Bruna Silvestroni Pimentel

Constituintes de ceras cuticulares de espécies de *Croton* L.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Prof^ª Dr. Antonio
Salatino

Versão corrigida

São Paulo

2014

Bruna Silvestroni Pimentel

Constituintes de ceras cuticulares de
espécies de *Croton* L.

Constituents of cuticular waxes from
Croton L. species

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Prof^ª Dr. Antonio
Salatino

São Paulo

2014

Pimentel, Bruna Silvestroni

Constituintes de ceras cuticulares de espécies de *Croton* L.

85 páginas

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Cera cuticular 2. *Croton* 3. Quimiotaxonomia

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Departamento de Botânica

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedico este trabalho à minha família e
ao meu namorado Mauro,
por existirem na minha vida.

(Watterson, B. There's Treasure Everywhere: A Calvin and Hobbes Collection. 1996)

"If you don't love yourself, how in the hell are you gonna love
somebody else?"

RuPaul

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao professor Salatino, pela orientação, ensinamentos, paciência, respeito e pelas conversas infundáveis sobre tudo!

À professora Maria Luiza Faria Salatino, pelos ensinamentos, apoio, carinho, conselhos, atenção e pela companhia nos cafés matinais!

À Profa. Claudia Furlan e Profa. Déborah pelos ensinamentos, opiniões importantes, discussões e conversas não acadêmicas. Déborah: obrigada por me ensinar a fazer o café fitoquímico!

Ao Prof. Marcelo pela generosidade e prestatividade. Seja bem vindo!

À Giuseppina Negri, pela identificação dos triterpenos e esteroides. Muito obrigada!

À Lucimar, pelo auxílio nas coletas e dicas valiosas.

À Inês Cordeiro pela companhia nas coletas, identificação das espécies, paciência, generosidade e por sempre se lembrar de mim nas suas coletas.

Ao Prof. Diego Demarco pelo auxílio e identificações das imagens de MEV, pela paciência e inúmeras discussões sobre a morfologia da cera e tricomas de *Croton*.

Ao Irwandro pelas imagens de MEV e pela paciência com as inúmeras repetições!

Aos técnicos: Paula (ex-técnica) pela enorme ajuda no início do mestrado; Leandro, e em especial, Mourisa e Aline. Sem a ajuda de vocês, eu não terminaria este projeto! Obrigada.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e demais funcionários do IBUSP.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos amigos e amigas do Laboratório de fitoquímica por terem me alegrado em momentos críticos, especialmente, Adne, Alice, Anary, Augusto, Carmen, Carol, Fernandas, Janaina, Janayne, Jocimar, Kátia, Liss, Marco, Natália, Paula, Priscila, Toshi, Sarah. Obrigada pela amizade!

A Prof Magda pelos conselhos, ao Bruno, Paula e Dani pelo apoio, idas ao posto e pausas do café.

Aos amigos que sempre me ajudaram direta ou indiretamente: Cassis, Erro, Mica, SemVe, Wally-man, Amarula, Pato, Perê, Junior, David, Gabriel e muitos outros. Muito obrigada!

À minha família! Amo vocês!

Ao meu pai, Antonio, por todo o apoio.

À minha mãe, Virlei, eu não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Muito obrigada por nunca ter desistido de mim e por todo o amor!

À minha avó, Vilma, por todo o carinho e por me mimar sempre!

À minha irmã, Stefani! Sem você a vida não teria graça! Quero ser igual a você quando eu crescer! Você é o meu orgulho! E ao Marcelo, obrigada Pre!

Aos meus padrinhos, por sempre estarem presentes na minha vida, me apoiando e mimando!

Ao tio João pelas conversas sobre biologia!

Aos primuscos Fê e Ri por todo o apoio! e ao Guilherme, obrigada!

À família Caiuby e Sugawara por terem me recebido tão bem! Já me sinto parte da família!

Ao Mauro, por todo o carinho, cuidado e paciência comigo nesses sete anos.

Muito Obrigada, lindo! E obrigada pela ajuda na formatação!

Obrigada a todos. Esse trabalho não seria o mesmo sem vocês

Índice

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Os sistemas de revestimento das plantas.....	1
1.2. As ceras cuticulares	2
1.3. Morfologia das ceras epicuticulares	4
1.4. Biossíntese dos compostos de ceras.....	5
1.4.1. Biossíntese de compostos alifáticos	5
1.4.2 Biossíntese de triterpenoides.....	8
1.5 Transporte dos componentes de cera.....	11
1.6 Quimiotaxonomia	12
1.7 A família Euphorbiaceae	13
1.8 O gênero <i>Croton</i> L.	14
1.8.1 Caracterização geral.....	14
1.8.2 Usos medicinais e caracterização química	15
2. Objetivos	17
3. Material e Métodos	18
3.1 Material	18
3.2 Métodos	18
3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura da superfície foliar.....	18
3.2.2 Determinação do teor de cera cuticular	19
3.2.3 Separação das classes de constituintes da cera cuticular.....	20
3.2.4 Análise das frações.....	20
3.3 Análises de agrupamento	22
4. Resultados e Discussão	23
4.1 Microscopia eletrônica de varredura da superfície foliar de espécies de <i>Croton</i>	23
4.2 Determinação do teor de cera cuticular	28
4.3 Separação das classes químicas dos componentes de cera cuticular ...	29
4.4 Análises das frações de <i>n</i> -alcanos.....	31
4.5 Análise das frações de alcoóis primários e triterpenos	35
4.5.1 Alcoóis primários.....	35
4.5.2 Triterpenos.....	39

4.5.3 Esteroides	50
4.6 Análises de agrupamento	54
4.6.1 <i>n</i> -Alcanos	54
4.6.2 Alcoóis primários.....	58
4.6.3 Triterpenos.....	61
4.6.4 Esteroides	64
4.6.5 <i>n</i> -Alcanos e alcoóis primários	64
5. Considerações finais	67
Resumo	68
Abstract.....	70
Referências Bibliográficas	72

Lista de Figuras

Figura 1 - Biossíntese de ácidos graxos	6
Figura 2 - Biossíntese dos componentes de ceras cuticulares	8
Figura 3 - Representação da síntese de pirofosfato de isopentenila (IPP) e de pirofosfato de dimetilalila (DMAPP).	9
Figura 4 - Biossíntese de pirofosfato de farnesila (FPP)	10
Figura 5 - Biossíntese de triterpenos.....	11
Figura 6 - Exemplos de fitoesteróis.	11
Figura 7 - Eletromicrografias de varredura da superfície foliar abaxial e adaxial de espécies de <i>Croton</i>	23
Figura 8 - Cromatogramas em camada delgada preparativa de ceras foliares cuticulares de espécies de <i>Croton</i>	30
Figura 9 - Espectro de massas do <i>n</i> -triacontano.....	32
Figura 10 - Espectro de massas do derivado TMSi do octacosanol.....	36
Figura 11 - Espectro de massas do derivado TMSi da α -amirina.....	41
Figura 12 - Espectro de massas do derivado TMSi da β -amirina.....	42
Figura 13 - Espectro de massas do derivado TMSi do lupeol.	42
Figura 14 - Espectro de massas da friedelan-3-ona.....	43
Figura 15 - Espectro de massas do triterpeno 1.....	44
Figura 16 - Espectro de massas do triterpeno 2.....	45
Figura 17 - Espectro de massas do triterpeno 3.....	45
Figura 18 - Espectro de massas do triterpeno 5.....	46
Figura 19 - Espectro de massas do triterpeno 6.....	47
Figura 20 - Espectro de massas do triterpeno 7.....	47
Figura 21 - Espectro de massas do triterpeno 9.....	48
Figura 22 - Espectro de massas do triterpeno 12.....	49
Figura 23 - Espectro de massas do derivado TMSi do campesterol.	51
Figura 24 - Espectro de massas do derivado TMSi do sitosterol.	52
Figura 25 - Espectro de massas do derivado TMSi do estigmasterol.	53
Figura 26 - Espectro de massas de estigmast-4-en-3-ona.....	53
Figura 27 - Dendrograma de afinidades entre os indivíduos de espécies de <i>Croton</i> , baseado na distribuição de <i>n</i> -alcanos das ceras foliares cuticulares, determinado pelo coeficiente de Distancias Euclidianas e método UPGMA de agrupamento.	55

Figura 28 - Dendrograma de afinidades entre os indivíduos das espécies de <i>Croton</i> baseado na distribuição de alcoois primários das ceras foliares cuticulares, determinado pelo coeficiente de Distancias Euclidianas e método UPGMA de agrupamento.	59
Figura 29 - Dendrograma de afinidades entre indivíduos de espécies de <i>Croton</i> , baseado na distribuição de triterpenos das ceras foliares cuticulares, determinado pelo coeficiente de Dice e método UPGMA de agrupamento.	62
Figura 30 - Dendrograma de afinidades entre os indivíduos das espécies de <i>Croton</i> baseado na reunião de <i>n</i> -alcanos e alcoois primários das ceras foliares epicuticulares, determinado pelo coeficiente de Distâncias Euclidianas com método UPGMA de agrupamento.	65

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espécies de <i>Croton</i> utilizadas no trabalho.	18
Tabela 2 - Rendimento de cera foliar cuticular de espécies de <i>Croton</i>	29
Tabela 3 - Tempos de retenção e <i>n</i> -alcanos identificados nas ceras foliares cuticulares de espécies de <i>Croton</i>	31
Tabela 4 - Abundâncias relativas dos homólogos de <i>n</i> -alcanos nos indivíduos de <i>Croton</i> estudados	33
Tabela 5 - Tempos de retenção e <i>n</i> -álcoois primários identificados nas ceras cuticulares de espécies de <i>Croton</i> estudadas	36
Tabela 6 - Abundâncias relativas dos homólogos de álcoois primários, analisados como derivados TMSi, da cera foliar cuticular de indivíduos de <i>Croton</i>	37
Tabela 7 - Tempos de retenção dos triterpenos encontrados nas ceras cuticulares de espécies de <i>Croton</i> estudadas	39
Tabela 9 - Tempos de retenção dos esteroides identificados nas ceras cuticulares de espécies de <i>Croton</i> estudadas	50

1. Introdução

1.1 Os sistemas de revestimento das plantas

As plantas terrestres possuem tecidos de revestimento que conferem resistência a diversos fatores: a cutícula é o revestimento presente na superfície das folhas e dos tecidos clorofilados, o súber desempenha essa função nos caules e raízes em crescimento secundário. Em comparação com a cutícula, os tecidos de revestimento dos caules e raízes são bem mais espessos, e constituem o súber. A cutícula é basicamente composta por uma matriz polimérica insolúvel e por lipídeos solúveis. A matriz polimérica, a cutina, é composta por ω -hidroxi ácidos graxos com cadeias carbônicas de C16 e C18 (Baker, 1982). Os lipídeos solúveis representam uma complexa mistura de compostos de cadeia alifática, as ceras cuticulares. No súber do caule e da raiz, podem ocorrer outras substâncias poliméricas lipófilas, como a suberina e lignina.

Essa camada protetora, a cutícula, rica em ceras, possui várias funções, entre elas o controle da perda de água por transpiração (Rieder & Schreiber, 2001); controle da temperatura (Buschhaus *et al.*, 2007); proteção contra radiação solar (Pfundel *et al.*, 2006); prevenção do ataque de patógenos (Buschhaus & Jetter, 2011); regulação da interação da planta com insetos (Eigenbrode & Esperlie, 1995); repelência da água e de partículas (Barthlott & Neinhuis, 1997; Koch *et al.*, 2009)

A produção de cera cuticular é influenciada por diversas condições, como variações de temperatura, estresse hídrico, ataque de patógenos e herbívoros, entre outras (Cameron *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Franchini *et al.*, 2010).

O surgimento de uma camada hidrófoba cobrindo as superfícies aéreas primárias das plantas vasculares é apontado como um dos fatores mais importantes para o seu estabelecimento no ambiente terrestre (Baker 1982). Essa camada hidrófoba recebe o nome de cutícula, que em latim (*cuticula*) significa “pele fina” (Riederer, 2006).

Os vestígios mais antigos de cutículas de plantas remontam ao limite entre o fim do Siluriano e o início do Devoniano, cerca de 400 milhões de anos atrás. A Paleoecofisiologia interpretou o surgimento simultâneo de cutículas e estômatos como evidências de adaptações fisiológicas para a colonização da terra, para a atmosfera relativamente seca, por precursores basais de modernas plantas

superiores (Riederer, 2006). A cutícula basal provavelmente também teve outras funções equivalentes às de cutículas modernas, como defesa contra parasitas, proteção contra a radiação ultravioleta (UV) e repelência à água.

A origem evolutiva da cutícula não é bem conhecida, mas um estudo recente com musgo *Funaria hygrometrica* demonstrou que a caliptra apresenta uma cutícula associada, apresentando um potencial na prevenção da dessecação de esporófitos imaturos e pode ter sido fundamental para a evolução do esporófito do musgo (Budke *et al.*, 2011).

1.2. As ceras cuticulares

As ceras cuticulares formam a fração da cutícula que pode ser facilmente extraída por solvente orgânico e geralmente apresentam-se como uma mistura de substâncias com propriedades físicas e químicas semelhantes.

Essas substâncias são insolúveis e repelentes à água, cristalinas ou pseudocristalinas à temperatura ambiente, e com ponto de fusão entre 40° C a 100° C (Mazliak, 1968).

Comumente, a extração da cera cuticular é realizada por imersão das folhas em solvente orgânico. É indicado o uso de solvente com polaridade intermediária, que permite a extração de hidrocarbonetos extremamente hidrofóbicos e compostos polares com múltiplos grupos funcionais (Stammitti *et al.*, 1996); *n*-hexano é indicado somente para extração de constituintes muito apolares, como os *n*-alcanos. O solvente mais indicado, segundo Holloway (1984), é o clorofórmio. O tempo de contato entre o material e o solvente varia entre 2 segundos até 1 minuto (Silva Fernandes *et al.*, 1964; Silva Fernandes 1965; Salatino *et al.*, 1989; Cordeiro *et al.*, 2011). Além disso, o material deve estar intacto, assim a extração de lipídios internos é minimizada (Jetter *et al.*, 2006).

Existem dois tipos de ceras cuticulares: as que estão embebidas na matriz, ceras intracuticulares, e as que estão presentes na superfície, ceras epicuticulares, que frequentemente formam estruturas tridimensionais complexas (Neinhuis *et al.*, 2001).

As ceras cuticulares compreendem as frações epi- e intracuticular e são uma complexa mistura de compostos de cadeia alifática como *n*-alcanos, ácidos graxos,

alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres (Barthlott *et al.*, 1998; Jetter *et al.*, 2006; Dragota & Riederer, 2007). Triterpenoides não são raros; ocasionalmente, outras classes de substâncias, como os flavonoides, podem ocorrer em ceras cuticulares. As ceras cuticulares podem conter substâncias inéditas. Como exemplos, podem-se citar um hidrocarboneto aromático de *Pilocarpus jaborandi* (Negri *et al.*, 1998) e flavonóides prenilados e C-metilados de Velloziaceae (Harborne *et al.*, 1993).

As ceras epicuticular e intracuticular podem apresentar teores e composições distintas (Shepherd & Griffiths, 2006). Jetter e colaboradores (2000), em estudo realizado com *Prunus laurocerasus*, observaram que a cera epicuticular é constituída por compostos alifáticos, enquanto a cera intracuticular apresenta 63% de triterpenoides. Buschhaus & Jetter (2011) observaram que a cera epicuticular apresenta maiores quantidades de ácidos graxos e alcanos, enquanto a cera intracuticular apresenta maiores concentrações de alcoóis primários e de compostos cíclicos, como triterpenos, estes últimos sendo quase exclusivos dessa camada.

A composição das ceras cuticulares pode variar entre grupos taxonômicos, podendo ser característico de espécies ou grupos de espécies (Mimura *et al.*, 1998). Por outro lado, a distribuição de constituintes nas ceras cuticulares pode variar em função de estádios de crescimento e condições ambientais (Bondada *et al.*, 1996; Furlan *et al.*, 2006; Buschhaus *et al.*, 2011).

Segundo Jeffree (2006), a quantidade de cera cuticular foliar pode ser menor que 1 µg por cm² em algumas espécies. No entanto, *Copernicia prunifera*, fonte da cera de carnaúba, apresenta camadas grossas de cera com vários miligramas por centímetro quadrado, podendo ser extraída mecanicamente batendo as folhas secas (Jeffree, 2006). A cera de carnaúba possui o maior ponto de fusão entre as ceras naturais e é comercialmente a mais importante, sendo utilizada na fabricação de ceras automotivas, produtos para marcenaria e nas indústrias alimentícia e cosmética.

Silva Fernandes e colaboradores (1964, 1965) estão entre os primeiros pesquisadores a determinar o teor e a composição química da cera de frutos e folhas de plantas de interesse econômico, como maçã, repolho, café e eucalipto. Recentemente, estudos vêm sendo feitos com o objetivo de alterar a composição da cera epicuticular em plantas transgênicas, com vistas ao incremento da resistência a

pressões ambientais extremas (Kosma *et al.*, 2009; Lü *et al.*, 2009; Reina-Pinto *et al.*, 2009).

1.3. Morfologia das ceras epicuticulares

Em 1871, Bary fez o primeiro estudo de morfologia de ceras epicuticulares, utilizando um microscópio de luz e analisando 60 espécies vegetais. Foi possível dividir as ceras em quatro categorias: camadas ou crostas, “varetas”, grânulos e empilhadas/amontoadas (Jeffree, 2006). Com os avanços tecnológicos e com o advento da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível a descoberta de outras categorias e, em 1998, Barthlott e colaboradores analisaram cerca de 13000 espécies e puderam observar que as ceras epicuticulares estão depositadas sobre a superfície da cutícula como um filme amorfo, sobre o qual, muitas vezes, há a deposição de mais cera formando camadas, crostas ou estruturas cristalóides, classificando-as em 23 tipos morfológicos. As camadas podem ser lisas, fissuradas ou crostosas, enquanto os cristalóides podem se apresentar como grânulos, placas e plaquetas (inteiras, irregulares ou membranosas), bastonetes (poligonais, teretiformes, “torcidos” ou “enrugados” transversalmente), filamentos ou túbulos.

Essas estruturas apresentam uma forte correlação com a composição química da cera, considerando-se que seu constituinte predominante seja o responsável pela formação dos cristais (Kolattukudy, 1976; Baker, 1982; Jeffree, 1986; Gülz, 1994; Barthlott *et al.*, 1998). Assim, por exemplo, ceras epicuticulares com *n*-alcanos como constituintes principais apresentam, muitas vezes, aparência amorfa; túbulos são encontrados onde há predominância de alcoóis secundários ou β -dicetonas e plaquetas onde os compostos majoritários são alcoóis primários ou cetonas, mas nesse último caso são geralmente mais complexas (Eigenbrode & Espelie, 1995; Barthlott *et al.*, 1998; Jeffree, 2006). Esses cristais também apresentam padrões de orientação e de agregação bem definidos (Jeffree, 2006; Barthlott *et al.*, 1998), sendo utilizados para a caracterização de táxons. Em monocotiledôneas, foram estabelecidos os tipos “*Convallaria*” e “*Strelitzia*”, cada um caracterizando grupos de famílias (Barthlott & Frolich, 1983 *apud* Pansarin *et al.*, 2008). No entanto, tais tipos de ceras foram também encontrados em algumas espécies de eudicotiledôneas (Jeffree, 2006). O clado das Comelinídeas apresenta

como sinapomorfia ceras cuticulares do tipo bastonetes agregados com forma ondulada (APG III, 2009). Fatores genéticos são determinantes da morfologia das ceras (Jeffree, 2006), e a expressão desses genes relacionados à síntese de ceras cuticulares pode ser influenciada por fatores ambientais (Shepherd & Griffiths, 2006; Joubès *et al.*, 2008).

A estrutura da cera pode influenciar na adesão e locomoção de insetos herbívoros, influenciando na interação entre plantas e insetos (Müller & Riederer, 2005). Em estudo realizado por Riedel e colaboradores (2003) observou-se que os cristais presentes nas paredes internas dos jarros de espécies de *Nepenthes* criam uma superfície escorregadia, crucial para a captura de insetos.

1.4. Biossíntese dos compostos de ceras

1.4.1. Biossíntese de compostos alifáticos

Suh e colaboradores (2005) demonstraram que a síntese da cutícula começa nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, por deposição de uma procutícula na fase globular tardia da embriogênese de *Arabidopsis* e é fortemente co-regulada com o crescimento das plantas, possibilitando a deposição constante de cera e cutina.

Os componentes das ceras cuticulares consistem de uma mistura complexa de séries homólogas de compostos alifáticos de cadeia longa (VLC, do inglês *very long chain*), triterpenoides e compostos minoritários, como taninos e flavonóides (Samuels *et al.*, 2008). As cadeias alifáticas dos compostos de ceras podem ser produzidas por duas vias distintas originando: (I) alcoóis primários e ésteres, e (II) aldeídos, alcanos, alcoóis secundários e cetonas (Bernard & Joubès, 2013).

Segundo Dewick (2009), inicialmente ocorre a síntese de ácidos graxos C16 e C18 no estroma dos plastídeos pelo complexo ácido graxo sintase do tipo II (FAS, do inglês *fatty acid synthase*): Acetil-CoA é a unidade inicial e o malonil-CoA é a unidade extensora, ambos formando tioésteres ligados a enzimas. Ocorre inicialmente a reação de Claisen, catalisada pela enzima ácido graxo sintase, formando um β -cetoéster que é reduzido à álcool, que passa então por desidratação, formando o éster conjugado e há redução da dupla ligação, formando-se assim um composto com dois átomos de carbonos a mais que o composto inicial; esse

composto volta ao sistema, sendo adicionada mais uma unidade C2 via malonil-ACP, que passa por todo o ciclo de reações (redução-desidratação-redução), aumentando o tamanho da cadeia em dois átomos de carbonos. Ciclos sucessivos de adição de unidades C2 conduzem à síntese da cadeia final. Um grupamento cetônico é reduzido após cada passo de condensação e antes da próxima extensão (adição de malonil-CoA) (Figura 1).

Figura 1 - Biossíntese de ácidos graxos (adaptado de Dewick, 2009).

Os ácidos graxos C16 e C18 assim produzidos são esterificados a Coenzima A (CoA) por enzimas LACS (do inglês *long chain acyl-CoA synthase*) e exportados do plastídeo para o retículo endoplasmático, onde sofrerão alongamento de suas cadeias mediado por um complexo multienzimático de alongases (FAE, do inglês *fatty acid elongase*, Kunst & Samuels, 2003; Samuels *et al.*, 2008; Kunst & Samuels, 2009; Bernard & Joubès, 2013), tornando-se ácidos graxos de cadeia longa, com, geralmente, 20 a 36 átomos carbono em suas cadeias (Post-Beittenmiller, 1999 *apud* Bernard & Joubès, 2013).

Os componentes de ceras derivados desses ácidos graxos de cadeia longa são formados por duas vias biossintéticas: via de redução do grupamento acila, que dá origem aos constituintes com números pares de átomos de carbono, como aldeídos, álcoois primários e ésteres; via de descarboxilação, que leva à formação de alcanos, álcoois secundários e cetonas, que são constituintes com predominância de homólogos com números ímpares de átomos de carbono (Kunst & Samuels, 2003). Segundo Kunst & Samuels (2003), a formação de aldeídos ocorre na via de redução no grupamento acila, já que, bioquimicamente, os aldeídos fazem parte da formação de álcoois primários: ácidos graxos são reduzidos a aldeídos e estes a álcoois primários, no entanto, um estudo realizado por Rowland & Domergue (2012) revelou que a biossíntese de álcoois a partir de ácidos graxos pode ser realizada por uma única enzima, sem a formação do intermediário aldeído, em estudos *in vitro*. Bernard & Joubès (2013) posicionam os aldeídos na via da descarboxilação, já que estudos realizados com mutantes de *Arabidopsis* sugerem que aldeídos sejam precursores na formação de alcanos.

Na via de redução da acila, as enzimas redutases de ácidos graxos formam álcoois primários. Estes podem ser combinados com ácidos graxos de cadeia longa pela enzima cera sintase (WSD1, encontrada em *Arabidopsis*), levando à formação de ésteres. Outra alternativa seria a redução dos ácidos graxos primeiramente a aldeídos e, posteriormente, redução destes a álcoois primários. Vioque & Kolattukudy (1997) sugerem que os álcoois primários são produzidos diretamente a partir dos ácidos graxos, sem a formação de intermediário aldeído. No entanto, um estudo realizado com mutantes de *Arabidopsis* demonstrou que a mutação no gene CER4 afetou a via de redução da acila: observou-se uma diminuição de álcoois primários e ésteres e um aumento nas quantidades de aldeídos, sugerindo a presença deste composto como intermediário.

Na via da descarboxilação, os aldeídos perdem o grupo funcional (perda de um grupo CO), dando origem aos alcanos. A oxidação dos alcanos leva à formação dos álcoois secundários; uma oxidação posterior dará origem a cetonas. Ambas as reações são catalisadas pela mesma enzima, segundo estudos realizados em *Arabidopsis* (Bernard & Joubès, 2013). Outra alternativa seria a transformação direta de ácidos graxos em alcanos, sem o intermediário aldeído.

Diversos estudos foram feitos com mutantes de *Arabidopsis* a fim de se encontrar as enzimas responsáveis pela biossíntese de compostos de cera. Muitas enzimas foram encontradas, no entanto, não houve êxito na busca de enzimas específicas responsáveis pela transformação de aldeídos em alcanos ou de aldeídos em alcoóis primários (revisão feita por Bernard & Joubés, 2013).

A Figura 2 esquematiza a biossíntese dos componentes de ceras.

Figura 2 - Biossíntese dos componentes de ceras cuticulares. Os genes CER4, WSD1, MAH1 e LACS) foram estudados em *Arabidopsis*; pontos de interrogação indicam enzimas desconhecidas (Adaptado de Samuels et al., 2008; Kunst & Samuels, 2009; Bernard & Joubés, 2013).

1.4.2 Biossíntese de triterpenoides

Outros componentes importantes da cera cuticular são os triterpenoides, substâncias que são biossintetizadas a partir da via acetato-mevalonato (Vranová et al., 2013). Podem ser divididos em dois grupos principais: os compostos tetracíclicos, de quatro anéis (os esteroides), e os pentacíclicos, de cinco anéis (os triterpenos) (Vickery & Vickery, 1981).

A biossíntese dos triterpenos começa com a formação do mevalonato, composto de seis carbonos, através da redução, por NADPH, da hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA), proveniente de 3 moléculas de acetil-CoA. Por dupla fosforilação seguida de descarboxilação, obtém-se o pirofosfato de isopentenila (IPP); este, por isomerização forma o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Figura 3).

Figura 3 - Representação da síntese de pirofosfato de isopentenila (IPP) (Adaptação de Vranová et al., 2013 e de Thimmappa et al., 2014) e de pirofosfato de dimetilalila (DMAPP).

A combinação de uma unidade de IPP e outra de DMAPP dá origem ao pirofosfato de geranila (GPP). A adição de outra unidade de IPP origina o pirofosfato de farnesila (FPP), um composto com 15 átomos de carbono (C15) (Figura 4).

Figura 4 - Biossíntese de pirofosfato de farnesila (FPP) (Adaptação de Vranová et al., 2013).

Duas unidades de FPP darão origem ao *esqualeno* (um composto com 30 átomos de carbono), o precursor de todos os triterpenoides cíclicos e esteróides. O esqualeno é ciclisado por ação da enzima esqualeno epoxidase-ciclase, formando o 2,3-epóxi-esqualeno. A reação requer oxigênio e NADPH. O 2,3-epóxi-esqualeno é o precursor imediato de triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos. Na formação dos triterpenos tetracíclicos, a enzima cicloartenol-ciclase formará o cicloartenol, principal precursor dos fitoesteróis (esteroides vegetais) mais comuns. No caso dos triterpenos pentacíclicos, a nova conformação do composto 2,3-epóxi esqualeno, por ação da ciclase, formará o cátion damarenil, precursor do cátion lupanil (precursor do lupeol), oleanil (precursor da β -amirina), ursanil (precursor da α -amirina) entre outros precursores (Brooks, 1979, Dey & Harborne, 1997; Piironen *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2002; Dewick, 2009; Vranová *et al.*, 2013; Thimmappa *et al.*, 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Biossíntese de triterpenos (Adaptação de Thimmappa et al., 2014).

Os fitoesteróis diferem entre si por detalhes estruturais. O estigmasterol e o β -sitosterol, apresentados na Figura 6A e 6B, diferem entre si pela ligação dupla entre C-22 e C-23. O campesterol (Figura 6C) apresenta um grupo metila em C-24, enquanto os outros dois fitoesteróis apresentam um grupo etila (Piironen *et al.*, 2000).

Figura 6 - Exemplos de fitoesteróis.

1.5 Transporte dos componentes de cera

Os componentes de ceras cuticulares devem ser transportados dos seus sítios de síntese para a membrana plasmática e daí para a cutícula. O transporte intracelular desses compostos permanece desconhecido, no entanto, algumas hipóteses têm sido discutidas recentemente. No que diz respeito ao transporte dos compostos produzidos no retículo endoplasmático para a membrana plasmática, Bernard & Joubés (2013) sugerem algumas hipóteses: (I) presença de proteínas carregadoras; (II) acumulação dentro de vesículas do tipo oleosina; (III) transporte em vesículas provenientes do aparato de golgi; (IV) contato físico entre o retículo e a membrana plasmática. O transporte dessas moléculas da membrana plasmática para a matriz extracelular ocorre por intermédio de proteínas carregadoras do tipo ABC (Samuels *et al.*, 2008). Diversos autores têm proposto que proteínas de transferência de lipídios (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*) estariam associadas aos mecanismos de transporte de cera para a cutícula (Kader, 1996; Kunst & Samuels, 2003; Yeats & Rose, 2008).

1.6 Quimiotaxonomia

Várias classes de metabólitos secundários têm sido amplamente utilizadas em quimiotaxonomia, como os alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, compostos de ceras, lactonas sesquiterpenicas, saponinas, terpenoides, betalainas e iridoides (Cronquist, 1981; Harborne & Turner, 1984; APG III, 2009).

Dentre os componentes de ceras, os *n*-alcanos estão entre os marcadores mais reconhecidos e amplamente utilizados, com uma historia de estudos que remonta há quase um século (Chibnall *et al.*, 1934). Os *n*-alcanos têm sido muito utilizados por serem universais em plantas vasculares, além de poderem ser rapidamente extraídos e analisados por cromatografia a gás (Sonibare *et al.*, 2005). São marcadores úteis para fins de comparação em baixos níveis hierárquicos.

Os alcanos de ceras cuticulares começaram a ser amplamente utilizados como marcadores taxonômicos após os trabalhos pioneiros de Eglinton e colaboradores (1962a, 1962b) Eglinton & Hamilton (1963) e Herbin & Robins (1969). No entanto, alguns autores observaram inconsistências na distribuição de alcanos, alegando que tal distribuição pode ser fortemente afetada por vários fatores, por exemplo, a idade da planta (Stocker & Wanner, 1975; Nordby & Nagy, 1977). Em

estudo realizado por Salasso (1983) com ceras cuticulares de *Rhododendron fortune*, foi observada tal variação na distribuição de alcanos em plantas jovens. No entanto, em folhas expandidas da mesma espécie (a partir de seis semanas), foi verificado que a distribuição de alcanos é estável. Salatino e colaboradores (1989) analisaram as ceras epicuticulares de folhas de Velloziaceae e verificaram que a distribuição de alcanos usada é útil na caracterização dos diversos gêneros, sendo inclusive coerente com o reconhecimento de duas subfamílias. Zygadlo e colaboradores. (1994) caracterizaram a distribuição de alcanos de 20 espécies de Solanaceae. Mimura e colaboradores (1998) analisaram os alcanos das ceras foliares de 10 espécies de *Huberia*, verificando uma relativa homogeneidade dentro de cada espécie. Skorupa e colaboradores (1998) demonstraram que o padrão de alcanos são úteis taxonomicamente para espécies de *Pilocarpus*. Sonibare e colaboradores (2005) verificaram que os alcanos encontrados nas ceras epicuticulares de folhas de *Ficus* spp. podem fornecer informações importantes para o entendimento da variabilidade das espécies. Li e colaboradores (2012) demonstraram que a evolução e classificação de espécies de bambu são consistentes com a classificação morfológica, indicando que a composição das ceras deve ser considerada como uma ferramenta taxonomicamente importante. Costa Filho e colaboradores (2012) analisaram a distribuição de *n*-alcanos de espécies de *Croton*. Bush e colaboradores (2013) demonstraram que os alcanos são úteis para a distinção de musgos *Sphagnum* de outros grupos de plantas, sendo, no entanto, incapazes de diferenciar gramíneas de plantas lenhosas.

1.7 A família Euphorbiaceae

Segundo APGIII (2009), as Euphorbiaceae incluem-se na ordem Malpighiales e constituem uma das famílias mais diversificadas e complexas entre as Angiospermae, com aproximadamente 8000 espécies (Secco *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, as Euphorbiaceae eram divididas em cinco subfamílias: Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Oldfieldioideae e Phyllantoideae com grande variabilidade morfológica e poucas características em comum (Caruzo, 2005). Nos atuais sistemas de classificação, o grupo é dividido em quatro

famílias, com base em filogenia molecular: Euphorbiaceae *sensu stricto*, Phyllanthaceae, Putranjivaceae e Picrodendraceae (Secco *et al.*, 2012).

Do ponto de vista econômico, Euphorbiaceae é uma das famílias mais importantes de angiospermas, especialmente por incluir gêneros como *Hevea* e *Manihot*. *Hevea brasiliensis* Will ex A. Juss. é fonte natural da borracha e contribuiu para mudar drasticamente a vida humana em um século, *Manihot esculenta* Crantz é um dos treze alimentos mais importantes (Schultes, 1987 apud Secco *et al.*, 2012). A família apresenta diversas outras espécies de importância econômica (Souza & Lorenzi, 2008).

1.8 O gênero *Croton* L.

1.8.1 Caracterização geral

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com aproximadamente 1300 espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia (Webster, 1993; Govaerts *et al.*, 2000). É possível encontrar representantes de *Croton* em quase todos os ecossistemas brasileiros e há cerca de 300 espécies no país.

O gênero apresenta inflorescências espiciformes, flores femininas com pétalas reduzidas, estames curvados no botão, tipo de indumento (estrelado, escamiforme ou simples) e látex não leitoso, que permitem distingui-lo de outros gêneros de Crotonoideae (Lima, 2006).

Webster (1993) subdividiu o gênero em 40 seções baseadas em caracteres morfológicos. Em 2005, Berry e colaboradores publicaram o primeiro estudo filogenético de *Croton*, incluindo 88 táxons, baseando-se em em sequências de ITS (nuclear) e *trnL-F* (cloroplasto). Recentemente, van Ee e colaboradores (2011) propuseram uma filogenia para espécies do novo mundo, incluindo 712 espécies que foram divididas em 31 seções e 10 subseções, com base em sequências das mesmas regiões analisadas por Berry e colaboradores, adicionadas de *rps3* (mitocôndria) e *EMB2765*. Os autores salientam a importância de futuros estudos que possam contribuir para elucidar as complexas relações entre as espécies de um gênero tão diverso.

1.8.2 Usos medicinais e caracterização química

O uso medicinal das espécies do gênero é largamente difundido nas diferentes regiões do país para o tratamento de uma ampla variedade de males, tais como diabetes, obesidade, reumatismo, úlcera, inflamações, dores, câncer, distúrbios nervosos, anorexia, e problemas gastrointestinais; folhas e cascas de *Croton* são usadas como adoçante (Salatino *et al.*, 2007). Tal variedade de usos pode estar relacionada à grande diversidade química de espécies de *Croton*. A abundância de metabólitos secundários encontrados no gênero, que é formado majoritariamente por espécies herbáceas ou arbustivas de crescimento rápido, é coerente com a teoria da ecologia química sugerida por Coley e colaboradores (1985), conhecida como teoria da alocação de recursos.

A química de *Croton* é bastante diversa, abrangendo terpenoides, mais frequentemente diterpenoides, óleos voláteis, alcaloides e flavonoides (Salatino *et al.*, 2007). Entre os diterpenoides podem ser destacados os clerodanos (como a *trans*-desidroctonina, obtida de *C. cajucara*), traquilobanos, labdanos, cauranos, ésteres de forbol e uma nova classe de diterpenos, os sarcopetalanos (obtidos de *C. sarcopetalus*) (Salatino *et al.*, 2007). Podocarpanos foram descritos em *C. sonderianus* (Craveiro & Silveira, 1982), *C. salutaris* (Itokawa *et al.*, 1991) e em *C. moritibensis* (Araújo-Júnior *et al.*, 2004) e recentemente foram descritos diterpenoides do tipo abietano em *C. sphaerogynus* (Motta *et al.*, 2011). Óleos voláteis são comuns entre as espécies de *Croton*. Como componentes desses óleos foram identificados monoterpenos como cineol e linalol, sesquiterpenos como cariofileno e fenilpropanoides, como eugenol e anetol, entre outros (Salatino *et al.*, 2007). Os alcaloides mais frequentemente encontrados em *Croton* são benzilisoquinolínicos, como os encontrados em Ranunculales (Salatino *et al.*, 2007). Triterpenoides têm sido isolados de espécies de *Croton*, além de fenilbutanoides, uma rara classe de substâncias, que foram obtidos de *C. schideanus* (Salatino *et al.*, 2007).

No entanto, o único estudo com ceras cuticulares de espécies de *Croton* foi realizado por Costa Filho e colaboradores (2012). Tal estudo foi feito com sete espécies provenientes da Caatinga e somente a fração de *n*-alcanos foi analisada. A análise de *n*-alcanos permitiu a divisão dessas espécies em dois grupos, em

coerência parcial com estudos morfológicos de tricomas foliares. Os autores sugerem que uma análise fenética com maior número de espécies deve ser realizada antes de generalizações sobre o real valor taxonômico dos *n*-alcanos em *Croton*.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral analisar a composição e morfologia das ceras de diversas espécies de *Croton*. Entre os objetivos específicos, estão a determinação do perfil de composição das ceras cuticulares, isolamento das frações de *n*-alcanos, alcoóis primários e triterpenos e a análise da distribuição dos componentes dessas frações, estabelecendo afinidades químicas e comparando-as com os relacionamentos estabelecidos na filogenia de *Croton* e observação da morfologia dos depósitos de ceras foliares por microscopia eletrônica de varredura.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Foram coletadas folhas de treze espécies de *Croton* (Tabela 1). As coletas ocorreram no período de dezembro de 2012 a julho de 2013, contando-se com o auxílio de especialistas para a identificação das espécies. Foram depositados espécimes testemunhos no Herbário do Instituto de Botânica (SP).

Tabela 1 - Espécies de *Croton* utilizadas no trabalho, com as seções definidas segundo van Ee *et al.* (2011), números de voucher, data e locais de coleta.

Seção	Espécie	Voucher	Data	Local
<i>Cyclostigma</i>	<i>C. celtidifolius</i> Baill.	LBM 68	jan/13	serra entre Amparo e Morungaba - SP
<i>Cyclostigma</i>	<i>C. macrobothrys</i> Baill.		abr/13	Rodoanel, São Paulo - SP
<i>Cyclostigma</i>	<i>C. urucurana</i> Baill.	LBM 69	jan/13	Parque do Taquaral, Campinas - SP
<i>Cyclostigma</i>	<i>C. vulnerarius</i> Baill.	I. Cordeiro 2793	dez/12	Instituto de Botânica, São Paulo - SP
<i>Cleodora</i>	<i>C. sphaerogynus</i> Baill.	LBM 65	jan/13	Itanhaém - SP
<i>Cleodora</i>	<i>C. salutaris</i> Casar.	I. Cordeiro 3441	abr/13	Parque do Jaraguá, São Paulo - SP
<i>Cleodora</i>	<i>C. campanulatus</i> Caruzo & Cordeiro	Caruzo 93	jul/13	Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro - RJ
<i>Lasiogyne</i>	<i>C. floribundus</i> Spreng.	A. Custódio Filho 391	dez/12	Instituto de Botânica, São Paulo - SP
<i>Sampatik</i>	<i>C. piptocalyx</i> Müll Arg.	LBM 70	jan/13	Parque do Taquaral, Campinas - SP
<i>Julocroton</i>	<i>C. fuscescens</i> Spreng.	I. Cordeiro 2762	dez/12	Instituto de Botânica, São Paulo - SP
<i>Julocroton</i>	<i>C. triqueter</i> Lam.	LBM 71	jan/13	Condomínio dos Dourados, Campinas - SP
<i>Geiseleria</i>	<i>C. glandulosus</i> L.	LBM 72	jan/13	Condomínio dos Dourados, Campinas - SP
<i>Geiseleria</i>	<i>C. lundianus</i> (Didr.) Müll. Arg.	LBM 73	fev/13	campus da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP

3.2 Métodos

3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura da superfície foliar

A morfologia da cera epicuticular foi estabelecida por observação da superfície de uma folha de cada espécie (Tabela 1). As folhas foram prensadas, para evitar o enrugamento, e secas a temperatura ambiente (Pathan *et al.*, 2008). Retiraram-se fragmentos quadrados de aproximadamente 4 mm de lado entre a nervura central e as nervuras laterais, no centro do limbo, evitando regiões com

nervuras. Um fragmento foi utilizado para a análise da face abaxial e outro da face adaxial. Esse material foi colocado em suportes de alumínio (“stubs”, com 10 mm de diâmetro), próprios para uso em microscopia eletrônica de varredura, com o auxílio de fita adesiva dupla-face, e foram mantidos em dessecador a vácuo por dois dias. Em seguida, o material foi metalizado com ouro e visualizado com um aparelho “Digital Scanning Microscope DSM 940, Zeiss, West Germany”, do Instituto de Biociências, USP, a 10 kV e aumento de 5000 vezes quando possível.

3.2.2 Determinação do teor de cera cuticular

Foram coletadas de 20 a 50 folhas por indivíduo, três indivíduos de cada espécie e pertencentes à mesma população, a fim de permitir a avaliação de variações intraespecíficas. No entanto, só foi possível a coleta de material de dois indivíduos de *C. urucurana* e um de *C. piptocalyx* e *C. campanulatus*. Selecionaram-se folhas plenamente expandidas, excluindo-se folhas dos três primeiros nós, a fim de evitar possíveis influências do grau de desenvolvimento (Bianchi, 1995). Foram selecionadas também folhas sem lesões, a fim de se evitar a extração de lipídeos internos. As folhas foram digitalizadas com impressora multifuncional HP deskjet F 4100 antes da extração da cera. A área foliar total foi obtida utilizando-se o programa ImageJ 1.44p [64-bit]. Antes da extração, todo o material utilizado no procedimento (vidraria, pinças, espátulas e papel de filtro) foi previamente lavado três vezes com diclorometano. A extração da cera foi feita por imersão das folhas em diclorometano por três vezes consecutivas, a primeira por 30 seg, a segunda por 20 seg e a última por 10 seg (Oliveira *et al.*, 2003). Os extratos foram reunidos, filtrados e concentrados até evaporação total do solvente em evaporador rotatório. A cera foi dissolvida em pequeno volume de diclorometano e transferida para frascos de vidro previamente lavados e pesados. O solvente foi evaporado até a secura em banho-maria a 60°C e os frascos mantidos em dessecador a vácuo até massa constante. As massas das ceras cuticulares foram determinadas e o teor médio por unidade de superfície foi calculado pela razão entre a quantidade de cera obtida (μg) e a área foliar total (cm^2), levando em conta as face abaxial e adaxial.

3.2.3 Separação das classes de constituintes da cera cuticular

A separação das frações de constituintes da cera foi feita por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) de gel de sílica G Typ 60 (Merck), impregnada com fluoresceína sódica a 0,02%. Foram usadas placas com gel de sílica de 0,75 mm de espessura. As placas foram previamente tratadas com fase móvel diclorometano:acetato de etila (5:1) a fim de evitar a interferência de possíveis contaminantes presentes na sílica. Utilizou-se como fase móvel hexano:diclorometano (7:3). As faixas adsorvidas foram visualizadas com luz ultravioleta de ondas longas (Salatino & da Silva, 1988).

Os componentes da cera distribuíram-se em diversas frações. As faixas de sílica impregnadas com os componentes da cera foram removidas com espátula e transferidas para frascos de vidro. As substâncias adsorvidas foram eluídas com diclorometano, três vezes sobre banho-maria por 20, 15 e 10 minutos, com agitação constante. O sobrenadante foi filtrado e transferido para frascos de vidro previamente pesados. Após evaporação total do solvente, os frascos foram mantidos em dessecador a vácuo até massa constante.

3.2.4 Análise das frações

As frações de *n*-alcanos correspondem às faixas com maior mobilidade na análise por cromatografia em camada delgada usando-se hexano:diclorometano (7:3) como fase móvel. Essa fração foi retomada com *n*-hexano e analisada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado um aparelho Agilent 6850/Agilent 5975C, coluna capilar HP-5MS - Sílica - (30 m x 0.25 mm x 0.10 µm), volume de injeção de 1 µL, gás de arraste hélio com fluxo de 1 mL min⁻¹ e método de impacto eletrônico em 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram 300 °C. Foi utilizada a seguinte programação de temperaturas da coluna: temperatura inicial 170 °C por 2 min e rampa de 4°C por min até 320 °C (temperatura final), mantida por 5 min. O tempo total de análise foi 45,5 minutos.

A identificação dos *n*-alcanos foi realizada por análise dos respectivos espectros de massas e comparação com a biblioteca NIST e dados da literatura, além da comparação com amostras padrões.

A quantidade relativa dos homólogos de *n*-alcanos foi determinada por análise com o mesmo equipamento e condições, mas empregando-se detector de ionização de chamas e coluna capilar DB-5HT - Sílica - (30 m x 0.32 mm x 0.10 µm).

Para a detecção das frações de alcoóis primários e triterpenos, foi feita cromatografia em camada delgada qualitativa com as frações obtidas na separação da cera bruta, com exceção da fração 1, correspondente aos *n*-alcanos.

Foram utilizadas placas cromatográficas de gel de sílica G Typ 60 (Merck) impregnadas com fluoresceína 0,2%. Foram depositados 5 µL de solução de cada amostra, ao lado de 5 µL de solução de lupeol e 5 µL de uma mistura de octacosanol e triacontanol (padrões Sigma-Aldrich). Foi utilizada como fase móvel hexano:diclorometano (7:3). Para melhor visualização e possível separação dos compostos, após evaporação fase móvel, a mesma placa foi usada para análise com diclorometano.

Uma vez obtidas as condições para separação das frações de álcoois primários e triterpenos, foram feitas cromatografias preparativas em camada delgada para cada fração.

As frações que apresentaram tempos de retenção iguais ou muito próximos aos dos padrões foram selecionadas e tratadas com N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA, 50 µL) em piridina (50 µL) por 30 min a 80°C em banho seco, para obtenção de derivados trimetil-sililados (Jetter *et al.* 2000). As amostras foram retomadas com uma mistura de hexano e tolueno (1:1) e analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado um aparelho Agilent 6850/Agilent 5975C, coluna capilar HP-5MS - Sílica - (30 m x 0.25 mm x 0.10 µm), volume de injeção de 1 µL, gás de arraste hélio com fluxo de 1 mL min⁻¹ e método de impacto eletrônico em 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram 300 °C. Foi utilizada a seguinte programação de temperaturas da coluna: temperatura inicial 100 °C por 3 min e rampa de 5 °C por min até 320 °C (temperatura final), mantida por 5 min. O tempo total de análise foi 52 minutos (Mimura *et al.*, 1998). A identificação dos compostos foi realizada por análise dos respectivos espectros de massas e comparação com a biblioteca NIST e dados da literatura, além da comparação com os padrões derivados trimetilsililados de lupeol, octacosanol e triacontanol.

As quantidades relativas dos homólogos de alcoóis primários e triterpenos foram determinadas com o mesmo equipamento e condições, empregando-se detector de ionização de chamas e coluna capilar DB-5HT - Sílica - (30 m x 0.32 mm x 0.10 μ m).

3.3 Análises de agrupamento

Foi preparada uma matriz ordenada de dados, na qual as colunas foram representadas pelas abundâncias relativas dos homólogos dos constituintes das ceras e as linhas, os táxons de *Croton*. Os terminais foram tratados como Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As análises de agrupamento foram realizadas com o software Fitopac v1 (Shepherd, 1996). Foram utilizadas Distâncias Euclidianas e o método UPGMA (método da ligação média entre grupos) para obtenção dos agrupamentos por afinidade entre as OTUs. O método utilizado é amplamente aplicado abordagens taxonômicas, ligando as OTUs aos pares, pelo cálculo da média aritmética não ponderada dos valores mais próximos, obtidos com os dados da matriz (Crisci & Armengol, 1983 *apud* Motta, 2007). As Distâncias Euclidianas são utilizadas nos casos em que as matrizes apresentam dados quantitativos (no nosso caso, abundâncias relativas, variando de 0 a 100). Os dados qualitativos foram analisados mediante uma matriz de dados na qual foram registradas as informações de presença/ausência (1/0) e foi empregado o coeficiente de Dice associado ao método UPGMA, para o estabelecimento de similaridade entre os terminais. O agrupamento final obtido (o dendrograma) é chamado fenograma (dendrograma de afinidades fenéticas). Segundo Shepherd (1996), quanto maior o valor da correlação cofenética, melhor a representação dos dados originais fornecida pelo fenograma, sendo considerados valores entre 0,7 a 0,9 boas representações.

4. Resultados e Discussão

4.1 Microscopia eletrônica de varredura da superfície foliar de espécies de *Croton*

A Figura 7 apresenta as eletromicrografias de varredura das superfícies adaxial e abaxial das folhas das amostras de *Croton*.

Figura 7 - Eletromicrografias de varredura da superfície foliar abaxial (esquerda) e adaxial (direita) de *Croton* spp. A1 (100x) e A2 (5000x) *C. campanulatus*; B1 (100x) e B2 (5000x) *C. fuscescens*; C1 e C2 (ambos com 5000x) *C. glandulosus*; D1 e D2 (ambos com 5000x) *C. lundianus*; E1 e E2 (ambos com 5000x) *C. macrobothrys*; F1 e F2 (ambos com 5000x) *C. piptocalyx*; G1(100x) e G2(5000x) *C. salutaris*; H1 e H2 (ambos com 5000x) *C. sphaerogynus*; I1 (3000x) e I2 (5000x) *C. triqueter*; J1 e J2 (ambos com 5000x) *C. urucurana*; L1(100x) e L2 (5000x) *C. vulnerarius*; M2 (5000x) *C. celtidifolius*.

Figura 7 (continuação).

Figura 7 (continuação).

Figura 7 (continuação).

Figura 7 (continuação).

Segundo a classificação de Barthlott e colaboradores (1998), as ceras epicuticulares da face abaxial de *Croton* analisadas apresentam, na maioria dos casos, um filme amorfo (Figura 7; C1, D1, E1, I1, J1, L1), com algumas exceções, por exemplo *C. piptocalyx*, que apresenta crostas com algumas plaquetas (Figura 7; F1), e *C. sphaerogynus* que apresenta alguns grânulos sobre uma camada amorfa (Figura 7; H1). As faces abaxiais de *C. campanulatus*, *C. fuscescens* e *C. salutaris* apresentam muitos tricomas, impossibilitando a visualização de suas superfícies (Figura 7; A1, B1, G1). As ondulações observadas em *C. glandulosus*, *C. lundianus*, *C. macrobothrys*, *C. triqueter* e *C. urucurana* são ornamentações da cutícula das células epidérmicas (Figura 7; C1, D1, E1, I1, J1).

Já a face adaxial das ceras epicuticulares das espécies de *Croton* analisadas é recoberta, na maioria dos casos, por crostas (Figura 7; A2, E2, F2, G2, I2, J2, L2) e em alguns casos é possível visualizar algumas fissuras (Figura 7; E2, J2). Em *C. piptocalyx*, também é possível visualizar alguns grânulos (Figura 7; F2). *C. campanulatus* e *C. macrobothrys* apresentam poucas plaquetas juntamente com as crostas (Figura 7; A2, E2). *C. glandulosus*, *C. lundianus* e *C. celtidifolius* apresentam uma camada amorfa, sendo possível a visualização de fissuras na última espécie (Figura 7; C2, D2, M2). Segundo Barthlott e colaboradores (1998) as fissuras presentes nas camadas amorfas não são características das ceras e sim um artefato devido à secagem do material. *C. fuscescens* e *C. sphaerogynus* também possuem

um filme amorfo. No entanto, o primeiro apresenta um indício de plaquetas e o segundo apresenta alguns grânulos (Figura 7; B2, H2). As ondulações observadas em *C. glandulosus*, *C. lundianus*, *C. macrobothrys*, *C. triqueter*, *C. urucurana*, *C. vulnerarius* e em *C. celtidifolius* são ornamentações da cutícula (Figura7; C2, D2, E2, I2, J2, L2, M2). Problemas técnicos impediram a realização da microscopia eletrônica de varredura da face abaxial de *C. celtidifolius* e de ambas as faces de *C. floribundus*.

C. glandulosus, *C. lundianus*, *C. sphaerogynus*, *C. celtidifolius* e *C. fuscescens* caracterizam-se por possuírem depósitos amorfos na face adaxial e, nas três primeiras espécies, o mesmo padrão também é encontrado na face abaxial.

C. campanulatus, *C. macrobothrys*, *C. salutaris*, *C. tiqueter*, *C. piptocalyx*, *C. urucurana* e *C. vulnerarius* caracterizam-se por depósitos em crostas na face adaxial e, as duas primeiras espécies possuem depósitos em plaquetas sobre essas crostas. Essas espécies apresentam depósitos amorfos na face abaxial (exceto *C. campanulatus* e *C. salutaris*, espécies que apresentam grande quantidade de tricomas na face abaxial, impossibilitando a visualização dos depósitos cerosos).

4.2 Determinação do teor de cera cuticular

O teor de cera cuticular das espécies analisadas é apresentado na Tabela 2. O rendimento foi calculado com a média da extração dos três indivíduos de cada espécie, com exceção de *C. urucurana*, com dois indivíduos, e *C. piptocalyx* e *C. campanulatus* com um indivíduo cada.

Segundo Baker (1982) o teor de cera epicuticular e seus constituintes são característicos de cada espécie, podendo variar de acordo com a idade da planta e a fatores do meio. *Lactuca sativa* e *Spinacia oleracea* apresentam 5-10 µg de cera por cm² de folha; *Pistacia lentiscus* e *Olea europaea* cultivadas em condições de aridez apresentam 60-300 µg de cera por cm² de folha; já folhas de *Vitis vinifera* apresentam 10-25 µg de cera por cm².

Tabela 2 - Rendimento de cera foliar cuticular de espécies de *Croton* (*: espécies com apenas um indivíduo analisado; **: espécies com apenas dois indivíduos analisados; -: ausência de valores).

Espécie	Rendimento ($\mu\text{g por cm}^2$)
<i>C. floribundus</i>	19,31 $\pm$ 2,65
<i>C. vulnerarius</i>	24,87 $\pm$ 3,77
<i>C. fuscescens</i>	14,25 $\pm$ 1,54
<i>C. celtidifolius</i>	28,89 $\pm$ 4,49
<i>C. urucurana</i> **	14,52 $\pm$ 2,54
<i>C. glandulosus</i>	13,11 $\pm$ 1,12
<i>C. triqueter</i>	16,71 $\pm$ 4,41
<i>C. piptocalyx</i> *	22,44
<i>C. lundianus</i>	-
<i>C. salutaris</i>	6,14 $\pm$ 0,73
<i>C. sphaerogynus</i>	4,7 $\pm$ 0,72
<i>C. macrobothrys</i>	4,02 $\pm$ 1,43
<i>C. campanulatus</i> *	7,98

C. salutaris, *C. sphaerogynus*, *C. macrobothrys* e *C. campanulatus* apresentam teores similares aos encontrados em *Lactuca sativa* e *Spinacia oleracea*. Já as espécies restantes apresentam teores similares aos encontrados nas folhas de *Vitis vinifera*, com exceção de *C. lundianus*.

As espécies que apresentaram maior teor de cera cuticular foram: *C. celtidifolius*, *C. vulnerarius* e *C. piptocalyx*.

C. lundianus apresentou pouca quantidade de ceras cuticulares, impossibilitando a quantificação. A quantidade de cera epicuticular foliar pode ser inferior a 1 $\mu\text{g por cm}^2$ em algumas espécies (Jeffree, 2006). As folhas de *C. lundianus* parecem estar numa condição semelhante a essa. Isso não deixa de ser surpreendente, tendo em vista que plantas terrestres selvagens em geral apresentem teores de cera cuticular elevado (Amaral *et al.*, 1985), muito superior aos de folhas de plantas herbáceas cultivadas, como as citadas por Baker (1982).

4.3 Separação das classes químicas dos componentes de cera cuticular

Os componentes da cera distribuíram-se em diversas frações nas diferentes espécies (Figura 8).

Figura 8 - Cromatogramas em camada delgada preparativa de ceras foliares cuticulares de espécies de *Croton*, empregando-se fase móvel hexano:diclorometano (7:3): **A:** *C. salutaris*; **B:** *C. fuscescens*; **C:** *C. urucurana*.

As frações foram numeradas a partir da fração mais distante do ponto de partida, sendo assim, em todas as amostras a fração 1 corresponde aos *n*-alcanos.

O lupeol, utilizado como referência para a separação de triterpenoides, apresentou $R_f = 0,39$ com o emprego de diclorometano. A mesma mobilidade cromatográfica foi encontrada para os padrões de álcoois graxos primários octacosanol e triacontanol. Frações contendo álcoois primários foram obtidas de todas as amostras. Essas frações continham triterpenoides alcoólicos, com exceção dos indivíduos de *C. urucurana* e um indivíduo de *C. lundianus* que não apresentaram triterpenoides. Foram obtidos também esteroides dos indivíduos de *C. celtidifolius*, *C. piptocalyx*, um indivíduo de *C. glandulosus* e *C. sphaerogynus* e dois indivíduos de *C. salutaris*.

Não foi possível a quantificação das frações obtidas, devido à quantidade muito pequena de material obtido com todas as amostras. Isso se deve, em grande parte, aos baixos teores de cera foliar cuticular das espécies estudadas.

4.4 Análises das frações de *n*-alcanos

Foram identificados 15 homólogos de *n*-alcanos com cadeias carbônicas C19-C33 (Tabela 3).

Tabela 3 - Tempos de retenção e *n*-alcanos identificados nas ceras foliares cuticulares de espécies de *Croton* (TR= tempo de retenção).

TR (min)	<i>n</i> -alcanos	<i>m/z</i> (intensidade, %)	M ⁺ (<i>m/z</i>)
8,32	<i>n</i> -nonadecano (C ₁₉ H ₄₀)	57(100); 71(80); 85 (70)	268
10,15	<i>n</i> -eicosano (C ₂₀ H ₄₂)	57(100); 71(80); 85 (70)	282
12,07	<i>n</i> -heneicosano (C ₂₁ H ₄₄)	57(100); 71(80); 85 (70)	296
14,04	<i>n</i> -docosano (C ₂₂ H ₄₆)	57(100); 71(80); 85 (70)	310
16,01	<i>n</i> -tricosano (C ₂₃ H ₄₈)	57(100); 71(80); 85 (70)	324
17,95	<i>n</i> -tetracosano (C ₂₄ H ₅₀)	57(100); 71(80); 85 (70)	338
19,85	<i>n</i> -pentacosano (C ₂₅ H ₅₂)	57(100); 71(80); 85 (70)	352
21,70	<i>n</i> -hexacosano (C ₂₆ H ₅₄)	57(100); 71(80); 85 (70)	366
23,48	<i>n</i> -heptacosano (C ₂₇ H ₅₆)	57(100); 71(80); 85 (70)	380
25,26	<i>n</i> -octacosano (C ₂₈ H ₅₈)	57(100); 71(80); 85 (70)	394
27,03	<i>n</i> -nonacosano (C ₂₉ H ₆₀)	57(100); 71(80); 85 (70)	408
28,60	<i>n</i> -triacontano (C ₃₀ H ₆₂)	57(100); 71(80); 85 (70)	422
30,37	<i>n</i> -hentriacontano (C ₃₁ H ₆₄)	57(100); 71(80); 85 (70)	436
31,75	<i>n</i> -dotriacontano (C ₃₂ H ₆₆)	57(100); 71(80); 85 (70)	450
33,52	<i>n</i> -tritriacontano (C ₃₃ H ₆₈)	57(100); 71(80); 85 (70)	464

Os *n*-alcanos foram identificados pelos característicos espectros de massas, picos moleculares bem detectáveis (em alguns casos em pequena abundância), pico base em *m/z* 57 [CH₃-(CH₂)₃]⁺ e fragmentos *m/z* 71 e *m/z* 85 abundantes (Buckley *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 2008). A figura 9 mostra o espectro de massas do *n*-triacontano como exemplo.

Figura 9 - Espectro de massas do *n*-triacontano.

As abundâncias relativas da distribuição dos homólogos de *n*-alcanos, determinada por cromatografia a gás e detecção por ionização de chamas, encontra-se na Tabela 4. Observa-se predominância dos homólogos de cadeia longa e números ímpares de átomos de carbono.

Todas as espécies apresentaram porcentagens altas de *n*-alcanos ímpares, com exceção de *C. campanulatus*, que apresentou C28 como homólogo de maior teor, seguido de C27 e C29, com valores próximos.

Tabela 4 - Abundâncias relativas dos homólogos de *n*-alcanos nos indivíduos de *Croton* estudados. Valores em porcentagens (-: homólogos não detectados; tr: valores menores que 1%).

Indivíduos	<i>n</i> -alcanos (%)														
	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33
<i>C. campanulatus</i>	1,7	tr	tr	tr	tr	1,1	5,5	2,5	18,9	26,3	16,8	11,0	9,5	2,0	2,0
<i>C. celtidifolius</i> A	-	-	-	-	-	-	1,1	-	6,2	1,3	44,3	2,9	38,8	1,6	3,9
<i>C. celtidifolius</i> B	-	-	-	-	-	-	tr	-	4,1	2,3	58,3	5,1	26,5	1,3	1,5
<i>C. celtidifolius</i> C	-	-	-	-	-	-	1,0	tr	4,8	1,8	53,4	4,4	31,1	1,4	1,8
<i>C. floribundus</i> A	-	-	-	-	-	-	tr	-	21,8	1,4	54,0	tr	19,6	-	1,4
<i>C. floribundus</i> B	-	-	-	-	-	-	1,7	-	26,5	1,6	51,2	tr	16,6	-	1,6
<i>C. floribundus</i> C	-	-	-	-	-	-	1,0	-	22,2	1,9	50,3	1,4	21,2	tr	1,6
<i>C. fuscescens</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	27,4	6,7	46,8	2,8	16,3	-	-
<i>C. fuscescens</i> B	-	-	-	-	-	-	tr	tr	22,1	7,8	44,7	3,9	17,9	tr	1,4
<i>C. fuscescens</i> C	-	-	-	-	-	-	tr	tr	14,8	5,6	48,9	3,7	23,2	1,0	1,9
<i>C. glandulosus</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7	3,2	42,2	3,2	31,2	2,4	9,2
<i>C. glandulosus</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	5,8	2,4	52,8	4,2	29,4	-	5,4
<i>C. glandulosus</i> C	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	-	47,6	-	36,1	-	7,9
<i>C. lundianus</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47,6	6,8	39,8	-	5,8
<i>C. lundianus</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	3,5	29,6	7,4	46,8	4,3	5,7
<i>C. lundianus</i> C	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	3,3	29,2	7,4	46,7	4,0	5,7
<i>C. macrobothrys</i> A	-	-	-	-	-	1,3	1,4	tr	4,3	2,3	50,6	7,9	25,7	3,4	2,2
<i>C. macrobothrys</i> B	-	-	-	-	-	1,2	1,7	tr	3,0	3,6	58,9	13,0	16,6	-	1,4
<i>C. macrobothrys</i> C	-	-	-	tr	1,3	1,9	2,6	1,8	6,3	3,2	40,8	7,6	29,5	2,7	1,7
<i>C. piptocalyx</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	21,3	1,8	60,0	1,4	14,4	-	1,1
<i>C. salutaris</i> A	-	-	-	-	-	-	3,5	2,9	26,0	4,7	37,1	6,0	14,4	1,9	3,6
<i>C. salutaris</i> B	-	-	-	-	-	tr	4,5	5,2	32,4	4,6	34,5	2,4	11,3	1,4	2,9
<i>C. salutaris</i> C	-	-	-	-	1,6	2,8	7,8	7,9	22,1	5,5	30,1	3,4	14,4	1,7	2,8
<i>C. sphaerogynus</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	38,1	4,3	48,4	2,9	5,7
<i>C. sphaerogynus</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	32,8	4,7	51,9	3,6	6,2
<i>C. sphaerogynus</i> C	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	34,9	4,4	49,5	3,6	6,4
<i>C. triqueter</i> A	-	-	-	-	-	-	2,9	-	13,6	3,3	48,2	2,9	25,5	-	3,7
<i>C. triqueter</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	12,2	3,9	48,7	5,8	22,8	3,0	3,5
<i>C. triqueter</i> C	-	-	-	-	-	-	2,1	1,8	7,4	4,2	39,3	9,3	25,8	5,1	5,1
<i>C. urucurana</i> A	-	-	-	-	-	-	4,2	-	36,2	2,9	23,8	11,1	11,4	6,3	4,1
<i>C. urucurana</i> B	-	-	-	-	-	-	5,7	1,6	28,0	3,5	20,4	16,8	13,1	6,9	4,2
<i>C. vulnerarius</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	1,7	65,6	2,6	25,6	tr	tr
<i>C. vulnerarius</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	1,2	57,9	2,5	33,8	tr	1,4
<i>C. vulnerarius</i> C	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	1,0	46,3	3,0	44,0	1,5	2,2

C. floribundus, *C. piptocalyx* e *C. salutaris* apresentaram como homólogo principal C29, seguido de C27 e C31. Dois indivíduos de *C. fuscescens* apresentaram distribuição semelhante, no entanto, um indivíduo dessa espécie (*C. fuscescens* C) apresentou C31 em maior quantidade que C27. *C. celtidifolius*, *C.*

glandulosus, *C. triqueter*, *C. macrobothrys*, *C. vulnerarius* e um indivíduo de *C. lundianus* (*C. lundianus* A) também apresentaram C29 como homólogo principal, seguido de C31 e, nas três primeiras espécies, o terceiro homólogo mais abundante foi C27 e, nas últimas três foi C30.

C. sphaerogynus e dois indivíduos de *C. lundianus* (*C. lundianus* B e C) apresentaram C31 como homólogo principal e C29 em seguida. Para a primeira espécie, C33 é o terceiro homólogo e para a segunda é C30.

C. urucurana apresentou predomínio de C27, seguido de C29 e valores de C30 e C31 semelhantes.

Todos os indivíduos de uma mesma espécie foram coletados no mesmo local, pertencendo à mesma população, sendo assim, as variações intraespecíficas encontradas nas quantidades de *n*-alcanos não são decorrentes das variações ambientais.

Eglinton e Hamilton (1967) analisaram as ceras de gramíneas e concluíram que as proporções relativas dos hidrocarbonetos variam grandemente com a idade da folha. As coletas dos materiais analisados no presente trabalho foram cuidadosamente executadas, excluindo-se folhas dos três primeiros nós, a fim de se evitar tais variações.

Costa Filho e colaboradores (2012) analisaram a fração de alcanos da cera de sete espécies da caatinga e dentre as espécies estudadas encontra-se *C. glandulosus*, com a seguinte composição de *n*-alcanos: C25 (1,97%), C27 (10%), C28 (1,38%), C29 (40,2%), C30 (1,75%), C31 (22%) e C 33 (8,10%). No presente estudo, não foi detectado C25 em nenhum dos três indivíduos de *C. glandulosus* analisados. Por outro lado, um indivíduo apresentou C32 em pequena concentração, homólogo não mencionado no estudo citado. Em concordância com esse estudo, o homólogo majoritário nos três indivíduos analisados foi o C29, seguido de C31. As diferenças entre o presente estudo e o de Costa Filho e colaboradores (2012) podem ser decorrentes de variação intraespecífica motivada por diversas razões, entre elas o ambiente, uma vez que os indivíduos estudados no presente trabalho são provenientes de uma região de Mata Atlântica ou Cerrado ou por serem de populações geneticamente distintas.

As ceras epicuticulares de plantas terrestres geralmente possuem homólogos de *n*-alcanos com cadeias carbônicas de 15 a 35 átomos de carbono e predominância de cadeias com números ímpares de átomos de carbono (Eglinton & Hamilton, 1967; Osborne *et al.*, 1989, Bush & McInerney, 2013). Os *n*-alcanos mais abundantes nas plantas superiores são os homólogos C29 e C31 (Juniper & Jeffree, 1983). Nas espécies de *Croton* estudadas, os homólogos mais abundantes também foram C29 e C31 com exceção de um indivíduo de *C. ururcurana* que apresentou C27 como homólogo principal e *C. campanulatus*, que apresentou um homólogo par como predominante (C28). Estudos realizados com cera cuticulares de *Gossypium hirsutum* revelaram predominância de *n*-alcanos de cadeias carbônicas pares (Bondada *et al.*, 1996). Tal padrão também foi encontrado em *Encephalartos* (Osborne *et al.*, 1989), sugerindo que a ocorrência de tais alcanos seja proveniente de uma possível α -oxidação em algum estágio da biossíntese desses compostos. Reddy e colaboradores (2000) sugerem que o predomínio de cadeias pares pode ser decorrente de erros experimentais ou contaminações das amostras.

O presente trabalho foi realizado tomando diversas precauções no que diz respeito às possíveis contaminações, sendo improvável que o predomínio de C28 em *C. campanulatus* seja resultado de contaminantes.

4.5 Análise das frações de alcoóis primários e triterpenos

4.5.1 Alcoóis primários

Os *n*-álcoois primários foram analisados como éteres TMSi. Foram detectados doze alcoóis primários na faixa de C18-C34 (Tabela 5).

O íon molecular de tais substâncias é frequentemente inaparente, no entanto, seus espectros de massas são caracterizados por um pico base intenso $[M-15]^+$ que permite a identificação dos álcoois, um pico abundante em m/z 75, correspondente ao fragmento $[HO+=Si(CH_3)_2]$, além de um pico menos abundante $[CH_2=O+-Si(CH_3)_3]$ em m/z 103 (Walton & Kolattukudy, 1972; Gutierrez *et al.*, 2008). A figura 10 mostra o espectro de massas do octacosanol-TMSi (C28) como exemplo.

Tabela 5 - Tempos de retenção e *n*-álcoois primários identificados nas ceras cuticulares de espécies de *Croton* estudadas (TR: tempo de retenção; TMSi: trimetilsilil; M+: íon molecular).

TR (min)	Éteres TMSi de álcoois primários	<i>m/z</i> (intensidade, %)	M ⁺ (<i>m/z</i>)
30,2	Octadecanol (C ₂₁ H ₄₆ OSi)	75 (60); 103 (30)	342
37,1	Tetracosanol (C ₂₇ H ₅₈ OSi)	75 (60); 103 (30)	426
38,3	Pentacosanol (C ₂₈ H ₆₀ OSi)	75 (60); 103 (30)	440
39,6	Hexacosanol (C ₂₉ H ₆₂ OSi)	75 (60); 103 (30)	454
40,7	Heptacosanol (C ₃₀ H ₆₄ OSi)	75 (60); 103 (30)	468
41,9	Octacosanol (C ₃₁ H ₆₆ OSi)	75 (60); 103 (30)	482
43,0	Nonacosanol (C ₃₂ H ₆₈ OSi)	75 (60); 103 (30)	496
44,1	Triacontanol (C ₃₃ H ₇₀ OSi)	75 (60); 103 (30)	510
45,2	Hentriacontanol (C ₃₄ H ₇₂ OSi)	75 (60); 103 (30)	524
46,2	Dotriacontanol (C ₃₅ H ₇₄ OSi)	75 (60); 103 (30)	538
47,3	Tritriacontanol (C ₃₆ H ₇₆ OSi)	75 (60); 103 (30)	552
48,3	Tetratriacontanol (C ₃₇ H ₇₈ OSi)	75 (60); 103 (30)	566

Figura 10 - Espectro de massas do derivado TMSi do octacosanol.

A distribuição dos homólogos de alcoóis primários, como éteres TMSi, determinada por cromatografia a gás e detecção por ionização de chamas, encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Abundâncias relativas dos homólogos de álcoois primários, analisados como derivados TMSi, da cera foliar cuticular de indivíduos de *Croton*. Valores em porcentagens (- : homólogos não detectados; tr: valores menores que 1%).

Indivíduos	Álcoois primários											
	C18	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34
<i>C. campanulatus</i>	-	1,2	2,7	27,3	3,6	27,9	2,6	21,4	-	13,3	-	-
<i>C. celtidifolius A</i>	-	14,2	1,9	56,9	-	11,7	-	10,9	-	4,4	-	-
<i>C. celtidifolius B</i>	-	12,7	1,8	54,1	-	17,7	-	9,0	-	4,6	-	-
<i>C. celtidifolius C</i>	-	14,9	2,0	52,7	3,9	13,5	tr	7,8	-	4,7	-	-
<i>C. floribundus A</i>	-	4,2	1,1	24,3	1,4	22,2	2,1	31,2	-	13,5	-	-
<i>C. floribundus B</i>	-	-	-	26,1	-	24,7	-	32,0	-	17,2	-	-
<i>C. floribundus C</i>	-	-	-	19,1	-	24,7	3,4	33,5	-	19,3	-	-
<i>C. fuscescens A</i>	-	-	-	26,5	6,7	37,5	-	18,0	-	11,3	-	-
<i>C. fuscescens B</i>	-	-	-	35,2	9,1	32,9	-	13,7	-	9,1	-	-
<i>C. fuscescens C</i>	-	-	-	34,7	6,0	30,2	-	19,1	-	9,9	-	-
<i>C. glandulosus A</i>	-	-	-	16,0	-	44,1	-	39,9	-	9,9	-	-
<i>C. glandulosus B</i>	-	-	-	17,3	-	43,9	-	38,8	-	-	-	-
<i>C. glandulosus C</i>	-	-	-	13,2	-	45,7	-	41,1	-	-	-	-
<i>C. lundianus A</i>	-	-	-	-	-	11,5	-	40,1	-	48,4	-	-
<i>C. lundianus B</i>	7,2	-	-	6,4	2,1	25,4	5,7	25,8	-	27,4	-	-
<i>C. lundianus C</i>	-	-	-	5,8	-	26,6	4,1	25,6	-	37,9	-	-
<i>C. macrobothrys A</i>	-	1,4	1,2	45,3	2,0	20,6	1,2	13,0	-	15,3	-	-
<i>C. macrobothrys B</i>	-	-	-	34,1	2,9	20,8	2,5	20,7	-	17,1	-	1,8
<i>C. macrobothrys C</i>	-	1,7	1,2	47,2	1,9	19,6	tr	9,1	-	12,6	-	5,9
<i>C. piptocalyx</i>	-	-	-	2,1	1,7	47,1	3,6	38,4	-	7,1	-	-
<i>C. salutaris A</i>	-	2,5	1,5	49,8	2,9	23,8	1,0	11,1	-	6,2	-	1,3
<i>C. salutaris B</i>	-	3,5	1,9	51,2	2,8	22,9	tr	9,9	-	5,9	-	1,1
<i>C. salutaris C</i>	-	2,8	1,6	46,0	3,3	26,2	1,1	11,5	-	6,2	-	1,2
<i>C. sphaerogynus A</i>	-	-	-	1,9	tr	14,2	2,5	51,1	-	22,3	-	7,5
<i>C. sphaerogynus B</i>	-	-	-	2,1	tr	10,4	2,8	43,5	-	29,5	-	11,2
<i>C. sphaerogynus C</i>	-	tr	-	3,0	tr	12,4	3,1	41,0	3,3	25,1	1,8	9,5
<i>C. triqueter A</i>	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	-
<i>C. triqueter B</i>	-	-	-	24,6	-	37,7	-	37,7	-	-	-	-
<i>C. triqueter C</i>	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-
<i>C. urucurana A</i>	-	1,7	tr	42,4	1,4	25,4	tr	10,5	-	12,0	-	5,1
<i>C. urucurana B</i>	-	1,1	tr	40,5	1,7	26,6	tr	11,0	-	12,6	-	4,8
<i>C. vulnerarius A</i>	-	9,1	1,9	50,7	1,3	15,7	1,2	9,0	tr	7,8	-	2,9
<i>C. vulnerarius B</i>	-	9,2	1,9	48,9	1,2	15,8	1,0	9,8	-	9,0	-	3,3
<i>C. vulnerarius C</i>	-	5,7	2,2	40,1	2,3	15,2	1,0	10,1	-	16,4	-	7,1

Segundo a tabela 6, *C. campanulatus* apresentou dois homólogos de álcoois primários majoritários, com abundâncias relativas iguais: C26 e C28, seguido de C30. *C. celtidifolius*, *C. macrobothrys*, *C. salutaris*, *C. urucurana*, *C. vulnerarius* e dois indivíduos de *C. fuscescens* (B e C) apresentaram C26 como homólogo mais abundante, seguido de C24 ou C28 na primeira espécie e C28 nas demais. *C. glandulosus* e *C. piptocalyx* apresentaram C28 como homólogo majoritário, seguido de C26 na primeira espécie e C30 na segunda. Tanto *C. floribundus* quanto *C. sphaerogynus* apresentaram triacontanol (C30) como álcool mais abundante. *C. triqueter* apresentou apenas C28 no indivíduo A, apenas C30 no indivíduo C e no indivíduo B apresentou quantidades iguais desses dois homólogos, além da presença de C26. *C. lundianus* foi a única espécie a apresentar C18.

Os álcoois primários apresentam predomínio de cadeias carbônicas com números pares de átomos de carbono (Baker, 1982). Todos os indivíduos de *Croton* analisados apresentaram esse padrão. Na literatura consultada foi encontrado apenas um registro de um álcool primário em *Croton regelianus*, o triacontanol, em extrato de folhas (Torres, *et al.*, 2010). Estudos detalhados sobre álcoois primários de ceras cuticulares de *Croton* são aparentemente inexistentes.

4.5.2 Triterpenos

Foram encontrados, por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas de derivados TMSi, 12 triterpenos (Tabela 7).

Tabela 7 - Tempos de retenção dos triterpenos encontrados nas ceras cuticulares de espécies de *Croton* estudadas. Os triterpenos alcoólicos foram analisados como derivados TMSi (TR: tempo de retenção; TMSi: trimetilsilil; M+: íon molecular).

TR (min)	Triterpenos	M ⁺ (m/z)	m/z (intensidade, %)
46,408	1	498	498 (5), 483 (10), 374 (20), 255 (40), 204 (100), 121 (80)
46,527	2	496	496 (20), 481 (5), 396 (20), 357 (20), 218 (60), 204 (70), 189 (100), 109 (100), 73 (90)
46,527	3	498	498 (20), 393 (20), 281 (20), 218 (60), 204 (70), 189 (100), 109 (100), 73 (90)
46,663	4	498	498 (5), 218 (100), 203 (50), 189 (30)
46,756	5	498	498 (10), 483 (20), 393 (20), 218 (40), 205 (70), 189 (100), 175 (60)
46,908	6	498	498 (1), 483 (5), 393 (30), 241 (100), 229 (90), 218 (50), 203 (60), 191 (60)
46,926	7	426	498 (1), 483 (2), 393 (20), 259 (40), 187 (30), 134 (100)
47,096	8	498	498 (1), 483 (2), 218 (100), 203 (30), 189 (40)
47,183	9	498	498 (1), 483 (5), 369 (30), 218 (100), 203 (50), 189 (90)
47,19	10	498	498 (10), 483 (5), 393 (10), 408 (5), 359 (20), 218 (40), 203 (50), 189 (100), 109 (80), 73 (100)
48,685	11	426	426 (10), 281 (40), 273 (50), 207 (50), 123 (100), 69 (70)
53,578	12	424	424 (1), 409 (1), 281 (20), 229 (100), 206 (60)

A distribuição dos triterpenos, determinada por cromatografia a gás e detecção por ionização de chamas, encontra-se na Tabela 8, juntamente com a análise dos fitoesteróis.

Tabela 8 - Abundâncias relativas de triterpenos e esteroides, analisados como derivados TMSi, da cera foliar cuticular de indivíduos de *Croton*. Valores em porcentagens (-: homólogos não detectados; tr: valores menores que 1%).

Indivíduos	Esteroides				Triterpenos											
	Campesterol	Estigmasterol	Sitosterol	Estigmast-4-en-3-one	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>C. campanulatus</i>	-	-	-	-	-	tr	-	13,3	-	-	25,5	55,3	-	1,7	4,1	-
<i>C. celtidifolius A</i>	4,0	2,9	44,7	-	-	-	tr	12,1	2,8	-	-	13,1	-	7,6	-	12,8
<i>C. celtidifolius B</i>	-	2,1	24,3	2,2	-	-	tr	14,0	-	-	16,8	23,0	-	17,6	-	-
<i>C. celtidifolius C</i>	2,1	2,5	37,0	4,1	-	tr	-	11,6	-	-	16,7	13,2	-	9,1	-	3,8
<i>C. floribundus A</i>	-	-	-	-	3,2	tr	-	67,0	14,2	-	-	12,7	-	2,9	-	-
<i>C. floribundus B</i>	-	-	-	-	-	-	-	11,1	32,5	-	-	47,1	9,3	-	-	-
<i>C. floribundus C</i>	-	-	-	-	4,5	-	-	42,1	11,8	-	-	34,6	6,4	tr	-	-
<i>C. fuscescens A</i>	-	-	-	-	-	-	-	9,0	-	-	78,2	12,8	-	-	-	-
<i>C. fuscescens B</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-
<i>C. fuscescens C</i>	-	-	-	-	-	-	-	9,4	-	-	42,9	47,7	-	-	-	-
<i>C. glandulosus A</i>	-	-	-	-	1,5	tr	-	40,8	-	7,3	-	50,4	-	-	-	-
<i>C. glandulosus B</i>	-	-	-	-	1,9	tr	-	48,2	-	12,1	-	37,8	-	-	-	-
<i>C. glandulosus C</i>	1,9	tr	13,3	-	1,0	tr	-	37,5	-	9,2	-	34,5	2,0	-	-	-
<i>C. lundianus A</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lundianus B</i>	-	-	-	-	-	-	-	34,6	-	-	-	65,4	-	-	-	-
<i>C. lundianus C</i>	-	-	-	-	-	-	tr	39,5	-	7,5	-	50,5	-	2,5	-	-
<i>C. macrobothrys A</i>	-	-	-	-	-	-	-	24,7	-	-	-	71,4	-	3,9	-	-
<i>C. macrobothrys B</i>	-	-	-	-	-	-	-	28,9	-	-	-	71,1	-	-	-	-
<i>C. macrobothrys C</i>	-	-	-	-	-	-	-	41,8	-	-	-	58,2	-	-	-	-
<i>C. piptocalyx</i>	2,5	-	39,7	-	-	-	tr	-	-	-	-	15,7	-	42,1	-	-
<i>C. salutaris A</i>	-	-	-	-	-	-	tr	31,1	-	-	-	68,9	-	-	-	-
<i>C. salutaris B</i>	-	-	-	27,0	-	-	tr	26,2	-	-	-	46,8	-	-	-	-
<i>C. salutaris C</i>	-	-	-	8,0	-	tr	tr	40,5	-	-	-	51,5	-	-	-	-
<i>C. sphaerogynus A</i>	1,9	-	-	1,8	-	-	-	10,2	-	-	-	79,8	-	6,4	-	-
<i>C. sphaerogynus B</i>	-	-	-	-	-	-	tr	12,0	-	-	-	82,4	-	5,6	-	-
<i>C. sphaerogynus C</i>	-	-	-	-	-	-	tr	15,6	-	-	-	84,4	-	-	-	-
<i>C. triqueter A</i>	-	-	-	-	74,4	-	-	9,7	-	-	-	6,4	-	9,6	-	-
<i>C. triqueter B</i>	-	-	-	-	-	-	tr	4,7	-	-	68,2	20,4	-	6,7	-	-
<i>C. triqueter C</i>	-	-	-	-	9,5	-	tr	28,5	-	-	45,3	10,6	-	6,0	-	-
<i>C. urucurana A</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. urucurana B</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. vulnerarius A</i>	-	-	-	-	-	-	-	5,7	-	-	-	9,4	-	84,9	-	-
<i>C. vulnerarius B</i>	-	-	-	-	-	-	-	6,1	-	-	-	8,7	-	85,1	-	-
<i>C. vulnerarius C</i>	-	-	-	-	-	-	-	6,1	-	-	-	8,7	-	85,1	-	-

A análise dos espectros de massas permitiu a identificação dos triterpenos 4, 8, 10 e 11.

Os triterpenos 4 e 8 foram identificados como derivados TMSi das α - e β -amirinas (Figuras 11 e 12, respectivamente): caracterizam-se pelo pico base m/z 218, característico de esqueleto ursano ou oleano, proveniente da reação Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, portador da dupla ligação entre C12 e C13 nos triterpenos pentacíclicos. Os fragmentos m/z 203 e m/z 189 correspondem às perdas dos grupos metila (CH_3) e etila (CH_3CH_2), relativos ao pico base (m/z 218). No espectro da β -amirina, o fragmento m/z 203 é mais intenso que m/z 189, enquanto no espectro da α -amirina m/z 189 é mais intenso que m/z 203. O íon molecular observado nos derivados TMSi das α - e β -amirinas é m/z 498 (Budzikiewicz et al., 1963; Ogunkoya 1981; Bauer et al., 2004; Mathe et al., 2004; Zanon et al., 2008).

Figura 11 - Espectro de massas do derivado TMSi da α -amirina.

Figura 12 - Espectro de massas do derivado TMSi da β -amirina.

Todas as espécies de *Croton* analisadas apresentaram α - e β -amirinas, com exceção dos indivíduos de *C. urucurana*, de um indivíduo de *C. lundianus* (A) e de um indivíduo de *C. fuscescens* (B). Em *C. piptocalyx* foi encontrado somente α -amirina.

O triterpeno 10 foi identificado como lupeol.

Figura 13 - Espectro de massas do derivado TMSi do lupeol.

Os íons m/z 207 e m/z 189 são característicos da fragmentação de triterpenos com esqueleto lupano dotado de grupo hidroxila na posição 3 (Figura 13). A fragmentação do lupeol inicia-se com a clivagem entre C-14 e C-27 e conseqüente perda de um radical metila ($^{\circ}\text{CH}_3$) formando o fragmento m/z 411. A perda de um radical $-\text{C}_2\text{H}_4$ gera o fragmento m/z 383. Tais fragmentos podem não ser aparentes no espectro, no entanto, sucessivas fragmentações destes geram os fragmentos menores m/z 207 e m/z 189 (Figura 13).

Foi proposto que tais fragmentos são resultados de duas vias competitivas, que podem ser usadas para diagnosticar a presença de substituintes nos anéis A, B, C, D ou E (Carvalho *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2011). O íon molecular é observado em m/z 498. Também é possível visualizar a presença do fragmento m/z 218 proveniente da reação Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, portador da dupla ligação entre C12 e C13.

Lupeol foi encontrado nas seguintes espécies estudadas: *C. campanulatus*, *C. celtidifolius*, *C. floribundus*, *C. sphaerogynus*, *C. triqueter*, *C. piptocalyx* e *C. vulnerarius*, sendo o triterpeno majoritário nas duas últimas espécies.

O triterpeno 11 foi identificado como friedelan-3-ona (friedelina) (Figura 14).

Figura 14 - Espectro de massas da friedelan-3-ona.

A friedelan-3-ona é um triterpeno cetônico com esqueleto friedelano, apresentou picos intensos em m/z 273, m/z 205, m/z 163, m/z 123, e íon molecular m/z 426 (Figura 14), em conformidade com dados de Igoli & Alexander (2008). Esse triterpeno foi detectado somente em *C. campanulatus*.

A análise dos espectros de massas e dos tempos de retenção dos demais triterpenos encontrados não foi suficiente para indentificá-los.

O triterpeno 1 (Figura 15) apresentou pico base m/z 204, íon molecular m/z 498 e picos significativos em m/z 483, 374, 255 e 121.

Figura 15 - Espectro de massas do triterpeno 1.

Esse triterpeno foi encontrado em dois indivíduos de *C. triqueter* (A e C), dois indivíduos de *C. floribundus* (A e C) e nos três indivíduos de *C. glandulosus*, sendo que em *C. triqueter* A esse composto apresentou abundancia relativa de 74% e em *C. glandulosus* foi encontrado em quantidades pequenas.

Os triterpenos 2 e 3 (Figura 16 e 17, respectivamente) apresentam padrões de fragmentação similares ao padrão encontrado no lupeol. Ambos apresentam m/z 109 como pico base, m/z 189 e 204 intensos, no entanto o primeiro apresenta íon molecular m/z 496 e o segundo apresenta íon molecular m/z 498.

Figura 16 - Espectro de massas do triterpeno 2.

Figura 17 - Espectro de massas do triterpeno 3.

O triterpeno 2 foi encontrado em *C. campanulatus*, em um indivíduo de *C. celtidifolius* (C), em um indivíduo de *C. floribundus* (A), nos três indivíduos de *C. glandulosus*, e em um indivíduo de *C. salutaris* (C). O triterpeno 3 foi encontrado em dois indivíduos de *C. celtidifolius* (A e B), dois indivíduos de *C. lundianus* (A e C), *C. pipitocalyx*, nos três indivíduos de *C. salutaris*, em dois indivíduos de *C. sphaerogynus* (B e C) e em dois indivíduos de *C. triqueter* (B e C). Esses triterpenos foram detectados em quantidades de traços.

O triterpeno 5 (Figura 18) apresentou pico base m/z 189, íon molecular m/z 498, m/z 483 ($M^+ - 15$) e picos significativos m/z 393, 218, 205 e 175.

Figura 18 - Espectro de massas do triterpeno 5.

Esse triterpeno foi encontrado nos três indivíduos de *C. floribundus* e em pequenas quantidades em *C. celtidifolius* A.

O triterpeno 6 (Figura 19) apresentou pico base m/z 241, íon molecular m/z 498 pouco intenso, m/z 483 ($M^+ - 15$) e picos significativos m/z 393, 229, 218, 203 e 191. Esse triterpeno foi detectado nos três indivíduos de *C. glandulosus* e em um indivíduo de *C. lundianus* (C).

Figura 19 - Espectro de massas do triterpeno 6.

O triterpeno 7 (Figura 20) foi detectado em *C. campanulatus*, nos três indivíduos de *C. fuscescens*, em dois indivíduos de *C. celtidifolius* (B e C) e em dois indivíduos de *C. triqueter* (B e C). Esse triterpeno apresenta pico base m/z 134, o íon molecular m/z 498 pouco intenso, m/z 483 ($M^+ - 15$) e picos significativos m/z 393, 259 e 187.

Figura 20 - Espectro de massas do triterpeno 7.

O triterpeno 9 (Figura 21) apresenta pico base m/z 218, íon molecular m/z 498 pouco intenso, m/z 483 ($M^+ - 15$) e picos significativos m/z 369, 203 e 189. Esse triterpeno foi encontrado em dois indivíduos de *C. floribundus* (B e C) e em um de *C. glandulosus* (C).

Figura 21 - Espectro de massas do triterpeno 9.

O triterpeno 12 (Figura 22) apresentou m/z 229 como pico base, íon molecular m/z 424 pouco intenso, m/z 409 ($M^+ - 15$) e picos significativos m/z 281 e 206. Esse triterpeno foi detectado apenas em dois indivíduos de *C. celtidifolius* (A e C).

Figura 22 - Espectro de massas do triterpeno 12.

A distribuição dos triterpenos determinada por cromatografia a gás e detecção por ionização de chamas encontra-se na Tabela 8, juntamente com a distribuição de fitoesteróis. É possível perceber que as amirinas foram os triterpenos com maiores abundâncias relativas na maioria dos indivíduos estudados, enquanto o triterpeno 7 foi majoritário em um indivíduo de *C. celtidifolius* (indivíduo C) com valores muito próximos aos encontrados para as amirinas, e em dois indivíduos de *C. fuscescens* (A e B) e em dois indivíduos de *C. triqueter* (B e C); lupeol foi o triterpeno mais abundante em *C. piptocalyx* e nos três indivíduos de *C. vulnerarius*. Um indivíduo de *C. celtidifolius* (A) apresentou quantidades muito similares de amirinas e do triterpeno 12 e um indivíduo de *C. triqueter* (A) apresentou o triterpeno 1 como principal, com abundância relativa superior a 70%.

Triterpenos já foram encontrados em espécies de *Croton*. A α -amirina foi encontrada em extratos metanólicos de partes aéreas de *C. catamarcensis*, *C. ceanothifolius*, *C. linearifolius*, *C. mullerianus*, *C. pallidulus* var. *glabrus* (Feliu, 2011), *C. hieronymi* (Catalán et al., 2003) e em extratos etanólicos de partes aéreas de *C. antisiphiliticus*, *C. betulaster*, *C. grandivelum*, *C. montevidensis* e *C. pycnocephalus*, (Matos, 2011). Já a β -amirina foi encontrada em *C. hieronymi* (Catalán et al., 2003), *C. hovarum* (Krebs & Ramiarantsoa, 1997), ,

C. antisiphiliticus, *C. grandivelum* e *C. montevidensis* (Matos, 2011). O lupeol foi isolado de *C. betulaster* (Barbosa *et al.*, 2003) e encontrado em extratos metanólicos de *C. catamarcensis*, *C. dusenii*, *C. ericoides*, *C. eskucheii*, *C. pallidulus* var *glabrus*, *C. pallidulus* var *pallidulus* (Feliu, 2011) e *C. erythroxyloides* (Saviotto, 2011), no óleo volátil de *C. zambesicus* (Mohamed *et al.*, 2009), em tecidos jovens de *C. hieronymi* (Catalán *et al.*, 2003) e em extratos de caule de *C. pulley* (Abreu *et al.*, 2001) e *C. megalocarpus* (Addae-Mensah *et al.*, 1989). A friedelina foi isolada do caule de *C. hovarum* (Krebs & Ramiarantsoa, 1997).

Outros triterpenos têm sido relatados como constituintes de espécies de *Croton*: lupenona, 3-oxo-22-hidroxiopane, 3-oxo-20- β -hidroxitaraxastano, 3-oxo-20-hidroxiupano, ácido 3-oxo-olean-12-en-28-óico, ácido 3-oxo-olean-18-en-28-óico, ácido 3-oxo-cicloart-24E-en-26-óico em folhas e caules de *C. betulaster* (Barbosa *et al.*, 2003); um triterpeno raro, o ácido acetil-aleurítico, foi encontrado em *C. urucurana* (Peres *et al.*, 1998a, 1998b). Esse último triterpeno não foi detectado nos indivíduos de *C. urucurana* analisados no presente trabalho.

4.5.3 Esteroides

Os esteroides, ou fitoesteróis, possuem estrutura com arranjo ciclopentanoperidrofenantreno. Foram detectados quatro esteroides, três alcoólicos (analisados como derivados TMSi) e um cetônico (Tabela 9).

Tabela 8 - Tempos de retenção dos esteroides identificados nas ceras cuticulares de espécies de *Croton* estudadas (TR=tempo de retenção; TMSi=trimetilsilil; M+= íon molecular).

TR (min)	Esteroides	M ⁺ (m/z)	Espectro de massas (m/z, %)
45,448	Campesterol-TMSi	472	472 (10), 457 (5), 382 (50), 367 (60), 343 (20), 255 (30), 213 (30), 129 (100)
45,839	Estigmasterol-TMSi	484	484 (10), 469 (10), 394 (20), 379 (20), 355 (30), 255 (50), 129 (80), 83 (100)
46,535	Sitosterol-TMSi	486	486 (20), 471 (5), 396 (40), 381 (30), 357 (50), 255 (20), 129 (100)
47,733	Estigmast-4-en-3-ona	412	412 (20), 370 (20), 289 (30), 229 (60), 124 (100).

A distribuição dos esteroides, determinada por cromatografia a gás e detecção por ionização de chamas, encontra-se na Tabela 8.

Campesterol e sitosterol foram caracterizados pelo pico base m/z 129 (Figura 23 e Figura 24, respectivamente). Dumazer e colaboradores, (1986) interpretam os fragmentos m/z 129 $[(CH_3)_3SiOC_3H_4]$ e 357 $[M-129]^+$ como provenientes da quebra das ligações C1-C10 e C3-C4, com a transferência de um átomo de H. Outro fragmento frequente nos espectros de massas dos fitoesteroides é m/z 343, originado da perda de um grupo $TMSiOH$. Na fragmentação do sitosterol os fragmentos m/z 471 $[M-15]^+$, 396 $[M-90]^+$ e 381 $[M-105]^+$ correspondem às perdas de um grupo metila, um grupo $HOSi(CH_3)_3$ e novamente um grupo metila, respectivamente. Alguns fragmentos comuns, como m/z 255, m/z 303 e m/z 329, têm sido reportados (Moreau *et al.*, 2002), assim como o fragmento m/z 257 (Willie & Djerassi, 1968). O íon molecular do campesterol-TMSi é m/z 472 e do sitosterol-TMSi é m/z 486.

Figura 13 - Espectro de massas do derivado TMSi do campesterol.

Figura 14 - Espectro de massas do derivado TMSi do sitosterol.

O campesterol foi detectado na cera de dois indivíduos de *C. celtidifolius* (A e C), *C. piptocalyx*, *C. sphaerogynus* (indivíduo A) e *C. glandulosus* (indivíduo C). O sitosterol foi detectado nos mesmos indivíduos citados acima, com exceção de *C. sphaerogynus*, e na cera de *C. celtidifolius* (indivíduo B), tendo sido em todos os casos o esteroide mais abundante.

O espectro do derivado TMSi do estigmasterol apresenta o fragmento m/z 83 como pico base e íon molecular m/z 484 (Figura 25). O fragmento m/z 395 foi reportado como característico desse fitoesterol (Segura *et al.*, 2008). O estigmasterol foi detectado na cera dos três indivíduos de *C. celtidifolius* e em quantidades inferiores a 1% em um indivíduo de *C. glandulosus* (C) (Tabela 8).

Figura 15 - Espectro de massas do derivado TMSi do estigmasterol.

Estigmast-4-en-3-ona foi caracterizada pelo íon molecular m/z 412, pico base m/z 124 e fragmentos característicos m/z 229, 289 e 370 (Seca *et al.*, 2000;) (Figura 26).

Figura 16 - Espectro de massas de estigmast-4-en-3-ona

Esse fitoesterol foi detectado em dois indivíduos de *C. celtidifolius* (B e C) e de *C. salutaris* (B e C), e em um indivíduo de *C. sphaerogynus* (A).

Esteroides têm sido reportados para espécies de *Croton*. O campesterol foi encontrado em extratos metanólicos de partes aéreas *C. cajucara* e *C. urucurana* (Peres *et al.*, 1998a), em *Croton stellatopilosus* (Konduang *et al.*, 2013) e em extratos etanólicos de partes aéreas de *C. antisyphiliticus*, *C. grandivelum* e *C. hemiargyreus* (Matos, 2011). O sitosterol foi relatado em diversas espécies de *Croton*: *C. antisyphiliticus*, *C. grandivelum*, *C. hemiargyreus*, *C. montevidensis* e *C. pycnocephalus* (Matos, 2011), *C. urucurana* (Peres *et al.*, 1998a), *C. sellowii* (Palmeira Junior *et al.*, 2004), *C. cajucara* (Maciel *et al.*, 2000), *C. pulley* (Abreu *et al.*, 2001), *C. stellatopilosus* (Konduang *et al.*, 2014), *C. regelianus* (Torres *et al.*, 2010), *C. nepetaefolius* (Santos *et al.*, 2008), entre outras espécies. Estigmasterol foi encontrado em *C. antisyphiliticus*, *C. betulaster*, *C. grandivelum*, *C. hemiargyreus* e *C. pycnocephalus* (Matos, 2011), *C. urucurana* (Peres *et al.*, 1998a), *C. cajucara* (Maciel *et al.*, 2000), *C. pulley* (Abreu *et al.*, 2001), *C. stellatopilosus* (Konduang *et al.*, 2013), *C. regelianus* (Torres *et al.*, 2010), *C. nepetaefolius* (Santos *et al.*, 2008), *C. catamarcensis*, *C. ceanothifolius*, *C. eskuchei*, *C. linearifolius* e *C. pseudoadipatus* (Feliu, 2011). Estigmast-4-en-3-ona foi encontrado em *C. antisyphiliticus*, *C. hemiargyreus*, *C. montevidensis*, *C. pycnocephalus* (Matos, 2011), *C. catamarcensis*, *C. ceanothifolius*, *C. dusenii*, *C. ericoides*, *C. eskuchei*, *C. linearifolius*, *C. mullerianus*, *C. pallidulus* var. *glabrus*, *C. pallidulus* var. *pallidulus* e *C. pseudoadipatus* (Feliu, 2011).

4.6 Análises de agrupamento

4.6.1 *n*-Alcanos

O dendrograma gerado pela análise por UPGMA apresenta três agrupamentos principais (I, II e III), com base na distribuição dos *n*-alcanos das ceras foliares cuticulares das espécies estudadas (Figura 27). O valor de correlação cofenética associado à análise é 0,7800.

Figura 17 - Dendrograma de afinidades entre os indivíduos de espécies de *Croton*, baseado na distribuição de *n*-alcanos das ceras foliares cuticulares, determinado pelo coeficiente de Distancias Euclidianas e método UPGMA de agrupamento.

C. campanulatus isola-se no agrupamento I, apresentando homólogos com cadeias carbônicas mais curtas, como C19, C20, C21 e C22, além de apresentar C28 como homólogo principal. No mesmo agrupamento estão os dois indivíduos de *C. urucurana*, com C27 como homólogo principal (Tabela 4).

O agrupamento II é subdividido em dois grupos: IIa, com espécies apresentando C29 como homólogo principal, englobando *C. lundianus* A, próximo de *C. vulnerarius* C, ambos com C31 como homólogo importante, e *C. celtidifolius* A, com C27 abundante; IIb, com C31 como *n*-alcano majoritário, seguido de C29, englobando outros dois indivíduos de *C. lundianus* (B e C), ambos com C31 abundante, diferindo dos indivíduos de *C. sphaerogynus*, o qual possui C33 como *n*-alcano importante.

O agrupamento III tem C29 como homólogo principal e reúne os três indivíduos de *C. salutaris*, *C. fuscescens*, *C. floribundus*, *C. macrobothrys*, *C. triqueter* e *C. glandulosus*, além de dois indivíduos de *C. celtidifolius* e *C. vulnerarius*, e o único indivíduo de *C. piptocalyx*. Esse agrupamento é subdividido em dois subgrupos. O subgrupo IIIa (*C. floribundus*, *C. fuscescens*, *C. piptocalyx* e *C. salutaris*), apresenta C27 e C31 como segundo e terceiro *n*-alcanos mais abundantes, respectivamente. O subgrupo IIIb (*C. celtidifolius*, *C. glandulosus*, *C. macrobothrys*, *C. triqueter* e *C. vulnerarius*) apresenta C31 como segundo *n*-alcano mais abundante. Nesse subgrupo, *C. glandulosus* (A e C) apresentam C27 e C33 *n*-alcanos importantes, enquanto *C. triqueter* C e *C. macrobothrys* C apresentam proporções semelhantes de C27 (Tabela 4; Figura 27). *C. triqueter* (A e B) e *C. fuscescens* (C) assemelham-se pelas proporções de C27, C29 e C31. *C. celtidifolius* B, *C. vulnerarius* (A e B) e *C. macrobothrys* A apresentam C30 como homólogo importante. *C. macrobothrys* B emerge isoladamente nesse agrupamento por apresentar baixa abundância de C31 (16,6%) e ausência de C32 (Tabela 4; Figura 27).

Apesar do alto valor de correlação cofenética (0,7800), nem todos os indivíduos de mesma espécie ficaram agrupados, por exemplo, *C. celtidifolius* A e *C. vulnerarius* C encontram-se no agrupamento II, enquanto os outros indivíduos encontram-se no agrupamento III.

Van Ee e colaboradores (2011) dividem o gênero *Croton* em quatro subgêneros. O primeiro subgênero, *Croton*, agrupa às espécies do velho mundo, os outros três subgêneros, as do novo mundo. O subgênero *Quadrilob*

compreende nove seções, *Adenophylli* duas e *Geiseleria* 20. No presente trabalho, estão representados os subgêneros do novo mundo, com as seguintes seções e espécies: seção *Sampatik* (subg. *Quadrilob*) representada por *C. piptocalyx*; seção *Cyclostigma* (subg. *Adenophylli*) com *C. celtidifolius*, *C. macrobothrys*, *C. urucurana* e *C. vulnerarius*; seção *Cleodora* (subg. *Geiseleria*), com *C. campanulatus*, *C. salutaris* e *C. sphaerogynus*; seção *Lasiogyne* (subg. *Geiseleria*), com *C. floribundus*; seção *Julocroton* (subg. *Geiseleria*), com *C. fuscescens* e *C. triqueter*; seção *Geiseleria* (subg. *Geiseleria*), com *C. lundianus* e *C. glandulosus*. Os autores ressaltam que essa última seção e a seção *Lasiogyne* não são monofiléticas.

O fenograma obtido com a distribuição de *n*-alcanos (Figura 27) não é coerente com a filogenia estabelecida por van Ee e colaboradores (2011). Não só a variação intraespecífica da distribuição de *n*-alcanos é grande em algumas espécies, mas também, nos casos em que essa variação é pequena, as espécies não se agrupam no fenograma segundo a composição das seções reconhecidas na filogenia.

A variação intraespecífica observada no presente estudo não pode ser atribuída a fatores ambientais (os indivíduos da mesma espécie foram obtidos de uma única população), nem de desenvolvimento (foram selecionadas sempre folhas totalmente expandidas, não senescentes).

As afinidades na distribuição de *n*-alcanos aparentes na Figura 27 não são coerentes também com afinidades baseadas em alguns caracteres morfológicos, por exemplo, tricomas foliares (Webster et al., 1996). *C. celtidifolius*, *C. macrobothrys*, *C. urucurana*, *C. vulnerarius* e *C. piptocalyx* apresentam tricomas estrelados; *C. sphaerogynus*, *C. floribundus*, *C. fuscescens*, *C. triqueter*, *C. glandulosus* e *C. lundianus* possuem tricomas estrelado-porrectos; *C. campanulatus* e *C. salutaris* têm tricomas lepidotos (Lucena & Sales, 2006; Caruzo & Cordeiro, 2007). Glândulas pecioares são comuns em *Croton* (van Ee et al., 2011). Apenas três espécies estudadas neste trabalho não possuem essas glândulas: *C. floribundus*, *C. fuscescens* e *C. triqueter*.

Muitos estudos têm indicado que os alcanos constituem um caráter taxonomicamente consistente em níveis inferiores de hierarquia (Eglinton et al., 1962a, 1962b; Salatino et al., 1989, 1991; Zygadlo et al., 1994; Mimura et al.,

1998; Skorupa *et al.*, 1998; Sonibare *et al.*, 2005; Halinski *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Bush & McInerney, 2013; Carr *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2014).

A distribuição de *n*-alcanos em *Croton* aparentemente é útil para caracterizar diversas espécies: *C. floribundus*, *C. salutaris*, *C. sphaerogynus* e *C. urucurana* (Figura 27). Provavelmente, a distribuição é útil também para caracterizar *C. campanulatus*, tendo em vista a sua distribuição de *n*-alcanos tão pouco comum em angiospermas (predominância de C28, Tabela 4).

4.6.2 Alcoóis primários

O dendrograma de afinidades baseado na distribuição de *n*-álcoois primários e Distâncias Euclidianas, gerado por UPGMA, é apresentado na Figura 28. O valor de correlação cofenética associado à análise é 0,8235, superior, portanto ao obtido com a análise de *n*-alcanos e acima do valor mínimo aceitável (0,8; Sokal & Rohlf, 1962). O teor de álcoois primários de *C. triqueter* mostrou-se insuficiente para uma análise adequada de sua distribuição. Por essa razão, essa espécie foi excluída da análise.

Três agrupamentos principais são discerníveis no dendrograma. O agrupamento I reúne *C. glandulosus* e *C. piptocalyx*. Todas as espécies desse grupo apresentam C28 como álcool principal. A distinção entre os membros do agrupamento se dá pelas proporções relativas de C26 e C30, que são altas em *C. glandulosus*. *C. piptocalyx* distingue-se pelos teores muito baixos de C26 (Tabela 6). No agrupamento II, as espécies apresentam C32 ou C30 como álcool majoritário, sendo o primeiro o álcool principal nos indivíduos de *C. lundianus* e o segundo em *C. sphaerogynus* (Tabela 6)

O agrupamento III é formado por *C. campanulatus*, *C. celtidifolius*, *C. floribundus*, *C. fuscescens*, *C. macrobothrys*, *C. salutaris*, *C. urucurana* e *C. vulnerarius*. Esse agrupamento compreende dois subgrupos: IIIa, caracterizado por C30 ou C26 como homólogos majoritários, e IIIb, com C26 como majoritário.

Em IIIa, *C. floribundus* apresenta C30 como álcool principal e teores altos de C26 e C28. Em *C. fuscescens*, C28 é homólogo importante. *C. macrobothrys* (indivíduo B) e *C. campanulatus* agrupam-se devido à importância em sua cera cuticular dos homólogos C26 e C28 (Tabela 6).

Figura 18 - Dendrograma de afinidades entre os indivíduos das espécies de *Croton* baseado na distribuição de alcoóis primários das ceras foliares cuticulares, determinado pelo coeficiente de Distancias Euclidianas e método UPGMA de agrupamento.

Os componentes de IIIb apresentam elevado teor de C26 e valores relativamente baixos dos outros homólogos. *C. macrobothrys* (A e C), *C. salutaris*, *C. urucurana* são afins por possuírem C28 como segundo álcool majoritário (Tabela 6). *C. celtidifolius* e *C. vulnerarius* apresentam proporções semelhantes de C26 (alta) e de C28 e C30 (Tabela 6).

A distribuição dos alcoóis primários também não se mostrou coerente com a composição das seções reconhecidas em *Croton*. No entanto, as espécies da seção *Cyclostigma* aparecem reunidas no agrupamento III (Figura 28) e todos os seus representantes possuem C26 como homólogo majoritário.

Estudos realizados em diversas espécies de gramíneas por Tulloch & Hoffman (1977) demonstraram que a distribuição dos alcoóis primários não apresenta variações com a idade das folhas. Comentário semelhante foi feito por Eglinton e Hamilton (1967). Tulloch (1982) conseguiu distinguir membros de diferentes subfamílias de gramíneas utilizando os alcoóis primários livres.

Salatino (1986) observou que os perfis de alcoóis primários demonstraram potencial taxonômico, uma vez que possibilitaram a distinção entre gêneros de Velloziaceae. *Pleurostima* e *Vellozia* apresentaram valores médios de cadeias carbônicas mais elevados do que *Aylthonia*, *Barbacenia* e *Burlemarxia*.

Halinski e colaboradores (2011) analisaram a composição das ceras cuticulares de *Solanum melongena* e de espécies relacionadas cultivadas em dois períodos distintos. A análise revelou grandes variações na distribuição dos componentes, com exceção dos hidrocarbonetos. A análise de agrupamento realizada para a distribuição dos alcoóis primários resultou no agrupamento randômico de *S. incanum*, enquanto a análise de *n*-alcanos foi coerente, sendo esses compostos utilizados como marcadores quimiotaxonômicos.

Os resultados do presente trabalho indicam o inverso do encontrado por Halinski e colaboradores (2011): o agrupamento baseado em alcoóis primários apresentou-se mais coerente do que o obtido com *n*-alcanos, mantendo a maior parte dos indivíduos de mesma espécie agrupados, isto é, menor variação intraespecífica (comparar as Figuras 27 e 28).

Comparando as evidências da distribuição de álcoois primários e os tipos de tricomas de *Croton*, nota-se que as espécies que possuem C26 como homólogo majoritário apresentam tricomas estrelados ou lepidotos, com

exceção de dois indivíduos de *C. fuscescens*, que possuem tricomas do tipo estrelado-porrecto. *C. floribundus* e *C. fuscescens*, espécies reunidas no agrupamento IIIa (Figura 28), não possuem glândulas peciolares.

4.6.3 Triterpenos

A distribuição dos triterpenos foi analisada mediante uma matriz de dados na qual foram registradas informações de presença/ausência (1/0). Com o emprego do método UPGMA, foi obtido o fenograma de afinidades entre as amostras que revelaram a presença de triterpenos (Figura 29). Foi empregado o coeficiente Dice para avaliar a similaridade entre os terminais, pois com esse coeficiente o compartilhamento de ausências não é usado como critério para o estabelecimento de afinidades. O valor de correlação cofenética obtido foi 0,8543.

Os indivíduos de *C. urucurana* e um indivíduo de *C. lundianus* (A) foram excluídos da análise por não apresentarem triterpenos.

C. fuscescens B emerge isoladamente no dendrograma por apresentar apenas um triterpeno, o triterpeno 7.

As demais espécies reúnem-se num grande agrupamento (I). Este divide-se em dois agrupamentos principais (II e III). Um deles (III) subdivide-se em IIIa e IIIb (Figura 29). As espécies no grande agrupamento I apresentam α e β - amirina, com exceção de *C. piptocalyx* que não apresenta β - amirina.

O agrupamento II é caracterizado pela presença do triterpeno 1. Os indivíduos de *C. glandulosus* possuem os triterpenos 2 e 6, enquanto os de *C. floribundus* agrupam-se pela presença do triterpeno 5.

No agrupamento III, *C. celtidifolius* C e *C. campanulatus* apresentam lupeol e os triterpenos 2 e 7. Em IIIa, dois indivíduos de *C. macrobothrys* (B e C) e um de *C. lundianus* (B) possuem somente amirinas; o agrupamento contendo *C. triqueter* A, os indivíduos de *C. vulnerarius*, *C. sphaerogynus* A e *C. macrobothrys* A caracterizam-se por possuírem lupeol. Em IIIb, todas as espécies possuem o triterpeno 3. *C. celtidifolius* (A e B), *C. lundianus* C, *C. piptocalyx*, *C. sphaerogynus* B, *C. triqueter* C e B encontram-se agrupados por possuírem lupeol.

Figura 19 - Dendrograma de afinidades entre indivíduos de espécies de *Croton*, baseado na distribuição de triterpenos das ceras foliares cuticulares, determinado pelo coeficiente de Dice e método UPGMA de agrupamento.

Ao analisar o dendrograma, percebemos que *C. glandulosus*, *C. salutaris* e *C. vulnerarius* são bem caracterizados pela distribuição de triterpenos. Nas demais espécies, porém, a variação intraespecífica é muito grande, motivo pelo qual indivíduos de uma espécie emergem em agrupamentos distintos (*C. celtidifolius*, *C. fuscescens*, *C. lundianus*, *C. macrobothrys* e *C. triqueter*, Figura 29). Não foi possível o estabelecimento de correlações entre a distribuição de triterpenos com caracteres morfológicos.

Gunatilaka (1986) revisou a presença de triterpenoides em plantas do Sri Lanka, ressaltando o valor taxonômico desses compostos. Wink & Waterman (1999) afirmam que os triterpenos comumente encontrados, como α e β -amirinas, ocorrem amplamente nas plantas terrestres e não contribuem taxonomicamente para a distinção entre grupos. No entanto, raras classes de triterpenos, como os limonoides de Rutales (atual Sapindales, APG III), apresentam distribuição limitada. Sapogeninas triterpenoides são sinapomorfias de Santalales (APG III). Braga e colaboradores (2006) demonstrou que a presença de triterpenoides de esqueleto do tipo dammareno em *Cabralea canjerana* reforçou seu posicionamento na subfamília Melioideae.

Halinsk e colaboradores (2011) excluíram os triterpenos das análises de agrupamento por apresentarem grande variação entre os cultivares estudados e, em alguns casos estarem presentes somente em quantidades de traços. No presente trabalho, optou-se pela análise qualitativa desses compostos já que os triterpenos 2 e 3 estão presentes somente em quantidades de traços em várias espécies. A presença de tal triterpeno é responsável pelo agrupamento III.

Os triterpenos parecem ser bons marcadores para diferentes populações: em estudo realizado com espécies de *Sedum* de diferentes populações demonstrou que os triterpenoides apresentam alta variação quantitativa intra e interespecífica. No entanto, qualitativamente a variação é pequena, apresentando padrão claro na distribuição, com ótimo valor diagnóstico entre as populações (Stevens *et al.*, 1994). Makhnev e colaboradores (2012) analisou triterpenos nas folhas de *Betula pendula* de diferentes populações e constatou diferenças quanto ao conteúdo desses compostos ligadas a variações climáticas. Mesmo apresentando grande variação qualitativa, 70% dos triterpenos encontrados apresentavam esqueleto do tipo damareno, sendo bons marcadores bioquímicos de populações. O

presente trabalho utilizou espécies de mesma população, não sendo possível a verificação da eficácia desses compostos como marcadores bioquímicos de populações.

4.6.4 Esteroides

Não foi realizada análise de agrupamento baseada na distribuição de esteroides, uma vez que sua detecção foi rara nas amostras analisadas. *C. celtidifolius* possui os quatro esteroides, *C. glandulosus* (C) apresenta somente os esteroides alcoólicos, *C. piptocalyx* possui campesterol e sitosterol, *C. salutaris* (B e C) um esteroide cetônico e *C. sphaerogynus* (A) apresenta campesterol e estigmast-4-en-9-ona.

Halinsk e colaboradores, (2011) também excluíram esteroides das análises de agrupamento pois esses compostos apresentaram grande variação em sua composição.

4.6.5 *n*-Alcanos e alcoóis primários

Tanto os *n*-alcanos quanto os alcoóis primários mostraram-se úteis como marcadores de afinidades entre espécies estudadas. A combinação de dados provenientes de distintas características é um recurso muito utilizado em taxonomia e filogenia, pois em geral contribui para a obtenção de resultados mais robustos. O dendrograma obtido com uma matriz combinando as distribuições de *n*-alcanos e álcoois primários é apresentada na Figura 30. Obteve-se um alto coeficiente de correlação fenética: 0,8246.

Os *n*-alcanos e álcoois primários caracterizam bem e permitem distinguir entre várias espécies, cujos representantes emergem todos reunidos no mesmo agrupamento. Tal é o caso de várias espécies analisadas, tais como *C. floribundus*, *C. fuscescens*, *C. glandulosus*, *C. lundianus*, *C. salutaris*, *C. sphaerogynus* e *C. urucurana*. (Figura 30). Apenas em *C. celtidifolius*, *C. macrobothrys* e *C. vulnerarius* observou-se alta variabilidade intraespecífica, o que resultou na emergência de indivíduos da mesma espécie em agrupamentos distintos (Figura 30).

Figura 20 - Dendrograma de afinidades entre os indivíduos das espécies de *Croton* baseado na reunião de *n*-alcanos e alcoois primários das ceras foliares epicuticulares, determinado pelo coeficiente de Distâncias Euclidianas com método UPGMA, de agrupamento.

Três grandes agrupamentos principais (I-III) são observados no fenograma da Figura 30. Os agrupamentos I e II são correspondentes aos agrupamentos I e II observados no fenograma da Figura 28.

O agrupamento III pode ser subdividido: IIIa possui espécies com C26 como álcool primário principal e C29 como *n*-alcano majoritário; IIIb possui C26, C28 ou C30 como álcool principal e C27 ou C29 como *n*-alcano majoritário. *C. fuscescens* e *C. floribundus* (agrupamento IIIb) não apresentam glândulas peciolares e emergem agrupados.

5. Considerações finais

O presente trabalho é o primeiro a fazer considerações sobre a morfologia dos depósitos cerosos de folhas de *Croton*. Os padrões dos depósitos cerosos possibilitam a caracterização de espécies e o estabelecimento de afinidades entre elas.

n-Alcanos, álcoois primários e triterpenos são constituintes importantes de ceras foliares cuticulares de *Croton*. Embora as afinidades químicas não se tenham mostrado congruentes com as interrelações filogenéticas entre as espécies, a distribuição desses constituintes são úteis para a caracterização de várias das espécies analisadas.

A distribuição de álcoois primários, um constituinte frequente em ceras cuticulares que raramente tem sido utilizado em quimiotaxonomia, mostrou-se consistente como marcador de espécies de *Croton*.

O presente trabalho é pioneiro na utilização quimiotaxonômica de frações de álcoois primários e triterpenos de ceras cuticulares de *Croton*. São raros os artigos em quimiotaxonomia baseada em constituintes de ceras que levem em conta a variação intraespecífica. Não foi possível no presente trabalho a coleta de material de indivíduos da mesma espécie, provenientes de populações distintas. Essa abordagem poderia possibilitar a caracterização e distinção de populações de uma mesma espécie.

Resumo

O gênero *Croton* possui aproximadamente 1300 espécies amplamente distribuídas em zonas tropicais e subtropicais do novo e velho mundo e é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae. No presente trabalho, foram analisadas a composição e a morfologia das ceras foliares cuticulares de 13 espécies de *Croton*. Para a maioria das espécies, foram amostrados três indivíduos.

A morfologia das ceras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Diversos tipos de depósitos cerosos foram observados (amorfos, plaquetas, grânulos), principalmente na face adaxial e caracterizando grupos de espécies. A observação dos padrões de depósitos cerosos de várias espécies foi prejudicada na face abaxial, devido à alta densidade de tricomas.

As ceras foram extraídas por três imersões consecutivas das folhas em diclorometano e a separação das classes dos constituintes foi feita por cromatografia em camada delgada preparativa. A análise da distribuição dos constituintes foi realizada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. *n*-Alcanos e álcoois primários foram detectados em todos os indivíduos analisados. Triterpenos também são muito comuns, não tendo sido detectados em apenas uma espécie. Os esteroides são constituintes raros nas espécies analisadas. Os resultados da distribuição de *n*-alcanos, álcoois primários e triterpenos foram utilizados para o estabelecimento de afinidades químicas por meio de análises de agrupamento pelo método UPGMA, empregando-se distâncias euclidianas (*n*-alcanos e álcoois) e coeficiente de DICE (triterpenos), baseando-se na distribuição de cada classe de constituinte isoladamente e combinando-se as distribuições de *n*-alcanos e álcoois primários.

Não se notou congruência entre as topologias dos dendrogramas de afinidades químicas e a filogenia molecular do gênero. Observou-se coerência entre algumas afinidades químicas e características morfológicas, como tipos de tricomas foliares e presença de glândulas peciolares. A distribuição de *n*-alcanos, álcoois primários e triterpenos mostraram-se úteis como caracteres da maioria das espécies analisadas. Entre os constituintes analisados, distribuição de álcoois primários revelou-se o melhor marcador para a caracterização de

espécies. A variação intraespecífica, no entanto, impede que esses caracteres sejam úteis como marcadores taxonômicos de algumas espécies de *Croton*.

Palavras-chave: *n*-alcanos, álcoois primários, triterpenos, esteroides, quimiotaxonomia, UPGMA.

Abstract

Croton comprises nearly 1300 species distributed in tropical and subtropical areas of either the New or Old Worlds, making up the largest genus of Euphorbiaceae. In the present work, the chemical composition and the morphology of the foliar cuticular waxes of 13 species of *Croton* were analyzed. Three individuals were sampled for analyses of most species.

The morphology of the waxes was analyzed by scanning electron microscopy. Several types of wax deposits were observed (amorph, platlets, granules), chiefly on the adaxial side, characterizing groups of species. The observation of wax deposits on the abaxial side was hampered in several species due to the high density of trichomes.

The cuticular wax was extracted by three successive immersions of the leaves in dichloromethane, and the separation of the constituent classes was achieved by preparative thin layer chromatography. The analyses of the distribution of the constituents were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *N*-Alkanes and primary alcohols were detected in all analyzed individuals. Triterpenes were also very common, having not been detected in only one species. Steroids are rare constituents in the analyzed species. The results of the distribution of *n*-alkanes, primary alcohols and triterpenes were used for the establishment of chemical affinities using cluster analysis by the UPGMA method and Euclidean distances (*n*-alkanes and alcohols) and DICE coefficient, based on the distribution of each constituent class alone and combining the distribution of *n*-alkanes and primary alcohols.

No congruence was noted between the topologies of the dendrograms of chemical affinity and the molecular phylogeny of the genus. Coherence was observed between chemical affinities and morphologic characteristics, such as types of foliar trichomes and petiolar glands. The distribution of *n*-alkanes, primary alcohols and triterpenes were shown to be useful as characters for most analyzed species. Among the constituents analyzed, the distribution of primary alcohols was the best marker for species characterization. Intraspecific variation, however, precludes the use of these characters as taxonomic markers of some *Croton* species.

Keywords: *n*-alkanes, primary alcohols, triterpenes, steroids, chemotaxonomy, UPGMA.

Referências Bibliográficas

- Abreu, A. S., P. S. Barbosa, A. H. Muller, & G. M. S. P. Guillon, 2001. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pulley* var. *glabrior* (Euphorbiaceae). *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA* 1:1–9.
- Addae-Mensah, I., R. Waibel, H. Achenbach, G. Muriuki, C. Pearce, & K. M. Sanders, 1989. A clerodane and other constituents of *Croton megalocarpus*. *Phytochemistry* 28:2759–2761.
- Amaral, M. C. E., M. L. F. Salatino, & A. Salatino, 1985. Teor de cera foliar epicuticular de dicotiledôneas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 8:127–130.
- APG III, A., 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: Apg III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105–121.
- Araujo-Junior, V. T., M. S. da Silva, E. V. L. da Cunha, M. F. Agra, R. N. Silva-Filho, & R. Braz-Filho, 2004. Alkaloids and diterpenes from *Croton moritibensis*. *Pharmaceutical Biology* 42:62–67.
- Baker, E., 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. Pp. 139–165, in C. D.F., A. K. L., & P. C.E., eds. *The Plant Cuticle*. Academic Press, London.
- Barbosa, P., 2003. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31:307–308.
- Barthlott, W. & C. Neinhuis, 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202:1–8.
- Barthlott, W., C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen, & H. Wilhelmi, 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126:237–260.
- Bauer, S., E. Schulte, & H. P. Thier, 2004. Composition of the surface wax from tomatoes. *European Food Research and Technology* 219:487–491.
- Bernard, A. & J. Joubès, 2013. *Arabidopsis* cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Progress in Lipid Research* 52:110–129.
- Berry, P., A. Hipp, K. J. Wurdack, B. Van Ee, & R. Riina, 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae

sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92:1520–1534.

Bianchi, G., 1995. Plant waxes. Pp. 175–342, in R. J. Hamilton, ed. *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. The Oily Press.

Bondada, B. R., D. M. Oosterhuis, J. B. Murphy, & K. S. Kim, 1996. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. *Environmental and Experimental Botany* 36:61–69.

Braga, P. A. d. C., M. S. Soares, M. F. D. G. F. da Silva, P. C. Vieira, J. B. Fernandes, & A. L. Pinheiro, 2006. Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 34:282–290.

Brooks, C. J., 1979. Some aspects of mass spectrometry in research on steroids. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London A* 293:53–67.

Buckley, S. A., A. W. Stott, & R. P. Evershed, 1999. Studies of organic residues from ancient Egyptian mummies using using high temperature-gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 124:443–452.

Budke, J. M., B. Goffinet, & C. S. Jones, 2011. A hundred-year-old question: Is the moss calyptra covered by a cuticle? A case study of *Funaria hygrometrica*. *Annals of Botany* 107:1279–1286.

Budzikiewicz, H., J. M. Wilson, & C. Djerassi, 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. *Journal of the American Chemical Society* 85:3688–3699.

Buschhaus, C., H. Herz, & R. Jetter, 2007. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Annals of Botany* Pp. 1557–1564.

Buschhaus, C. & R. Jetter, 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany* 62:841–853.

Bush, R. T. & F. A. McInerney, 2013. Leaf wax *n*-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 117:161–179.

Cameron, K., M. Teece, E. Bevilacqua, & L. Smart, 2002. Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species. *Phytochemistry* 60:715–725.

Carr, A. S., A. Boom, H. L. Grimes, B. M. Chase, M. E. Meadows, & A. Harris, 2014. Leaf wax *n* -alkane distributions in arid zone South African flora: Environmental controls, chemotaxonomy and palaeoecological implications. *Organic Geochemistry* 67:72–84.

Caruzo, M., 2005. Estudo taxonômico e biogeográfico do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Caruzo, M. B. R. & I. Cordeiro, 2007. Sinopse da tribo Crotoneae Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea* 34:571–585.

Carvalho, T. C., A. M. Polizeli, I. C. Turatti, M. E. Severiano, C. E. Carvalho, S. R. Ambrosio, A. E. M. Crotti, U. S. Figueiredo, P. C. Vieira, & N. A. J. C. Furtado, 2010. Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for lupeol biotransformation. *Molecules* 15:6140–6151.

Catalan, C. A. N., C. S. De Heluani, C. Kotowicz, T. E. Gedris, & W. Herz, 2003. A linear sesquiterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* 64:625–629.

Chibnall, A. C., S. H. Piper, A. Pollard, E. F. Williams, & P. N. Sahai, 1934. The constitution of the primary alcohols, fatty acids and paraffins present in plant and insect waxes. *The Biochemical Journal* 28:2189–2208.

Coley, P., J. Bryant, & F. Chapin, 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230:895–899.

Cordeiro, S. Z., N. K. Simas, R. D. C. D. O. Arruda, & A. Sato, 2011. Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 39:198–202.

Costa Filho, L. O., M. H. de Moura Silva, J. S. de Almeida-Cortez, S. I. da Silva, & A. F. Morais de Oliveira, 2012. Foliar cuticular *n* -alkane of some *Croton* species from Brazilian semiarid vegetation. *Biochemical Systematics and Ecology* 41:13–15.

Craveiro, A. A. & E. R. Silveira, 1982. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. *Phytochemistry* 21:2571–2574.

Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Uni-versity Press, New York.

Dewick, P., 2009. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltda, London.

Dey, P. M. & J. B. Harborne, 1997. Plant Biochemistry. Academic Press, London.

Dragota, S. & M. Riederer, 2007. Epicuticular wax crystals of *Wollemianobilis*: morphology and chemical composition. *Annals of Botany* 100:225–231.

Dumazer, M., M. Farines, & J. Soulier, 1986. Identification de sterols par spectrometrie de masse. *Revue Francaise des Crops Gras* 4:151–156.

Eglinton, G., A. G. Gonzalez, H. R. J., & R. A. Raphael, 1962a. Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves: a taxonomic survey. *Phytochemistry* 1:89–102.

Eglinton, G. & R. J. Hamilton, 1963. The distribution of alkanes. Pp. 187–217, in T. Swain, ed. *Chemical Plant Taxonomy*. Academic Press, New York.

———, 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156:1322–1335.

Eglinton, G., R. J. Hamilton, & M. Martin-Smith, 1962b. The alkane constituents of some new zealand plants and their possible taxonomic implications. *Phytochemistry* 1:137–145.

Eigenbrode, S. D. & K. E. Esperlie, 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Review of Entomology* 40:171–194.

Feliu, D. A. D., 2011. Análise de terpenoides de espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Franchini, M., L. Hernandez, & L. Lindstrom, 2010. Cuticle and cuticular wax development in the sunflower (*Helianthus annuus* L.) pericarp grown at the field under a moderate water deficit. *Phyton* 79:153–161.

Furlan, C. M., D. Y. Santos, A. C., Salatino, & M. Domingos, 2006. *n* - Alkane distribution of leaves of *Psidium guajava* exposed to industrial air pollutants. *Environmental and Experimental Botany* 58:100–105.

Govaerts, R., D. Frodin, & A. Radcliffe-Smith, 2000. Euphorbiaceae: *Croton* to *excoecariopsis*. In World checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae), vol. 2. Royal Botanical Gardens, Kew.

Gunatilaka, A. A. L., 1986. Triterpenoids and steroids of Sri Lankan plants: a review of occurrence and chemistry. Journal of the National Science Council of Sri Lanka 14:1–54.

Guo, N., J. Gao, Y. He, Z. Zhang, & Y. Guo, 2014. Variations in leaf epicuticular *n*-alkanes in some *Broussonetia*, *Ficus* and *Humulus* species. Biochemical Systematics and Ecology 54:150–156.

Gutierrez, A., I. M. Rodriguez, & J. C. del Rio, 2008. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. Industrial Crops and Products 28:81–87.

Gulz, P. G., 1994. Epicuticular leaf waxes in the evolution of the Plant Kingdom. Journal of Plant Physiology 143:453–464.

Halinski, L. P., J. Szafrank, & P. Stepnowski, 2011. Leaf cuticular *n*-alkanes as markers in the chemotaxonomy of the eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. Plant Biology (Stuttgart, Germany) 13:932–939.

Harbone, J., J. Greenham, C. Williams, J. Eagles, & K. Markham, 1993. 10 isoprenylated and C-methylated flavonoids from the leaves of 3 *Vellozia* species. Phytochemistry 34:219–226.

Harborne, J. & B. Turner, 1984. Plant Chemosystematics. Academic Press, London.

Herbin, G. A. & P. A. Robins, 1969. Patterns of variation and development in leaf wax alkanes. Phytochemistry 8:1985–1998.

Holloway, P. J., 1984. Surface lipids of plants and animals. Pp. 347–380, in H. Mangold, G. Zweig, & J. Sherma, eds. Handbook of Chromatography, Lipids, vol. 1. CRC Press, Boca Raton.

Igoli, O. J. & G. I. Alexander, 2008. Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. International Journal of Physical Sciences 3:156–158.

Itokawa, H., Y. Ichihara, M. Mochizuki, T. Enomori, H. Morita, H. Shirota, M. Inamatsu, & K. Ta-keya, 1991. A cytotoxic substance from sangre-de-drago. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 39:1041–1042.

Jeffree, C., 1986. The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, function and evolution. Pp. 23–64, in B. Juniper & R. Southwood, eds. *Insects and Plant Surfaces*. Edward Arnold, London.

Jeffree, C. E., 2006. The fine structure of the plant cuticle. in M. Riederer & M. C, eds. *Annual Plant Reviews: Biology of the Plant Cuticle*, vol. 23, Pp. 11–125. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

Jetter, R., L. Kunst, & A. Samuels, 2006. Composition of plant cuticular waxes. Pp. 145–181, in M. Riederer & C. Muller, eds. *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford.

Jetter, R., S. Schaffer, & M. Rieder, 2000. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell & Environment* 23:619–628.

Joubès, J., S. Raffaele, B. Bourdenx, C. Garcia, J. Laroche-Traineau, P. Moreau, & R. Lessire, 2008. The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modeling and expression profiling. *Plant Molecular Biology* 67:547–566.

Kader, J., 1996. Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:627–654.

Kim, K., S. Park, & M. Jenks, 2007. Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology* 164:1134–1143.

Koch, K., B. Bhushan, & W. Barthlott, 2009. Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science* 54:137–178.

Kolattukudy, P. E. (ed.) 1976. *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Amsterdam.

Kongduang, D., W. De-Eknamkul, W. Sitthithaworn, & J. Wungsintaweekul, 2013. Terpenoid content and transcription profile analysis in callus and suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23:61–68.

Kosma, D. K., B. Bourdenx, A. Bernard, E. P. Parsons, S. Lu, J. Joubès, & M. A. Jenks, 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151:1918–1929.

Krebs, H. & H. Ramiarantsoa, 1996. Clerodane diterpenes of *Croton hovarum*. *Phytochemistry* 45:379–381.

Kunst, L. & A. L. Samuels, 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42:51–80.

Kunst, L. & L. Samuels, 2009. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology* 12:721–727.

Li, R., G. Luo, P. A. Meyers, Y. Gu, H. Wang, & S. Xie, 2012. Leaf wax *n*-alkane chemotaxonomy of bamboo from a tropical rain forest in Southwest China. *Plant Systematics and Evolution* 298:731–738.

Lima, L., 2006. Estudos taxonômicos em *Croton* seção Lamprocroton (Mull.Arg.) Pax.(Euphorbiaceae). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Lucena, M. d. F. d. A. & M. F. d. Sales, 2005. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). *Rodriguesia* 57:11–25.

Lu, S., T. Song, D. K. Kosma, E. P. Parsons, O. Rowland, & M. A. Jenks, 2009. *Arabidopsis* CER8 encodes long-chain acyl-CoA synthetase 1 (lacs1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant Journal* 59:553–564.

Maciel, M., A. C. Pinto, A. C. Arruda, S. G. Pamplona, F. A. Vanderlinde, A. Lapa, A. J. Echevarria, N. F. Grynberg, I. M. Côlus, R. A. Farias, A. M. Luna Costa, & V. S. Rao, 2000. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharmacology* 70:41–55.

Makhnev, A. K., E. S. Degtyarev, & S. V. Migalina, 2012. Intraspecific variability of triterpene content in the leaves of *Betula pendula* Roth. *Contemporary Problems of Ecology* 5:179–184.

Mathe, C., G. Culioli, P. Archier, & C. Vieillescazes, 2004. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1023:277–285.

Matos, L. M. M., 2011. Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Mazliak, P., 1968. Chemistry of plant cuticles. in L. Reinhold & Y. Liwschitz, eds. *Progress in phytochemistry*, vol. I. Interscience Pub., New York.

Mimura, M. R. M., M. L. F. Salatino, A. Salatino, & J. E. A. Baumgratz, 1998. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia species*: taxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:581–588.

Mohamed, I. E., E. Bushra, E. E. Nur, M. I. Choudhary, & S. N. Khan, 2009. Bioactive natural products from two sudanese medicinal plants *Diospyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*. *Rec. Nat. Prod* 3:198–203.

Moreau, R. A., B. D. Whitaker, & K. B. Hicks, 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research* 41:457–500.

Motta, L. B., 2007. Aspectos químicos e moleculares ligados à filogenia de *Camarea* (Malpighiaceae). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Motta, L. B., C. M. Furlan, D. Y. A. C. Santos, M. L. F. Salatino, G. Negri, J. E. Carvalho, P. A. Monteiro, A. L. T. G. Ruiz, I. Cordeiro, M. B. Caruzo, & A. Salatino, 2011. Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* (Euphorbiaceae). *Phytomedicine*.

Muller, M., C. Riederer, 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* 31:2621–2651.

Negri, G., M. Salatino, A. Salatino, & L. A. Skorupa, 1998. An aromatic hydrocarbon from the foliar epicuticular wax of *Pilocarpus jaborandi*. *Phytochemistry* 49:127–129.

Neinhuis, C., K. Koch, & W. Barthlott, 2011. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* 213:427–434.

Nordby, H. & S. Nagy, 1977. Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Citrus* peels. *Phytochemistry* 16:1393–1397.

Ogunkoya, L., 1981. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry* 20:121–126.

Oliveira, A. F. M., S. T. Meirelles, & A. Salatino, 2003. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 75:431–439.

Osborne, R., A. Salatino, & M. L. F. Salatino, 1989. Alkanes of foliar waxes of the genus *Encephalartos*. *Phytochemistry* 28:3027–3030.

Palmeira Junior, S. F., F. D. S. Moura, V. D. L. Alves, F. M. Oliveira, E. S. de Bento, L. M. Conserva, & E. H. D. A. Andrade, 2006. Neutral components

from hexane extracts of *Croton sellowii*. Flavour and Fragrance Journal 19:69–71.

Pansarin, E. R., A. Salatino, & A. S. Pereira, 2008. Micromorphological and chemical characteristics of cuticular waxes of *Cleistes* (Orchidaceae, Pogonieae). Bol. Bot. Univ. São Paulo 26:79–91.

Pathan, A. K., J. Bond, & R. E. Gaskin, 2008. Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces-horses for courses. Micron 39:1049–1061.

Peres, M. P., F. Monache, M. Pizzolatti, A. Santos, A. Beirith, J. Calixto, & R. Yunes, 1998a. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. pharmaco-chemical criteria used in their isolation. Phytotherapy Research 12:209–211.

Peres, M. T. P., M. G. Pizzolatti, R. A. Yunes, & F. D. Monache, 1998b. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. Phytochemistry 49:171–174.

Pfundel, E. E., Z. G. A., & G. Cerovic, 2006. Optical properties of plant surfaces. in M. Riederer & M. C, eds. Annual Plant Reviews: Biology of the Plant Cuticle, vol. 23, Pp. 216–239. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

Piironen, V., D. G. Lindsay, T. A. Miettinen, J. Toivo, & A. M. Lampi, 2000. Review plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. Journal of the Science of Food and Agriculture 80:939–966.

Reddy, C. M., T. I. Eglinton, R. Palic, B. C. Benitez-Nelson, G. Stojanovic, I. Palic, S. Djordjevic, & G. Eglinton, 2000. Even carbon number predominance of plant wax *n* -alkanes: A correction. Organic Geochemistry 31:331–336.

Reina-Pinto, J. J. & A. Yephremov, 2009. Surface lipids and plant defenses. Plant Physiology and Biochemistry 47:540–549.

Riedel, M., A. Eichner, & R. Jetter, 2003. Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. Planta 218:87–97.

Rieder, M. & L. Schreiber, 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticle. Journal of Experimental Botany 52:2023–2032.

Riederer, M., 2006. Introduction: biology of the plant cuticle. in M. Riederer & M. C, eds. Annual Plant Reviews: Biology of the Plant Cuticle, vol. 23, Pp. 1–8. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

Rowland, O. & F. Domergue, 2012. Plant fatty acyl reductases: Enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. *Plant Science* 193-194:28–38.

Salasoo, I., 1983. Effect of leaf age on epicuticular wax alkanes in *Rhododendron*. *Phytochemistry* 22:461–463.

Salatino, A., M. L. F. Salatino, R. Mello-Silva, & I. Duerholt-Oliveira, 1991. An appraisal of the plasticity of alkane profiles of some species of *Velloziaceae*. *Biochemical Systematics and Ecology* 19:241–248.

Salatino, A., M. L. F. Salatino, & G. Negri, 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18:11–33.

Salatino, A. & J. B. da Silva, 1988. Método para separação de constituintes comuns de ceras vegetais por cromatografia em camada delgada. *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo* 10:1–6.

Salatino, M., A. Salatino, N. Menezes, & R. Mello-Silva, 1989. Alkanes of foliar epicuticular waxes of *Velloziaceae*. *Phytochemistry* 28:1105–1114.

Salatino, M. L. F., 1986. Constituintes da cera foliar epicuticular e a taxonomia de *Velloziaceae*. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Samuels, L., L. Kunst, & R. Jetter, 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* 59:683–707.

Santos, H. S., F. M. R. Mesquita, T. L. G. Lemos, F. J. Q. Monte, & R. Braz-Filho, 2008. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). *Quimica Nova* 31:601–604.

Savietto, J. P., 2011. Análise fitoquímica e atividade antiproliferativa de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

Seca, A. M. L., A. M. S. Silva, A. J. D. Silvestre, M. J. Domingues, & C. P. Neto, 2000. Chemical composition of the light petroleum extract of *Hibiscus cannabinus* Bark and Core. *Phytochemical Analysis* 350:345–350.

Secco, R. D. S., I. Cordeiro, L. Senna-vale, M. F. de Sales, L. R. de Lima, D. de Medeiros, & P. Croton, 2012. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae in Brazil. *Rodriguesia* 63:227–242.

Segura, C. A., A. Carrasco-Pancorbo, S. Cortacero, A. Gori, L. Cerretani, & A. Fernandez-Gutierrez, 2008. A simplified method for HPLC-MS analysis of sterols in vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110:1142–1149.

Shepherd, G. J., 1996. FITOPAC 1. Manual de usuário. Departamento de Botânica, UNICAMP.

Shiojima, K., Y. Arai, K. Masuda, Y. Takase, T. Ageta, & H. Ageta, 1992. Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40:1683–1690.

Silva, K. M. M., M. D. F. da Agra, D. Y. A. C. Santos, & A. F. M. d. dos Oliveira, 2012. Leaf cuticular alkanes of *Solanum* subg. *Leptostemonum* Dunal (Bitter) of some northeast Brazilian species: Composition and taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 44:48–52.

Silva Fernandes, A., 1965. Studies on plant cuticle. VIII. surface waxes in relation to water-repency. *Annals of Applied Biology* 56:297–304.

Silva Fernandes, A., E. Baker, & J. Martin, 1964. Studies on plant cuticle. VI. the isolation and fractionation of cuticular waxes. *Annals of Applied Biology* 53:43–49.

Skorupa, L., M. Salatino, & A. Salatino, 1998. Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic meaning. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:655–662.

Sokal, R. R. & F. J. Rohlf, 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11:30–40.

Sonibare, M. A., A. A. Jayeola, & A. Egunyomi, 2005. Chemotaxonomic significance of leaf alkanes in species of *Ficus* (Moraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33:79–86.

Souza, H., V.C.; Lorenzi, 2008. *Botânica sistemática*. 2 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.

Stammitti, L., S. Derridj, J. P. Garrec, I. Unit, D. Phytopharmacie, M. Chimiques, & D. S. Cyr, 1996. Leaf epicuticular lipids of *Prunu laurocerasus*: importance of extraction methods. *Phyto-chemistry* 43:45–48.

Stevens, J. F., H. T. Hart, A. J. A. Pouw, A. Bolck, & J. H. Zwaning, 1994. Epicuticular waxes of *Sedum* series *Rupestria*. *Phytochemistry* 36:341–348.

Stocker, H. & H. Wanner, 1975. Changes in the composition of coffee leaf wax with development. *Phytochemistry* 14:1919–1920.

Suh, M. C., A. L. Samuels, R. Jetter, L. Kunst, M. Pollard, J. Ohlrogge, & F. Beisson, 2005. Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiology* 139:1649–1665.

Thimmappa, R., K. Geisler, T. Louveau, P. O'Maille, & A. Osbourn, 2014. Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 65:225–257.

Torres, M. C. M., R. Braz-Filho, L. R. Silveira, J. C. Diniz, F. Viana, & O. Pessoa, 2010. Terpenoids from *Croton regelianus*. *Helvetica Chimica Acta* 93:375–381.

Tulloch, A. P., 1981. Waxes of *Panicum miliaceum*, *Panicum texanum* and *Setaria italica*. *Phytochemistry* 21:2251–2255.

Tulloch, A. P. & L. L. Hoffman, 1977. Composition of epicuticular waxes of some grasses. *Canadian Journal of Botany* 55:853–857.

Van Ee, B., R. Riina, & P. Berry, 2011. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60:1–33.

Vickery, B., M. L. & Vickery, 1981. *Secondary Plant Metabolism*. Warwick Univ. UK.

Vioque, J. & P. E. Kolattukudy, 1997. Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L.). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340:64–72.

Vranova, E., D. Coman, & W. Gruissem, 2013. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual Review of Plant Biology* 64:665–700.

Walton, T. J. & P. E. Kolattukudy, 1972. Metabolism of alkyl glyceryl ethers and their noninvolvement in alkane biosynthesis in Plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 150:310–317.

Webster, G., 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42:793–823.

Webster, G. L., M. J. Del-Arco-Aguiar, & B. A. Smith, 1996. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 121:41–57.

Willie, S. G. & C. Djerassi, 1968. Mass spectrometric fragmentations typical of sterols with unsaturated side chains. *Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems* 33:305–313.

Wink, M. & P. G. Waterman, 1999. Chemotaxonomy in relation to molecular phylogeny of plants. *Annual Plant Reviews* 2:300–341.

Yeats, T. H. & J. K. C. Rose, 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 17:191–198.

Zanon, R. B., D. F. Pereira, T. K. Boschetti, M. Santos, & M. L. Athayde, 2008. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18:226–229.

Zygadlo, J. A., D. M. Maestri, & N. R. Grosso, 1994. Alkane distribution in epicuticular wax of some Solanaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology* 22:203–209.