

Jóice Panzarín Savietto



*Análise fitoquímica e atividade
antiproliferativa de espécies nativas de
Croton L. (Euphorbiaceae)*

São Paulo

2011

Jóice Panzarin Savietto

**Análise fitoquímica e atividade
antiproliferativa de espécies nativas de
Croton L. (Euphorbiaceae)**

Phytochemical screening and antiproliferative
activity of native *Croton* L. (Euphorbiaceae)
species

Versão corrigida

São Paulo

2011

Jóice Panzarin Savietto

**Análise fitoquímica e atividade
antiproliferativa de espécies nativas de
Croton L. (Euphorbiaceae)**

Phytochemical screening and antiproliferative
activity of native *Croton* L. (Euphorbiaceae)
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.

Orientadora: Profa. Dra. Déborah Yara
Alves Cursino dos Santos

São Paulo

2011

Savietto, Jóice Panzarin

Análise fitoquímica e atividade
antiproliferativa de espécies nativas de
Croton L. (Euphorbiaceae)

111 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. *Croton*; 2. fitoquímica; 3. óleos voláteis;
4. flavonoides; 5. antiproliferativo.

Versão corrigida. Original encontra-se disponível no Instituto de
Biotecnologia da USP

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Inês Genovese

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Profa. Dra. Déborah Yara Alves dos Santos

Orientadora

*Ao meu companheiro, Rodrigo,
por todo incentivo, paciência e, é
claro, por todo o amor.*

AGRADECIMENTOS

Depois de todo o trabalho, como é bom poder agradecer!

Agradeço à Profa. Déborah, pela orientação dada nestes anos de mestrado, por compartilhar seu conhecimento e por ter me acolhido como aluna, mesmo sabendo desde o início que cedo ou tarde eu partiria em direção a outros desafios.

Aos profs. Salatino, Maria Luiza e Cláudia Furlan pelos valiosos conhecimentos, aulas, broncas e festas! Aprendi muito com vocês. Também agradeço a colaboração da Profa. Giusepinna Negri.

Aos colegas e de laboratório: Adne, Alice, Caroline, Janaína, Augusto, Bruno, Caio, Carmen, Fernanda, Marianas, Milene e Vítor por todo o apoio e companhia.

Agradeço especialmente aos colegas de projeto: Lilian Arita (você deixou saudades!), Daniela Carvalho, Liss Maristhane e Diego Feliu. Obrigada pela amizade, pelo comprometimento e por todas as horas de estudo compartilhadas.

À Paula Jardim e Mourisa Ferreira, por terem sempre ajudado muito no laboratório e por todas as risadas compartilhadas. A Mourisa agradeço especialmente à ajuda extra no final do trabalho!

Um carinho todo especial para a Vanessa Silva. Te desejo o melhor sempre!

À Letícia Lima, Inês Cordeiro, Ricarda Riina e Beatriz Caruzo pela realização da coleta do material. Às últimas três agradeço pela oportunidade e pela ótima companhia durante a viagem de coleta que realizamos juntas, também na presença do nosso motorista Luis e com a querida Lucimar Barbosa. Lu, muitíssimo obrigada por toda a ajuda e pela amizade! Bia, agradeço demais por toda a “assistência online” prestada e também por ter ganhado uma amiga.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sobretudo ao Departamento de Botânica, por fornecer toda a infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Central Analítica do Instituto de Química USP, pelas análises realizadas em CLAE/EM/EM e aos Drs. João de Carvalho e Ana Lúcia Ruiz, da Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, da UNICAMP pela realização dos testes antiproliferativos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado e pelo apoio ao projeto, respectivamente.

Ao meu querido noivo, Rodrigo Atique, por absolutamente tudo! Agradeço também aos meus outros “meninos”: José Hernandez, por todas as experiências, mágoas, alegrias e botânicas compartilhadas e Marcelo Higa, primo lindo! Companheiro para todas as horas.

Aos meus familiares, pai Clemente, mãe Gicélia, irmã Júlia, avó Thereza, tios e primos e também à minha família “emprestada” do noivo, “pais” Wlad e Vastí, “irmão” Vinícius, “avós” Magdalena, Adilles e Roberto, Tania, e, é claro, a minha adorável sobrinha Caterina por todo o apoio, carinho, incentivo e, principalmente, por compreenderem minhas ausências físicas e não físicas durante os últimos meses de mestrado. Um beijo especial para minha mãe que fez a revisão do trabalho em condições não ideais. Ela estava sempre disposta a corrigir os capítulos picados e fora de ordem. Obrigada também à Augusta, que mesmo com o pouco tempo de amizade se dispôs a revisar a parte química.

Aos queridos e preciosos amigos! Sinto tanto por não caberem todos aqui mas cito alguns: Camila Ornelas, Elaine Françoso, Fernandas Pinto e Sais, Marte Blikstad, Renata Mantovanele, Sara Romano, Thatila Rodrigues, Viviane Neri, André Rueda, Bruno Medeiros, Gerson Kobayashi, José Manuel Iglesias, Rafael Peres e, em especial ao grande amigo Heman – vulgo Alexandre Zuntini – pela ajuda com as análises em R.

Agradeço também aos amigos da Natura! Alessandra Mateus, Aline Nakashima, Clarissa Romeu, Daniela Diógenes, Fernanda Delfini, Joana Miranda, Juliana Flor, Kassandra Tadini, Larissa Zonta, Luana Prado, Nórís Ferreira, Simone Emídio, Viviane Moratti, Thaís Takeda, Eduardo Reis e Lucas Portilho. Vocês sempre foram muito compreensivos com minha vida de “jornada dupla” com o mestrado. Obrigada por toda a amizade.

E, em especial, à Simone Esteves, que além de amiga, companheira e modelo a ser seguido, acreditou em mim e no meu conhecimento acadêmico sobre metabólitos secundários para me levar a um outro nível. Adoro você!

Obrigada!

ÍNDICE

Introdução geral	12
Capítulo I – Óleos voláteis de quatro espécies de <i>Croton</i> L. de diferentes populações	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Metodologia.....	30
Resultados e discussão.....	33
Conclusões.....	44
Capítulo II – Prospecção de flavonoides em quatro espécies de <i>Croton</i> L.	52
Resumo.....	53
Abstract.....	54
Introdução.....	55
Metodologia.....	58
Resultados e discussão.....	61
Conclusões.....	71

Capítulo III – Atividade antiproliferativa de extratos metanólicos de quatro espécies de <i>Croton</i> L. sobre diferentes linhagens celulares humanas	78
Resumo.....	79
Abstract.....	80
Introdução.....	81
Metodologia.....	83
Resultados e discussão.....	87
Conclusões.....	94
Considerações finais.....	100
Resumo.....	109
Abstract.....	110

INTRODUÇÃO GERAL

PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por um público cada vez maior, e sua exploração recebe incentivo da própria Organização Mundial de Saúde, que recomendou aos países membros que desenvolvessem pesquisas visando ao uso da flora com propósitos terapêuticos. O principal fator a contribuir para o crescimento dessa prática terapêutica consiste no desenvolvimento de estudos químicos e farmacológicos que comprovem a eficácia de plantas medicinais (Castro *et al.*, 2004).

Apesar da elevada competitividade dos fármacos sintetizados, as substâncias obtidas de plantas continuam tendo enorme importância para as indústrias farmacêutica e químico-farmacêutica. Muitos medicamentos de alto valor agregado possuem ingredientes ativos botânicos. Certos fármacos são obtidos por síntese a partir de substâncias extraídas de plantas; por exemplo, o antiespasmódico Buscopan® (Boehringer Ingelheim do Brasil Ltda., 2010), sintetizado a partir do alcaloide escopolamina, derivado de *Duboisia* R. Br. (Solanaceae). Um feito recente e notável foi a obtenção de um alcaloide morfina (tazopsina) de uma Menispermaceae nativa de Madagascar (*Strychnopsis thouarsii* Baill.), cuja estrutura foi alterada, obtendo-se a NCP-tazopsina, que se revelou ativa contra várias espécies de *Plasmodium* em sua fase hepática de desenvolvimento, o que reduz a praticamente zero a possibilidade de desenvolvimento de resistência (Carras *et al.* 2006). A NCP-tazopsina representa atualmente a principal esperança para o tratamento da malária.

Há ainda princípios ativos colinérgicos, como a pilocarpina (extraída de espécies de *Pilocarpus* Vahl, (Rutaceae), e utilizada no tratamento do glaucoma. Vincristina (Oncovin®) e vinblastina (Velban®), alcaloides utilizados no tratamento do câncer, isolados de *Catharanthus*

roseus (L.) G. Don. (Apocynaceae) de Madagascar. Paclitaxel (Taxol®) de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) também tem reconhecida atividade antitumoral. Virend® é um medicamento antiviral cujo princípio ativo é a SP 303, uma proantocianidina isolada do látex de *Croton lechleri* Müll. Arg (Orozco-Topete *et al.*, 1997). Além desses, existem inúmeros outros exemplos, como a morfina, potente analgésico de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) e a quinina, substância antimalárica de *Cinchona* L. (Rubiaceae) (Farnsworth & Morris, 1976; Cuendet & Pezzuto, 2008).

A grande biodiversidade e vasto potencial florístico para a provisão de recursos medicinais naturais e de fármacos potentes do Brasil amplificam a prioridade para os estudos de plantas medicinais (De Moura *et al.*, 2001). Um argumento frequentemente utilizado para realçar a importância da conservação de áreas nativas em países tropicais é a perda que representaria, para a medicina, a extinção de muitas espécies detentoras de substâncias com elevado potencial farmacológico, em sua maioria nunca analisadas por químicos e farmacólogos e, muitas delas, desconhecidas até mesmo pela comunidade taxonômica. Plantas medicinais incluem-se entre os argumentos de conservacionistas que procuram obter números que expressem o valor em dólares de determinadas espécies e ecossistemas (Edward-Jones *et al.*, 2000).

EUPHORBIACEAE

Euphorbiaceae está entre as famílias mais comuns nas formações naturais brasileiras. O caule, às vezes suculento, exsuda látex ou resina bastante rica em metabólitos secundários. Pertence às famílias de maior importância econômica entre as Angiospermas, sendo seus principais produtos a borracha (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), resinas (*Croton lechleri*) e óleos fixos (*Ricinus communis* L.) de grande aplicação. Apesar de atualmente ser objeto de vários estudos multidisciplinares envolvendo pesquisas em taxonomia, morfologia, anatomia, fitoquímica, filogenia e botânica econômica, o conhecimento do grupo ainda apresenta lacunas consideráveis (Lima, 2001).

A família pertence à Malpighiales e é irmã de Rafflesiaceae, segundo o APG III (Stevens, 2001). É uma das mais diversificadas e complexas entre as Angiospermae, com aproximadamente 8000 espécies, constituindo a sexta maior família depois das Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Rubiaceae (Lima, 2006). Sua caracterização dá-se por conta das folhas com estípulas, frequentemente com nectários extraflorais no pecíolo ou na face abaxial (Souza & Lorenzi, 2005).

Grupo de distribuição pantropical, é conhecido em muitas partes do mundo por seus compostos tóxicos e medicinais. Representantes dos gêneros *Euphorbia* L. e *Croton* L. são encontrados em regiões extratropicais como sul dos EUA, Mediterrâneo, Oriente Médio e sul da África. O foco de origem e diversificação da família encontra-se na região Indomalaia, porém áreas tropicais do Novo Mundo são relatadas como locais de alta diversidade (Lima, 2006).

CROTON

O gênero *Croton* é particularmente comum em quase todos os ecossistemas, com destaque para *Croton urucurana* Baill., típico das florestas ciliares (Souza & Lorenzi, 2005). Esse gênero reúne aproximadamente 1300 espécies descritas, distribuídas pelas zonas tropical e subtropical do mundo todo, constituindo o segundo maior gênero de Euphorbiaceae. Apenas no estado do Rio de Janeiro, reconhecem-se 39 espécies, algumas delas usadas em medicina popular com vários objetivos, inclusive para o tratamento de câncer (Pereira *et al.*, 2002).

Entre as principais características do gênero estão inflorescências espiciformes, flores femininas com pétalas reduzidas, estames encurvados no botão, tipo de indumento (estrelado, escamiforme ou simples) e látex não leitoso, que permitem distingui-lo de outros gêneros da subfamília Crotonoideae, tais como *Jatropha* L., *Hevea* Aubl. e *Manihot* Mill. (Lima, 2006). Na

figura 1 é possível observar o aspecto geral de algumas espécies e características encontradas nas flores do gênero.



Figura 1. Aspecto geral de *Croton myrianthus* (a) e *C. splendidus* (b). Detalhe das flores de *C. dichrous* (c) e *C. erythroxyloides* (d). Fotos: (a) e (c) por Lima, L.R. (b) e (d) por Caruzo, M.B.R.

Apesar do grande número de espécies e acentuado poliformismo, autores como Mueller e Baillon propuseram classificações infragenéricas de *Croton* ainda no século XIX. Com base nesses trabalhos, Webster (1993) utilizou características morfológicas para propor a subdivisão do gênero em 40 seções. Em 2005, Berry e colaboradores publicaram o primeiro estudo filogenético de *Croton*, incluindo 88 taxa, baseados em dados moleculares, morfológicos e biogeográficos (Fig. 2). Os autores salientam a importância de futuros estudos que possam contribuir para elucidar as complexas relações entre as espécies de um gênero tão diverso, abundante em ecossistemas tropicais e com amplo potencial farmacológico.

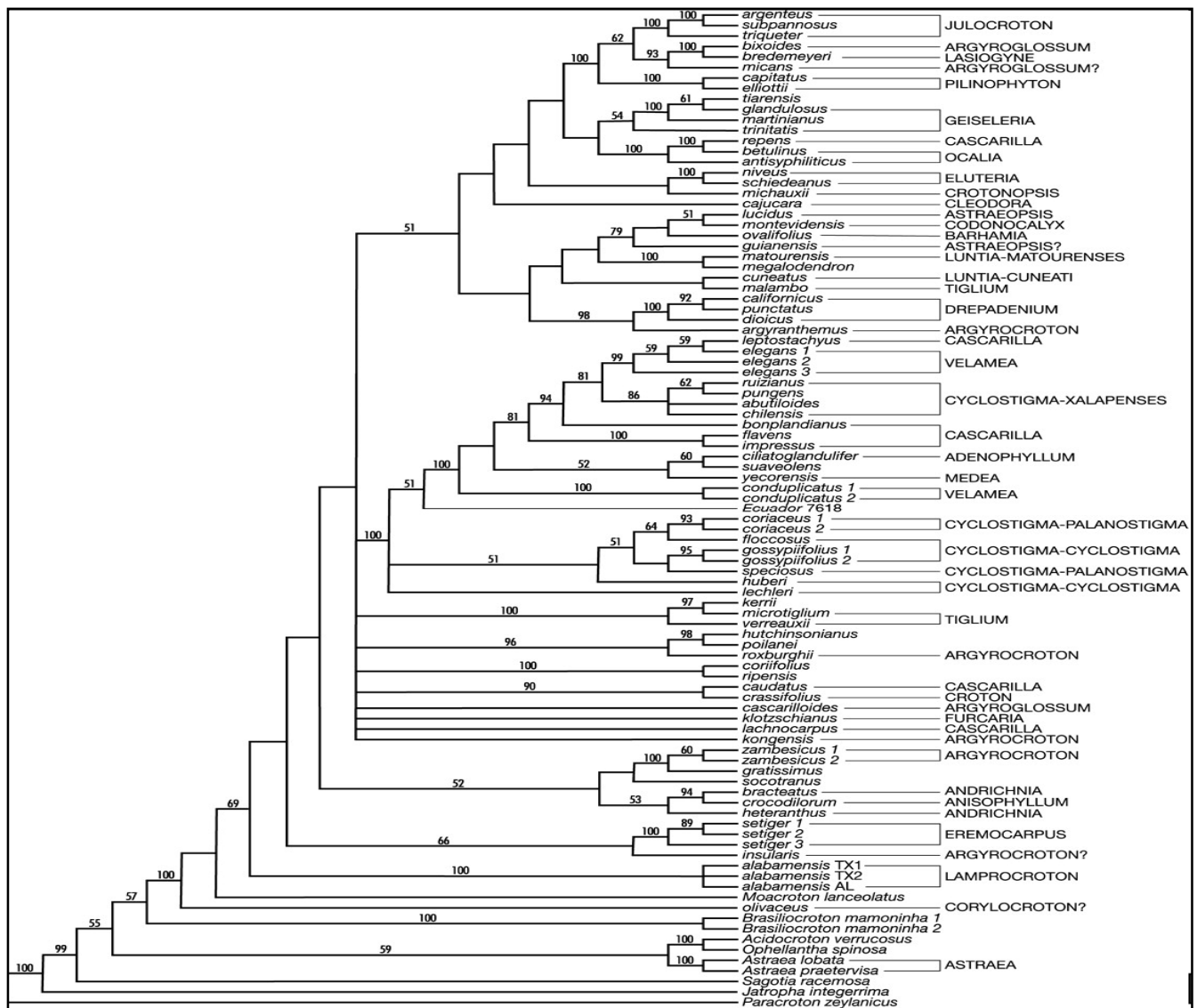


Figura 2. Filogenia de *Croton* dividida em sessões gerada por análise de dados de ITS (Berry *et al.*, 2005).

A seção *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax provavelmente é um grupo natural, composto por indivíduos monoicos ou dioicos, com ramificações difusas, subarbustos ou arbustos, com indumento foliar lepidoto, inflorescências terminais uni ou bissexuadas com ausência de címulas, flores estaminadas com nove a dezesseis estames e flores pistiladas com sépalas inteiras e estiletos que são de uma a duas vezes bífidos (Lima & Pirani, 2008).

Em muitos locais da Ásia, África e Américas, espécies de *Croton* são apreciadas pela população como medicinais. Por exemplo, no Brasil, espécies como *C. cajucara* Benth., *C. celtidifolius* Baill., *C. nepetaefolius* Baill., *C. palanostigma* Klotzsch., *C. schiedeianus* Schltld., *C.*

urucurana Baill. e *C. zehntneri* Pax & K.Hoffm. são utilizadas em medicina tradicional para tratamentos de uma ampla diversidade de males, tais como hipercolesterolemia, obesidade (*C. cajucara*), inflamações, úlcera, leucemia (*C. celtidifolius*), inapetência, cólicas (*C. nepetaefolius*), feridas, inflamação intestinal (*C. palanostigma*), reumatismo, câncer (*C. urucurana*), anorexia, distúrbios gastrointestinais, folhas e cascas usadas como adoçante (*C. zehntneri*) (Salatino *et al.*, 2007).

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *CROTON*

As plantas produzem uma vasta e diversa gama de compostos orgânicos que, aparentemente, não possuem nenhuma relação direta com seu crescimento ou desenvolvimento. Essas substâncias são chamadas de metabólitos secundários. Por muitos anos, o valor adaptativo dos compostos secundários para as plantas manteve-se desconhecido. Hoje se acredita que eles sejam importantes, entre outras funções, na defesa contra herbivoria e patógenos (Taiz & Zeiger, 2009).

A maioria das espécies de *Croton*, notadamente as herbáceas e arbustivas, têm crescimento rápido. De acordo com a mais bem-sucedida teoria da ecologia bioquímica (alocação de recursos, Coley *et al.*, 1985), plantas de crescimento rápido investem preferencialmente em defesas qualitativas, ou seja, substâncias com atividade fisiológica, como alcaloides e terpenoides. Não é surpreendente, portanto, que *Croton* seja uma fonte abundante de metabólitos secundários, com ampla diversidade de atividades farmacológicas (Salatino *et al.*, 2007), muitas delas conhecidas e utilizadas popularmente.

Numerosos artigos tratam de efeitos dos extratos de partes de plantas de *Croton* e de substâncias isoladas buscando analisar os compostos responsáveis por tais efeitos farmacológicos. Por exemplo, o látex vermelho de *C. lechleri* apresenta atividades antibacteriana (Chen *et al.*,

1994) e inibidora da proliferação de células da leucemia (Rossi *et al.*, 2003). Extratos aquosos e etanólicos de *C. schideanus* têm atividade vaso-relaxante e anti-hipertensiva (Guerrero *et al.*, 2001 e 2002). Entre as substâncias isoladas de espécies de *Croton*, a que tem recebido maior atenção em estudos sobre atividade farmacológica é a *trans*-desidrocrotonina (Fig. 3a), um diterpenoide obtido de uma espécie nativa, *C. cajucara*. Comprovaram-se efeitos hipolipidêmico e hipoglicêmico (Maciel *et al.*, 2002), além de antiestrogênico e antitumoral (Grynberg *et al.*, 1999) dessa substância. Outros metabólitos de *Croton* de grande interesse farmacológico são o alcaloide taspina (Fig. 3b) de *C. lechleri*, que tem atividade citotóxica (Itokawa *et al.*, 1991), e um diterpeno de cadeia aberta, chamado plaunotol (de *C. sublyratus* Kurz), que tem atividade potencializadora de drogas contra *Helicobacter pylori* (que causa a úlcera péptica) (Koga *et al.*, 2002) e antiangiogênica (Kawai *et al.*, 2005).

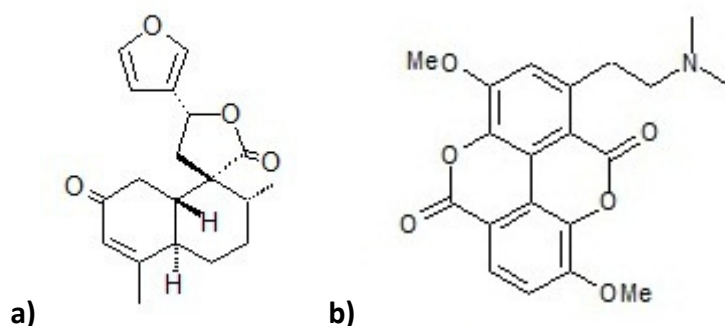


Figura 3. O diterpeno *trans*-desidrocrotonina (a) e o alcaloide taspina (b).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, ocorrendo estreita relação entre essas rotas e aquelas responsáveis pela síntese de metabólitos primários (Castro *et al.*, 2004).

Muitos terpenoides ocorrem livres em tecidos vegetais, mas também são comumente encontrados como glicosídeos, éter de ácidos orgânicos e, em alguns casos, em combinação com

proteínas (Geissman & Crout, 1969). A volatilidade de alguns terpenos faz com que esses compostos sejam facilmente perceptíveis nos aromas das plantas e prontamente obtidos por destilação de órgãos vegetais (Castro *et al.*, 2004). A classe dos terpenoides é dividida de acordo com o número de unidades de isopreno (5C) que os constitui. Em *Croton*, a classe dos diterpenos é bastante abundante e eles possuem uma cadeia de 20 átomos de carbono, com quatro unidades de isopreno.

Os flavonoides podem ser classificados, entre outros, como flavonas, flavanonas, isoflavonas, chalconas e antocianinas. Esses compostos ocorrem como misturas, sendo muito raro encontrar um único flavonoide isolado no tecido vegetal (Harborne, 1984; Silva *et al.*, 1995). Oferecem à planta proteção contra herbivoria e contra o ataque de fungos e bactérias (Taiz & Zeiger, 2009).

Sendo compostos fenólicos típicos, agem como oxidantes potenciais e quelantes de metais. Atuam como filtros da luz ultravioleta (UV-A e UV-B). A camada epidérmica consegue absorver mais de 90% da radiação solar. Estudos recentes sugerem que os flavonoides exercem atividade de regulação no crescimento vegetal, como moduladores no transporte de auxina (Taiz & Zeiger, 2009).

Muitos flavonoides são indicados como anti-inflamatórios, antivaricosos, diuréticos, antiviróticos, antioxidantes, com atividade microbiana e fungistática entre outras (Silva *et al.*, 1995).

Os dados relacionados a flavonoides em *Croton* são ainda raros. Alguns flavonoides já conhecidos são artemetina (*C. brasiliensis* Müll.Arg.) e vitexina (*C. hovarum* Leandri). O banco de dados atual sugere a presença comum de flavonóis e flavonas do tipo agliconas altamente metoxilados. Isso pode ser reflexo da metodologia de extração geralmente utilizada em química

de produtos naturais, que privilegia solventes menos polares e não o metanol 80%, solvente preferencial para obtenção de flavonoides glicosídicos. Por esse motivo, é provável que os glicosídeos de flavonas e flavonóis não tenham sido detectados em muitas análises químicas (Salatino *et al.*, 2007).

Os óleos voláteis são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, formadas principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Sua principal característica é a volatilidade (Almeida, 2002). Embora bastante estudados e importantes para a indústria de flavorizantes, fármacos e perfumes, as funções biológicas dos óleos voláteis ainda não são totalmente esclarecidas. Atualmente são bastante conhecidos por sua ação antifúngica. Além disso, desempenham papel ecológico importante na atração de polinizadores e dispersores e apresentam propriedade repelente de insetos (Taiz & Zeiger, 2009). Em termos medicinais, exercem uma grande gama de atividades. O óleo de menta (mentol) e o de eucalipto (eucaliptol) apresentam eficaz ação antibacteriana, antisséptica e expectorante, sendo bastante utilizados no tratamento de distúrbios respiratórios e em produtos de ação desinfetante. Além disso, muitos óleos voláteis possuem atividade anti-inflamatória, carminativa e desodorante.

Óleos voláteis foram relatados, até o momento, em 18 espécies de *Croton*. Dessas, quinze são das Américas e três da África. *Croton flavens* L., espécie originária da região do Caribe, é bastante conhecida e utilizada pelas populações locais como medicinal. As folhas possuem altas concentrações de óleos voláteis. Foram identificados mais de 47 compostos distintos na espécie, sendo viridifloreno (12,22%), germacrona (5,27%), γ -bisaboleno (5,25%) e β -cariofileno (4,95%) os majoritários (Sylvestre *et al.*, 2005). Entre os muitos componentes de óleos de espécies do gênero, foram relatados monoterpenos, como o cineol e o linalol; sesquiterpenos, como o cariofileno e fenilpropanoides, como o eugenol e o anetol (Salatino *et al.*, 2007) (Fig. 4).

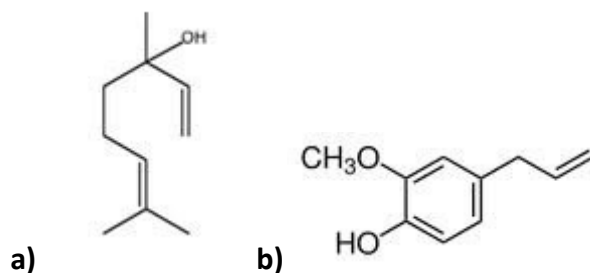


Figura 4. Componentes descritos em óleos voláteis de *Croton*: linalol (a) e eugenol (b).

Poucas espécies incluídas na filogenia de *Croton* publicada por Berry *et al.* (2005) têm sua composição química conhecida. Portanto, seria interessante pesquisar quimicamente espécies incluídas em estudos filogenéticos, assim como incluir à filogenia espécies com química já elucidada. Dessa maneira, seria possível estudar o padrão de distribuição desses metabólitos secundários nesse gênero.

OBJETIVOS:

O presente estudo tem os objetivos de ampliar o conhecimento sobre a química de *Croton* através da identificação dos componentes de óleos voláteis e de flavonoides e de algumas espécies do gênero, além de gerar conhecimento potencial para a ampliação da utilização do gênero para a medicina de compostos naturais. Também visa testar a atividade antiproliferativa de extratos de espécies do gênero. O estudo faz parte de um projeto maior no laboratório de Fitoquímica (FAPESP 2007/02518-6) que abrange o *screening* químico de um grande número de espécies, a realização de bioensaios, além de um estudo filogenético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALMEIDA, J.M.D. Flavonoides, óleos voláteis e glândulas foliares de *Bauhinia* sp. Dissertação de Mestrado. IB-USP. 87p., 2002.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; EE, B.V.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* DNA sequence data. American Journal of Botany 92: 1520-1534, 2005.
- BOEHRINGER INGELHEIM DO BRASIL LTDA. Buscopan – Butilbrometo de escopolamina. Disponível em www.buscopan.com.br. Acesso em maio 2011.
- CARRAZ, M.; JOSSANG, A.; FRANETICH, J.F.; SIAN, A.; CICERON, L.; MANNOUM, L.; SAUERWEIN, R.; FRAPPIER, F.; RASOANAIVO, P.; SNOUNOU, G.; MAZIER, D. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. PLoS Medicine 3: 2392-2402, 2006.
- CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos Secundários. 2.ed – Visconde do Rio Branco. Viçosa. 113p., 2004.
- CHEN, Z.P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J.D. Studies on the antitumor, antibacterial and wound-healing properties of dragon's blood. Planta Medica 60: 541-545, 1994.
- COLEY, P.G.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defense. Science 230: 895-899, 1985.
- CUENDET, M.; PEZZUTO, J.M. Antitumor alkaloids in clinical use or in clinical trials. In: FATTORUSSO, E.; TAGLIATELLA-SCAFATI, O. (Eds.) Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. Weinheim: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co., 2008.
- De MOURA, K.C.G.; EMERY, F.S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M.C.F.R.; DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S.L.; PINTO, A.V. Trypanocidal activity of Isolated naphtoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. Journal of the Brazilian Chemistry Society 12: 325-338, 2001.
- EDWARDS-JONES, G.; DAVIES, B.; HUSSAIN, S.S. Ecological economics. Blackwell, Oxford. 272p, 2000.
- FARNSWORTH, N.R.; MORRIS, R.W. Higher plants – the sleeping giant of drug development. American Journal of Pharmacy 148: 46-52, 1976.
- GEISSMAN, T.A.; CROUT, D.H.G. Organic chemistry of secondary plant metabolism. San Francisc: Freeman, Cooper and Company. 592 p., 1969.
- GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J.E.; PAMPLONA, S.S.R.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin, from *Croton cajucara*. Planta Medica 68: 687-689, 1999.
- GUERRERO, M.F.; CARRON, R.; MARTIN, M.L.; SAN ROMA, N.L.; REGUERO, M.T. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. Journal of Ethnopharmacology 75: 33-36, 2001.
- GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRON, R.; MARTIN, M.L.; ARTEAGA, L.; SAN ROMAN, L. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 80: 37-42, 2002.
- HARBORNE, J.B. Phytochemical methods. 2. Ed. Hong Kong: Chapman and Hall. 288 p, 1984.

- ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKI, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, H.; INAMATSU, M.; TAKEYA, K. A cytotoxic substance from sangre-de-drago. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39: 1041-1042, 1991.
- KAWAI, K.; TSUNO, N.H.; KITAYAMA, J.; OKAJI, Y.; YAZAWA, K.; ASAKAGE, M.; YAMASHITA, H.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA, H. Anti-angiogenic properties of plaunotol. *Anti-Cancer Drugs* 16: 401-407, 2005.
- KOGA, T.; INOUE, H.; ISHII, C.; OKAZAKI, Y.; DOMON, H.; UTSUI, Y. Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 133-136, 2002.
- LIMA, L.R. O gênero *Croton* L. da Cadeia do Espinhaço (MG). Dissertação de Mestrado. IB-USP. M-994, 2001.
- LIMA, L.R. Estudos Taxonômicos em *Croton* seção *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). Tese de Doutorado. IB-USP, 2006.
- LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae) from Brazil. *Kew Bulletin* 63: 121–129, 2008.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. *Química Nova* 25: 429-438, 2002.
- MARKHAM, K.R. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London, 1982.
- OROZCO-TOPETE, R.; SIERRA-MADERO, J.; CANO-DOMINGUEZ, C.; KERSHENOVICH, J.; ORTIZ-PEDROZA, G.; VAZQUEZ-VALLS, E.; GARCIA-COSIO, C.; SORIA-CORDOBA, A.; ARMENDARIZ, A.M.; TERAN-TOLEDO, X.; ROMO-GARCIA, J.; FERNANDEZ, H.; ROZHON, E.J. Safety and efficacy of Virend for topical treatment of genital and anal herpes simplex lesions in patients with AIDS. *Antiviral Research* 35:91-103, 1997.
- PEREIRA, A.D.; CARBONELL, S.A.; NETO, F.R.D.; AMARAL, A.C.F.; BARNES, R.A. High-temperature gás chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. *Journal of Chromatography* 947: 255-265, 2002.
- ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Crotonlechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomedicine* 10: 139-144, 2003.
- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(1): 11-33, 2007.
- SILVA, I.; MIRANDA-NETO, M.H.; FRANCO, S.L.; CARDOSO, M.L.C.; MOLINARI, S.L.; SANT'ANA, D.M.G.; CONEGERO, C.I.; IWANKO, N.S. Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais. Cascavel, Assoeste. 203 p., 1995.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática*. Institutum Plantarum de estudos da flora Ltda. Nova Odessa, 2005.
- STEVENS, P.F. (2001 onwards). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 9, June 2008. Disponível em <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/>>. Acesso em maio de 2011.
- SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 99-102. 2005.
- TAIZ, L.; SEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre. 848 p., 2009.
- WEBSTER, G.L. A Provisional Synopsis of the Sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42:793-823, 1993.

Capítulo I

**ÓLEOS VOLÁTEIS DE QUATRO ESPÉCIES DE *CROTON* L. DE
DIFERENTES POPULAÇÕES.**

ÓLEOS VOLÁTEIS DE QUATRO ESPÉCIES DE *CROTON* L. DE DIFERENTES POPULAÇÕES

RESUMO

Os óleos voláteis de *Croton* possuem grande potencial econômico. Entretanto, dependendo das condições da planta, a composição desses óleos pode variar. Das folhas e do caule de *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, cada um coletado em três diferentes localizações das regiões Sul e Sudeste do país, foram obtidos os óleos voláteis e analisados por CG/EM. Na composição dos óleos foram identificadas trinta e seis substâncias nas folhas e trinta e três nos caules. Destacam-se entre elas monoterpenos oxigenados, como linalol e 1,8 cineol e sesquiterpenos oxigenados, como o espatulenol e o α -bisabolol, além do ledol que até agora havia sido descrito apenas em uma espécie de *Croton* e em pequena quantidade. Grande variabilidade intraespecífica foi observada na composição dos óleos voláteis para as espécies analisadas, indicando forte dependência entre a composição de óleos voláteis e fatores ambientais.

PALAVRAS-CHAVE

Croton, Euphorbiaceae, óleos voláteis, variação intraespecífica, ledol, 1,8 cineol.

ABSTRACT

Essential oils of *Croton* species have a great economic potential. However, depending on plant conditions, the composition of these oils may vary. Leaves and stems of *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* and *C. splendidus*, each one harvested in three different locations of south and southeast of Brazil, had the essential oils extracted and analyzed by GC/MS. Thirty six compounds were identified from leaf essential oils and thirty three from stems. Oxygenated monoterpenes such as linalool and 1,8 cineol were very common, as well as oxygenated sesquiterpenes such as α -bisabolol and espatulenol. Ledol, which has been described only for one species of *Croton* at a small amount, has been detected herein. Great intraspecific variability was observed in the composition of essential oils for the analyzed species, indicating strong correlation between the composition of essential oils and environmental factors.

KEY WORDS

Croton, Euphorbiaceae, essential oil, intraespecific variation, ledol, 1,8 cineol.

1. INTRODUÇÃO

Segundo maior e mais diverso gênero dentro das Euphorbiaceae, com aproximadamente 1250 espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas (Govaerts *et al.*, 2000), *Croton* L. se distribui por zonas tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Austrália. São registradas até o momento 350 espécies de ocorrência no território nacional, sendo 178 de ocorrência para a região Sudeste do Brasil (Berry *et al.*, 2005). *Croton* é bastante rico em metabólitos secundários, sendo os óleos voláteis, comuns no gênero, formados por muitos mono e sesquiterpenos (como o cineol, o linalol), além de fenilpropanoides, como o eugenol e o anetol (Salatino *et al.*, 2007).

No Brasil, muitas espécies de *Croton* são utilizadas como medicinais por populações locais ou mesmo em larga escala, como é o caso da sacaca (*Croton cajucara* Benth. - Maciel *et al.*, 2000) e de algumas espécies de látex vermelho como *Croton lechleri* Müll. Arg. (Cai *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994; Jones, 2003), *C. urucurana* Baill. (Peres *et al.*, 1998; Simionatto *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008) e *C. celtidifolius* Baill. (Nardi *et al.*, 2003). No Nordeste, muitas espécies são aromáticas (Craveiro *et al.*, 1981; Moreno *et al.*, 2009). Em geral, nas espécies brasileiras, mono e sesquiterpenos são os compostos voláteis mais abundantes, com exceção de *C. zehntneri* Pax et Hoffm., para a qual foram propostas as variedades químicas “eugenol” e “anetol” (Craveiro *et al.*, 1978, 1980, 1981).

Radulovic *et al.* (2006) sugerem a presença abundante de β -cariofileno e do monoterpene linalol como compostos recorrentes nos óleos voláteis do gênero *Croton*.

Entretanto, a composição dos óleos pode variar tanto quantitativa quanto qualitativamente por fatores climáticos (Thappa *et al.*, 2004; Telci *et al.*, 2010), irrigação (Ram *et al.*, 1995; Atallah *et al.*, 2011), recursos disponíveis, tais como disponibilidade de nitrogênio no

solo (Ram *et al.*, 1995), interação com insetos (Biswas *et al.*, 2009) além das características intrínsecas (fatores genéticos) da espécie (Adzet *et al.*, 1992). Um trabalho muito interessante abordando diversos fatores que podem afetar a produção de óleos voláteis foi conduzido por Figueiredo e colaboradores em 2008.

O objetivo deste trabalho foi fazer uma prospecção das substâncias presentes nos óleos voláteis de quatro espécies de *Croton* e verificar a existência ou não de diferenças significativas associadas a localizações distintas de coleta das espécies.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram analisadas amostras de três populações de *Croton dichrous* Müll. Arg., *C. erythroxyloides* Baill., *C. myrianthus* Müll. Arg. e *C. splendidus* Mart. coletadas em municípios das regiões Sul e Sudeste do Brasil (Tabela 1). As espécies foram identificadas pelas Dras Letícia Ribes Lima, Inês Cordeiro e Sônia Aragaki. Exsicatas dos materiais estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica - São Paulo (SP), exceto as de *C. myrianthus*, que se encontram no Herbário do Instituto de Biociências – São Paulo (SPF) (Thiers, constantemente atualizado).

Tabela 1: Locais de coleta e números voucher das espécies analisadas.

Espécie	Voucher	População	Data	Local
<i>C. dichrous</i>	Lima 320	1	out/2003	Campos do Jordão - SP
	Aragaki 1101	2	mai/2007	São José do Barreiro - SP
	Cordeiro 3123	3	set/2009	São José dos Pinhais - PR
<i>C. erythroxyloides</i>	Lima 481	1	fev/2008	Campos do Jordão - SP
	Lima 511	2	set/2008	Alto Caparaó - MG
	Cordeiro 3216	3	nov/2009	Caldas - MG
<i>C. myrianthus</i>	Lima 296	1	abr/2003	Cambará do Sul - RS
	Lima 329	2	jan/2004	Palmeira - PR
	Lima 356	3	abr/2004	Urubici - SC
<i>C. splendidus</i>	Lima 357	1	abr/2004	Campina Grande do Sul - PR
	Cordeiro 3041	2	fev/2009	Santa Barbara - MG
	Cordeiro 3149	3	nov/2009	Ouro Preto - MG

2.2 EXTRAÇÃO

As folhas e cascas foram secas em estufa e 1 g foi triturado; o pó resultante, colocado em balão para destilação em extrator de Clevenger juntamente com 50 mL de água destilada, aquecidos por 5 horas. O óleo obtido foi recolhido em 1 mL de éter etílico e analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas – CG/EM – em um conjunto Agilent GC/MS 6859/5975B com coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25µm) DB-5 HT, usando-se He como gás de arraste em fluxo de 1 mL.min⁻¹. A quantidade injetada em cada corrida foi 1 µL. A temperatura do injetor foi de 250°C e as da coluna obedeceram ao programa: 40°C - 1 min, elevação de 6°C.min⁻¹ até 100°C e de 3°C.min⁻¹ até 200°C, modo splitless. A temperatura da fonte foi de 230°C e do quadrupolo, 150°C. Modo de detecção positivo e obtenção do espectro de massas por varredura dos ions, voltagem da eletromultipladora de 70 eV.

2.3 IDENTIFICAÇÃO

A identificação dos componentes foi feita por comparação dos respectivos espectros de massas com os da biblioteca NIST 05 MS Library Bundle e pelo cálculo do IRL conforme descrito por Viegas & Bassoli (2007).

Uma mistura padrão de *n*-alcanos (Sigma-Aldrich C8-C20) foi utilizada para verificar o desempenho do sistema CG/EM e calcular o índice de retenção linear (IRL) de cada composto na amostra. O padrão (1 µL) desses alcanos foi injetado no sistema CG/EM, operando nas mesmas condições de análise dos óleos, e seus respectivos tempos de retenção foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do IRL, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O IRL de cada componente foi calculado conforme a seguinte equação:

$$\text{IRL} = 100 \times \left[\frac{(t_c - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)} + n \right] \text{ (Viegas \& Bassoli, 2007)}$$

Onde: IRL - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_n - tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - número de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Todos os valores de IRL obtidos foram comparados com os valores presentes em Adams (2009) e na literatura específica de óleos voláteis em *Croton* (Agnaniet, 2005; Dias, 2006; Sylvestre, 2006; Brasil, 2009; Compagnone, 2010).

2.4 ANÁLISE DE DADOS

Para comparar as três populações das quatro espécies estudadas e verificar a semelhança química entre elas, foi calculado o Índice de Dissimilaridade de Jaccard. Essa análise foi realizada no Ambiente R (R Development Core, 2011), e utilizaram-se os pacotes *vegan* (Oksanen *et al.*, 2011) e *ape* (Paradis *et al.*, 2004). Para o cálculo do Índice de Jaccard, foi utilizada a função *vegdist* (pacote *vegan*), por permitir o uso de dados binários (presença e ausência). A matriz de dissimilaridade foi considerada como matriz de distância e o agrupamento das amostras (por similaridade) por meio da função *UPGMA* (*ape*). A relação entre as amostras foi apresentada pela representação topológica em dendrograma. O *script* utilizado está disponível no Anexo I.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos óleos voláteis das folhas e caules de praticamente todas as espécies. Na população 1 de *C. dichrous* não foi detectado óleo nas folhas nem no caule e, na população 3 da mesma espécie, só foi detectado óleo nas folhas. As substâncias presentes nas espécies estudadas estão elucidadas nas tabelas 2 e 3.

A maioria das substâncias identificadas é representada por hidrocarbonetos sesquiterpênicos, embora seja interessante notar que, na população 3 de *C. dichrous*, foram encontrados somente monoterpenos, oxigenados ou não. Monoterpenos oxigenados, como linalol e cineol, também aparecem em quantidades expressivas em *C. myrianthus* e *C. splendidus*.

ESPÉCIES												
Substância	IRL	<i>C.dic2</i>	<i>C.dic3</i>	<i>C.ery1</i>	<i>C.ery2</i>	<i>C.ery3</i>	<i>C.myr1</i>	<i>C.myr2</i>	<i>C.myr3</i>	<i>C.sple1</i>	<i>C.sple2</i>	<i>C.sple3</i>
SESQUITERPENOS												
germacreno D	1480	10,97	-	-	-	-	-	-	-	-	18,56	27,99
elixeno*	1484	-	-	24,38	18,87	-	-	8,33	2,29	11,46	-	5,20
α-zingibereno	1486	-	-	-	-	1,27	-	-	-	-	-	-
γ-cadineno	1497	1,30	-	-	-	-	-	1,45	-	-	-	-
δ-cadineno	1524	2,03	-	1,71	1,73	-	-	2,24	-	-	0,65	1,44
calameneno	1533	-	-	8,81	-	11,77	-	-	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1558	1,41	-	-	-	0,73	-	-	-	-	3,71	-
TOTAL		32,24	0,00	80,70	30,57	40,08	0,00	26,73	2,29	26,22	39,62	59,67
SESQUI. OXIGENADOS												
espatulenol	1557	-	-	9,59	27,41	-	-	7,96	-	-	-	-
Ledol	1590	-	-	-	6,65	-	-	3,37	-	4,96	-	-
1,10-di-epi-cubenol	1599	22,48	-	-	4,04	-	-	-	-	-	-	-
β-eudesmol	1630	-	-	-	3,48	-	-	-	-	-	-	-
τ-cadinol	1631	2,42	-	-	5,69	-	-	4,12	-	-	-	-
α-bisabolol	1676	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,15
TOTAL		24,90	0,00	9,59	47,27	0,00	0	15,45	0,00	4,96	0,00	9,15
6-metil-5-hepten-2-ona*	988	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,76	-
bornil acetato	1276	-	-	-	-	3,64	-	-	-	-	-	-
Não identificadas		38,57	20,89	2,86	17,42	44,65	12,44	26,65	4,86	21,09	24,52	25,87

IRL: Índices de retenção linear referentes aos alcanos C9–C22 obtidos em uma coluna DB-5; *C.dic*: *Croton dichrous*; *C.ery*: *C. erythroxyloides*; *C.myr*: *C. myrianthus*; *C.sple*: *C. splendidus*. Os números que seguem o nome das espécies correspondem às diferentes coletas.

*referência: YU *et al.*, 2007. Todos os demais valores de IRL foram comparados com os valores encontrados em ADAMS, 2009

Em negrito, as substâncias voláteis encontradas em concentrações relativas maiores do que 7% no óleo de cada amostra.

Tabela 3: Porcentagem relativa das substâncias encontradas nos óleos voláteis dos caules das quatro espécies estudadas. Não foi encontrada nenhuma substância no óleo das populações 1 e 3 de *C. dichrous*.

Substância	IRL	ESPÉCIES									
		<i>C.dic2</i>	<i>C.ery1</i>	<i>C.ery2</i>	<i>C.ery3</i>	<i>C.myr1</i>	<i>C.myr2</i>	<i>C.myr3</i>	<i>C.sple1</i>	<i>C.sple2</i>	<i>C.sple3</i>
MONOTERPENOS											
α-pineno	923	-	0,67	-	1,27	37,01	0,92	-	-	-	0,55
camfeno	935	-	-	-	0,80	-	-	-	-	-	0,22
β-pineno	962	-	2,04	0,26	-	47,43	3,74	-	-	3,90	2,89
TOTAL		0,00	2,71	0,26	2,07	84,45	4,66	0,00	0,00	3,90	3,66
MONO. OXIGENADOS											
1,8-cineol	1019	-	0,47	2,61	-	15,55	-	99,95	5,82	-	0,33
borneol	1161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36
TOTAL		0,00	0,47	2,61	0,00	15,55	0,00	99,95	5,82	0,00	0,69
SESQUITERPENOS											
α-cubebeno	1341	-	-	-	17,76	-	-	-	-	-	-
ciclosativeno	1350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22
α-copaeno	1360	-	1,23	0,53	3,22	-	1,12	-	-	1,01	2,34
β-bourboneno	1367	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-	0,35
β-elemeno	1369	-	0,81	1,42	-	-	1,35	-	-	1,72	1,62
α-cedreno	1393	-	-	-	2,79	-	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1409	23,49	3,75	3,97	9,03	-	13,31	-	-	3,45	6,12
β-gurjuneno	1411	-	-	-	-	-	-	-	-	4,94	-
(E)-α-bergamoteno	1413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36
aromadendreno	1429	-	1,28	1,01	-	-	3,89	-	-	-	0,55
γ-elemeno	1429	-	1,47	11,69	5,20	-	47,91	-	-	-	8,36
α-guaieno	1451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,77
α-humuleno	1458	-	0,95	1,01	2,24	-	1,91	-	-	-	1,39
germacreno D	1460	31,38	14,34	4,11	3,22	-	12,16	-	-	-	25,29
allo aromadendreno	1470	-	-	-	-	-	-	-	-	2,37	-
γ-muuroleno	1476	-	-	-	-	-	-	-	-	11,80	-
ledeno	1477	-	14,63	-	-	-	-	-	-	5,96	8,36

Substância	IRL	ESPÉCIES									
		<i>C.dic2</i>	<i>C.ery1</i>	<i>C.ery2</i>	<i>C.ery3</i>	<i>C.myr1</i>	<i>C.myr2</i>	<i>C.myr3</i>	<i>C.sple1</i>	<i>C.sple2</i>	<i>C.sple3</i>
SESQUITERPENOS											
biciclogermacreno	1488	-	15,29	-	-	-	-	-	6,24	-	-
epizonareno	1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24
elixeno*	1508	15,04	1,48	1,80	-	-	-	-	26,14	-	3,22
calameneno	1510	6,34	-	0,94	7,83	-	-	-	-	-	2,77
epoxi-allo-aromadendreno	1637	-	4,37	3,30	-	-	-	-	-	3,17	2,21
TOTAL		76,25	59,99	29,76	51,28	0,00	81,65	0,00	32,38	34,43	64,18
SESQUI. OXIGENADOS											
espatulenol	1557	-	11,46	16,55	-	-	-	-	-	5,47	-
ledol	1570	-	-	6,66	-	-	-	-	-	-	-
1,10-di-epi-cubenol	1599	7,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-eudesmol	1633	-	-	5,48	-	-	-	-	-	3,14	-
α-bisabolol	1676	-	-	-	-	-	-	-	-	31,59	8,78
TOTAL		7,23	11,46	28,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	40,20	8,78
bornil acetato	1276	-	-	-	2,38	-	-	-	-	-	-
Não identificadas		16,51	25,37	38,70	44,27	0	13,69	0,05	61,80	21,47	22,70

IRL: Índices de retenção linear referentes aos alcanos C9–C22 obtidos em uma coluna DB-5; *C.dic*: *Croton dichrous*; *C.ery*: *C. erythroxyloides*; *C.myr*: *C. myrianthus*; *C.sple*: *C. splendidus*. Os números que seguem o nome das espécies correspondem às diferentes coletas.

Todos os valores de IRL foram comparados com os valores encontrados em ADAMS, 2009.

Em negrito, as substâncias voláteis encontradas em concentrações relativas maiores do que 7% no óleo de cada amostra.

Também se destacaram sesquiterpenos oxigenados, como o espatulenol e o α -bisabolol, que são abundantes nos óleos voláteis de *C. erythroxyloides* e *C. splendidus*, respectivamente, sendo que o α -bisabolol ocorre apenas em *C. splendidus* e predominantemente no caule. Várias atividades biológicas já foram descritas para esta classe de substâncias. Por exemplo, espatulenol é reconhecidamente ativo contra várias espécies de microrganismos (Cavar *et al.*, 2008). α -Bisabolol é o principal componente do óleo volátil de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, Asteraceae), sendo encontrado também em *Arnica* spp (Asteraceae). Tanto preparados de *Arnica* quanto o óleo de camomila têm reconhecida atividade anti-inflamatória. O óleo de camomila, assim como α -bisabolol isoladamente, é empregado na composição de cosméticos, pelo fato de apresentar atividade anti-irritante (Andre *et al.*, 1991). Por esses motivos, duas espécies dignas de nota dentre as analisadas são *Croton erythroxyloides* da população 2, com 27% de espatulenol no óleo volátil de suas folhas, e *C. splendidus*, com 31% de α -bisabolol no caule da população 2. Outro sesquiterpenoide alcoólico que chama atenção na presente análise é o T-cadinol, encontrado no óleo volátil das folhas de algumas populações de *C. dichrous*, *C. erythroxyloides* e *C. myrianthus*. Essa substância é farmacologicamente ativa e revelou-se útil na imunoterapia contra o câncer (Takei *et al.*, 2006).

Ledol, um sesquiterpeno oxigenado detectado até o momento apenas em *Croton heterocalyx* e em pequena quantidade - 1,6% da amostra (Moreno *et al.*, 2009), foi identificado em todas as espécies com exceção de *C. dichrous*. Em um trabalho ainda não publicado, realizado por outra aluna do Laboratório de

Fitoquímica, a substância aparece como majoritária nos óleos de folhas e caules de *C. cf montevidensis* (Matos, 2011).

Em duas das coletas de *C. myrianthus* (1 e 3) foram encontrados quase exclusivamente monoterpenos oxigenados, principalmente o 1,8 cineol, sinônimo de eucaliptol (32,88% e 92,85%, respectivamente). Ainda nessa espécie, a população 3 continha exclusivamente 1,8 cineol em seu óleo. Tal composto também é majoritário na população 3 de *C. dichrous* e na 1 de *C. splendidus*, mostrando-se de suma importância para este estudo. O 1,8-cineol apresenta propriedades farmacológicas, tais como ação anestésica, antibronquítica, antisséptica, bactericida, expectorante e, também, atividades herbicida e insetífuga (Cardozo-Filho *et al.*, 1997) sendo, em função disso, muito utilizado na indústria farmacêutica.

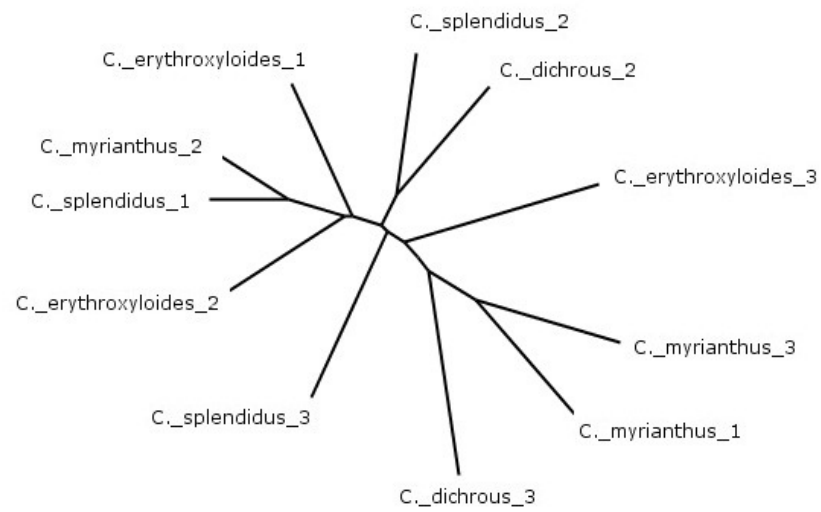
O 1,8-cineol, juntamente com o 1,10-di-epi-cubenol, que foi encontrado em todas as espécies, mas principalmente em *C. erythroxyloides* e *C. splendidus*, são importantes compostos utilizados como fragrâncias e aromas (Araújo *et al.*, 2010). Ambos também possuem propriedade inseticida relatada por Guenther (1972), Panizzi & Parra (1991) e Simões & Spitzer (2004).

Monoterpenos, como α -pineno e β -pineno, são comuns e abundantes em alguns casos, como na folhas da população 3 de *C. dichrous* (α -pineno 15,67%) e caule da população 1 de *C. myrianthus* (α -pineno 37%, β -pineno 47,43%), sendo as substâncias predominantes nessa amostra.

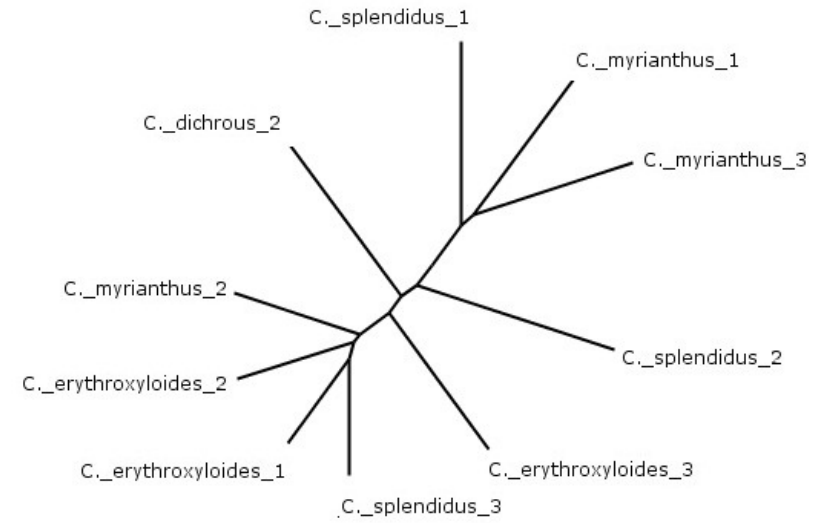
A ausência de fenilpropanoides é compartilhada por todas as espécies analisadas, tanto em caules como em folhas, o que de fato é comum em *Croton* (Salatino *et al.*, 2007).

Destacam-se como substâncias amplamente presentes nas diferentes populações o α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, β -cariofileno e elixeno e, nos caules, também é bem constante a presença de germacreno D.

As árvores geradas pelas matrizes de similaridade estão ilustradas na figura 1.



a)



b)

Figura 1. Relações de similaridade entre as espécies de *Croton* baseadas na distribuição dos componentes dos óleos voláteis obtidas com Índice de Jaccard e agrupadas pelo método UPGMA para folhas **(a)** e caules **(b)**.

Pelos dendrogramas, fica claro que não há um agrupamento preferencial pelas populações de mesma espécie, a não ser para as populações 1 e 3 de *C. myrianthus* que, tanto nas folhas quanto no caule, apresentam alto grau de semelhança. Tal fato pode ser consequência de as coletas terem sido feitas no outono em ambas as localidades e também por apresentarem uma diversidade muito baixa de substâncias, predominando o 1,8-cineol.

Fatores climáticos, intensidade metabólica da planta, diferenciação e atividade secretora de tricomas glandulares afetam a síntese de óleos. Considerando-se que óleos voláteis são produtos do metabolismo secundário da planta, uma atividade metabólica mais intensa pode estar associada a uma maior produção de óleos (Russo *et al.*, 1998).

Um dos fatores que provavelmente teve maior influência na grande variação de óleos identificados em uma mesma espécie nas diferentes populações foi o clima. As coletas não foram padronizadas com relação a época do ano e/ou horário. A tabela 4 ilustra as características climatológicas e topográficas encontradas nos locais de coleta.

Tabela 4: Locais de coleta com seus respectivos valores médios de altitude e de temperatura e precipitação para o mês em que foram coletadas.

Espécie	População	Local	Data	Temperatura (C°)	Precipitação (mm)	Altitude (m)
<i>C. dichrous</i>	1	Campos do Jordão - SP	out/2003	15,6	164	1610
	2	São José do Barreiro - SP	mai/2007	19,8	34	528
	3	São José dos Pinhais - PR	set/2009	14,6	121	898
<i>C. erythroxyloides</i>	1	Campos do Jordão - SP	fev/2008	17,5	306	1610
	2	Alto Caparaó - MG	set/2008	17,7	52	1080
	3	Caldas - MG	nov/2009	22,2	160	1103
<i>C. myrianthus</i>	1	Cambará do Sul - RS	abr/2003	16,3	132	1017
	2	Palmeira - PR	jan/2004	21,4	186	901
	3	Urubici - SC	abr/2004	13,3	105	1056
<i>C. splendidus</i>	1	Campina Grande do Sul - PR	abr/2004	17,2	79	925
	2	Santa Barbara - MG	fev/2009	23,2	188	1380
	3	Ouro Preto - MG	nov/2009	22,2	228	1063

Dados de temperatura e precipitação: Sentelhas *et al.*, 2003. Quando a cidade em questão não constava na lista de monitoradas, foram considerados os dados da cidade mais próxima.

Dados de altitude: software Google Earth 6.0 (beta).

É interessante notar algumas coincidências quando comparamos a tabela das condições climatológicas dos locais de coleta e os agrupamentos feitos com base nos óleos presentes. As populações 1 e 3 de *C. myrianthus*, que aparecem como muito similares nos dendrogramas tanto para os dados de folhas quanto de caules, além de serem da mesma espécie foram coletadas na mesma época do ano sob condições de temperatura e precipitação médias e a altitudes muito semelhantes, ou seja, fortes indícios de relação entre fatores ambientais e a qualidade do óleo produzido. Indo mais além, os óleos caulinares dessas duas populações estão associadas à população 1 de *C. splendidus*, que foi coletada na região Sul, na mesma época do ano, em altas altitudes e a baixas temperaturas e pluviosidade. Também podemos observar o mesmo tipo de relação entre os óleos obtidos nas folhas das populações

2 de *C. myrianthus* e 1 de *C. splendidus*, ambas coledadas no Paraná e em condições climáticas e topográficas semelhantes.

No geral, observamos uma variação qualitativa e quantitativa muito grande dentro de uma mesma espécie que pode ocorrer tanto devido ao clima – temperatura, altitude, umidade, pluviosidade – quanto aos recursos disponíveis em cada região, diferenças no período fértil, diferenças genéticas entre indivíduos, período do dia e até mesmo a interações com animais e insetos – predação, atração, polinização. Tendo em vista as diferenças encontradas, em um estudo futuro seria interessante padronizar algumas variáveis, como, por exemplo, um período específico do ano para realização de coletas, de forma a delimitar como os diversos fatores ambientais e até mesmo genéticos influenciam a produção de óleos voláteis em *Croton*.

4. CONCLUSÕES

Algumas espécies apresentam grande potencial devido às substâncias encontradas em seus óleos. *Croton erythroxylodes* pelo espatulenol, *C. splendidus* rico em α -bisabolol e todas as espécies, exceto *C. splendidus*, por conterem T-cadinol. *Croton myrianthus* se destaca por conter 1,8 cineol em grandes quantidades.

O presente trabalho detectou ledol em quantidades expressivas em três das espécies estudadas, sendo que, anteriormente, essa substância havia sido encontrada apenas em uma espécie de *Croton* e em pequena quantidade.

Estudos de prospecção devem considerar que a qualidade e a quantidade dos óleos de uma mesma espécie variam muito conforme a localidade e, provavelmente, uma mesma população sofra alterações significativas ao longo de um ano e até em períodos de um mesmo dia, além de diferenças genéticas entre indivíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography-mass spectrometry (4a. ed.). Allured Business Media, Carol Stream, 2009.
- ADZET, T.; PONZ, R.; WOLF, E.; SCHULTE, E. Genetic Variability of the Essential Oil Content of *Melissa officinalis*. *Planta Med.* 58: 1992.
- AGNANIET, H.; AKAGAH, A.; MOUNZEO, H.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M. Aromatic plants of tropical central Africa. XLI. Volatile constituents of *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch growing in Gabon. *Journal Of Essential Oil Research* 17: 201-203, 2005.
- ANDRE, D.; VERITE, P.; DUCLOS, R.; ORECCHIONI, A.; FAILLY, F. Determination of α -bisabolol and D-panthenol in cosmetic products by gas chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*, 13: 137–142, 1991.
- ARAÚJO, F.O.L.; RIETZLER, A.C.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; CARAZZA, F.; VIEIRA-FILHO, S.A. Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de *Eucalyptus urograndis* (Mirtaceae). *Quím. Nova* 33(7): 1510-1513, 2010.
- ATALLAH, S.S.; SALIBY, I.; BAALBAKI, R.; TALHOUK, S.N. Effects of different irrigation, drying and production scenarios on the productivity, postharvest quality and economic feasibility of *Origanum syriacum*, a species typically over-collected from the wild in Lebanon. *J Sci Food Agric* 91: 337–343, 2011.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *Amer. J. Bot.* 92 (9): 1520-1534, 2005.
- BISWAS, K.K.; FOSTER, A.J.; AUNG, T.; MAHMOUD, S.S. Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. *Acta Physiol. Plant* 31: 13–19, 2009.
- BRASIL, D.S.B.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P.; ALVES, C.N.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, J.K.R.; MAIA, J.G.S. Essential oil composition of *Croton palanostigma* from north Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20(6): 1188-1192, 2009.
- CAI, Y.; EVANS, F.J.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J.D.; ZENK, M.H.; GLEBA, Y.Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 30: 2033-2040, 1991.
- CARDOZO-FILHO, L.; WOLFF, F.; MEIRELES, M.A.A. High Pressure Phase Equilibrium: Prediction of Essential Oil Solubility. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 17(4): 485-488, 1997.
- CAVAR, S.; MAKSIMOVIC, M.; SOLIC, M. E.; JERKOVIC-MUJIC, A.; BESTA, R. *Food Chemistry* 111: 648-653, 2008.
- CHEN, Z.; CAI, Y.; PHILLIPSON, D. Studies on the anti-tumor, anti-bacterial and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Medica* 60: 541-545, 1994.
- CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE C.H.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W. Anise-Like Flavor of *Croton aff. zehntneri* Pax et Hoffm. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 26: 26-27, 1978.

- CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE C.H.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; DANTAS, T.N. Fixed and volatile constituents of *Croton aff. nepetifolius*. *Journal of natural products* 43:756-7, 1980.
- CRAVEIRO, A.A.; RODRIGUES, A.S.; ANDRADE C.H.; MATOS, F.J.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Volatile constituents of brazilian Euphorbiaceae genus *Croton*. *Journal of Natural Products* 44: 602-608, 1981.
- COMPAGNONE, R.S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A.I. Composition and Cytotoxic Activity of Essential Oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. *Records of Natural Products* 4(2): 101-108, 2010.
- DIAS, I.J.M., CÂMARA, C.A.G.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile Constituents of the Leaves of *Croton sellowii* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Essential Oil Research* 18: 360-361, 2006.
- FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23: 213–226, 2008.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. *World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)*. Kew, Royal Botanic Gardens. v. 2. 921p, 2000.
- GUENTHER, E.; *The Essential Oils*, KRIEGER PUBLICATION CO.: MALABAR, 1972.
- GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R.K. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 361-80, 2008.
- JONES, K. Review of sangre de drago (*Croton lechleri*)- a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9: 877-896, 2003.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA, A.J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; COLUS, I.M.S.; FARIAS, R.A.F.; LUNA COSTA, A.M.; RAO, V.S.N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 41-55, 2000.
- MATOS, L.M.M. Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado. IB-USP. 2011.
- MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; CARUZO, M.B.R.; TORRES, D.S.C.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) leaves. *Journal of Essential Oil Research* 21: 190-192, 2009.
- NARDI, G.M.; FELIPPI, R.; DALBO, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; ARRUDA, D.C.; MONACHE, F.D.; TIMBOLA, A.K.; PIZZOLATTI, M.G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine* 10: 176-184, 2003.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; WAGNER, H. *Vegan: Community Ecology Package - versão 1.17-6*, 2011.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*, Ed. Manole: São Paulo, 1991.
- PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. *APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language - versão 2.6-2*. *Bioinformatics* 20: 289–290, 2004.

- PERES, M.T. P.; MONACHE, F.D.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. *Phytotherapy Research* 12: 209-211, 1998.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2011. Disponível em <http://www.R-project.org>. Acesso em março de 2011.
- RADULOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTENAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 648-653, 2006.
- RAM, M.; RAM, D.; SINGH, S. Irrigation and nitrogen requirements of Bergamot mint on a sandy loam soil under sub-tropical conditions. *Agricultural Water Management* 27: 45-54, 1995.
- RUSSO, M.; GALLETTI, G.C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (link) letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3741-3746, 1998.
- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(1): 11-33, 2007.
- SENTELHAS, P.C.; MARIN, F.R.; FERREIRA, A.S.; SÁ, E.J.S. Banco de Dados Climáticos do Brasil. Embrapa – monitoramento pro satélite e ESALQ-USP. 2003. Disponível em <http://www.bdclima.cnpm.embrapa.br>. Acesso em maio de 2011.
- SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; MOREL, A.F.; ROPPI, N.R.; RAPOSO JUNIOR, J.L.; STUKER, C.Z.; PERUZZO, G.M.; PERES, M.T.L.P.; HESS, S.C. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon. (Euphorbiaceae) stem bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18: 879-885, 2007.
- SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., Eds.; 2ª. ed., Ed. Universidade/UFRGS: Porto Alegre, Florianópolis, 2004.
- SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 99-102, 2006.
- TAKEI, M.; UMEYAMA, A.; SHIGENOBU, A. EUR. *Journal of Pharmacology* 537: 190-199, 2006.
- TELCI, I.; DEMIRTAS, I.; BAYRAM, E.; ARABACI, O.; KACAR, O. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products* 32: 588–592, 2010.
- THAPPA, R.K.; BAKSHI, S.K.; DHAR, P.L.; AGARWAL, S.G.; KITCHLU, S.; KAUL M.K.; SURI, K.A. Significance of changed climatic factors on essential oil composition of *Echinacea purpurea* under subtropical conditions. *Flavour Fragr. J.* 19: 452–454, 2004.
- THIERS, B. [constantemente atualizado]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em <http://sweetgum.nybg.org/ih/>

VIEGAS, M.C; BASSOLI, D.G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-INNOWAX2007. *Quimica Nova* 30(8): 2031-2034, 2007.

YU, J.Q.; LIAO, Z.X.; CAI, X.Q.; LEI, J.C.; ZOU, G.L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental toxicology and Pharmacology* 23: 162-167, 2007.

ANEXO I

Script utilizado no ambiente R para análise de dados:

```
require(ape)
require(vegan)

read.csv("tudo.csv",header=T)->data
caule<-data[1:12,]
folha<-data[13:24,]

rownames(folha)<-folha[,1]
rownames(caule)<-caule[,1]

folha.cl<-folha[,c(3:37)]
caule.cl<-caule[,c(3:37)]

folha.dist<-vegdist(folha.cl,method="jaccard",binary=T)
caule.dist<-vegdist(caule.cl,method="jaccard",binary=T)

folha.tree<-upgma(folha.dist)
caule.tree<-upgma(caule.dist)

folha.tree$tip.label<-c("C. dichrous 2","C. dichrous 3","C. erythroxyloides 1","C.
erythroxyloides 2", "C. erythroxyloides 3","C. myrianthus 1","C. myrianthus 2","C. myrianthus
3","C. splendidus 1","C. splendidus 2","C. splendidus 3")

caule.tree$tip.label<-c("C. dichrous 2","C. erythroxyloides 1","C. erythroxyloides 2", "C.
erythroxyloides 3","C. myrianthus 1","C. myrianthus 2","C. myrianthus 3","C. splendidus 1","C.
splendidus 2","C. splendidus 3")

plot(folha.tree,type="unrooted")
plot(caule.tree,type="unrooted")

write.tree(folha.tree,file="Folha.txt")
write.tree(caule.tree,file="Caule.txt")

layout(matrix(1,ncol=1))
plot(folha.tree,type="unrooted")
plot(caule.tree,type="unrooted",main="Caule")

pdf("folha.pdf")
```

```
plot(folha.tree,type="unrooted")  
dev.off()
```

```
pdf("caule.pdf")  
plot(caule.tree,type="unrooted")  
dev.off()
```

```
write(folha.dist,file="Folha.dist.csv")  
write(caule.dist,file="Caule.dist.csv")
```

Capítulo II

**PROSPECÇÃO DE FLAVONOIDES EM QUATRO
ESPÉCIES DE *CROTON* L.**

PROSPECÇÃO DE FLAVONOIDES EM QUATRO ESPÉCIES DE *CROTON* L

RESUMO

Das folhas e dos caules de *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, cada um coletado em três diferentes localizações do sul e sudeste do país, foi feita a extração e identificação de seus flavonoides. Foram encontrados trinta e cinco diferentes compostos, a maioria flavonóis glicosilados, sendo a presença do flavonol tilirosídeo uma característica marcante nas espécies estudadas.

PALAVRAS-CHAVE

Croton, Euphorbiaceae, flavonoides, tilirosídeo.

ABSTRACT

From leaves and stems of *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* and *C. splendidus*, each one harvested in three different locations of south and southeast of Brazil, the extraction and identification of their flavonoids was made. Thirty five different compounds were found, mostly flavonol glycosides. The flavonol tiliroside was a remarkable feature for the studied species.

KEY WORDS

Croton, Euphorbiaceae, flavonoids, tiliroside.

1. INTRODUÇÃO

Flavonoides são produtos naturais amplamente distribuídos nas plantas. São capazes de modular atividade enzimática e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares. Isso sugere que esses compostos possuam atividades antihepática, antialérgica, anti-inflamatória e até antitumoral significativas (Di Carlo *et al.*, 1999).

A reconhecida atividade antioxidante dos flavonoides desperta crescente interesse, uma vez que podem conferir propriedades terapêuticas aos alimentos de origem vegetal nos quais são abundantes (Marín *et al.*, 2002). O poder antioxidante de um flavonoide está relacionado com sua estrutura. Hidroxilas nas posições *orto* do anel B, assim como na posição 3 do anel C fazem com que flavonóis tenham efeito antioxidante mais potente que flavonas e que a quercetina e a luteolina que possuam maior atividade que seus respectivos correspondentes com uma só hidroxila ligada ao anel B, campferol e apigenina (Rice-Evans *et al.*, 1996; Marín *et al.*, 2002).

A atividade anticancerígena de flavonoides também é objeto de diversos estudos (Hollman *et al.*, 1996), assim como o uso no tratamento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Williams *et al.*, 2004). Aguirre-Hernández e colaboradores (2010) atribuem às agliconas de quercetina e campferol o efeito ansiolítico que justifica o uso de espécies de Malvaceae do México como calmantes. Os autores ainda sugerem que glicosídeos de flavonoides possam servir como características diagnósticas do gênero, assim como de algumas espécies.

O segundo maior gênero de Euphorbiaceae é *Croton* L., com aproximadamente 1300 espécies arbóreas, arbustivas ou herbáceas, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundos. Apenas no estado do Rio de Janeiro,

reconhecem-se 39 espécies, algumas delas usadas em medicina popular com vários objetivos, inclusive para o tratamento de câncer (Pereira *et al.*, 2002). Em praticamente todos os ecossistemas brasileiros, encontram-se representantes de *Croton*. Em muitos locais da Ásia, África e Américas, espécies de *Croton* são relatadas pela população como medicinais. Por exemplo, no Brasil, algumas espécies são usadas em medicina tradicional para tratamento de uma ampla diversidade de males, tais como hipercolesterolemia e obesidade (*C. cajucara* Benth.), inflamações, úlcera e leucemia (*C. celtidifolius* Baill.), inapetência e cólicas (*C. nepetaefolius* Baill.), feridas e inflamação intestinal (*C. palanostigma* Klotzsch.), reumatismo e câncer (*C. urucurana* Baill.), anorexia e distúrbios gastrointestinais (*C. zehntneri* Pax & K.Hoffm.) (Salatino *et al.*, 2007).

Com base nos trabalhos até hoje publicados, *Croton* poderia ser caracterizado pela presença de glicosídeos de flavonóis e suas agliconas, como quercetina e campferol, que são comuns em tecidos vegetais, assim como de agliconas altamente metoxiladas, como artemetina ou penduletina (Palmeira *et al.*, 2006). É interessante também a presença de glicosídeos de flavonoides acilados, ou seja, ligados a ácidos fenólicos, como o tilirosídeo (campferol-*p*-cumaroil-glicosídeo). Contudo, considerar essas características um padrão pode ser prematuro, uma vez que essas substâncias foram encontradas em extratos feitos com diversos solventes, em trabalhos cujo foco não era necessariamente caracterizar as espécies quanto ao conteúdo de flavonoides.

Do extrato hexânico de folhas de *C. ciliato glanduliferus* Ort. foram isolados os flavonóis metoxilados retusina e paquipodol (González-Vazquez *et al.*, 2006). Capasso e colaboradores (2000) isolaram rutina, campferol rutinosídeo, e tilirosídeo das partes

áreas de *C. menthodorus* Benth. O tilirosídeo também foi encontrado em folhas de *C. sellowii* Baill., juntamente com uma série de flavonóis metoxilados, como artemetina, penduletina, crisosplenetina e casticina (Palmeira *et al.*, 2006). Praticamente os mesmos flavonóis metoxilados acrescidos de crisosplenol D foram identificados em *C. brasiliensis* Müll. Arg. (Palmeira *et al.*, 2005). Guerrero e colaboradores (2002) testaram a atividade vasorelaxante dos flavonóis também metoxilados isolados de *C. schiedeanus* Schlecht. Atividade antimalárica e citotoxicidade de quercetina e tamarixetina obtidas das folhas de *C. steenkampianus* Gerstner foram testadas por Adelekan e colaboradores (2008). Uma flavona dimetoxilada foi isolada das folhas de *C. betulaster* Müll. Arg. (Barbosa *et al.*, 2004). De *C. cajucara* isolaram-se dois derivados metoxilados de campferol (Maciel *et al.*, 2000). Glicosídeos de campferol, quercetina e miricetina foram encontrados no látex de *C. gossypifolius* Vahl. (Quintyne-Walcott *et al.*, 2007). Quercitrina foi identificada nas folhas de *C. pullei* var. *glabrior* Lanj. (Barbosa *et al.*, 2007). Das folhas de *C. zambesicus* foram isolados os C-glicosídeos de flavonas vitexina, isovitexina, vicenina, orientina e isoorientina (Wagner *et al.*, 1970). Vitexina foi também isolada de folhas de *C. hovarum* Leandri (Krebs & Ramiarantsoa, 1997) e miricetrina, do látex de *C. draco* Schltdl. (Tsacheva *et al.*, 2004) e *C. panamensis* (Klotzsch) Müll. Arg. (Kostova *et al.*, 1999). Vitexina, isovitexina e tilirosídeo também foram encontrados nas folhas de *C. tonkinensis* Gagnep. (Giang *et al.*, 2004), assim como nas partes áreas de *C. lobatus* L. (Lagnika *et al.*, 2009), *C. gnaphallii* Baill. (Lencina *et al.*, 2001) e *C. caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. (Zou *et al.*, 2010). Dessa última espécie, Zou e colaboradores (2010) isolaram também um novo flavonoide metoxilado, a crotocaudatina.

Uma análise mais cuidadosa e padronizada dos flavonoides de espécies de *Croton* pode fornecer ferramentas para compreensão tanto de potenciais aplicações terapêuticas como de eventuais características diagnósticas de subgrupos dentro deste gênero gigante.

O objetivo deste trabalho foi fazer uma prospecção dos flavonoides presentes nas folhas e caules de quatro espécies de *Croton* utilizando técnicas de extração direcionadas a maximizar a extração desses metabólitos.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram analisadas amostras de três populações de *Croton dichrous* Müll.Arg., *C. erythroxyloides* Baill., *C. myrianthus* Müll.Arg. e *C. splendidus* Mart., todas as espécies pertencentes à seção *Lamprocroton*, coletadas em municípios das regiões Sul e Sudeste do Brasil (Tabela 1). As espécies foram identificadas pelas Dras Inês Cordeiro, Letícia Ribes Lima e Sônia Aragaki. Exsicatas dos materiais estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica - São Paulo (SP), exceto as de *C. myrianthus*, que se encontram no Herbário do Instituto de Biociências – São Paulo (SPF) (Thiers, constantemente atualizado).

Tabela 1: Locais de coleta e números voucher das espécies analisadas.

Espécie	Voucher	População	Data	Local
<i>C. dichrous</i>	Lima 320	1	out/2003	Campos do Jordão - SP
	Aragaki 1101	2	mai/2007	São José do Barreiro - SP
	Cordeiro 3123	3	set/2009	São José dos Pinhais - PR
<i>C. erythroxyloides</i>	Lima 481	1	fev/2008	Campos do Jordão - SP
	Lima 511	2	set/2008	Alto Caparaó - MG
	Cordeiro 3216	3	nov/2009	Caldas - MG
<i>C. myrianthus</i>	Lima 296	1	abr/2003	Cambará do Sul - RS
	Lima 329	2	jan/2004	Palmeira - PR
	Lima 356	3	abr/2004	Urubici - SC
<i>C. splendidus</i>	Lima 357	1	abr/2004	Campina Grande do Sul - PR
	Cordeiro 3041	2	fev/2009	Santa Barbara - MG
	Cordeiro 3149	3	nov/2009	Ouro Preto - MG

2.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE

A extração e identificação dos flavonoides seguiram a metodologia adaptada de Furlan *et al.* (2010) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria de UV/vis (Markham, 1982).

Cerca de 1 g de folhas e cascas secas em estufa foram submetidas à extração em MeOH 80% sob refluxo durante 1 hora por três vezes. Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, particionados com tolueno e o resíduo seco ressuspendido em 5 mL (folhas) e 3mL (caules) de MeOH grau CLAE. Alíquotas de 10 µL das amostras das folhas e 20 µL dos caules foram analisadas por CLAE em cromatógrafo líquido HP série II 1090, empregando-se o seguinte gradiente de solução aquosa de ácido acético 0,1% (A) em acetonitrila (B): 0-5min 12% de B em A; 5-8min 12% - 20% de B em A; 8-28min 20% de B em A; 28-38min 20% - 50% de B em A; 38-

48min 50% - 65% de B em A. O fluxo de solvente foi $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura da coluna constante em 40°C e a detecção através de DAD em $\lambda = 352\text{nm}$.

2.3 IDENTIFICAÇÃO

A identificação dos flavonoides foi feita por comparação do tempo de retenção com biblioteca organizada no Laboratório de Fitoquímica (IB-USP), comparação entre espectros UV gerados, análise de espectros de massas obtidos por CLAE/EM ou CLAE/EM/EM, conseguidos por análises realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP. As análises de CLAE/EM ou CLAE/EM/EM foram feitas usando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas modelo Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, com mesmo gradiente de solventes e coluna utilizados nas análises em CLAE do nosso laboratório, fluxo de $90 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, voltagem de 4000V, nebulizador a 27 psi, gás secante a 320°C e fluxo de $7,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Literatura especializada também foi consultada (Mabry *et al.*, 1970; Cuyckens & Claeys, 2002, 2004).

2.4 ANÁLISE DE DADOS

Para comparar as três populações das quatro espécies estudadas e verificar a semelhança química entre elas, foi calculado o Índice de Dissimilaridade de Jaccard. Essa análise foi realizada no Ambiente R (R Development Core, 2011), e utilizaram-se os pacotes *vegan* (Oksanen *et al.*, 2011) e *ape* (Paradis *et al.*, 2004). Para o cálculo do Índice de Jaccard, foi utilizada a função *vegdist* (pacote *vegan*), por permitir o uso de dados binários (presença e ausência). A matriz de dissimilaridade foi considerada como

matriz de distância e o agrupamento das amostras (por similaridade) por meio da função UPGMA (ape). A relação entre as amostras foi apresentada pela representação topológica em dendrograma. O *script* utilizado está disponível no Anexo I.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 apresenta os flavonoides mais frequentes ou abundantes nas amostras analisadas com dados de espectrofotometria UV/vis e EM e, a tabela 3, as quantidades relativas de cada substância nos diferentes extratos.

Tabela 2: Flavonoides encontrados nas folhas e nos caules das quatro espécies de *Croton* estudadas e suas características. Em negrito, as substâncias encontradas tanto nos caules quanto nas folhas.

	TR (min)	Substância	UV (nm) (BII, BI, ombros)	EM (abundância do fragmento)
1	15,20±0,09	Apigenina di-hexosídeo	271, 334	595 (100), 271
2	16,19	NI	255, 265 om, 295 om, 351	
3	16,42±0,08	Derivado de apigenia (triglicosídeo metilado)	271, 285 om, 335	757 (5), 565 (100), 148 (5)
4	16,48	Flavona 1	265, 293 om, 333	
5	16,57	Apigenina diglicosídeo (hexose, pentose)	269, 341	565 (100)
6	16,72	Derivado de quercetina 1	255, 265 om, 299 om, 353	
7	17,45	Quercetina diglicosídeo (hexose, pentose)	257, 265 om, 294 om, 353	597, 465, 303
8	19,44±0,24	Rutina (quercetina-3-O-ramnoglicosídeo)	257, 265 om, 291 om, 355	611 (100), 148 (5)
9	20,46	NI	255 om, 263, 299 om, 349	
10	20,60±0,20	Vitexina	269, 305om, 335	433(100)
11	20,93±0,05	Derivado de quercetina 2	255, 265 om, 295 om, 353	
12	21,42±0,16	Derivado de quercetina 3	257, 267 om, 355	581 (14), 465 (100), 279 (15), 204 (15), 148 (40), 130 (5)
13	22,03	Derivado de quercetina 4	255, 265 om, 285 om, 353	595 (100), 465 (90), 302 (15), 204 (10), 148 (30)
14	24,63±0,30	Campferol diglicosídeo (hexose, ramnose)	260, 287 om, 340	625 (15), 595 (100), 279 (15), 204 (10), 148 (30), 130 (5)
15	25,27	NI	257 om, 263, 291 om, 349	

16	25,95±0,05	Derivado de isoramnetina (hexose-ramnose)	257, 265 om, 295om, 353	625 (100), 479 (10), 316 (5), 278 (5), 204 (5), 148 (25)
17	28,49	Flavona 2	255, 263 om, 315 om, 347	
18	28,77	Flavona 3	255, 263 om, 309 om, 343	
19	38,71±0,16	Derivado de luteolina	271, 281om, 331	449 (100), 434(30), 302 (15), 286 (30), 204 (10), 148 (30)
20	39,03±0,04	Flavona 4	267, 285 om, 331	
21	39,21	Flavonol 1	269, 283 om, 353	
22	39,67±0,12	Quercetina <i>p</i> -cumaroil glicosídeo	269, 285 om, 313	611 (100)
23	39,80	Flavonol 2	267, 287 om, 313, 359 om	
24	39,89±0,01	Flavonol 3	257 om, 265, 303 om, 313, 357 om	
25	40,69	Flavonol 4	255, 265 om, 307 om, 351	
26	40,90±0,05	Flavonol 5	267, 299 om, 313, 356 om	
27	41,13±0,15	Flavonol 6	267, 300 om, 313, 355 om	
28	41,49±0,19	Tilirosídeo (campferol <i>p</i>-cumaroil glicosídeo)	267, 300 om, 313, 355 om	595 (90), 309(100), 287(10), 147(2)
29	41,33	NI	267, 313, 355 om	
30	41,85±0,05	NI	269, 315, 365om	
31	42,87±0,18	Flavonol <i>p</i>-cumaroil glicosídeo	269, 287 om, 313, 359 om	579 (20), 557 (40), 539 (100), 456 (5), 331 (5), 282 (50), 204 (5), 148 (25), 130 (10)
32	43,33±0,24	Flavonol 7	269, 287 om, 313, 357 om	
33	44,35±0,10	Flavonol 8	268, 284 om, 313, 360 om	
34	44,49±0,02	NI	267, 317, 359 om	
35	47,22	NI	271, 287 om, 313, 363 om	

TR: Tempo de retenção; UV: espectro de absorção ultravioleta; EM: espectro de massas.

	FLAVONAS										FLAVONÓIS													Não Identificados										
	APIGENINA				LUT.	CAMP.		QUERCETINA						ISO.	OUTROS																			
	1	3	5	10	19	4	17	18	20	14	28	6	7	8	11	12	13	22	16	21	23	24	25	26	27	31	32	33	2	9	15	29	30	34
C. splendidus 1	F (%)	-	t	8,2	25,6	-	-	-	-	6,1	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C (%)	-	-	-	-	-	6,8	-	-	-	-	19,0	-	-	-	-	-	-	-	-	9,4	-	-	-	-	5,1	8,7	-	-	-	-	-	-	
C. splendidus 2	F (%)	-	0,1	-	27,2	7,0	-	-	-	-	1,7	6,2	-	-	2,4	-	-	-	-	2,7	-	-	-	0,6	16,7	1,8	-	2,0	-	-	-	-	-	
	C (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,9	-	-	0,5	-	-	5,5	-	-	-	-	-	21,8	-	9,8	-	6,5	-	-	-	-	-	
C. splendidus 3	F (%)	-	0,4	-	25,9	9,6	-	-	-	-	1,2	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,2	2,3	-	2,2	-	-	-	-	-	-	
	C (%)	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	14,1	-	-	-	-	14,7	-	6,9	-	-	-	-	-

LUT.: luteolina; CAMP.: campferol; ISO.: isoramnetina.

Os números que seguem o nome das espécies correspondem às diferentes populações (ver Tabela 1). F: extrato foliar. C: extrato do caule.

Os números das substâncias correspondem àqueles da Tabela 2.

t: substâncias detectadas em quantidades muito baixas; “ - “: substâncias ausentes.

A partir dos dados obtidos de tempo de retenção (TR), espectros UV/vis (UV) e espectros de massas (EM e EM/EM), foi possível identificar alguns flavonoides, como vitexina, rutina e tilirosídeo e, parcialmente, outros, como derivados de quercetina, luteolina e apigenina (Tabelas 2 e 3).

Vitexina já foi descrita como detentora de potente atividade anti-inflamatória e com efeito hipotensor (Prabhakar *et al.*, 1981). A quercetina é um potente antioxidante amplamente presente em plantas comestíveis, principalmente sobre a forma de glicosídeos como a rutina (Manach *et al.*, 1997).

O flavonoide mais abundante e presente em todas as espécies é o tilirosídeo (28 - Campferol *p*-cumaroil glicosídeo, fig. 1), exceto em *C. splendidus* onde a incidência da substância é mais baixa e sequer aparece em duas amostras: nas folhas da população 1 e no caule da população 3. Esse composto possui uma série de atividades biológicas: antioxidante e anti-inflamatória (Sala *et al.*, 2003), citotóxica (Rao *et al.*, 2007), anti-giardíase (Barbosa *et al.*, 2007), ansiolítica (Herrera-Ruiz *et al.*, 2008), antiprotozoário (Calzada & Alanís, 2007), inibitória na via clássica do sistema complemento (Lee *et al.*, 2005) e como relaxante muscular (Costa *et al.*, 2007), atividades que estão associadas aos variados usos medicinais das espécies de *Croton* e podem trazer à tona potenciais ainda não investigados. O tilirosídeo, devido à sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, já é utilizado na indústria cosmética como ativo para peles sensíveis (EMD Chemicals).

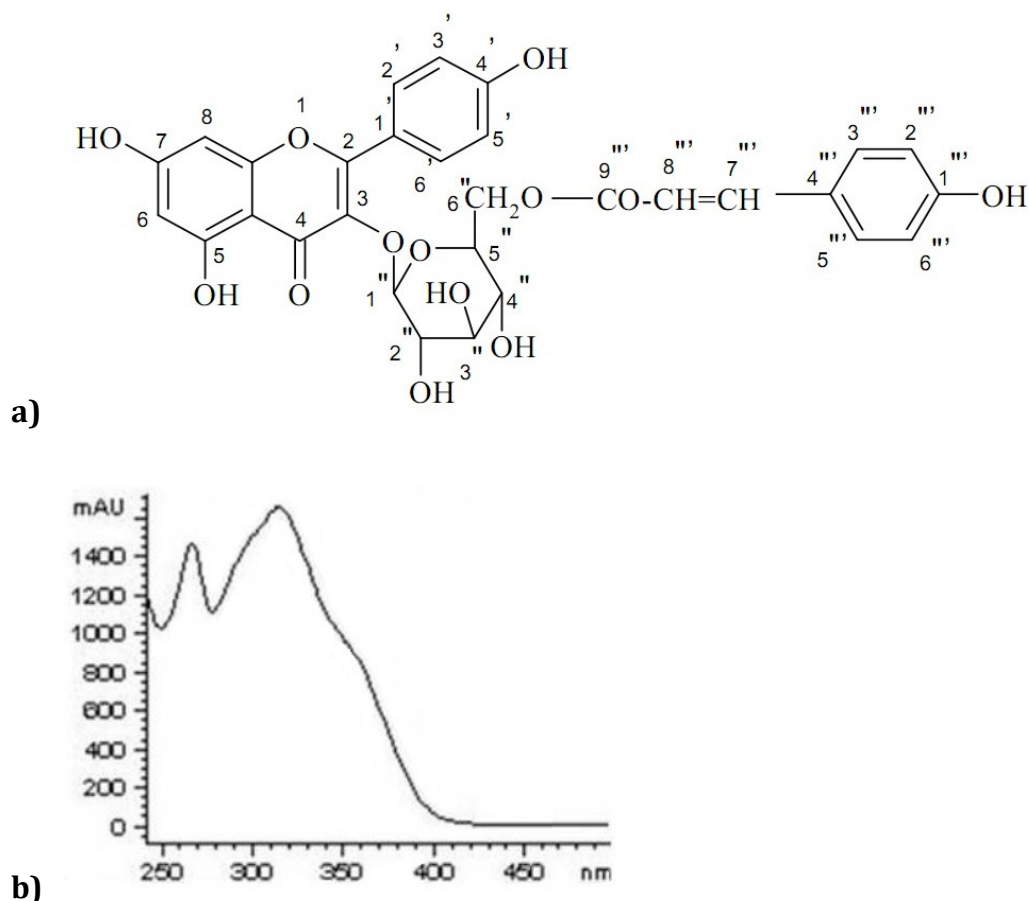


Figura 1. a) Estrutura química do tilirosídeo. b) Espectro UV/Vis do flavonol tilirosídeo, evidenciando sua Banda I com pico de absorção reduzido (313 nm).

Apesar de ser um flavonol, o tilirosídeo apresenta banda I de 313 nm, menor do que os usuais 350 nm ou mais. Glicosilações e *O*-metilações têm efeito hipsocrômico (Rice-Evans *et al.*, 1996), ou seja, de redução do comprimento de onda absorvido, assim como substituições com ácidos fenólicos e açúcares, como é o caso dessa molécula.

Nos cromatogramas obtidos em CLAE, a faixa entre 38 e 43 min apresenta um grande número de picos muito próximos, e aparecem bandas de flavonoides coelundo, na maioria das vezes, em baixa abundância em relação ao tilirosídeo (41,49 min), o pico mais abundante em praticamente todas as amostras. Em função

da dificuldade em determinar, com segurança, os tempos de retenção e espectros de UV dessas substâncias, apenas alguns picos puderam ser diagnosticados, como o nº22, Quercetina *p*-cumaroil glucosídeo (Tabela 2). Nas demais, não foi possível considerá-los. O caule de *C. splendidus*, por exemplo, apresenta duas substâncias consideravelmente abundantes, 23,4% (pico 29) e 14,1% (pico 23), que não puderam ser identificadas. Nesses casos, apenas métodos de separação específicos, como cromatografia em coluna ou papel, realizados antes de análise em CLAE, poderiam auxiliar na obtenção de substâncias mais puras para uma identificação precisa.

Os extratos de caule apresentam uma tendência a possuírem a grande maioria de seus flavonoides concentrados no final da corrida, com tempos de retenção maiores do que 38 min. Em todas as amostras de *C. dichrous* e *C. erythroxyloides*, os extratos de seus caules apresentam quase que exclusivamente flavonoides nessa faixa entre 38 minutos e o final da análise, ou seja, possuem praticamente apenas agliconas.

Os flavonoides são armazenados no vacúolo e, em pequena quantidade, na parede celular. A partir disso, constata-se que, quando presentes em pétalas de flores, ajudam na polinização (Dey & Harborne, 1997); nas folhas, teriam uma função de proteção contra raios UV, resguardando sua delicada estrutura. Já o caule é mais lignificado e dispensa tal proteção, fato que ajuda a explicar tanto sua menor quantidade de flavonoides quanto a predominância de agliconas em sua composição.

Tabela 4: Proporção da concentração relativa de flavonas e flavonóis presentes por extrato nas 4 espécies de *Croton* estudadas (% dos picos identificados)

Amostra	Folha/Caule	% Flavonas	% Flavonóis
<i>C. dichrous 1</i>	F	43,1	56,9
	C	-	100,0
<i>C. dichrous 2</i>	F	35,2	64,8
	C	6,3	93,7
<i>C. dichrous 3</i>	F	12,2	87,8
	C	-	100,0
<i>C. erythroxyloides 1</i>	F	33,1	66,9
	C	-	100,0
<i>C. erythroxyloides 2</i>	F	27,6	72,4
	C	6,5	93,5
<i>C. erythroxyloides 3</i>	F	4,6	95,4
	C	3,0	97,0
<i>C. myrianthus 1</i>	F	40,1	59,9
	C	6,5	93,5
<i>C. myrianthus 2</i>	F	24,1	75,9
	C	3,6	96,4
<i>C. myrianthus 3</i>	F	20,3	79,7
	C	7,8	92,2
<i>C. splendidus 1</i>	F	72,4	27,6
	C	13,9	86,1
<i>C. splendidus 2</i>	F	50,2	49,8
	C	-	100,0
<i>C. splendidus 3</i>	F	50,8	49,2
	C	1,0	99,0

Nas espécies analisadas, os flavonóis possuem maior abundância relativa (tabela 4), sendo que os flavonoides identificados em caules de duas amostras de *C. dichrous*, uma de *C. erythroxyloides* e uma de *C. splendidus* são 100% flavonóis. Entretanto, as folhas de *C. splendidus* são uma exceção, já que apresentaram presença majoritária de flavonas em todas as amostras coletadas.

Este trabalho apresenta um novo perfil de flavonoides para *Croton*, mostrando a abundância de glicosídeos de flavonóis e de flavonas existentes nas

espécies estudadas. Até hoje havia pouca informação a respeito desses glicosídeos nas espécies do gênero, uma vez que os trabalhos não tinham foco específico em flavonoides, e muitas agliconas metoxiladas foram isoladas de extratos feitos com solventes mais apolares (Salatino *et al.*, 2007).

Não foram identificadas agliconas altamente metoxiladas, muito comuns em *Croton*, fato que pode estar relacionado à extração com solventes mais polares e com a dificuldade de identificação de flavonoides correspondentes a várias bandas nos cromatogramas obtidos, principalmente agliconas. A identificação completa dos compostos requer a obtenção de espectros de massas, eventual isolamento das substâncias e análise através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou uso de reagentes de deslocamento.

Os dendrogramas gerados pela matriz de similaridade, contendo os dados de presença ou ausência de compostos nas folhas e nos caules, estão ilustrados na figura 2.

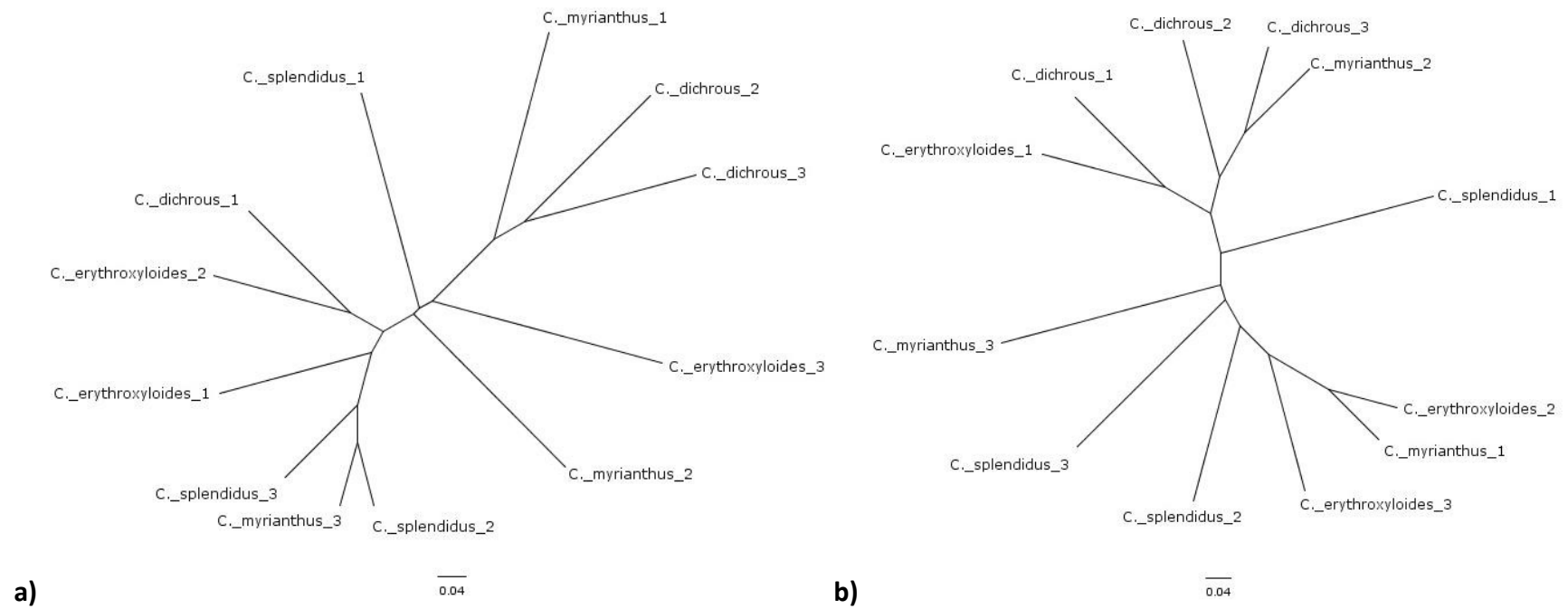


Figura 2. Relações de similaridade entre as espécies de *Croton* baseadas na distribuição dos flavonoides obtidas com Índice de Jaccard e agrupadas pelo método UPGMA para folhas **(a)** e caules **(b)**.

A distribuição de flavonoides forma dois padrões distintos entre folhas e caules e, observando as relações entre as espécies encontradas pela análise de dados, é possível notar uma grande semelhança entre as populações 2 e 3 de *C. dichrous*, tanto nas folhas quanto nos caules, sendo ainda mais evidente nas primeiras. A distribuição de flavonoides nas populações 2 e 3 das folhas de *C. splendidus* também é bastante similar. Pela tabela 3, fica clara a grande semelhança na distribuição dos compostos entre as duas populações das duas espécies. *C. erythroxyloides* e *C. myrianthus* não deixaram claro pela análise nenhum padrão de composição entre populações.

Fora isso, algumas características são comuns a quase todas as espécies coletadas, como a presença do tilirosídeo, rutina, o flavonol nº 27, maior abundância de flavonóis que flavonas, grande diversidade de glicosídeos nas folhas e predominância de agliconas nos caules.

4 CONCLUSÕES

A prospecção realizada com essas espécies de *Croton* se revelou muito informativa, mostrando o perfil esperado para as espécies desse gênero. Apesar de as análises realizadas não permitirem a exata identificação de todos os flavonoides, descobrimos que flavonóis são predominantes e que o tilirosídeo pode ser considerado majoritário na maioria das populações das espécies estudadas. Sua presença parece ser muito característica no gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELEKAN, A.M.; PROZESKY, E.A.; HUSSEIN, A.A.; UREÑA, L.D.; VAN ROOYEN, P.H.; LILES, D.C.; MEYER, J.J.M.; RODRÍGUEZ, B. Bioactive Diterpenes and Other Constituents of *Croton steenkampianus*. *Journal of Natural Products* 6: 1919-1922, 2008.
- BARBOSA, E.; CALZADA, F.; CAMPOS, R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 552-554, 2007.
- BARBOSA, P.R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; ROQUE, N.F. Benzoyl-methylpolyols from *Croton* species (Euphorbiaceae). *Arkivoc* 2004: 95-102, 2004.
- BARBOSA, P.R.; ABREU, A.; BATISTA, E.; GUILHON, G.; MULLER, A.; ARRUDA, M.; SANTOS, L.; ARRUDA, A.; SECCO, R. Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 887-890, 2007.
- CALZADA, F.; ALANÍS, A.D. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research* 21: 78-80, 2007.
- CAPASSO, A.; PIACENTE, S.; DE TOMMASI, N.; RAGUCCI, M.; PIZZA, C. Constituents of *Croton menthodorus* and their effects on electrically induced contractions of the guinea-pig isolated ileum. *Phytotherapy Research* 14: 156-159, 2000.
- COSTA, D.A.; SILVA, D.A.; CAVALCANTI, A.C.; MEDEIROS, M.A.A.M.; LIMA, J.T.; CAVALCANTE, J.M.S.; SILVA, B.A.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickellii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-beta-D-(6"-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. *Química Nova* 30: 901-903, 2007.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 2341-8, 2002.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15, 2004.
- DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA, 554 p, 1997.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65(4): 337-353, 1999.
- EMD CHEMICALS. Rona. Special Skin Care with the Power of Nature: RonaCare Bioflavonoids. Disponível em: <http://85.238.144.18/rona/RonaCare%20Bioflavonoids.pdf>. Acesso em: junho de 2011.
- FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C.; MOTTA, L.B.; DOMINGOS, M.; SALATINO, A. *Guava* flavonoids and the effects of industrial air pollutants. *Atmospheric Pollution Research* 1: 30-35, 2010.
- GIANG, P.M.; JUNG, J.L.; PHAN, T.S. Flavonoid glycosides from the leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae. *Journal of Chemistry* 42: 125 – 128, 2004.

- GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R.; DÍAZ, B.K.; AGUILAR, M.I.; DIEGO, N.; LOTINA-HENNSEN, B. Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1217-1221, 2006.
- GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M.L.; SAN ROMÁN, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *Pharmacy and Pharmacology* 54: 1373-1378, 2002.
- HERRERA-RUIZ, M.; ROMAN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus maze test. *Journal of Ethnopharmacology* 118: 312-7, 2008.
- HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATANC, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 57: 43-46, 1996.
- KOSTOVA, I.; IOSSIFOVA, T.; ROSTAN, J.; KRAUS, W.; VOGLER, B.; NAVAS, H. Chemical and biological studies on *Croton panamensis* (Dragon's blood) *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 9: 34-36, 1999.
- KREBS, H.; RAMIARANTSOA, H. Clerodane diterpenes of *Croton hovarum*. *Phytochemistry* 45: 379-381, 1997.
- LAGNIKA, L.; WENIGER, B.; VONTHRON-SENECHEAU, C.; SANNI, A. Antiprotozoal activities of compounds isolated from *Croton lobatus* L. *African Journal of Infectious Diseases* 3: 1-5, 2009.
- LEE, S.; MIN, B.; KIM, J.; LEE, J.; KIM, T.; KIM, C.; KIM, Y.; LEE, H. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *Phytotherapy Research* 19: 273-6, 2005.
- LENCINA, C.; PIRES, V.S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Tilirosideo em *Croton gnaphalii* Baill. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11: 89-93, 2001.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer Verlag, 1970.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA, A.J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; COLUS, I.M.S.; FARIAS, R.A.F.; LUNA COSTA, A.M.; RAO, V.S.N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 41-55, 2000.
- MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 409: 12-16, 1997.
- MARÍN, F.R.; FRUTOS, M.J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; MARTINEZ-SÁNCHEZ, F.; DEL RÍO, J.A. Flavonoids as nutraceuticals: structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry* V.26. Elsevier Science BV, 2002.
- MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, 1982.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; WAGNER, H. *Vegan: Community Ecology Package - versão 1.17-6*, 2011.
- PALMEIRA JUNIOR, S.F.; CONSERVA, L.M.; SILVEIRA, E.R. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16: 1420-1424, 2005.

- PALMEIRA JUNIOR, S.F.; ALVES, V.L.; MOURA, F.S.; VIEIRA, L.F.A.; CONSERVA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(3): 397-402, 2006.
- PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language - versão 2.6-2. *Bioinformatics* 20: 289-290, 2004.
- PEREIRA, A.D.; CARBONELL, S.A.; NETO, F.R.D.; AMARAL, A.C.F.; BARNES, R.A. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. *Journal of Chromatography* 947: 255-265, 2002.
- PRABHAKAR, M.C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M.A.; KHAN, S.Y. Pharmacological Investigations on Vitexin. *Planta Medica* 43: 396-403, 1981.
- QUINTYNE-WALCOTT, S.; MAXWELL, A.R.; REYNOLDS, W.F. Crotogossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. *Journal of Natural Products* 70: 1374-1376, 2007.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2011. Disponível em <http://www.R-project.org>. Acesso em março de 2011.
- RAO, Y.K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S.; TZENG, Y. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1770-1776, 2007.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PANANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956, 1996.
- SALA, A.; RECIO, M. C.; SCHINELLA, G. R.; MAÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* 461: 53-61, 2003.
- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(1): 11-33, 2007.
- WAGNER, H.; HORHAMMER, L.; KIRALY, I.C. Flavon-C-Glykoside in *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* 9: 897, 1970.
- ZOU, G.; SU, Z.; ZHANG, H.; WANG, Y.; YANG, J.; ZOU, Z. 2010. Flavonoids from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules* 15: 1097-1102, 2010.

ANEXO I

Script utilizado no ambiente R para análise de dados:

```
require(ape)
require(vegan)

read.csv("tudo.csv",header=T)->data
caule<-data[1:12,]
folha<-data[13:24,]

rownames(folha)<-folha[,1]
rownames(caule)<-caule[,1]

folha.cl<-folha[,c(3:37)]
caule.cl<-caule[,c(3:37)]

folha.dist<-vegdist(folha.cl,method="jaccard",binary=T)
caule.dist<-vegdist(caule.cl,method="jaccard",binary=T)

folha.tree<-upgma(folha.dist)
caule.tree<-upgma(caule.dist)

folha.tree$tip.label<-c("C. dichrous 2","C. dichrous 3","C. erythroxyloides 1","C.
erythroxyloides 2", "C. erythroxyloides 3","C. myrianthus 1","C. myrianthus 2","C. myrianthus
3","C. splendidus 1","C. splendidus 2","C. splendidus 3")

caule.tree$tip.label<-c("C. dichrous 2","C. erythroxyloides 1","C. erythroxyloides 2", "C.
erythroxyloides 3","C. myrianthus 1","C. myrianthus 2","C. myrianthus 3","C. splendidus 1","C.
splendidus 2","C. splendidus 3")

plot(folha.tree,type="unrooted")
plot(caule.tree,type="unrooted")

write.tree(folha.tree,file="Folha.txt")
write.tree(caule.tree,file="Caule.txt")

layout(matrix(1,ncol=1))
plot(folha.tree,type="unrooted")
plot(caule.tree,type="unrooted",main="Caule")
```

```
pdf("folha.pdf")  
plot(folha.tree,type="unrooted")  
dev.off()
```

```
pdf("caule.pdf")  
plot(caule.tree,type="unrooted")  
dev.off()
```

```
write(folha.dist,file="Folha.dist.csv")  
write(caule.dist,file="Caule.dist.csv")
```


Capítulo III

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS
METANÓLICOS DE QUATRO ESPÉCIES DE *CROTON* L.
SOBRE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES
HUMANAS**

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS METANÓLICOS DE QUATRO ESPÉCIES DE *CROTON* L. SOBRE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES HUMANAS

RESUMO

Os extratos brutos metanólicos obtidos de folhas e caule de *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus* tiveram sua atividade antiproliferativa testada em dez diferentes linhagens celulares tumorais humanas. Dos extratos testados, o obtido a partir das folhas de *C. erythroxyloides* apresentou resultados interessantes contra as linhagens celulares de câncer de ovário (OVCAR-3) e próstata (PC-3), que podem estar associados à presença de lupeol na amostra.

PALAVRAS-CHAVE

Croton, Euphorbiaceae, atividade antiproliferativa, extrato metanólico, lupeol, linhagens celulares humanas.

ABSTRACT

The crude methanolic extract obtained from the leaves and stem bark of *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* and *C. splendidus* were tested for antiproliferative activity against ten different human cell lines. The leaf extract obtained from *C. erythroxyloides* showed potent activity against PC-3 prostate and OVCAR-3 ovary cell lines. The presence of lupeol may be suggested as an active agent in this sample.

KEY WORDS

Croton, Euphorbiaceae, antiproliferative activity, methanolic extract, lupeol, human cell lines.

1. INTRODUÇÃO

Diversas espécies de Euphorbiaceae são conhecidas em diferentes partes do mundo por suas propriedades tóxicas e/ou medicinais (Salatino *et al.*, 2007). A grande diversidade de efeitos descritos é um reflexo da variedade de metabólitos presentes nessa família. Em *Croton* L., por exemplo, foram descritas as atividades farmacológicas do terpenoide *trans*-desidrocrotonina, obtido de uma espécie nativa, *C. cajucara* Benth., que possui efeitos hipolipidêmico e hipoglicêmico (Maciel *et al.*, 2002), além de antiestrogênico e antitumoral (Grynberg *et al.*, 1999). O alcaloide taspina de *C. lechleri* Müll. Arg. apresenta atividade citotóxica (Itokawa *et al.*, 1991), e o plaunotol (de *C. sublyratus* Kurz), um diterpeno de cadeia aberta, tem atividade potencializadora de drogas contra *Helicobacter pylori* (bactéria causadora da úlcera péptica) (Koga *et al.*, 2002) e antiangiogênica (Kawai *et al.*, 2005).

Croton é um dos maiores gêneros dentre as Angiospermas, possuindo entre 1200 e 1300 espécies de ervas, arbustos, árvores e ocasionalmente lianas. As plantas desse gênero são ecologicamente proeminentes e elementos importantes da vegetação secundária nos trópicos e subtropicais (Webster, 1993; Govaerts *et al.*, 2000). Estudos recentes estimam que existam cerca de 350 espécies de *Croton* somente no Brasil (Berry *et al.*, 2005).

De acordo com a teoria de alocação de recursos da ecologia bioquímica (Coley *et al.*, 1985), plantas de crescimento rápido se focam em produzir substâncias biologicamente ativas. A maior parte das espécies de *Croton* são plantas de crescimento rápido, principalmente arbustos e ervas. Logo, não é uma surpresa que esse gênero seja rico nessas substâncias (Salatino *et al.*, 2007).

As atividades biológicas desses compostos fazem com que as espécies de *Croton* sejam tradicionalmente usadas para o tratamento de certas doenças em diversas partes do globo (América do Sul, Ásia e África Ocidental) (Sampson *et al.*, 2000).

O câncer é uma doença reconhecida por sete características: crescimento indefinido de células atípicas, autossuficiência em fatores de crescimento, evasão de apoptose, angiogênese sustentada, microambiente inflamatório e, eventualmente, invasão de outros tecidos e metástase (Mantovani, 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 84 milhões de pessoas morrerão em decorrência do câncer entre 2005 e 2015, sendo essa a principal causa de morte no mundo (WHO, 2007).

O ensaio antiproliferativo visa realizar uma busca de possíveis fármacos que possam evitar o crescimento de células tumorais, encontrando-se assim, novas armas para o combate ao câncer.

O potencial uso de produtos naturais como agentes contra o câncer foi reconhecido nos anos 1950 pelo Instituto Nacional de Câncer nos EUA (*National Cancer Institute* - NCI) que, desde então, fez grandes contribuições para a descoberta de novos agentes anticancerígenos naturais (Cragg & Newman, 2005).

Algumas drogas importantes no mercado foram descobertas por meio de estudos com plantas, como o taxol, extraído do caule de *Taxus brevifolia* Nutt. (Wani *et al.*, 1971) e a vincristina, um alcaloide de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Johnson *et al.*, 1963).

Diversos extratos brutos de *Croton* já tiveram sua atividade antiproliferativa descrita. Os extratos de látex vermelho de *C. lechleri* (Rossi *et al.*, 2003) e do caule de *C. cajucara* (Maciel *et al.*, 2007) demonstraram atividade antitumoral para a linhagem celular leucêmica K562. Extratos das partes aéreas de plântulas de *C. hieronymi* Griseb. apresentaram forte atividade contra células de carcinoma pulmonar (A-549) e de linfoma murino, além de certa atividade contra células de carcinoma de cólon humano (Catalán *et al.*, 2003). Extratos diclorometânicos de *C. zambesicus* Müll. Arg. mostraram atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma cervical humano (Block *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho é investigar a atividade antiproliferativa de extratos metanólicos de quatro espécies nativas de *Croton*.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas amostras de *Croton dichrous* Müll.Arg. (Cordeiro 3066 - Campos do Jordão – SP), *C. erythroxyloides* Baill. (Cordeiro 3067 - Campos do Jordão – SP), *C. myrianthus* Müll.Arg. (Lima 296 - Cambará do Sul – RS) e *C. splendidus* Mart. (Cordeiro 3041 - Santa Barbara – MG). As espécies foram identificadas pelas Dras. Inês Cordeiro e Letícia Ribes Lima. Exsicatas dos materiais estão depositadas no Herbário do Instituto de Botânica - São Paulo (SP), exceto a de *C. myrianthus* que se encontra no Herbário do Instituto de Biociências – São Paulo (SPF) (Thiers, constantemente atualizado).

2.2 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Folhas e caules (2 g) secos em estufa foram pulverizados, separadamente, com auxílio de nitrogênio líquido e extraídos com metanol sob refluxo por 3 vezes durante 1 hora cada. Os extratos foram secos sob pressão reduzida e 10 mg de cada extrato seco usados nos testes antiproliferativos.

Os extratos foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) para identificação de substâncias presentes.

Metodologia em CLAE:

Os extratos secos obtidos foram ressuspensos em 20 mL de MeOH grau CLAE e analisados em cromatógrafo líquido HP série II 1090, empregando-se o seguinte gradiente de solução aquosa de ácido acético 0,1% (A) em acetonitrila (B): 0-5 min 12% de B em A; 5-8min 12% - 20% de B em A; 8-28min 20% de B em A; 28-38min 20% - 50% de B em A; 38-48min 50% - 65% de B em A. O fluxo de solvente foi 0,5 mL.min⁻¹, a temperatura da coluna constante em 40°C e a detecção através de DAD em $\lambda = 352\text{nm}$.

A identificação das substâncias foi feita por comparação do tempo de retenção com biblioteca organizada no Laboratório de Fitoquímica (IB-USP), comparação entre espectros UV gerados, análise de espectros de massas obtidos por CLAE/EM ou CLAE/EM/EM, conseguidos por análises realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP. As análises de CLAE/EM ou CLAE/EM/EM foram feitas usando cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas modelo Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, com mesmo gradiente de solventes e coluna

utilizados nas análises em CLAE do nosso laboratório, fluxo de $90 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, voltagem de 4000V, nebulizador a 27 psi, gás secante a 320°C e fluxo de $7,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Literatura especializada também foi consultada (MABRY *et al.*, 1970; Cuyckens & Claeys, 2002, 2004).

Metodologia em CG/EM:

Os extratos secos obtidos foram ressuspensos em 20 mL de MeOH grau CLAE e analisados em CG/EM, realizada em um conjunto Agilent GC/MS 6859/5975B com coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) DB-5 HT, usando-se He como gás de arraste em fluxo de $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi de 250°C , e o aquecimento da coluna obedeceu à seguinte programação: $150^\circ\text{C} - 1 \text{ min}$, elevação de $6^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 310°C , permanecendo constante 3 min, modo splitless. A temperatura da fonte foi de 230°C e do quadrupolo, 150°C . Modo de detecção positivo e varredura dos ions, voltagem da eletromultiplicadora de 70 eV.

2.3 TESTE ANTIPROLIFERATIVO

Os testes antiproliferativos foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, com a colaboração dos Prof. Dr. João de Carvalho e Dra. Ana Lúcia Ruiz.

2.3.1. CULTURA CELULAR

As linhagens celulares humanas tumorais 786-0 (rim), HT-29 (cólon), K562 (leucemia), NCI-ADR/RES (tumor ovariano resistente a drogas), NCI-H460 (pulmão), MCF-7 (mama), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioma), UACC-62 (melanoma) e uma linhagem controle VERO (epitélio renal de macaco verde africano)

foram usadas. As linhagens-estoque foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino. Acrescentou-se solução composta por penicilina:streptomicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$: 10UI.mL^{-1}) às culturas experimentais .

2.3.2. ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO

As células cultivadas em microplacas com 96 cavidades ($100 \mu\text{L}$ células/cavidade, densidade de inoculação de $3 - 6 \times 10^4$ células. mL^{-1}) foram expostas a diversas concentrações de amostra ($0,25 - 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{L/cavidade}$) em DMSO/RPMI 1640 à 37°C , 5% de CO_2 por 48 h. A concentração final de DMSO não afetou a atividade celular. Posteriormente, as células foram fixadas em ácido tricloroacético 50%, e a proliferação celular foi determinada por quantificação de proteína celular por espectrofotômetro ($\lambda=540\text{nm}$) usando-se o ensaio de Sulforhodamina B. Doxorubicina (DOX; $0,025 - 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi o controle positivo. Três medidas foram obtidas no início da incubação (tempo zero, T_0) e 48h depois da incubação para as células sem tratamento (C) e com tratamento (T). Calculou-se a proliferação celular segundo a equação: $100 \times [(T-T_0)/C-T_0]$, para $T_0 < T \leq C$, e $100 \times [(T-T_0)/T_0]$, para $T \leq T_0$. A curva de concentração-resposta para cada linhagem celular foi plotada usando-se o software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation) (Monks *et al*, 1991).

2.3.3. ANÁLISE DE DADOS

Usando-se a curva de concentração-resposta, o IC_{50} (concentração que resulta em 50% de inibição de crescimento; Shoemaker, 2006) foi determinado para cada linhagem celular através da análise de regressão não linear, usando-se o ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).

A partir dos valores de IC₅₀ foi calculada a atividade média (média do log de IC₅₀) de cada extrato usado, por meio do software MS Excel (Fouche *et al.*, 2008). A atividade média dos extratos é um parâmetro proposto pelo *National Cancer Institute* - NCI (Fouche *et al.*, 2008) que classifica os extratos como: I: inativo = Média log IC₅₀ > 1.5; D: atividade discreta = Média log IC₅₀ = 1.10-1.5; M: atividade moderada = Média log IC₅₀ = 0-1.1; P: atividade potente = Média log IC₅₀ < 0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados de atividade antiproliferativa obtidos com os extratos metanólicos de *Croton dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, e *C. splendidus* na inibição de crescimento das seguintes linhagens tumorais: U251 – glioma; UACC-62 – melanoma; MCF-7 - mama; NCI-ADR/RES - ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0 - rim; NCI-H460 - pulmão, tipo não pequenas células; PC-3 – próstata; OVCAR-3 - ovário; HT-29 - cólon e K562 - leucemia comparadas com uma linhagem não tumoral VERO - célula epitelial de rim de macaco verde.

É interessante observar que o extrato obtido a partir das folhas de *C. erythroxyloides* foi o único a apresentar atividade moderada contra as linhagens de câncer segundo o critério de análise do *National Cancer Institute* – NCI. Esse parâmetro permite identificar rapidamente quais extratos vegetais, dentre diversas plantas, possuem maior potencial antiproliferativo, sendo muito útil para prospecção de novas drogas mesmo antes de saber qual a composição do extrato, ou seja, permite focar o estudo em plantas com maior atividade.

O NCI é uma média do logaritmo do IC₅₀ para todas as linhagens utilizadas, exceto do controle VERO. O bom resultado do extrato foliar de *C. erythroxyloides* se

deve, particularmente, aos valores de IC_{50} (concentração que reduz o crescimento em 50%) apresentados contra as linhagens PC-3 (próstata) e OVCAR-3 (ovário), 0,80 e 0,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Cabe ressaltar que, os valores individuais de IC_{50} para estas duas culturas analisados segundo os critérios do NCI, ou seja, em função logarítmica, permitiriam a classificação desse extrato como potente ($\log IC_{50} < 0$) e, portanto com efeitos semelhantes aos da doxorubicina para essas duas linhagens.

Tabela 1: Atividade antiproliferativa dos extratos metanólicos de *Croton* em diferentes linhagens celulares representada pela concentração do extrato ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) necessária para inibição do crescimento da cultura em 50% (IC_{50}).

Material testado	Linhagens											NCI ^b
	VERO	U251	UACC-62	MCF-7	ADR/RES	786-0	H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562	
Doxorrubicina ^a	0,66	0,025	0,028	0,14	0,093	0,034	<0,025	0,052	0,12	0,033	0,054	-1,31 P
EXTRATOS DAS FOLHAS												
<i>C. dichrous</i>	26,43	26,86	22,21	16,07	23,38	60,9	28,72	25,06	27,95	79,63	26,5	1,48 D
<i>C. erythroxyloides</i>	>250	5,32	24,42	17,49	11,66	87,82	174,31	0,8	0,81	21,95	1,86	1,00 M
<i>C. myrianthus</i>	93,37	2,34	44,06	1,29	14,21	31,47	29,59	29,13	10,67	56,15	29,13	1,20 D
<i>C. splendidus</i>	88,03	27,6	26,36	25,32	26,05	30,03	6,08	28,79	28,65	40,35	8	1,34 D
EXTRATOS DOS CAULES												
<i>C. dichrous</i>	>250	24,83	34,38	17,49	10,05	93,78	33,78	35,71	9	82,76	2,11	1,34 D
<i>C. erythroxyloides</i>	191,2	8,51	25,44	29,88	23,36	49,14	16,08	9,28	20,44	64,64	7,48	1,30 D
<i>C. myrianthus</i>	>250	3,34	31,24	4,19	27,36	191,7	212,56	13,88	6,66	27,95	4,05	1,27 D
<i>C. splendidus</i>	133,9	10,25	30,03	69,67	28,3	143,9	49,48	55,87	45,38	199,8	11,06	1,64 I

a) Controle positivo

b) Critério do *National Cancer Institute* - NCI (Fouche *et al.*, 2008): I: inativo = Média log IC_{50} > 1.5; D: atividade discreta = Média log IC_{50} = 1.10-1.5; M: atividade moderada = Média log IC_{50} = 0-1.1; P: atividade potente = Média log IC_{50} < 0.

IC_{50} : *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para inibir 50% de crescimento; calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, em software Origin 7.5.

Linhagens: VERO - célula epitelial de rim de macaco verde (controle); U251 – glioma; UACC-62 – melanoma; MCF-7 - mama; ADR/RES - ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0 - rim; H460 - pulmão, tipo não pequenas células; PC-3 – próstata; OVCAR-3 - ovário; HT-29 - cólon; K562 - leucemia.

No anexo I estão ilustrados os gráficos relacionando a diminuição do crescimento celular pela concentração de doxorubicina e dos extratos aplicados nas culturas. Para o extrato foliar de *C. erythroxyloides* a quantidade mínima para inibição de 50% de crescimento é menor para as culturas PC-3 e OVCAR-3, demonstrando que é eficaz a baixas concentrações.

Convém ressaltar que, apesar de a doxorubicina ser uma droga excelente na inibição das culturas cancerígenas, ela também afeta o crescimento de células não tumorais como, por exemplo, a linhagem VERO. Nesse caso, os extratos testados são seguros, apresentando toxicidade para células sadias apenas em concentrações elevadas, acima de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Segundo Manthey & Guthrie (2002), extratos com valores de IC_{50} menores do que 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados com forte atividade antiproliferativa. Seguindo esse raciocínio, neste estudo encontramos 15 resultados interessantes além dos dois de *C. erythroxyloides* contra PC-3 e OVCAR-3. O extrato caulinar de *C. myrianthus* forneceu bons resultados para quatro das linhagens analisadas (U251 – glioma, MCF-7 – mama, OVCAR-3 – ovário, K562 – leucemia). Dos oito extratos, cinco apresentaram atividade antiproliferativa contra K562 (leucemia). Apenas dois extratos não apresentaram ação significativa contra qualquer uma das linhagens analisadas: o extrato foliar de *C. dichrous* e o caulinar de *C. splendidus*. Nenhum extrato obteve atividade considerável contra as linhagens UACC-62 (glioma), ADR/RES (ovário resistente), 786-0 (rim) e HT-29 (pulmão) (Tabela 1).

Com as análises realizadas em CLAE e CG/EM tentou-se delimitar quais seriam as substâncias potencialmente responsáveis pelos efeitos antiproliferativos,

principalmente da amostra foliar de *C. erythroxyloides*. A tabela 2 mostra os principais compostos identificados nas quatro amostras.

Tabela 2: Principais compostos identificados no extrato metanólico das folhas e caules das quatro espécies de *Croton*. As porcentagens correspondem às áreas de cada pico e são relativas a cada extrato.

TR (min)	Substância	<i>C. dichrous</i>		<i>C. erythroxyloides</i>		<i>C. myrianthus</i>		<i>C. splendidus</i>	
		F (%)	C (%)	F (%)	C (%)	F (%)	C (%)	F (%)	C (%)
Análise CG									
22,10	β -sitosterol	9,8	22,6	9,1	7,8	6,9			8,2
22,77	Lupeol			30,6	8				
Análise CLAE									
15,20	Apigenina di-hexosídeo	7,5		12,3		15,3			
20,60	Vitexina							31,9	
41,49	Tiliosídeo	14,01	56,6	37,7	59,0	27,3	72,5	8,6	38,1

TR: Tempo de retenção. F: extrato foliar. C: extrato do caule.

Na análise realizada em CLAE, as principais substâncias encontradas foram todas flavonoides, sendo as mais abundantes apigenina di-hexosídeo e campferol *p*-cumaroil glucosídeo (tiliosídeo). Apigenina di-hexosídeo foi detectado nos extratos foliares de *C. dichrous* e *C. myrianthus*, além de *C. erythroxyloides*. O tiliosídeo foi ainda mais comum, sendo encontrado em todos os extratos. Esses resultados sugerem que esses flavonoides não seriam as potenciais substâncias com atividade antiproliferativa que explicariam a melhor atividade encontrada em *C. erythroxyloides*, pois, não só ocorrem em outras espécies, como aparecem em maiores porcentagens. Além disso, *C. dichrous* já foi apontado como a espécie sem qualquer atividade antiproliferativa promissora (Tabela 1), mesmo apresentando quantidades expressivas desses flavonoides.

Glicosídeos de apigenina extraídos da camomila já foram relatados com atividade antiproliferativa, mas em intensidade muito menor quando comparados com a aglicona dessa flavona (Srivastava & Gupta, 2007). Um trabalho realizado com flavonoides de *Citrus* L. demonstrou que a atividade antiproliferativa de diversas agliconas é perdida com a glicosilação dessas estruturas (Manthey & Guthrie, 2002). Aglicona de apigenina possui atividade contra a linhagem PC-3 (Knowles *et al.*, 2000), também estudada neste trabalho, mas nesse caso a atividade contra essa linhagem não foi associada a apigenina provavelmente por ela estar na forma glicosilada.

O flavonol tilirosídeo apresentou atividade potente contra as linhagens Jurkat (leucemia linfocítica) e HepG2 (hepatoma) no trabalho realizado por Rao e colaboradores (2007). Curiosamente, para a linhagem de leucemia K562, utilizada em nosso estudo, houve uma forte relação entre a presença de tilirosídeo no extrato e atividade antiproliferativa (Tabela 1), com destaque para os extratos caulinares, que apresentam essa substância em alta proporção (Tabela 2). O extrato foliar de *C. erythroxyloides* apresentou o melhor valor de inibição de crescimento para linhagem de leucemia ($IC_{50} = 1,9$), sendo aquele com a maior concentração de tilirosídeo comparada às outras espécies.

Vitexina aparece apenas nas folhas de *C. splendidus*, que possui atividade moderada contra as linhagens H460 e K562. Tal composto foi isolado de uma planta medicinal do cerrado, *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae) que apresentou atividade antiproliferativa contra diversas linhagens celulares, incluindo K562 (Silva *et al.*, 2011).

Na análise em CG/EM encontramos o triterpeno lupeol (Figura 1) nos extratos de *C. erythroxyloides*. De fato, atividades antitumorais para diversas linhagens cancerígenas (Gallo & Sarachine, 2009), incluindo atividade contra câncer de ovário (Chaturvedula *et al.*, 2004) e próstata (Saleem *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2008) já foram demonstradas para essa substância. O extrato do caule também apresenta lupeol, mas em quantidade relativa muito menor que na folha. Apesar disso, sua atividade contra PC-3 é considerada moderada e melhor do que a dos demais extratos das outras espécies.

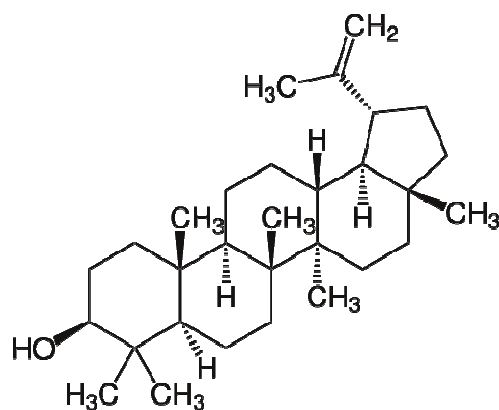


Figura 1. Estrutura química do lupeol.

β -sitosterol é utilizado no tratamento de hiperplasia benigna na próstata (Berges *et al.*, 2000; Wilt *et al.*, 2000), porém, não foi possível fazer uma correlação clara entre a presença dessa substância e a atividade contra PC-3. Jourdain e colaboradores (2006) sugerem que o efeito contra o câncer de próstata é mais forte quando o β -sitosterol está associado com polifenóis presentes, por exemplo, no extrato de cacau.

Atualmente é uma tendência procurar por drogas que possuam ação específica contra cada tipo de câncer, pois os mecanismos são diferentes em cada

caso. Portanto, é importante dar atenção a drogas que possuam ação potente contra um ou poucos tipos de câncer e que não afetem o crescimento de células sadias.

4. CONCLUSÕES

Entre os oito extratos testados das quatro espécies de *Croton*, um deles mostrou resultados muito promissores contra duas diferentes linhagens cancerígenas e baixa atividade contra linhagens celulares não cancerígenas. Portanto, o aprofundamento nos estudos para *Croton erythroxyloides* deve ser considerado. Além disso, obtivemos resultados considerados bons com outros cinco extratos, que também merecem atenção.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Frederick Cancer Research & Development Center of the National Cancer (Frederick, MA, USA) pelas linhagens celulares provisionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGES, R.R.; KASSEN, A.; SENGE, T. Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month follow-up. *BJU Int.* 85(7): 842-846, 2000.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *Amer. J. Bot.* 92 (9): 1520-1534, 2005.
- BLOCK, S.; STEVIGNY, C.; DE PAUW-GILLET M.C.; DE HOFFMAN E.; LLABRÉS G.; ADJAKIDJÉ V.; QUERTIN-LECLERCG, J. ent-Trachyloban-3beta-ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. *Planta Medica* 68: 647-648, 2002.
- CATALÁN, C.A.N.; HELUANI, C.S.; KOTOWICZ, C.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* 64: 625-629, 2003.
- CHATURVEDULA, V.S.P.; SCHILLING, J.K.; MILLER, J.S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V.E.; KINGSTON, D.G.I. New cytotoxic terpenoids from the wood of *Vepris punctata* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products* 67: 895-898, 2004.
- COLEY, P.D.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science*, 230: 895-899, 1985.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72-79., 2005.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 2341-8, 2002.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15, 2004.
- FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 455-461, 2008.
- GALLO, M.B.C; SARACHINE, M.J. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3(1): 46-66, 2009.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G; RADCLIFFE-SMITH, A. World check-list and bibliography of Euphorbiaceae, 4 vols. Royal Botanic Garden, Kew, UK, 2000.
- GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, J.E.; PAMPLONA, S.S.R.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Medica* 68: 687-689, 1999.
- ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKI, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, H.; INAMATSU, M.; TAKEYA, K. A cytotoxic substance from sangre-de-drago. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39: 1041-1042, 1991.

- JOHNSON, I.S.; ARMSTRONG, J.G.; GORMAN, M.; BURNETT, J.P. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Research* 23(8): 1390–1427, 1963.
- JOURDAIN, C.; TENCA, G.; DEGUERCY, A.; TROPLIN, P.; POELMAN, D. *In-vitro* effects of polyphenols from cocoa and [beta]-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *European Journal of Cancer Prevention* 15(4): 353-361, 2006.
- KAWAI, K.; TSUNO, N.H.; KITAYAMA, J.; OKAJI, Y.; YAZAWA, K.; ASAKAGE, M.; YAMASHITA, H.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA, H. Anti-angiogenic properties of plaunotol. *Anti-Cancer Drugs* 16: 401-407, 2005.
- KNOWLES, L.M.; ZIGROSSI, D.A.; TAUBER, R.A.; HIGHTOWER, C.; MILNER, J.A. Flavonoids Suppress Androgen-Independent Human Prostate Tumor Proliferation. *Nutrition and Cancer*, 38(1): 116–122, 2000.
- KOGA, T.; INOUE, H.; ISHII, C.; OKAZAKI, Y.; DOMON, H.; UTSUI, Y. Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 133-136, 2002.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer Verlag, 1970.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. *Química Nova* 25: 429-438, 2002.
- MACIEL, M.A.M.; MARTINS, J.R.; PINTO, A.C.; KAISER, C.R.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against ehrlich carcinoma and human K562 leukemia cells. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(2): 391-396, 2007.
- MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N. Antiproliferative Activities of *Citrus* Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.* 50(21): 5837–5843, 2002.
- MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. *Nature* 457: 36-37, 2009.
- MONKS, A.; SCUDEIRO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 757-766, 1991.
- RAO, Y.K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S.; TZENG, Y. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food and Chemical toxicology* 45: 1770-1776, 2007.
- ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of (Muell. Arg.) latex. *Phytomedicine* 10(2): 139-144, 2003.
- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society* 18(1): 11-33, 2007.

- SALEEM, M.; KWEON, M.; YUN, J.; ADHAMI, V.M.; KHAN, N.; SYED, D.N.; MUKHTAR, H. A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-Mediated Apoptotic Death of Androgen-Sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model. *Cancer Research* 65: 11203-11213, 2005.
- SAMPSON, J. H.; PHILLIPSON, J. D.; BOWERY N.G.; O'NEILL M. J.; HOUSTON J. G.; LEWIS, J. A. Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. *Phytotherapy Research* 14: 24-9, 2000.
- SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* 6: 813-826, 2006.
- SILVA, D.A.; ALVES, V.G.; FRANCO, D.M.M.; RIBEIRO, L.C.; SOUZA, M.C.; KATO, L.; CARVALHO, J.E.; KOHN, L.K.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, C.C. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 1: 1-6, 2011.
- SRIVASTAVA, J.K.; GUPTA, S. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Chamomile Extract in Various Human Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 55(23): 9470-9478, 2007.
- PRASAD, S.; NIGAM, N.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 47: 916-924, 2008.
- THIERS, B. [continuously updated]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em <http://sweetgum.nybg.org/ih/> Acesso em janeiro de 2011.
- WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93: 2325-2327, 1971.
- WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793-823, 1993.
- WILT, T.; ISHANI, A.; MACDONALD, R.; STARK, G.; LAU, J. Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* (2): CD001043, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer, 2007. Disponível em <http://www.who.int/cancer/en/> Acesso em abril de 2011.

ANEXO I

Gráficos da concentração necessária para inibir 50% de crescimento, representada pela linha pontilhada do gráfico, calculada por regressão não linear, tipo sigmoial, em software Origin 7.5.

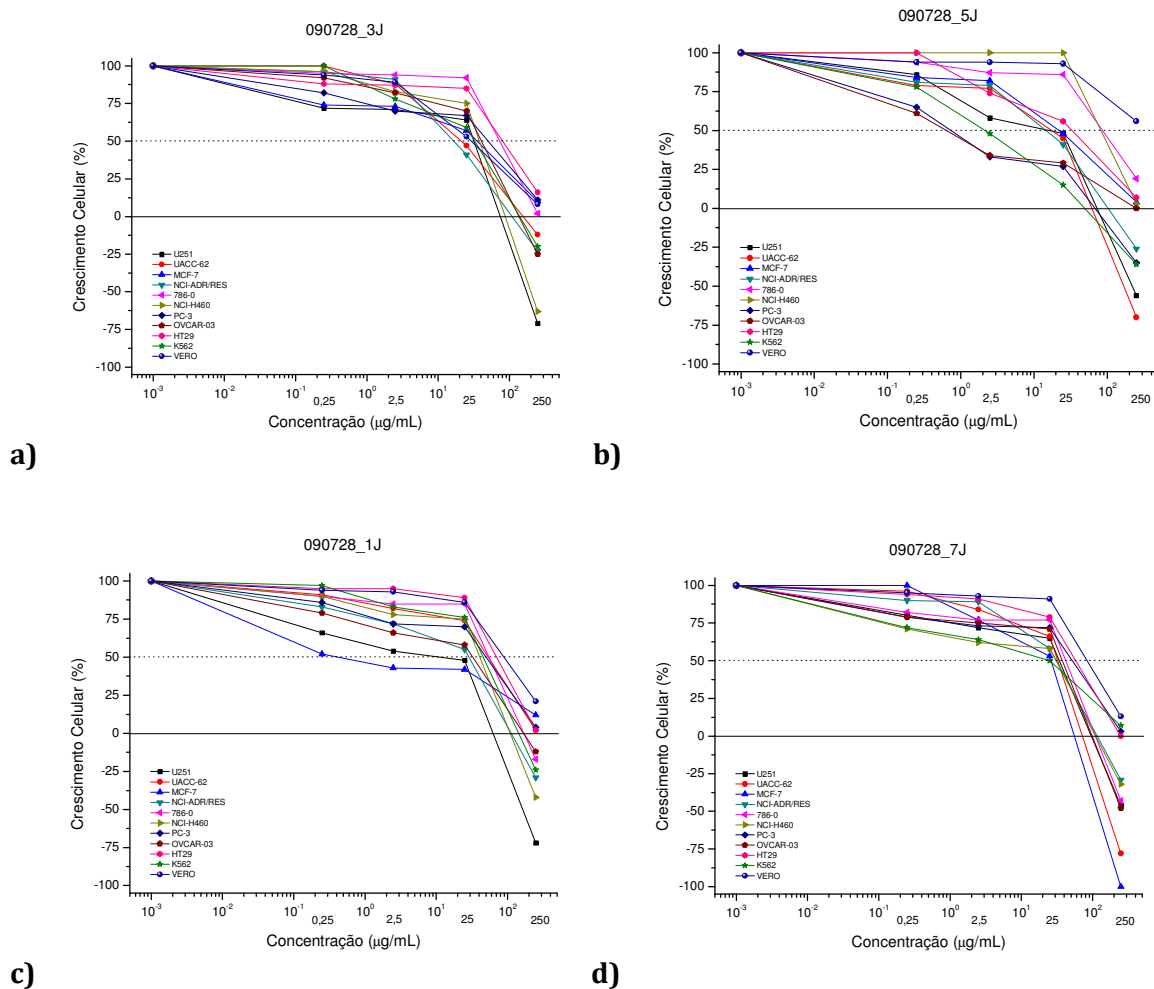


Figura 1. Gráficos obtidos com extrato das folhas de *C. dichrous* (a), *C. erythroxyloides* (b), *C. myrianthus* (c) e *C. splendidus* (d).

Linhas: U251 – glioma; UACC-62 – melanoma; MCF-7 - mama; NCI-ADR/RES - ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0 - rim; NCI-H460 - pulmão, tipo não pequenas células; PC-3 – próstata; OVCAR-3 - ovário; HT-29 - cólon; K562 – leucemia; VERO - célula epitelial de rim de macaco verde (controle).

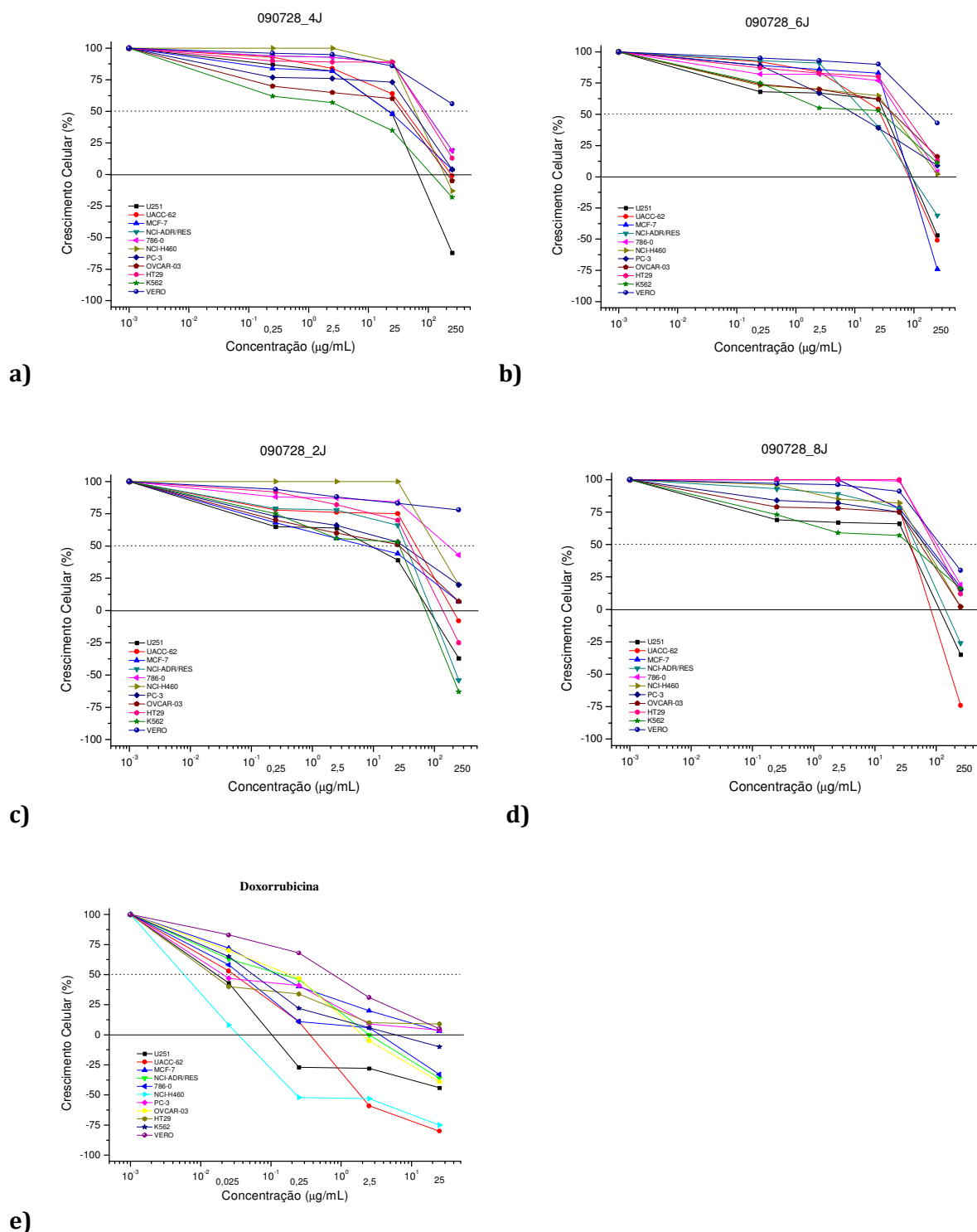


Figura 2. Gráficos obtidos com extrato dos caules de *C. dichrous* (a), *C. erythroxylodes* (b), *C. myrianthus* (c) e *C. splendidus* (d) e com Doxorubicina (controle positivo) (e).

Linhagens: U251 – glioma; UACC-62 – melanoma; MCF-7 - mama; NCI-ADR/RES - ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0 - rim; NCI-H460 - pulmão, tipo não pequenas células; PC-3 – próstata; OVCAR-3 - ovário; HT-29 - cólon; K562 – leucemia; VERO - célula epitelial de rim de macaco verde (controle).

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta inicial deste trabalho foi realizar uma prospecção de metabólitos secundários encontrados em quatro espécies de *Croton* da seção *Lamprocroton* e, adicionalmente, comparar os resultados entre populações distintas. Durante o período deste mestrado, optamos por dar foco a duas classes de compostos: os óleos voláteis e os flavonoides. Diante de bons resultados encontrados durante a prospecção e com a possibilidade de realizarmos uma parceria com a Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, da UNICAMP, decidimos desenvolver os testes antiproliferativos dos extratos metanólicos de uma população de cada uma das espécies estudadas.

Assim, como produtos desta pesquisa, foram desenvolvidos três capítulos no formato de manuscritos que serão submetidos à publicação.

Em cada capítulo, discutiram-se os dados obtidos, mas alguns pontos relevantes merecem ser destacados como considerações finais do trabalho.

Os resultados mais significativos do presente trabalho de mestrado foram compilados na tabela 1, que contém as principais substâncias identificadas para cada espécie, indicação dos efeitos medicinais descritos na literatura para o composto mais representativo e dados de atividade proliferativa. Para *C. erythroxyloides* foi inserida uma linha para a substância encontrada no extrato 100% metanólico feito para o teste antiproliferativo.

Tabela 1: Resumo dos principais compostos encontrados nos óleos voláteis, extrato metanólico 80% (flavonoides) e 100% (teste antiproliferativo) de *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*. Os efeitos farmacológicos descritos na literatura para alguns desses compostos e dados de atividade antiproliferativa também estão listados. As substâncias apresentam-se em ordem de abundância relativa decrescente para cada extrato, e a listagem de efeitos descritos é do composto mais representativo.

Espécie	Principais compostos identificados	Efeitos descritos na literatura	Atividade antiproliferativa
<i>C. dichrous</i>	<u>Óleos voláteis</u> Extrato foliar: 1,8 cineol, 1,10-di-epi-cubebol, sabineno, α -pineno Extrato caulinar: germacreno D, β -cariofileno, elixeno	<u>1,8 cineol</u> - anestésico, antibronquite, antisséptico, bactericida, expectorante, herbicida e insetífugo (Cardozo-Filho <i>et al.</i> , 1997)	Extrato caulinar: atividade moderada contra OVCAR-3 e K562
	<u>Flavonoides</u> Extrato foliar: rutina, apigenina di-hexosídeo, quecetina hexose-pentose, derivado de quercetina 1 e 2 Extrato caulinar: tilirosídeo, quercetina <i>p</i> -cumaroil glucosídeo, flavonol <i>p</i> -cumaroil glicosídeo, derivado de luteolina	<u>rutina</u> - anti-inflamatória (Guardia <i>et al.</i> , 2001), antioxidante (Metodiewa <i>et al.</i> , 1997), anticoagulante (Navarro-Núñez <i>et al.</i> , 2008)	
<i>C. erythroxyloides</i>	<u>Óleos voláteis</u> Extrato foliar: γ -muuroleno, espatulenol, elixeno, α -copaeno, calameneno Extrato caulinar: α -cubebeno, espatulenol, biociclogermacreno, ledeno, germacreno D	<u>γ-muuroleno</u> - antimicrobiano (Couladis <i>et al.</i> , 2002)	Extrato foliar: atividade potente contra PC-3 e OVCAR-3 e atividade moderada contra U251 e K562. Extrato caulinar: atividade moderada contra U251 e K562.
	<u>Flavonoides</u> Extrato foliar: tilirosídeo, apigenina di-hexosídeo, rutina, derivado de luteolina, derivado de isoramnetina, derivado de apigenina (triglicosídeo metilado) Extrato caulinar: tilirosídeo, quercetina <i>p</i> -cumaroil glucosídeo	<u>tilirosídeo</u> - antioxidante e anti-inflamatório (Sala <i>et al.</i> , 2003), citotóxico (Rao <i>et al.</i> , 2007), antiangiogênico (Barbosa <i>et al.</i> , 2007), ansiolítico (Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2008), antiprotozoário (Calzada & Alanís, 2007) e relaxante muscular (Costa <i>et al.</i> , 2007)	
	<u>Triterpenoide do extrato de MeOH 100%</u> lupeol	<u>lupeol</u> - antiproliferativo (Chaturvedula <i>et al.</i> , 2004; Saleem <i>et al.</i> , 2005; Prasad <i>et al.</i> , 2008; Gallo & Sarachine, 2009), anti-inflamatório (Fernández <i>et al.</i> , 2001), antioxidante (Sunitha <i>et al.</i> , 2001)	

Espécie	Principais compostos identificados	Efeitos descritos na literatura	Atividade antiproliferativa
<i>C. myrianthus</i>	<u>Óleos voláteis</u> Extrato foliar: linalol, 1,8 cineol, β-pineno, β-cariofileno Extrato caulinar: γ-elemeno, β-pineno, α-pineno, β-cariofileno, germacreno D	<u>linalol</u> - antimicrobiano (Mazzanti <i>et al.</i> , 1998), anticonvulsivo (Elisabetsky <i>et al.</i> , 1995)	Extrato foliar: atividade moderada contra U251 e MCF-7. Extrato caulinar: atividade moderada contra U251, MCF-7, OVCAR-3 e K562.
	<u>Flavonoides</u> Extrato foliar: campferol hexose-ramnose, vitexina, apigenina di-hexosídeo, tilirosídeo, rutina, derivado de luteolina Extrato caulinar: tilirosídeo, flavonol <i>p</i> -cumaroil glicosídeo, rutina, derivado de apigenina (triglicosídeo metilado)	<u>campferol</u> - anti-inflamatório (García-Mediavilla <i>et al.</i> , 2006; Hämäläinen <i>et al.</i> , 2007), inibição de reabsorção óssea (Wattel <i>et al.</i> , 2003)	
<i>C. splendidus</i>	<u>Óleos voláteis</u> Extrato foliar: germacreno D, 1,8 cineol, elixeno, β-cariofileno Extrato caulinar: α-bisabolol, elixeno, germacreno D, γ-muuroleno	<u>α-bisabolol</u> - anti-inflamatório, anti-irritante (Andre <i>et al.</i> , 1991)	Extrato foliar: atividade moderada contra H460 e K562.
	<u>Flavonoides</u> Extrato foliar: vitexina, derivado de luteolina, apigenina hexose-pentose Extrato caulinar: tilirosídeo, flavonol <i>p</i> -cumaroil glicosídeo, quercetina <i>p</i> -cumaroil glucosídeo	<u>vitexina</u> - hipotensora, anti-inflamatória e anti-espasmódica (Prabhakar <i>et al.</i> , 1981) e antiproliferativa (Silva <i>et al.</i> , 2011)	

Linhagens celulares: U251 – glioma; MCF-7 – mama; H460 - pulmão, tipo não pequenas células; PC-3 – próstata; OVCAR-3 – ovário; K562 – leucemia.

Os resultados encontrados foram muito satisfatórios e vão ao encontro das expectativas de grande diversidade química descrita em *Croton*. A atividade antiproliferativa encontrada foi surpreendente, pois todas as espécies apresentaram pelo menos um grau moderado de atividade contra algumas das linhagens cancerígenas, além do ótimo resultado percebido em *C. erythroxyloides*. Essa espécie também foi um destaque com maior diversidade de substâncias detectadas e muitas delas com efeitos farmacológicos descritos.

Apesar dos bons resultados encontrados, não há nenhum trabalho na literatura descrevendo a química ou os usos farmacológicos das quatro espécies estudadas. Das espécies nativas, o foco deste tipo de estudo se concentra nas espécies *C. cajucara* Benth., *C. celtidifolius* Baill., *C. lechreli* L., *C. urucurana* Baill. e *C. zehntneri* Pax. et Hoffm (Salatino *et al.*, 2007). Sendo assim, fica evidente todo o potencial latente deste gênero, lacuna que começa a ser preenchida com trabalhos como o que foi realizado no Laboratório de Fitoquímica, de prospecção química de diversas espécies com testes de atividade biológica.

O estudo feito com as três diferentes populações, a fim de realizar uma comparação entre os resultados encontrados dentro de uma mesma espécie, também revelou-se interessante. Enquanto os óleos voláteis apresentaram uma variação qualitativa e quantitativa muito grande dentro de uma mesma espécie, os flavonoides tenderam a demonstrar maior similaridade entre si, principalmente ao se compararem extratos de folha com folha e de caule com caule.

Seria muito interessante se, em estudos futuros focados em substâncias de interesse, a quantificação e o cálculo de rendimento das plantas coletadas em

condições ambientais conhecidas e padronizadas fossem realizados, a fim de viabilizá-las comercialmente. Exemplos de compostos que podem ter seus estudos aprofundados são os da coluna “Efeitos descritos na literatura” na tabela 1.

Por fim, pode-se concluir que este trabalho colaborou para a melhor elucidação da química e atividades biológicas de espécies ainda não estudadas de *Croton*, gênero com enorme potencial de utilização medicinal e de grande ocorrência no país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRE, D.; VERITE, P.; DUCLOS, R.; ORECCHIONI, A.; FAILLY, F. Determination of α -bisabolol and D-panthenol in cosmetic products by gas chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*, 13: 137–142, 1991.
- BARBOSA, E.; CALZADA, F.; CAMPOS, R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 552-554, 2007.
- CALZADA, F.; ALANÍS, A.D. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research* 21: 78-80, 2007.
- CARDOZO-FILHO, L.; WOLFF, F.; MEIRELES, M.A.A. High Pressure Phase Equilibrium: Prediction of Essential Oil Solubility. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 17(4): 485-488, 1997.
- CHATURVEDULA, V.S.P.; SCHILLING, J.K.; MILLER, J.S.; ANDRIANTSIFERANA, R., RASAMISON, V.E.; KINGSTON, D.G.I. New cytotoxic terpenoids from the wood of *Vepris punctata* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products* 67: 895-898, 2004.
- COSTA, D.A.; SILVA, D.A.; CAVALCANTI, A.C.; MEDEIROS, M.A.A.M.; LIMA, J.T.; CAVALCANTE, J.M.S.; SILVA, B.A.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-beta-D-(6"-E-p -coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. *Química Nova* 30: 901-903, 2007.
- COULADIS, M.; CHINO, I.B.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ballota pseudodictamnus* L. Benth. *Phytotherapy Research* 16(8): 723–726, 2002.
- ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D.O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 20(4): 461-465, 1995.
- FERNÁNDEZ, M.A.; HERAS, B.; GARCIA, M.D.; SÁENZ, M.T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53(11): 1533–1539, 2001.
- GALLO, M.B.C; SARACHINE, M.J. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3(1): 46-66, 2009.
- GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P.S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology* 557(2-3): 221-229, 2007.
- GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 56(9): 683–687, 2001.
- HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-

- KB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2007/45673, 2007.
- HERRERA-RUIZ, M.; ROMAN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus maze test. *Journal of Ethnopharmacology* 118: 312-7, 2008.
- MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 13(5): 289-294, 1998.
- METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-Diethylaminoethyl ethers of flavone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid rutin action. *IUBMB LIFE* 41(5): 1067–1075, 1997.
- NAVARRO-NÚÑEZ, L.; LOZANO, M.L.; PALOMO, M.; MARTÍNEZ, C.; VICENTE, V.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DIAZ-RICART, M.; ESCOLAR, G.; RIVERA, J. Apigenin Inhibits Platelet Adhesion and Thrombus Formation and Synergizes with Aspirin in the Suppression of the Arachidonic Acid Pathway. *J. Agric. Food Chem.* 56(9): 2970–2976, 2008.
- PRABHAKAR, M.C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M.A.; KHAN S.Y. Pharmacological Investigations on Vitexin, *Planta Med* 43(12): 396-403, 1981.
- PRASAD, S.; NIGAM, N.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 47: 916-924, 2008.
- RAO, Y.K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S.; TZENG, Y. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1770-1776, 2007.
- SALA, A.; RECIO, M.C.; SCHINELLA, G.R.; MAÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J.L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* 461: 53-61, 2003.
- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society* 18(1): 11-33, 2007.
- SALEEM, M.; KWEON, M.; YUN, J.; ADHAMI, V.M.; KHAN, N.; SYED, D.N.; MUKHTAR, H. A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-Mediated Apoptotic Death of Androgen-Sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model. *Cancer Research* 65: 11203-11213, 2005.
- SILVA, D.A.; ALVES, V.G.; FRANCO, D.M.M.; RIBEIRO, L.C.; SOUZA, M.C.; KATO, L.; CARVALHO, J.E.; KOHN, L.K.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, C.C. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 1: 1-6, 2011.
- SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 72(5): 516-523, 2001.
- WATTEL, A.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R.; LORGET, F.; PROUILLET, C.; PETIT, J.P.; FARDELONNE, P.; BRAZIER, M. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and

kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology* 65(1): 35-42, 2003.

RESUMO

Espécies de *Croton* são fonte abundante de metabólitos secundários, com ampla diversidade de atividades farmacológicas, muitas delas conhecidas e utilizadas popularmente. O presente projeto teve como objetivos ampliar o conhecimento sobre a química do gênero pela da prospecção de flavonoides e componentes de óleos voláteis das espécies *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, além de realizar um estudo antiproliferativo, gerando conhecimento potencial para a ampliação do emprego do gênero para a medicina de compostos naturais.

Como principais compostos identificados destacam-se 1,8 cineol, α -bisabolol, ledol e linanol, nos óleos voláteis; os flavonoides tilirosídeo, rutina e vitexina e o triperpeno lupeol.

Atividades antiproliferativas contra as linhagens U251 glioma, MCF-7 mama, H460 pulmão, K562 leucemia, PC-3 próstata e OVCAR-3 ovário foram observadas, com destaque para o extrato foliar de *C. erythroxyloides*, que teve atividade potente contra as duas últimas linhagens.

O presente trabalho colaborou para a melhor elucidação da química e atividades biológicas de espécies ainda não estudadas de *Croton*, gênero com enorme potencial de utilização medicinal e de grande ocorrência no país.

PALAVRAS-CHAVE

Fitoquímica; óleos voláteis; flavonoides; antiproliferativo; *Croton*.

ABSTRACT

Croton species are a great source of secondary metabolites, with a wide variety of pharmacological activities, many of these known and popularly used. This project aimed to increase knowledge about the chemistry of the genre through the exploration of flavonoids and essential oil components of the species *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* and *C. splendidus*, and by antiproliferative tests, generating potential knowledge for extending the use of gender in medicine of natural compounds.

The main identified compounds were 1,8 cineol, α -bisabolol, ledol and linanool present at the essential oil, the flavonoids tiliroside, rutin and vitexin and the triterpenoid lupeol.

Antiproliferative activity against U251 glioma, MCF-7 mammary, H460 lung, K562 leukemia, PC-3 prostate e OVCAR-3 ovary cell lines were found, and the leaf extract of *C. erythroxyloides* achieved potent activity against the last two cell lines.

This work contributed for the elucidation of chemistry and biological activities of unstudied species of *Croton*, a genre with great potential for medicinal use and large occurrence in Brazil.

KEY WORDS

Phytochemistry; essential oils; flavonoids; antiproliferative; *Croton*.

Capa: Aspecto geral de Croton splendidus. Foto por Caruzo, M.B.R.
