradadas, UNIVASF.

Introdução: Os filtros solares naturais, desenvolvidos a partir de plantas, são capazes de absorver a radiação UV, causador de danos na pele, por possuírem principalmente compostos aromáticos, como os fenóis e flavonoides. **Objetivos:** Quantificar o teor de fenóis e flavonoides totais, e avaliar o efeito fotoprotetor *in vitro* das folhas de *Crescentia cujete* L. **Métodos:** O extrato bruto das folhas de *C. cujete* (Cc-EEB) foi fracionado com sílica e solventes de polaridade crescente, resultando nas frações Cc-Hex, Cc-CHCl₃, Cc-AcOEt e Cc-MeOH. O teor de fenóis totais foi medido utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* e o padrão ácido gálico. O teor de flavonoides totais foi determinado através da reação com o cloreto de alumínio e como padrão catequina. Na avaliação da atividade fotoprotetora os extratos e frações foram secos em estufa a 40 °C e, em seguida, diluídos em etanol absoluto, obtendo-se concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L, sendo realizada a varredura em espectrofotômetro entre os comprimentos de 260 a 400 nm e calculado o Fator de Proteção Solar (FPS). Os experimentos foram realizados em triplicata. **Resultados:** O maior teor de fenóis totais foi apresentado em Cc-AcOEt com 115,6±8,34 mg EAG/g, e o maior teor de flavonóides totais foi encontrado no Cc-EEB (80,4±0,00 mg EC/g) e Cc-AcOEt (78,6±0,01 mg EC/g). A fração Cc-CHCl₃ foi a única das amostras que apresentou bandas de absorção entre 320-400 nm (UVA), indicando possível atividade fotoprotetora. Os melhores valores de FPS foram apresentados por Cc-EEB (4,90±0,07) e Cc-AcOEt (4,354±0,04) na concentração de 100 mg/L. **Conclusões:** O Cc-EEB e a fração Cc-AcOEt apresentaram melhor atividade fotoprotetora, que pode estar relacionada com o teor de compostos fenólicos presente nos extratos.

Palavras-chave: *Crescentia cujete*; Fotoproteção; Flavonoides

Apoio Financeiro: FACEPE; CNPq; CAPES.

*Atigo será submetido ao Journal of Medicinal Plants Research.

Chemical study and biological activities of leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae)

Iza Miranda Melo Paulo¹, Sandra Kelle Souza Macêdo¹, Juliana Leles Silva¹, Karina Shayene Duarte de Moraes¹, Sirley Sharliny Gomes Campos¹, Amanda Leite Guimarães¹, José Alves de Siqueira Filho², Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida¹, Larissa Araújo Rolim^{1,3}; Xirley Pereira Nunes^{1*}

¹ Center for Studies and Research of Medicinal Plants (NEPLAME), Federal University of San Francisco Valley, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil

² Center of Reference to Recuperation of Degraded Areas of Caatinga (CRAD), Federal University of San Francisco Valley, 56.300-000, Petrolina, Pernambuco, Brazil

³ Analytical Center of Drugs, Medications and Food (CAFMA), Federal University of San Francisco Valley, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

*Author for correspondence: Xirley Pereira Nunes, Federal University of San Francisco Valley, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil. Tel: +55 (87) 2101-6863. E-mail: xirley.nunes@univasf.edu.br

Abstract

Crescentia cujete L. it's widely used in folk medicine and has attracted growing interest as a source of new biologically active compounds. The present study aimed to carry out chemical study of the leaves of *C. cujete* and assess the antioxidant and photoprotective potential *in vitro* extract and fractions obtained. Was evaluated the total phenolic by the Folin-Ciocalteu showing better results than the ethyl acetate fraction (115.6 ± 8.34 mg GAE/g). The fingerprint was developed by HPLC-DAD. Antioxidant activities of the extracts were evaluated by using of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenging and β -carotene/linoleic acid system, where it was obtained better result for chloroform fraction ($36,39 \pm 0,12$ %AA). They were isolated mixture of stigmasterol and β -sitosterol and 4-hydroxybenzoic by chromatographic methods. Through spectrophotometric method was observed that the chloroform fraction showed characteristic absorption bands in region UVA, and crude ethanol extract presented the highest sun protection factor SPF ($4,909 \pm 0,123$) at the highest concentration.

Keywords: *Crescentia cujete*; Bignoniaceae; Chemical study; Fingerprint; HPLC-DAD; Antioxidant activity; Photoprotective activity.

1. Introduction

Among the many plant species of the Caatinga biome, is the *Crescentia cujete* L., a species belonging to the Bignoniaceae family, being very popular medicine and known as the “coité” or “calabash tree” (Albuquerque et al., 2007). It is a small tree (3-5 m tall), well known for spherical form of its fruit, that include among ornamental plants (Ejelonu et al., 2011). It is widely used in folk medicine in Brazil and in several other countries, especially to combat high blood pressure, diabetes, urinary problems, coughs, anemia, and bleeding effect of poisonous snake bites (Azevedo et al., 2010; Otero et al., 2000). The leaves, on the other hand, are used for the treatment of hypertension as well as poultice for headaches (Ejelonu et al., 2011; Parvin et al., 2015).

A large number of biological activities are associated with phenolic compounds and terpenes class, mainly act as strong antioxidants against free radicals and other reactive oxygen species (ROS), the leading cause of many chronic human diseases such as cancer and diseases cardiovascular. The capacity of these compounds to absorb solar radiation was also confirmed, as an antioxidant since they can neutralize free radicals produced in the skin after exposure to sunlight (Souza et al., 2013).

The plant extracts have been analyzed routinely by HPLC to obtain fingerprint as a strategy for identifying and assessing the quality of the plants used in medicine, mainly for providing important information about the type of constituents presente (Ji et al., 2005).

Like many other species of plants used in traditional medicine, *C. cujete* has also attracted increasing interest as a source of new biologically active compounds. Thus, the present study aimed to carry out chemical study of the leaves of *C. cujete* and assess the biological potential *in vitro* extract and fractions obtained as antioxidants and photoprotective.

2. Results and Discussion

2.1. Total phenolic content

The crude ethanol extract and the ethyl acetate and methanol fractions showed the highest content of total phenolics 73.40 ± 5.13 , 115.6 ± 8.34 and 70.44 ± 5.56 , respectively (Table 1). These results are in accordance with the literature, where the highest amounts of phenolics and flavonoids were found in the chloroform fractions and ethyl acetate, as well as the ethanol extract (Das et al., 2014; Parvin et al., 2015). Phenolic compounds and flavonoids have been identified as major contributors in the elimination of free radical oxidation pathways, and

further demonstrate inhibit proliferation and growth of microorganisms (Das et al., 2014; Parvin et al., 2015).

2.2. Fingerprint by HPLC-DAD

According to the calculation of HCRF, defined as the evaluation parameter, the best method of obtaining the fingerprint of *C. cujete* was flow 1.2 mL / min and 50 min gradient time (Figure 1).

The results are best observed from the statistical analysis graphically where you can observe the factors that influence the best chromatographic separation. Thus, the Pareto graph (Figure 2) showed statistical significance for the linear terms of both independent variables, primarily the analysis time, showed that the main factor for obtaining the fingerprint of *C. cujete*. The response surface graph (Figure 3) showed that there is influence of both variables: to increase the flow and analysis time, there was an increase in the method of response (value HCRF).

A fingerprint of a herbal medicines is a chromatogram here representing all the detectable chemical componentes present in the extract and being separated as much as possible so as to identify and characterize that herbal medicines (Xu et al., 2006).

2.3. Isolation of chemical constituents

Substance **1** corresponding to a mixture between steroids stigmasterol and β -sitosterol (Figure 4). Dates of NMR ^1H and ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) and correlations showed in Table 2 and 3. Agarwal and Popli (1992) isolated this two compounds of the sheets petroleum ether extract, and Binutu (1997) only β -sitosterol isolated from the stem bark, however none of the works bring the identification data of the substance. Steroids are a common class in Bignoniaceae, according to the evolutionary status of the family (Cipriani et al., 2012).

The substance **2** was identified as 4-hydroxybenzoic acid by comparison to the literature (Yoshioka et al., 2004) (Figure 4). Dates of NMR ^1H (CD_3OD , 125 MHz): 7.85 (*d*; *J*= 8.0 Hz); 6.83 (*d*; *J*= 8.0 Hz); 6.83 (*d*; *J*= 8.0 Hz); 7.85 (*d*; *J*= 8.0 Hz). Dates of NMR ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz): 122.6; 133.1; 116.0; 163.2; 116.0; 133.1; 170.1. The 4-hydroxybenzoic acid was also isolated from *C. cujete* the methanol extract of the stem bark and showed significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (MIC = 250 mg / mL for both bacteria) (Binutu, 1997). The antioxidant activity of these and other acids was confirmed by Tung et al. (2007).

2.4. Antioxidant activity

The results of the evaluation of the antioxidant activity are shown in Table 1. Data showed that the ethyl acetate and methanol fractions showed moderate antioxidant activity in eliminating DPPH, with the lowest values EC_{50} 19.07 ± 3.87 and 23.92 ± 1.74 , respectively. In the β -carotene method, the chloroform and ethyl acetate fractions also showed better activity, $36,39 \pm 0,12$ and $35,49 \pm 0,01$, respectively, followed by methanol fraction ($30,94 \pm 0,01$). The results are similar to those reported in the literature for this specie (Das et al., 2014; David et al., 2007).

The moderate antioxidant activity demonstrated by the chloroform fraction in this study, which was isolated from the mixture of steroids, may be related to the presence of these compounds in the fraction, because this activity are proven to β -sitosterol and stigmasterol. (Sotiroudis; Kyrtopoulos, 2008). The ethyl acetate fraction, of which the 4-hydroxybenzoic acid were isolated, showed the best results of antioxidant activity by the two tested methods and must be related to the presence of this and other phenolic acids in the fraction.

2.5. Photoprotective activity

The crude ethanol extract and the fractions hexane, ethyl acetate and methanol showed spectrophotometric absorption in the UVC region (100-290 nm) and the chloroform fraction showed maximum wavelengths in the UVA region (320-400 nm), suggesting a possible photoprotective activity.

The best SPF values in a concentration of 100 mg/l were $4,90 \pm 0,07$ and $4,354 \pm 0,04$ for crude ethanol extract and the ethyl acetate fraction, respectively (Figure 5). The photoprotective activity of a plant extract is greatly influenced by the presence mainly of phenolic compounds (Violante et al., 2009). Thus, it is suggested that the isolated 4-hydroxybenzoic acid, along with other phenolic compounds, are responsible for the activity demonstrated by the ethyl acetate fraction.

The evaluation of photoprotective activity *C. cujete* developed in the present study adds unprecedented knowledge of the plant, since there are no studies of this activity with no species of genre.

3. Experimental

3.1. Plant material

The leaves of *Crescentia cujete* were collected in the city of Casa Nova, Bahia, in May 2013. The samples were identified by a botanist and a voucher specimen of the plant was deposited in the Herbarium of the Federal University of San Francisco Valley (HVASF) under registration number 22603.

3.2. Obtaining and fractionation of the crude ethanol extract

The dried and powdered leaves (1429 g) were continuously extracted three times during a 72-hour period with 95% ethanol at room temperature. The ethanol solution obtained was filtered, and then the solvent was evaporated with the aid of a rotaevaporator at reduced pressure with an average temperature of 50 °C, yielding 195.03 g of crude ethanol extract after the distillation of the solvent. This was mixed with silica gel 60 (0.04-0.063 mm), subjected to a vacuum-liquid chromatography (VLC), and fractionated with hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol (Sigma-Aldrich, USA) to yield the following four fractions: hexane (1.66 g), chloroform (9.09 g), ethyl acetate (9.4 g) and methanol (48.21 g).

3.3. Total phenolic content

Total phenolic contents were assayed using the Folin-Ciocalteu reagent, it is based on the method reported by Slinkard and Singleton (1997) with adaptations. An aliquot (40 µl) of a suitable diluted extracts and fractions was added to 3.16 ml of distilled water and 200 µl of the Folin–Ciocalteu reagent, and mix well. The mixture was shaken and allowed to stand for 6 min, before adding 600 µl of sodium carbonate solution, and shake to mix. The solutions were left at 20 °C for 2 hours and the absorbance of each solution was determined at 765 nm against the blank and plot absorbance vs. concentration. Total phenolic contents of the extracts (three replicates per treatment) were expressed as mg gallic acid equivalents per gram (mg GAE/g) through the calibration curve with gallic acid. The calibration curve range was 50 – 1000 mg/l ($R^2 = 0.9928$). All samples were performed in triplicates.

3.4. Fingerprint by HPLC-DAD

By technique High Performance Liquid Chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) was obtained fingerprint of *C. cujete*, it is based on the method reported by Ji et al. (2005) with adaptations. Solutions of 10 mg.mL⁻¹ in methanol HPLC grade of the crude extract were injected into equipment HPLC-DAD Shimadzu® with column C18 Restek® (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) at 30 °C protected by pre-column Restek® C18 (10 mm x 4 mm, 5 mm).

The device was equipped with a quaternary pump system model LC - 20ADVP, degasser model DGU - 20A, detector PDA model SPD - 20AVP, oven model CTO - 20ASVP, autosampler model SIL - 20ADVP and controller model SCL - 20AVP, and the data treated by software Shimadzu® LC solution 1.0 (Japão). The samples were eluted with binary mobile phase gradient composed of: (A) trifluoroacetic acid 0.01% and (B) acetonitrila, as described in Table 4. The system was kept under 130 kgf of pressure and injection volume of 20 µL using flow 0.8, 1.0 and 1.2 ml/min. For the study was used wavelength band (λ) 270 nm to 350 nm. Determination of the fingerprint of *C. cujete* was plotted applying an experimental design statistical tools the factorial planning 3^k , analyzing two factors in three levels as described in Table 5. The dependent variable for analysis was chosen to calculate the hierarchical chromatographic response function (HCRF), using the following formula: $HCRF = 1,000,000n + 100,000R_{min} + (t_m - t_l)$; where n is the number of peaks in the chromatogram, R_{min} is the resolution of the least separated pair of peaks, t_m and t_l are the maximum acceptable analysis time and the retention time of the last peak, respectively. All analyzes were carried out in triplicate.

3.5. Isolation of chemical constituents

The chloroform fraction (6 g) was subjected to a column chromatography on silica gel and eluted with hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol in an increasing polarity gradient, resulting in collection 452 fractions. The fractions were monitored by TLC and classified in groups in accordance with its retention factor. Therefore, the fraction 145-160 underwent a new column chromatography under the same conditions as before, from which was obtained the 31-36 fraction was purified by recrystallization from methanol and preparative TLC resulting in the substance **1** (11.2 mg) as a white solid, soluble in chloroform.

The ethyl acetate fraction (6 g) was subjected to column chromatography on Sephadex LH-20 and eluted with methanol, resulting in the collection of 337 fractions are pooled according to similarity observed by TLC. The fraction 50-83 was subjected to new column chromatography under the same conditions as before, obtaining 196 fractions, pooled according to standard shown on TLC. The fraction 70-179 passed through a column chromatography with silica gel and eluted with chloroform, ethyl acetate and methanol, in an increasing polarity gradient, which resulted in the collection of 576 fractions, pooled according to observed on TLC. The fraction 450-489 showed to be pure and resulting substance **2** (106.5 mg). All compounds were identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C and compared to the literature.

3.6. DPPH free radical scavenging assay

The free radical scavenging activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) assay (Falcão et al., 2006). Sample stock solutions (1.0 mg/ml) of extracts were diluted to final concentrations of 243, 81, 27, 9, 3 and 1 µg/ml in ethanol. One ml of a 50 µg/ml DPPH ethanol solution was added to 2.5 ml of sample solutions of different concentrations, and allowed to react at room temperature. After 30 minutes the absorbance values were measured at 518 nm and converted into the percentage antioxidant activity (AA) using the following formula: $AA\% = [(absorbance\ of\ the\ control - absorbance\ of\ the\ sample) / absorbance\ of\ the\ control] \times 100$. Ethanol (1.0 ml) plus plant extracts solutions (2.5 ml) were used as a blank. DPPH solution (1.0 ml) plus ethanol (2.5 ml) was used as a negative control. The positive controls (ascorbic acid butylhydroxyanisole and butylhydroxytoluene) were those using the standard solutions. Assays were carried out in triplicate.

3.7. Inhibition of auto oxidation of β -carotene

The ability of the extracts to prevent the oxidation of β -carotene was evaluated according to the methodology described by Wannes et al. (2010). The antioxidant activity (%AA) was evaluated in terms of bleaching of β -carotene using the following formula: $\%AA = [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)] \times 100$; where A_0 is the initial absorbance and A_t is the final absorbance measured for the test sample; A_0^0 is the initial absorbance and A_t^0 is the measured absorbance for the final sample. A_0^0 is the initial absorption and A_t^0 is the final absorbance measured for the negative control. The results are expressed as percentage of antioxidant activity (% AA). Tests were carried out in triplicate.

3.8. Determination of the maximum absorption wavelength and Sun Protection Factor (SPF) in vitro

For determining of the maximum absorption wavelength (λ_{max}), the dried extracts were diluted in absolute ethanol, obtaining concentrations of 5, 25, 50 and 100 mg/l. Subsequently, was performed spectrophotometric scanning at wavelengths between 260-400 nm, with intervals of 5 nm. The readings were performed using 1 cm quartz cell and ethanol used as blank. Calculation of SPF was determined using the equation developed by Mansur et al. (1986): $SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot abs(\lambda)$; where: $EE(\lambda)$ – erythemal effect spectrum; I

(λ) – solar intensity spectrum; Abs (λ) – absorbance of sunscreen product; CF – correction factor (= 10). The values of EE x I are constants and were determined by Sayre et al. (1979).

3.9. Statistical analysis

Data obtained in triplicate experiments were analyzed statistically using the GraphPad Prism® version 5.0 and expressed as mean \pm SD. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

4. Conclusions

In summary, the present study demonstrates that *C. cujete* contain phenolic and steroids compounds which can serve as natural sources of antioxidants agents. The phenolics acids present in the extracts could be responsible by photoprotective effect presented in this study. Through analysis on HPLC-DAD was possible to trace a fingerprint of the plant, that allows identify and characterize that herbal medicines. This study confirms results demonstrated in the literature, and contributing new knowledge of unpublished trials have been conducted.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) and from Brazilian agency CNPq. The authors wish to express their thanks to Vicente Carlos de Oliveira Costa from the Federal University of Paraíba by the analysis of substances in Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

References

- Agarwal K, Popli SP (1992). The constituents of *Crescentia cujete* leaves. *Fitoterapia* 63:476.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMDFL, Melo JG, Santos JP (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharm.* 114:325-354.
- Azevedo CF, Bruno RDLA, Gonçalves EP, Quirino ZGM (2010). Germinação de sementes de cabaça em diferentes substratos e temperaturas. *Braz. J. Agr. Sci.* 5: 354-357.

- Binutu OA (1997). Phytochemical and antimicrobial studies on *Crescentia cujete*. *Fitoterapia*. 68(2).
- Cipriani FA, Figueiredo MR, Soares GLG, Kaplan MAC (2012). Chemical implications for systematic and phylogeny of Bignoniaceae. *Quim. Nova*. 35(11):2125-2131.
- Colombo R, Batista ANDL, Bomfim GC, Burgos RC, Cavalheiro AJ, Bolzani VDS, Reimberg MCH (2010). Validated high-performance liquid chromatographic method for the standardisation of *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae, commercial extracts. *Rev. Bras. Farmacog.* 20(5):781-788.
- Das N, Islam ME, Jahan N, Islam MS, Khan A, Islam MR, Parvin MS (2014). Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complem. Altern. Medicine*. 14:45.
- David JP, Meira M, David JM, Brandão HN, Branco A, Agra MF, Barbosa MRV, Queiroz LP, Giuliatti AM (2007). Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia*. 78(3):215-218.
- Dewanto V, Wu X, Adom K, Liu RH (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food. Chem.* 50:3010-3014.
- Ejelonu BC, Lasisi AA, Olaremu AG, Ejelonu OC (2011). The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). *Afr. J. Biotechnol.* 10:19631-19636.
- Falcão DQ, Costa ER, Alviano DS, Alviano CS, Kuster RM, Menezes FS (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. *Braz. J. Pharmacogn.* 16:73-76.
- Ji YB, Xu QS, Hu YZ, Vander Heyden, Y (2005). Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1066:97-104.
- Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H (1990). Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochem.* 29(7):2351-2355.
- Mansur JS, Breder MVR, Mansur MCA, Azulay RD (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61:121-124.
- Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, Saldarriaga M, Diaz A (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J. Ethnopharm.* 73:233-241.

- Parvin MS, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L, Islam ME (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. BMC Res. Notes. 8:412.
- Prado VMJ, Moraes VRS, Nogueira PCL, Cruz EMO, Blank AF, Pereira-Filho ER, Martins LRR (2012). Characterization of genotypes of teas *Lippia gracilis* schauer through chromatographic profile by HPLC-DAD combined with chemometric analysis. Quim. Nova. 35:1814-1818.
- Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E (1979). Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. Photochem. Photobiol. 29:559-566.
- Slinkard K, Singleton VL (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. Am. J. Enol. Viticult. 28:49-55.
- Souza FP, Campos GR, Packer FJ (2013). Determination of the photoprotective and antioxidant activity in emulsions containing extract *Malpighia glabra* L. – Acerola. Rev. Cienc. Farm. Basic. Apl. 34(1):69-77.
- Sotiroudis TG, Kyrtopoulos AS (2008). Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. Europ. J. Nutr. 47(2):69-72.
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F, Statti GA, Menichini F (2008). Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. Mini_Rev.Med. Chem. 8(4): 399.
- Tung YT, Wu JH, Kuo Y H, Chang ST (2007). Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. Bioresour. Technol. 98(5): 1120-1123.
- Violante IM, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AF, Santos RA, Ferrari M (2009). Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Rev. Bras. Farmacogn. 19(2A):452-57.
- Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. Food. Chem. Toxicol. 48:362-1370.
- Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, Kimura Y (2004). Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. Z. Naturforsch. C. 59(7-8):509-514.

Figure 1. Fingerprint of *C. cujete* obtained in HPLC-DAD of crude etanol extract (flow rate 1.2 ml/min; run time 50 min).

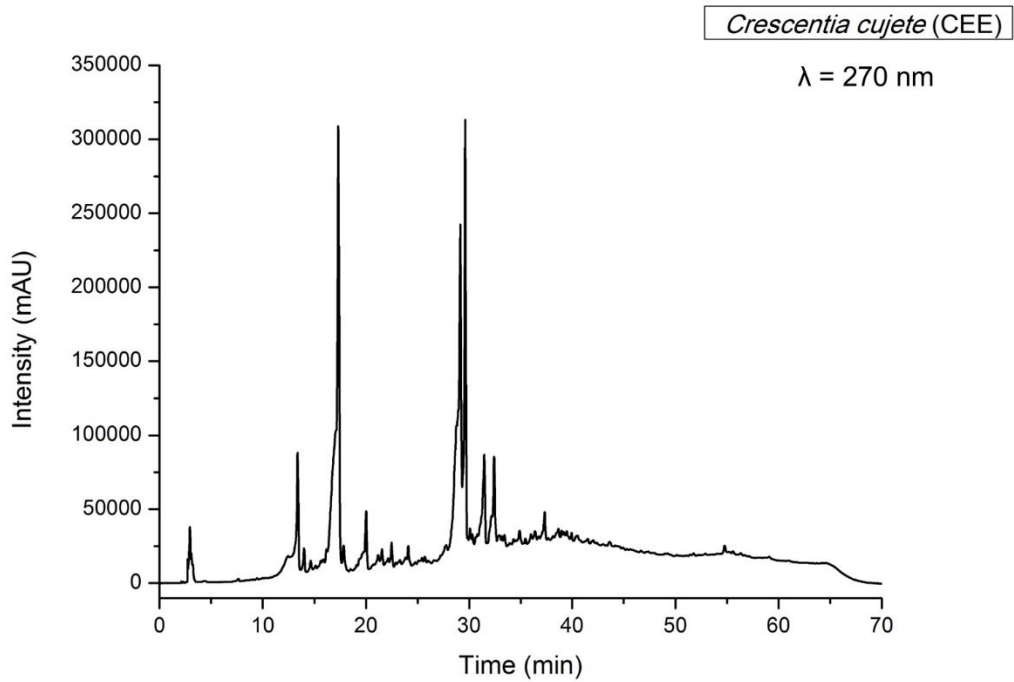


Figure 2. Pareto graph for the variables: time and flow. L = linear term; Q = quadratic term.

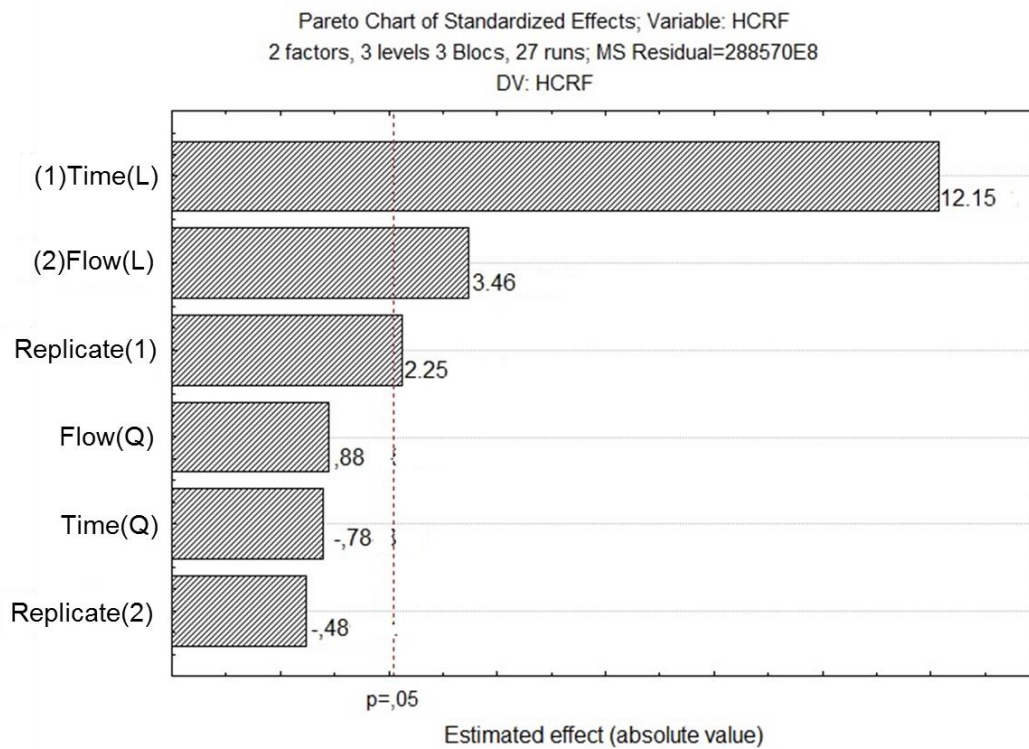


Figure 3. Response surface obtained by factorial analysis in HCRF.

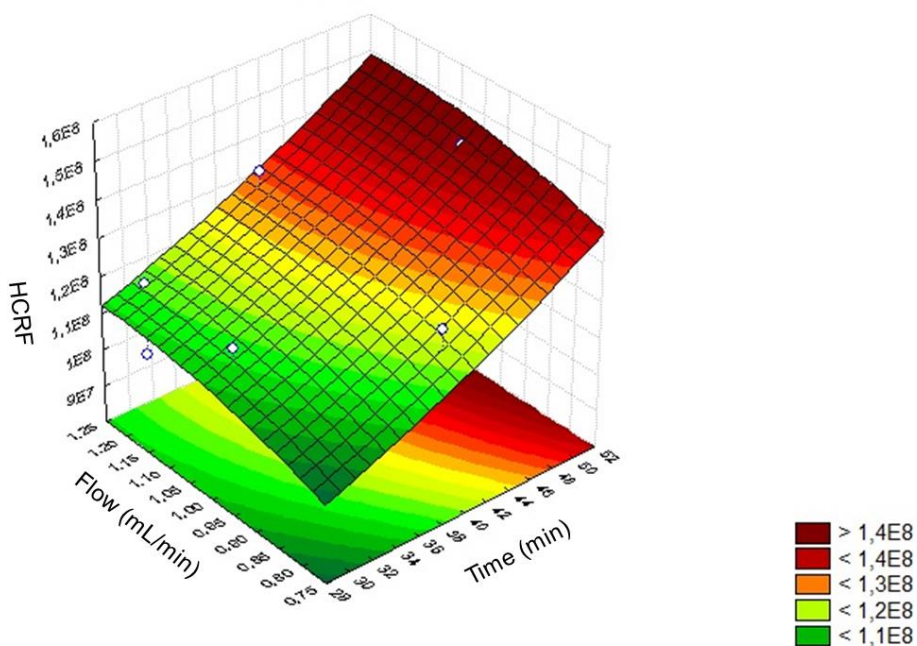


Figure 4. Isolated substances of *C. cujete*. **1**= stigmasterol and β -sitosterol; **2**= 4-hydroxybenzoic acid.

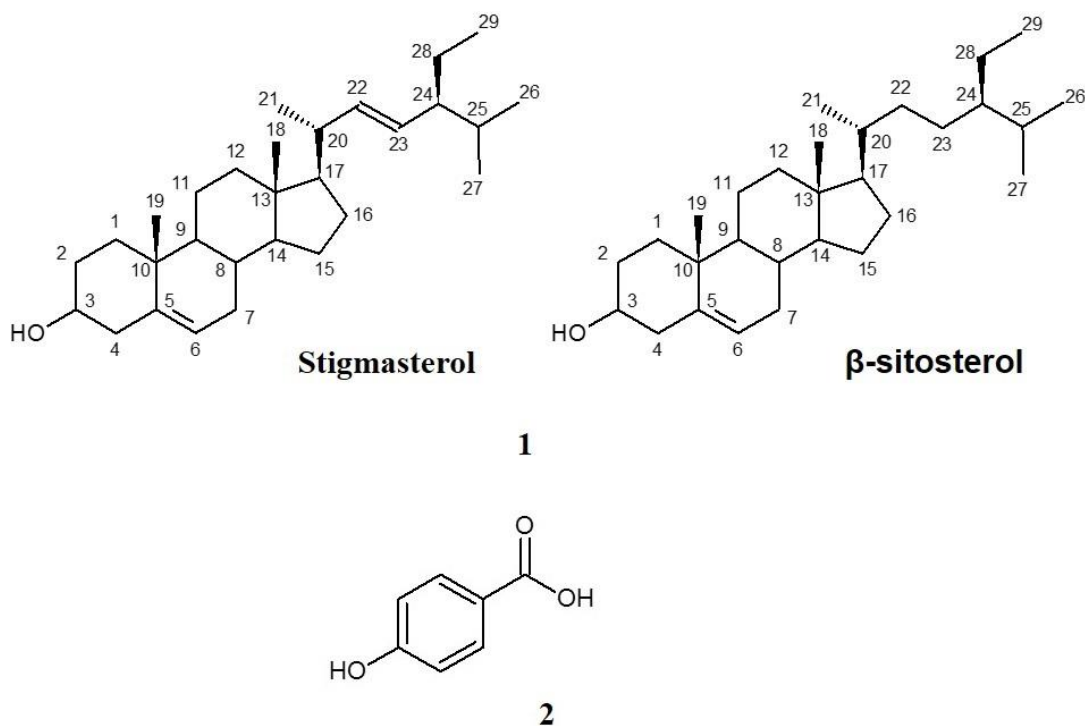
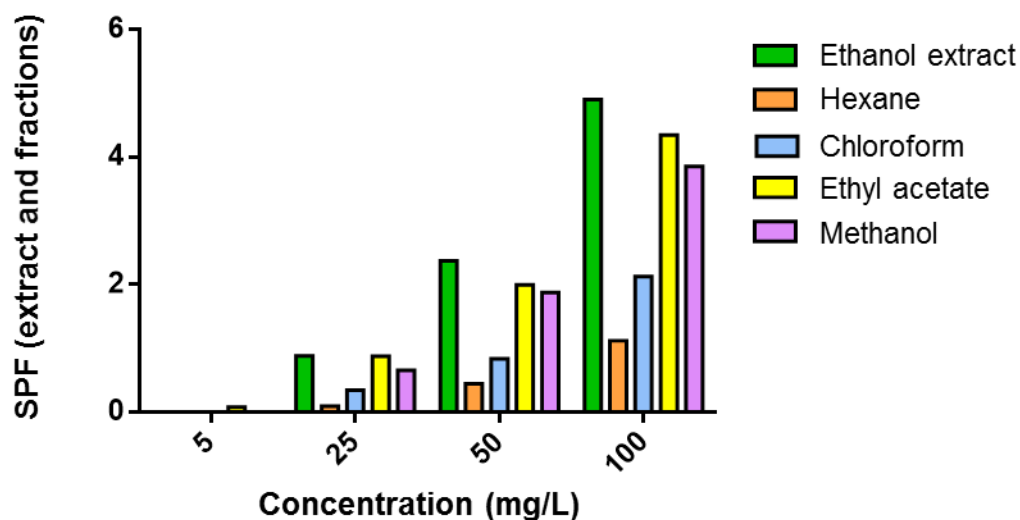


Figure 5. SPF of extract and fractions of *C. cujete*.Table 1. Total phenols content and antioxidant activity of *C. cujete*.

Extract / Fractions / Standards	Phenols (mg GAE/g)	DPPH (EC ₅₀ , µg/ml)	β-carotene (% AA)
Crude ethanol extract	73,40±5,13	64,9±15	16,88±0,10
Hexane fraction	23,04±5,70	45,07±8,72	7,81±0,17
Chloroform fraction	7,85±3,40	103,0±4,77	36,39±0,12
Ethyl acetate fraction	115,6±8,34	19,07±3,87	35,49±0,01
Methanol fraction	70,44±5,56	23,92±1,74	30,94±0,01
Ascorbic acid	-	2,89±0,22	30,76±0,02
Butylhydroxyanisole	-	6,16±0,12	57,50±0,16
Butylhydroxytoluene	-	9,23±0,53	68,12±0,07

* Values are presented as mean ± SD (n = 3). GAE= Gallic acid equivalentes; CE= Catechin equivalentes. EC₅₀ is defined as sufficient for 50% maximal effect concentration. (%AA)= percentage of antioxidant activity.

Table 2. Dates of NMR ^1H and ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz and 125 MHz) of **1** related to stigmasterol compared with literature data (NMR ^1H 400 MHz/NMR ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) (Kojima et al., 1990).

Posição	Tipo	$\delta_{\text{H}} \mathbf{1}$	$\delta_{\text{C}} \mathbf{1}$	δ_{C} Literature
C-1	CH_2	1,06 (<i>m</i>)	37,2	37,2
C-2	CH_2	1,08 (<i>m</i>)	31,6	31,6
C-3	CH	3,52 (<i>tdd</i> , $J = 5,0; 11,5; 16$)	71,8	71,8
C-4	CH_2	2,26 (<i>m</i>)	42,3	42,3
C-5	C	-	140,7	140,7
C-6	CH	5,32 (<i>d</i> , $J = 5,5$ Hz)	121,6	121,7
C-7	CH_2	1,08 (<i>m</i>)	31,6	31,9
C-8	CH	1,82 (<i>m</i>)	31,9	31,9
C-9	CH	0,91 (<i>m</i>)	50,1	50,1
C-10	C	-	36,5	36,5
C-11	CH_2	1,42 (<i>m</i>)	21,0	21,1
C-12	CH_2	1,15 (<i>m</i>)	39,7	39,7
C-13	C	-	42,2	42,1
C-14	CH	1,02 (<i>m</i>)	56,8	56,8
C-15	CH_2	1,06 (<i>m</i>)	24,4	24,4
C-16	CH_2	1,26 (<i>m</i>)	28,9	28,9
C-17	CH	1,25 (<i>m</i>)	55,9	55,9
C-18	CH_3	0,67 (<i>s</i>)	12,0	12,0
C-19	CH_3	0,99 (<i>s</i>)	19,4	19,4
C-20	CH	2,03 (<i>m</i>)	40,4	40,5
C-21	CH_3	1,01 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	21,2	21,2
C-22	CH	5,12 (<i>dd</i> ; $J = 8,5$ e 15 Hz)	138,3	138,3
C-23	CH	4,98 (<i>dd</i> ; $J = 8$ e 15,5 Hz)	129,2	129,2
C-24	CH	1,50 (<i>m</i>)	51,2	51,2
C-25	CH	1,45 (<i>m</i>)	31,9	31,9
C-26	CH_3	0,82 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	21,2	21,1
C-27	CH_3	0,77 (<i>d</i> , $J = 6,5$)	18,9	19,0
C-28	CH_2	1,13 (<i>m</i>)	25,4	25,4

Posição	Tipo	δ_H 1	δ_C 1	δ_C Literature
C-29	CH ₃	0,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7)	12,2	12,3

Table 3. Dates of NMR ¹H and ¹³C (CDCl₃, 500 MHz and 125 MHz) of **1** related to β -sitosterol compared with literature data (NMR ¹H 400 MHz/NMR ¹³C 100 MHz, CDCl₃) (Kojima et al., 1990).

Posição	Tipo	δ_H 1	δ_C 1	δ_C Literatura
C-1	CH ₂	1,06 (<i>m</i>)	37,2	-
C-2	CH ₂	1,08 (<i>m</i>)	31,6	-
C-3	CH	3,52 (<i>tdd</i> , <i>J</i> = 5,0; 11,5; 16)	71,8	-
C-4	CH ₂	2,26 (<i>m</i>)	42,3	-
C-5	C	-	140,7	-
C-6	CH	5,32 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,5 Hz)	121,6	-
C-7	CH ₂	1,08 (<i>m</i>)	31,6	-
C-8	CH	1,82 (<i>m</i>)	31,9	-
C-9	CH	0,91 (<i>m</i>)	50,1	-
C-10	C	-	36,5	-
C-11	CH ₂	1,42 (<i>m</i>)	21,0	-
C-12	CH ₂	1,15 (<i>m</i>)	39,7	39,8
C-13	C	-	42,2	42,3
C-14	CH	1,02 (<i>m</i>)	56,8	-
C-15	CH ₂	1,06 (<i>m</i>)	24,4	24,3
C-16	CH ₂	1,26 (<i>m</i>)	28,9	28,2
C-17	CH	1,25 (<i>m</i>)	55,9	56,0
C-18	CH ₃	0,67 (<i>s</i>)	12,0	11,9
C-19	CH ₃	0,99 (<i>s</i>)	19,4	-
C-20	CH	*	36,2	36,1
C-21	CH ₃	1,01 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	18,8	18,8
C-22	CH ₂	0,93 (<i>m</i>)	33,9	33,9
C-23	CH ₂	0,85 (<i>m</i>)	26,1	26,0
C-24	CH	*	*	45,8

Posição	Tipo	δ_H 1	δ_C 1	δ_C Literatura
C-25	CH	1,65 (<i>m</i>)	29,1	29,1
C-26	CH ₃	0,82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	19,9	19,8
C-27	CH ₃	0,77 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5)	18,9	-
C-28	CH ₂	1,13 (<i>m</i>)	25,4	23,0
C-29	CH ₃	0,64 (<i>m</i>)	12,0	12,0

Table 4. System elution and gradient of the mobile phase of the analysis in HPLC-DAD.

Time (minuts)	Gradient	
	A	B
0-10	100%	0%
11-20	40%	60%
21-30	100%	0%
0-20	100%	0%
21-30	40%	60%
31-40	100%	0%
0-30	100%	0%
31-40	40%	60%
41-50	100%	0%

A= trifluoroacetic acid (TFA) 0.01%; B= acetonirola HPLC grade.

Table 5. Factorial planning used in the fingerprint of *C. cujete*.

Levels	Factors	
	Gradient (time)	Flow (ml/min)
+	50 min	0,8
0	40 min	1,0
-	30 min	1,2

01/02/2016

Pharmacognosy Reviews On Web: Article Cycle

Journal On Web
Pharmacognosy Reviews

Welcome Xirley Nunes
Article Cycle
Logout

- Home ▶
- Submission ▶
- Downloads ▶
- Symposia ▶
- Submitted manuscript(s) ▶
- Accepted manuscripts ▶
- Personal details ▶
- About us ▶
- Reach us ▶
- Help ▶

Article details...

Title Chemical constituents and biological activities of genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae): a systematic review

Type Plant Review

Submission Date 01-Feb-16 14:51

Subjects Pharmacognos - [Click here to update](#)

Author profiles [\[View author profiles\]](#)

Your article files...

First Page File(s) [phrev_7_16FP.docx](#)

Article File(s)

1	phrev_7_16.docx
---	---------------------------------

Images [View Images](#)

Forms No Forms Uploaded

CheckList [View CheckList](#)

Article related...

[Search PubMed](#) [View copyright form](#) **Copyright form received**

[Search in Medknow](#) **Images Received**

Progress of review process...

	Status	Comments	Phase entry date	Days in review
1	Editorial Review	-	01/Feb/16 14:51	--

[Modify/Add Files](#) ||

01/02/2016

Fwd: [phrev]:Acknowledgment of Online Submission - Iza Miranda Melo Paulo

Fwd: [phrev]:Acknowledgment of Online Submission

Xirley Pereira Nunes

seg 01/02/2016 19:08

Para: Iza Miranda Melo <izamiranda@live.com>;

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Pharmacognosy Reviews" <mueen.ahmed@phcog.net>

Data: 01/02/2016 16:50

Assunto: [phrev]:Acknowledgment of Online Submission

Para: <xirleyon@gmail.com>

Cc:

If you cannot see this page properly, please [click here](#).

Dear Dr. Nunes,

Pharmacognosy Reviews has received your manuscript entitled "Chemical constituents and biological activities of genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae): a systematic review" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "phrev_7_16". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

Meanwhile, you can fill authorship form via this link

https://docs.opoole.com/forms/d/1aTwhHMofaDHKhKaa-Fb9pmDOot0FHL_eQTN5CdEinE6Q/viewform

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to one journal at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright/contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same, if images uploaded by you are not of printable quality.

The Editors will review the submitted manuscript initially. If found suitable, it will follow a double-blinded peer review. We aim to finish this review process within a short time frame, at the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/phrev>.

The journal allows free access (Open Access) to its contents and permits authors to self-archive final accepted version of the articles on any OAI-compliant institutional / subject-based repository.

Due to high publishing cost and other financial constraints in the year 2011, Articles clearing in peer review process or upon acceptance, Authors are required to pay a minimum of Rs. 3500/- (Indian Authors) and 150/- USD (Foreign Authors) towards pre-press charges to Medknow Publications and Media Pvt. Ltd, Mumbai. For more details visit <http://www.phcogrev.com/contributors.asp>

Also, visit www.phcog.net for more details on other journals, Phocg Rev supports Journal of Contradicting results in Science, we recommend you to visit <http://www.icrsri.org>

Visit <http://www.phcogrev.com>

We thank you for submitting your valuable work to the Pharmacognosy Reviews.

Yours sincerely,

<https://outlook.live.com/owa/#Viewmodel=ReadMessageItem&ItemID=AQMkADAwATM3ZmYAZS1hY2EyLTViYzgmDACLTAwCgBGAAADKgFTTbEIs...> 1/2

**Chemical constituents and biological activities of genus *Crescentia* L.
(Bignoniaceae): a systematic review**

Iza Miranda Melo Paulo¹, Sandra Kelle Souza Macêdo¹, Juliana Leles Silva¹, Sirley Sharliny Gomes Campos¹, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida¹, Xirley Pereira Nunes^{1*}

¹Center for Studies and Research of Medicinal Plants (NEPLAME), Federal University San Francisco Valley, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

*Author for correspondence: Xirley Pereira Nunes, Federal University of San Francisco Valley, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil. Tel: +55 (87) 2101-6863. E-mail: xirley.nunes@univasf.edu.br

ABSTRACT

The genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae) is present in tropical America, and has plants widely used in folk medicine for skin problems, wound healing, insecticide, anemia, back pain and diabetes. However, phytochemical studies and biological activities conducted with species of the genus are scarce. This study aimed to analyze, through a systematic review, the works in the literature about the genus *Crescentia* L. with chemical and/or biological studies of the species of this genus. A systematic review was carried out by consulting the specialized databases using the keyword "Crescentia" and the selected items after full reading. Preliminary research has identified 131 articles, and 32 articles were selected for full analysis. Among the main biological activities already carried out with species of this genus there is the antibacterial, cytotoxic and antioxidant. The most prevalent chemical compounds that have been isolated of this genus are the class of terpenes, better known as iridoids, among other classes. Chemical and biological studies carried out with this genus shows the great potential of these species for future studies.

KEYWORDS: *Crescentia*; Bignoniaceae; Systematic Review.

INTRODUCTION

The Bignoniaceae family belongs to order Lamiales^[1] being represented by 82 genera and 827 species distributed primarily in pantropical and most diverse in region neotropical, especially in dry forests.^[2] It is the most important family of liana of the Americas^[3], in Brazil having its major center of diversity with 32 genera and 391 species.^[4] Of the eight tribes in this family is divided, only Tecomeae, Bignonieae and Crescentieae occur in Brazil.^[3]

The genus *Crescentia* L. has six to seven species restricted to tropical America from Mexico, the Amazon region of Brazil and the West Indies.^[5-7] Plants quite grown due to its ornamental value, mainly due to the form of fruit.^[7] Some species are well known, they being the *Crescentia cujete* L., widely cultivated throughout the neotropical region since prehistoric times, *C. alata* HBK occurring from Mexico to Costa Rica, *C. amazonica* Ducke in the Amazon and Orinoco river on top of, and are three other species of *Crescentia* that are endemic to the West Indies.^[6]

The botanical perspective the species *Crescentia* are small trees 5-10 m tall, with alternate leaves, yellowish green flowers, split calyx, tubular corolla, unilocular ovary with many eggs, fruit shaped like a berry, hard, ovoid or globose with many seeds.^[7]

In Brazil the fruits are used in folk medicine for skin problems, healing of wounds, insect repellent and anemia^[8-9]; the leaves are used to back pain and diabetes.^[10-11] However, phytochemical studies and biological activities conducted with species of the genus are scarce. In this context, this study aimed to analyze, through a systematic review, the works in the literature about the genus *Crescentia* L. dealing on chemical and/or biological studies which have been carried out with species of this genus.

MATERIALS AND METHODS

A systematic review was conducted through a literature search between the months of October 2015 to January 2016, including all articles published until the period of the survey, conducted by consulting the specialized databases Scielo, Pubmed, Capes Journal, Lilacs, Embase, Dare, Cochrane Library, Scopus and Science Direct, using the keyword "*Crescentia*". The selection of manuscripts is based on the criterion Phytochemistry area of interest, including articles published in any language, and articles with the keyword in the title, abstract or full text, well as studies reporting some biological/pharmacological activity *in vitro* and/or *in vivo* extracts, fractions and/or compounds isolated from any species of *Crescentia* genus.

After selection of the manuscripts, the complete reading of the articles was conducted. The resulting articles were manually reviewed in order to identify and exclude those who did not fit

the criteria. Six different biological activities reported were found for species, and 58 different isolates compounds belonging to different chemical classes.

RESULTS

Preliminary research has identified 131 articles: 10 of Scielo, 5 of Lilacs, 22 of Pubmed, 2 of Science Direct, and 92 of Scopus. However, among these, 41 were indexed in two or more databases and have been considered only once, resulting in 88 articles. After a screening of the titles, abstracts and full text, 34 articles were selected, while the remainder did not meet the inclusion criteria. A flowchart illustrating the progressive selection methodology and numbers of each phase is shown in [Figure 1]. The selected articles are arranged in accordance with the biological activities of the species and isolated compounds, and according to the chemical composition of species.

DISCUSSION

Biological/pharmacological activities of genus Crescentia

A significant number of articles reported biological and pharmacological activities of isolated compounds, extracts and/or fractions of different parts of the *Crescentia* genus, described in [Table 1].

The studies of the species of *Crescentia*, all treat pre-clinical studies and has not been reported in the literature any clinical study. Most studies are related to in vitro assays, although it has also been reported to pharmacological evaluation in vivo in some cases. We found biological studies, well as chemical, only two species of the genus *Crescentia*, the *Crescentia alata* and *Crescentia cujete*.

Among the main biological activities of species of this genus, highlights the antibacterial activity. In a study conducted by Pío-Leon et al.^[12] was evaluated bactericidal and bacteriostatic activity in vitro of extracts of fruits of against 17 strains (11 Gram-negative, 6 Gram-positive) obtained from clinical isolates provided by an laboratory, and four strains ATCC (American Type Culture Collection), two Gram-negative and two Gram-positive. The study revealed that the chloroform extract has greater activity against Gram-positive bacteria, while the hexane extract was more active against Gram-negative bacteria and showed bactericidal activity against all tested strains. Rojas et al.^[13] also found similar results, where the hexane and chloroform extract were active against Gram-positive bacteria, the methanol extract showed activity against

Streptococcus pneumoniae and *Streptococcus pyogenes*, in addition of the chloroform extract inhibited the yeast *Candida albicans*.

The leaves, stem barks and roots of *C. cujete* showed remarkable antibacterial activity, especially chloroform extract of the root against Gram Positive.^[14-16] The stem bark extract showed better activity than the extract of the leaves and are related to the chemical constituents present, even considering that some organisms were selectively more sensitive to an extract than to the other.^[17]

Another activity carried out with the two species is cytotoxic, tested against *Artemia salina* L., *Aedes aegypti*, and against the macrophage cell line J774.A1.^[18-21] The results showed that the extract of leaves was lethal for *A. salina* larvae, but no significant cytotoxic effect on the cell line macrophages J774.A1. The extract of the fruits produced no toxic effects on larvae of *A. aegypti* and *A. salina*.

The cytotoxicity of *C. cujete* on the inhibition of seed germination and development of weeds *Senna obtusifolia* L. and *Mimosa pudica* Mill. was evaluated, demonstrating excellent results in low concentrations of the extract.^[22] Another study suggested that the fruit of the species is abortive in ruminants.^[18]

The *C. alata* fruit were also tested as biocides against the insect *Spodoptera frugiperda* JE Smith., using the methanol extract.^[23] It was observed that four fractions produced mortality 40 to 80%, mainly due to iridoids, which are the main constituents of *C. alata*, showing that the species has the potential to be considered as a source of bioinsecticides against *S. frugiperda*.

The stem bark of *C. alata* were studied by Rodriguez-Lopez et al.^[24] for spasmolytic activity on spontaneous contractions of the isolated rat ileum, not being found positive result. With the same extract of the bark tested the antioxidant activity comparing the result with the activity shown by the alkaloid papaverine, also not getting positive results.

The ethanol extract of the leaves of *C. alata* was evaluated for anti-inflammatory activity *in vivo* on rat paw edema induced by carrageenan, and showed exert significant anti-inflammatory activity to the highest dose tested.^[19]

The antioxidant activity of the leaves, stem bark and fruits *C. cujete* were tested by the methods of the free radical scavenging 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing power (FRP), equivalent antioxidant capacity Trolox (EACT), and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC).^[25-26] The leaves show properties have substantial elimination of free radicals by DPPH and FRP methods. However, for EACT and ORAC methods, the extract of the fruits showed no activity.

Another activity held was the ability to neutralize hemorrhagic effect of poisonous snake bites, using the ethanol extract of *C. cujete* fruit, against the poison of snakes *Vipera russelli* and *Bothrops atrox*, showing activity only to neutralize the venom *V. russelli*.^[27-28]

The leaves and stem bark of *C. cujete* were further evaluated for anti-inflammatory activity using the in vitro method of stabilizing red blood cells in human blood (HRBC) in which was observed a great potential for membrane stabilization.^[16]

Chemical constituents of the genus Crescentia L.

Chemical studies found in this study show that were isolated in this genus flavonoids, phenolic acids, terpenes, especially iridoids, naphthoquinones, steroids and glycosides, identified by spectrometric methods, described in [Table 2] and shown in [Figure 2].

From the ethanol extract of *C. alata* leaves were isolated three flavonoids, two glycosylated.^[19] The kaempferol showed anti-inflammatory activity in vitro in the protection induced by endotoxin in J774.A1 macrophages that directly inhibit the L-arginine-NO.^[19] They was also isolated four terpenes of the iridoid class, using the methanol extract of the ripe fruit, considered the major constituents of the species and those responsible for larvicidal activity against *S. frugiperda*.^[23]

Seven furanonaphthoquinones and two furofuranonaphthoquinones *C. cujete* were isolated from MeCOEt extract of the stem bark, and tested for selective activity against genetically modified yeast rad 52 RS322YK, based on the differential response of repair deficient strains of DNA.^[29-30]

The vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid, isolated from the chloroform extract of *C. cujete* root, are indicated as the main responsible for the antibacterial activity presented by the fraction.^[15] It is also observed that there is a clear relationship between antioxidant activity and phenolic content presented plant.^[25]

In a study done by Coe and collaborators^[20] were not found alkaloids in *C. cujete*. However, the efficacy of the species in the above-described biological activities is due to the presence of other types of secondary metabolites, such as triterpene class of the iridoids, flavonoids, glycosides, phenols, saponins, steroids and tannins.^[20]

CONCLUSION

This review showed that the *Crescentia* L. genus has not yet been extensively studied in relation to Phytochemistry, and most found jobs refer to preliminary phytochemical screening and some biological activity. The most studied species are the fruits of *Crescentia kujete* and *Crescentia alata*. According to the study we concluded that were isolated and identified 58 compounds of different chemical species *Crescentia* distributed in triterpenes, steroids, flavonoids and phenolic acids, thus forming the chemical constitution of *Crescentia* genus. More emphasis is given to the iridoids, most frequent class, and the fruit and stem bark are the parts of the plant from which the iridoids were isolated more frequently. It was also observed that many extracts of species *Crescentia* have presented different biological activities as well as their chemical compounds already isolated, thus demonstrating the potential of these species. The results found in this study may help direct future research for the isolation of novel compounds, as well as drive new pharmacological investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge UNIVASF the opportunity to carry out this work, the CNPq, FACEPE and CAPES for financial support.

REFERENCES

1. Dahlgren G. The last dahlgrenogram. System of classification of the Dicotyledons. In: Tan K, editor. Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects. Edinburgh University Press; 1989. p. 249-260.
2. Lohmann LG, Ulloa CU. Bignoniaceae. Iplants Prototype Checklist. 2007. Access 2016 jan 17. Available from: <<http://www.iplants.org/>>.
3. Gentry AH. Bignoniaceae - Part I (Crescentieae and Turretieae). Flora Neotropica. Monogr. 25. New York: The New York Botanical Garden, 1980.
4. Lohmann LG. Bignoniaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Access 2016 jan 17. Available from: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>.
5. Miers J. On the Genus *Crescentia*. *Trans Linn Soc Lond.* 1868; 26(1): p. 159-180.
6. Elias TS, Prance GT. Nectaries on the fruit of *Crescentia* and other Bignoniaceae. *Brittonia.* 1978; 30(2): 175-181.

7. Madhukar VK, Srivastava SK, Dubey NK. Revision of Genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae) in India. *Am J Med Sci*. 2013; (4): 1164-1168.
8. Monteiro MVB, Bevilaqua CML, Palha MDCC, Braga RR, Schwanke K, Rodrigues ST, Lameira OA. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. *Acta Amaz*. 2011; 41(2): 233-242.
9. Brito MR, Senna-Valle L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2011; 25(2): 363-372.
10. Pereira Júnior LRP, Andrade AP, Araújo KD, Barbosa AS, Barbosa FM. Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos. *Floresta e Ambiente*. 2014; 21(4): 509-520.
11. Moraes MC, Andrade LHC. Estudo etnobotânico sobre a mata de restinga do Sítio do Outeiro de Maracaípe, Pernambuco. 2012.
12. Pío-León JF, Díaz-Camacho SP, López-López MA, Uribe-Beltrán MJ, Willms K, López-Angulo G, Montes-Avila J, Delgado-Vargas F. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *B Latinoam Caribe Pl*. 2013; 12(4).
13. Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharm*. 2001; 74(1): 97-101.
14. Chauhan S, Chauhan SVS. Antimicrobial activity of some plants of Bignoniaceae family. *Plant Med*. 2012; 4(3).
15. Binutu OA. Phytochemical and antimicrobial studies on *Crescentia cujete*. *Fitoterapia*. 1997; 68(2).
16. Parvin MS, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L, Islam ME. Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Res Notes*. 2015; 8(1): 412.
17. Binutu OA, Lajubutu BA. Potenciais antimicrobiana de algumas espécies vegetais da família Bignoniaceae. *Afr Med J Med Sci*. 1994; 23(3).
18. Assis TS, Medeiros RM, Araújo JASD, Dantas AF, Riet-Correa F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. *Pesqui Vet Bras*. 2009; 29(11): 919-924.

19. Autore G, Rastrelli L, Lauro MR, Marzocco S, Sorrentino R, Sorrentino U, Pinto A, Aquino R. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sci.* 2001; 70(5): 523-534.
20. Coe FG, Parikh DM, Johnson CA, Anderson GJ. The good and the bad: Alkaloid screening and brineshrimp bioassays of aqueous extracts of 31 medicinal plants of eastern Nicaragua. *Pharm Biol.* 2012; 50(3): 384-392.
21. Espitia-Baena JE, Duran-Sandoval HDR, Fandiño-Franky J, Díaz-Castillo F, Gómez-Estrada HA. Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). *Rev Cubana Plant Med.* 2011; 6(4).
22. Pereira SG, Guilhon GMSP, Santos LS, Pacheco LC, Cantanhede Filho AJ, Souza Filho APS. Fitotoxicidade da fase orgânica e do composto majoritário obtidos da polpa dos frutos de *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Biotemas.* 2015; 28(4): 51-59.
23. Valladares-Cisneros MG, Rios-Gomez MY, Aldana-Llanos L, Valdes-Estrada ME, Ochoa MG. Biological Activity of *Crescentia alata* (Lamiales: Bignoniaceae) Fractions on Larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla Entomol.* 2014; 97(2): 770-777.
24. Rodriguez-Lopez V, Salazar L, Estrada S. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. *Fitoterapia.* 2003; 74(7): 725-728.
25. Das N, Islam ME, Jahan N, Islam MS, Khan A, Islam MR, Parvin MS. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14(1): 45.
26. Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem.* 2010; 119(4): 1566-1570.
27. Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, Saldarriaga M, Diaz A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharm.* 2000; 73(1): 233-241.
28. Shastry CS, Maulik MB, Aswathanarayana BJ. Antivenom activity of ethanolic extract of *Crescentia cujete* fruit. *Int J Phytomed.* 2012; 4(1): 108.

29. Heltzel CE, Gunatilaka AL, Glass TE, Kingston DG, Hoffmann G, Johnson RK. Bioactive furanonaphthoquinones from *Crescentia cujete*. *J Nat Prod.* 1993; 56(9): 1500-1505.
30. Heltzel CE, Gunatilaka AL, Glass TE, Kingston DG. Furofuranonaphthoquinones: bioactive compounds with a novel fused ring system from *Crescentia cujete*. *Tetrahedron.* 1993; 49(31): 6757-6762.
31. Cuevas-Juárez E., Yuriar-Arredondo KY, Pío-León JF, Montes-Avila J, López-Angulo G, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *J Funct Foods.* 2014; 9: 78-88.
32. David JP, Meira M, David JM, Brandão HN, Branco A, Agra MF, Barbosa MRV, Queiroz LP, Giuliatti, AM. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia.* 2007; 78(3): 215-218.
33. Mahbub KR, Hoq MM, Ahmed MM, Sarker A. In Vitro Antibacterial Activity of *Crescentia cujete* and *Moringa oleifera*. *Bangladesh Res Pub J.* 2011; 5(4): 337-43.
34. Parvin MS, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L, Islam ME. Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Res Notes.* 2015; 8(1): 412.
35. Agarwal K, Popli SP. The constituents of *Crescentia cujete* leaves. *Fitoterapia.* 1992; 63: 476.
36. Nielsen LB, Slamet R, Wege D. The synthesis of 3-hydroxymethylfuro [3, 2-b] naphtho [2, 3-d] furan-5, 10-dione, a novel metabolite isolated from *Crescentia cujete*. *Tetrahedron.* 2009; 65(23): 4569-4577.
37. Kaneko T, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Nguyen MD. n-Alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry.* 1998; 47(2): 259-263.
38. Kaneko T, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Duc NM. Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry.* 1997; 46(5): 907-910.
39. Wang G, Yin W, Zhou ZY, Hsieh KL, Liu J K. New iridoids from the fruits of *Crescentia cujete*. *J Asian Nat Prod Res.* 2010; 12(9): 770-775.

Figure 1. Representative flowchart of the review of the steps.

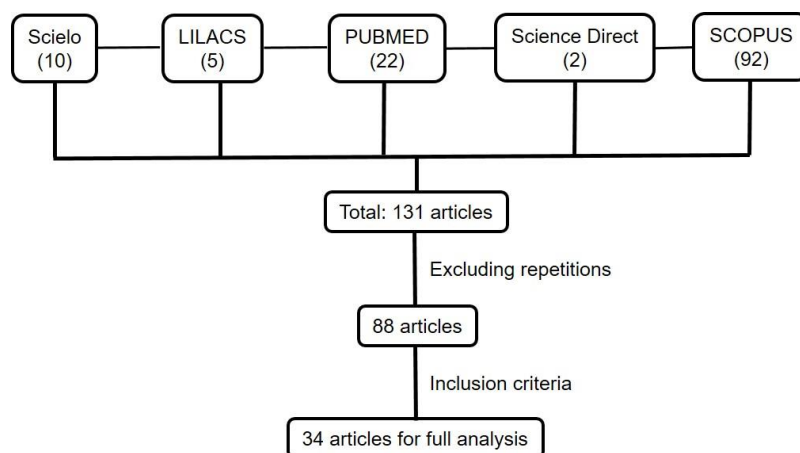


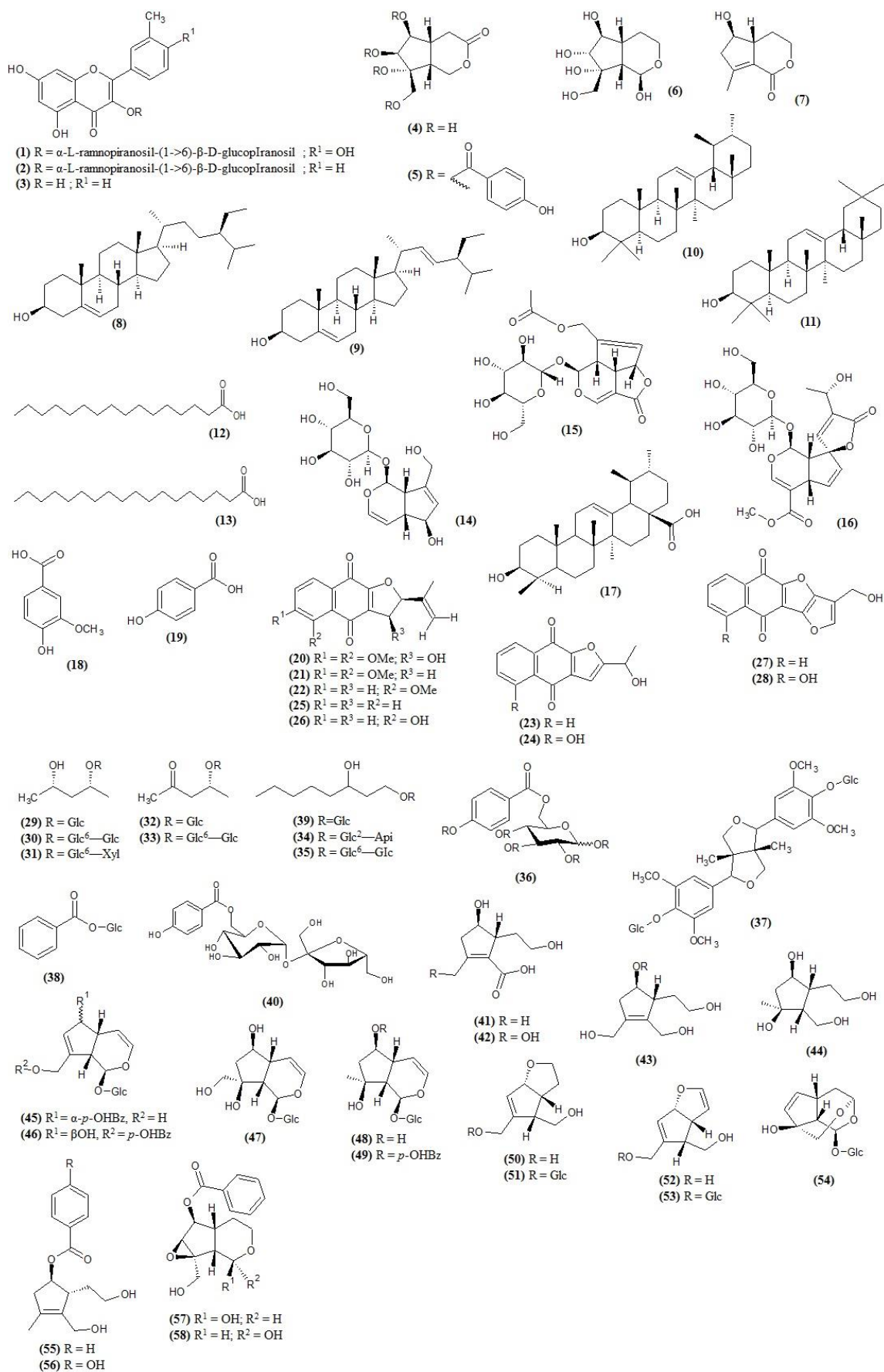
Figure 2. Structures of isolated compounds in species of *Crescentia* L.


Table I: Biological activity of extracts and fractions of the species *Crescentia*.

Species	Extract	Part of the Plant	Biological Activity	Reference
<i>C. alata</i>	Methanolic	Leaves	Anti-inflammatory and cytotoxic	[19]
	Methanolic	Fruit	Antioxidant	[31]
	Hexanic and chloroform	Fruit	Antibacterial	[12]
	Methanolic	Bark	Spasmolytic	[24]
	Hexanic, chloroform and methanolic	Fruit	Antibacterial	[13]
	Methanolic	Fruit	Larvicide	[23]
	<i>C. cujete</i>	-	Fruit	Cytotoxic
Hexanic, chloroform and methanolic		Root	Antibacterial	[15]
Methanolic		Leaves and stem bark	Antibacterial	[17]
Nd		Leaves and stem bark	Antibacterial	[14]
Aqueous		Leaves	Cytotoxic	[20]
Ethanollic and fractions: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and aqueous		Leaves and stem bark	Antioxidant	[25]
Methanolic		Aerial parts	Antioxidant and cytotoxic	[32]
Ethanollic		Fruit	Cytotoxic and genotoxic	[21]
Aqueous		Fruit	Antioxidant	[26]
Ethanollic		Leaves	Antibacterial	[33]
Ethanollic		Fruit	Antiophidic	[27]

Species	Extract	Part of the Plant	Biological Activity	Reference
	Ethanolic	Leaves and stem bark	Anti-inflammatory and antibacterial	[34]
	Ethanolic and ethyl acetate fraction	Fruit	Cytotoxic	[22]
	Ethanolic	Fruit	Antiophidic	[28]

Nd= No determined.

Table II: Chemical constituents found in species *Crescentia* L.

Species	Name	References
<i>C. alata</i>	(1) Rutin	[19]
	(2) Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside	
	(3) Kaempferol	
	(4) 6 β ,7 β ,8 α ,10-tetrahydroxy- <i>cis</i> -2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-one	[23]
	(5) 6 β ,7 β ,8 α ,10-tetra- <i>ph</i> ydroxybenzoyl- <i>cis</i> -2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-one	
	(6) 1 β ,6 β ,7 α ,8 α ,10-pentahydroxy- <i>cis</i> -2-oxabicyclo[4.3.0]nonane	
	(7) 6 β -hydroxy-2-oxabicyclo[4.3.0] Δ^{8-9} -nonen-1-one	
<i>C. cujete</i>	(8) β -sitosterol	[35]
	(9) Stigmasterol	
	(10) α -amirin	
	(11) β -amirin	
	(12) Palmitic acid	
	(13) Stearic acid	
	(14) Aucubin	
	(15) Asperuloside	
<i>C. cujete</i>	(8) β -sitosterol	[15]
	(17) Ursolic acid	
	(18) Vanilic acid	
	(19) 4-hydroxybenzoic acid	

Species	Name	References	
<i>C. cujete</i>	(20) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hydroxy-5,6-dimethoxydehydroiso- α -lapachone	[29]	
	(21) (2 <i>R</i>)-5,6-dimetoxydehydroiso- α -lapachone		
	(22) (2 <i>R</i>)-5-metoxydehydroiso- α -lapachone		
	(23) 2-(1-hydroxyethyl)nafto[2,3- β]-furan-4,9-dione		
	(24) 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)nafto[2,3- β]-furan-4,9-dione		
	(25) 2-isopropenilnafto[2,3- β]furan-4,9-dione		
<i>C. cujete</i>	(26) 5-hydroxydehydroiso- α -lapachone		
	(27) 3-hydroxymethylfuro[3,2 β]nafto[2-3d]furan-5,10-dione	[30-36]	
	(28) 9-hydroxy-3-hydroxymethylfuro[3,2 β]nafto[2-3d]furan-5,10-dione		
<i>C. cujete</i>	(29) 2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-2,4-pentanediol	[37]	
	(30) (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-2,4-pentanediol		
	(31) (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2- <i>O</i> - β -D-xilopyransyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-2,4-pentanediol		
	(32) (<i>R</i>)-4- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-4-hydroxy-2-pentanone		
	(33) (<i>R</i>)-4- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-4-hydroxy-2-pentanone		
	(34) (<i>R</i>)-1- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyransoyl-1,3-octanediol		
	(35) (<i>R</i>)-1- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopyranosyl-1,3-octanediol		
	(36) 6- <i>O</i> -(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)-D-Glucose		
	(37) Acantosideo D		
	(38) β -D-glucopyranosyl benzoate		
	(39) (<i>R</i>)-1- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-1,3-octanediol		
	(40) β -D-fructofuranosyl 6- <i>O</i> -(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)- α -D-glucopyranoside		
	<i>C. cujete</i>	(41) Crescentin I	[38]
		(42) Crescentin I	
(43) 6- <i>O</i> -(<i>p</i> -hydroxybenzoyl)-eucomiol			
(44) Crescentina IV			

Species	Name	References
	(14) Aucubin	
	(45) 6- <i>O-p</i> -hydroxybenzoyl-6-epiaucubin	
	(46) Agnuside	
	(47) 5,7-bisdeoxicinanchoside	
	(48) Ajugol	
	(49) 6- <i>O-p</i> -hydroxy-benzoylajugol	
	(50) Ningpogenin	
	(51) Ningpogenin-10- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	
	(52) 3,4-dehydroningpogenin	
	(53) 3,4-dehydroningpogenin-10- <i>O</i> - β -D-Glucopyranoside	
	(54) Crescentoside C	
<i>C. cujete</i>	(55) 6- <i>O-p</i> -hydroxybenzoyl-10-deoxyeucommiol	[39]
	(56) 6-Obenzoyl-10-deoxyeucommiol	
	(57) and (58) 6- <i>O</i> -benzoyl-dihydrocatalpolgenin (a mixture of two compounds)	
	(50) Ningpogenin	