

Daniela Carvalho Ogasawara

Constituintes químicos e atividades antioxidante e antiproliferativa de extratos de *Astraea* Klotzsch e *Croton* L. (Euphorbiaceae)

Chemical constituents and antioxidant and antiproliferative activities of *Astraea* Klotzsch e *Croton* L. (Euphorbiaceae) extracts

São Paulo

2012

Daniela Carvalho Ogasawara

Constituintes químicos e atividades antioxidante e antiproliferativa de extratos de *Astraea* Klotzsch e *Croton* L. (Euphorbiaceae)

Chemical constituents and antioxidant and antiproliferative activities of *Astraea* Klotzsch e *Croton* L. (Euphorbiaceae) extracts

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salatino

São Paulo

2012

Ogasawara, Daniela Carvalho

Constituintes químicos e atividades
antioxidante e antiproliferativa de
extratos de *Astraea* Klotzsch e *Croton*
(Euphorbiaceae)

90 folhas

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

Versão Corrigida

1. *Croton* 2. *Astraea* 3. Atividade
Antioxidante 4. Atividade Antiproliferativa
5. Euphorbiaceae

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Claudia Maria Furlan

Prof(a). Dr(a). Maria Inês Genovese

Prof. Dr. Orientador Antonio Salatino

Minha mãe, Márcia, que muitas
vezes sacrificou seus sonhos para
que os meus fossem realizados.

Agradecimentos

Agradeço ao prof. Salatino, pela orientação todos esses anos, pela compreensão, dedicação e paciência.

Às profas. Maria Luiza, Lucimar Barbosa, Claudia Furlan e Deborah dos Santos pelo auxílio, aulas, broncas e parceria.

À Profa. Giusepinna Negri por todo esforço e colaboração e a profa. Inês Cordeiro pela coleta e identificação do material.

Aos colegas de laboratório: Alice, Adne, Janaína, Bruno, Carmen, Carol, Milene, Bruna e principalmente aos colegas/amigos de projeto: Diego, Joice, Liss e Vitor por todo esforço, frustrações, conquistas e MUITA ajuda compartilhadas.

Às queridas Mourisa e Paula por toda ajuda, companheirismo, risadas e claro pelos milhares de cafés divididos.

À central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelas análises realizadas.

Aos profs. João Ernesto de Carvalho e Ana Lúcia Ruiz do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas pela realização dos testes antiproliferativos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio ao projeto.

Ao Departamento de Botânica e ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

À minha família, Mãe Márcia, irmão Lucas, tias Rosa e Irene, Tios Everaldo, Marcos e Luis, a minha avó Maria, meu avô Luis, minhas primas queridas Aman, Lara, Mi e Má muito obrigada pelo apoio, carinho, compreensão e claro por todo o amor. Se não fosse por vocês eu não estaria aqui hoje.

Aos meus amigos Geraldo, Amanda Suman, Laila, Maíra, Rafa, Henrique, Teia, Lilian, Manuel, Natália por todo apoio, carinho e compreensão e principalmente à queridíssima Ilse pelas revisões, por sempre estar presente e me compreender mesmo quando eu não me compreendo!

À Juliana Gomes pela super ajuda nas traduções, pela amizade, pelas horas de conversas e conselhos.

Agradeço a todos meus alunos pela compreensão das numerosas aulas vagas que tiveram.

Agradeço também aos meus colegas de prefeitura Renata, Pâmela, Natália, Maria Lúcia, Joyce, Dani, Margareth, Rosana, Leila, Janaína, Cris, Kelly, Rafael, Rodolfo, Arnaldo, Ana Paula, Silvana e Luciana pelas trocas de experiência, apoio e compreensão durante nossa dura jornada que é ensinar.

E agradeço principalmente a Deus por colocar todas essas pessoas na minha vida!!!

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	8
1. PLANTAS MEDICINAIS	8
2. A FAMÍLIA EUPHORBIACEAE.....	9
3. OS GÊNEROS <i>CROTON</i> L. E <i>ASTRAEA</i> KLOTZSCH.....	10
4. DIVERSIDADE QUÍMICA	13
4.1 ÓLEOS VOLÁTEIS	15
4.2 FLAVONÓIDES	16
5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	17
5.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	17
5.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	18
II OBJETIVOS.....	20
III JUSTIFICATIVA.....	20
IV METODOLOGIA.....	21
1. MATERIAL BOTÂNICO.....	21
2. ANÁLISES QUÍMICAS	21
2.1 ÓLEOS VOLÁTEIS	21
2.1.1 EXTRAÇÃO	21
2.1.2 ANÁLISE.....	22
2.1.3 IDENTIFICAÇÃO	22
2.2 FLAVONÓIDES	23
2.2.1 EXTRAÇÃO	23
2.2.2 ANÁLISE.....	23
2.2.3 IDENTIFICAÇÃO	23
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	24

2.3.1 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH•).....	24
2.3.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	25
2.3.2.1 ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO	25
2.3.2.2 CÉLULAS	25
2.3.2.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA (SKEHAN ET AL., 1990)	26
2.3.2.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	27
V RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
1. ÓLEOS VOLÁTEIS.....	28
2. FLAVONÓIDES	36
3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	45
3.1 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH•)	45
3.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	49
V CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
VI RESUMO	59
VII ABSTRACT	60
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
IX ANEXO	78

I INTRODUÇÃO

1. Plantas Medicinais

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno. O homem percebeu, de alguma forma, nas plantas a existência de algo que, administrado como chás, garrafadas, tinturas, pós, etc, ou como substância pura isolada em comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas, tem a propriedade de provocar reações benéficas no organismo, capazes de resultar na recuperação da saúde. Este algo atuante é o que se chama de princípio ativo (Matos & Lorenzi, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. Incluem-se nesses dados as populações que as usam *in natura* (por opção ou por ser a única alternativa disponível) e os sistemas de medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas (Yunes e Cechinel, 2001). Desse total, pelo menos 30% deu-se por indicação médica (Martins *et al.*, 1998).

Os medicamentos fitoterápicos são reconhecidos oficialmente pela OMS como recurso terapêutico desde 1978. Este órgão recomenda aos países membros da ONU a utilização de conhecimentos tradicionais sobre plantas medicinais como recurso terapêutico viável (Loguercio *et al.*, 2005).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta. Os recursos genéticos são uma parte bastante importante dessa biodiversidade e são definidos como “o material genético de valor real ou potencial para o ser humano” (Decreto legislativo nº 2 de 08.02.4 *apud* Walter, 2000), abrigando 55 mil espécies catalogadas, sendo que 4 mil espécies vegetais são utilizadas com fins medicinais, resultado da observação e manejo da flora por povos tradicionais (Biancarelli, 2001).

Grande parte das drogas vegetais comercializadas em nosso meio não consta em nenhuma Farmacopéia ou apenas na Farmacopéia Brasileira I. Em decorrência, para muitas dessas drogas, as normas farmacopeicas de identificação e qualidade atêm-se à identificação botânica da matéria-prima, o que, isoladamente, não garante a qualidade dos produtos. Muitos desses medicamentos fitoterápicos são

classificados como medicamentos de venda livre, ou seja, sua utilização ocorre, normalmente, sem análises confiáveis, havendo diversos problemas da qualidade dos fitoterápicos no Brasil (Schenkel, 2002).

Como consequência da revalorização mundial do uso de plantas medicinais, aumentou a pressão ecológica exercida sobre alguns desses recursos naturais. Essa pressão tem sido grande nos últimos anos e a tendência é que esse quadro se agrave, pois o extrativismo comercial das plantas medicinais acena como uma alternativa de renda para as populações que vivem em áreas de proteção ambiental (Montanari, 2005).

Um dos argumentos de que frequentemente se lança mão 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 (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).

2. A família Euphorbiaceae

Entre as Angiospermas de importância econômica e que são usadas medicinalmente pela população destacam-se as plantas da família Euphorbiaceae, produtora de um grande e diversificado número de compostos secundários.

A família Euphorbiaceae pertence à ordem Malpighiales (APG III, 2009). É uma das mais diversificadas e complexas entre as Angiospermas, com aproximadamente 8000 espécies, constituindo a sexta maior família depois das Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Rubiaceae (Lima, 2006).

Compreendem plantas de hábito diversificado, com representantes herbáceos, arbustivos e arbóreos, aquáticos e terrestres, amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais (Joly, 1976; Randau *et al.*, 2004) e temperadas do planeta (Wilson, 1976).

Dentre as espécies que possuem relevante importância econômica podem ser citadas: a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), utilizada na alimentação, a seringueira (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), com látex utilizado na produção de borracha, e a mamona (*Ricinus communis* L.), com óleo fixo muito utilizado como lubrificante, inclusive na indústria de aviação.

3. Os gêneros *Croton* L. e *Astraea* Klotzsch

A flora brasileira possui muitos representantes de Euphorbiaceae. Em muitas partes do mundo, representantes dessa família são muito conhecidos por serem tóxicos ou medicinais. 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 (Figura 1). 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 apreciadas pela população como medicinais. No Brasil, espécies de *Croton* são usadas em medicina tradicional para o tratamento de uma ampla diversidade de males, como hipercolesterolemia e obesidade (*C. cajucara*), inflamações, úlcera e leucemia (*C. celtidifolius*), inapetência e cólicas (*C. nepetaefolius*), feridas e inflamação intestinal (*C. palanostigma*), reumatismo e câncer (*C. urucurana*), anorexia, distúrbios gastrointestinais e como edulcorante (*C. zehntneri*) (Salatino *et al.*, 2007).

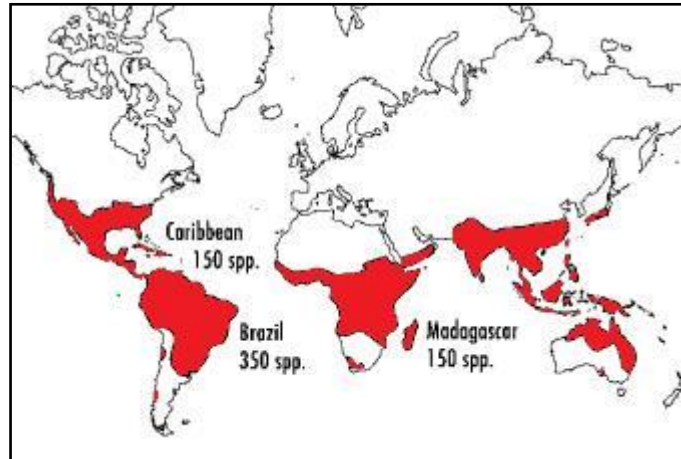


Figura 1: Distribuição pantropical das espécies arbóreas, arbustivas ou herbáceas de *Croton* L. (Berry *et al.*, 2005b).

As inferências filogenéticas moleculares sobre Euphorbiaceae de Berry e colaboradores (2005a, b) e Wurdack e colaboradores (2005) indicaram afinidades entre o gênero *Croton*, e vários gêneros, entre eles *Ophellantha* Standl. (América Central e Caribe), *Sandwithia* Lanj. (Guianas e Amazônia), *Sagotia* Baill. (Amazônia) e *Brasiliocroton* P.E. Berry & Cordeiro (este último recentemente descrito para o leste do Brasil), além de *Astraea* Klotzch (neotropical), gênero restabelecido por Berry e colaboradores (2005a) por segregação de *Croton* sect. *Astraea* (Klotzsch) Baill.

O gênero *Julocroton* Mart., reconhecido em trabalhos clássicos sobre a família, como o Prodomus de De Candolle (Müller, 1866) e a Flora brasiliensis (Müller, 1873), foi sinonimizado por Webster (1992) e tratado como uma seção de *Croton*. Os estudos de Berry e colaboradores (2005a, b), Wurdack e colaboradores (2005) e Van Ee e colaboradores (2011) justificaram filogeneticamente a sinonimização de *Julocroton* em *Croton* e também demonstraram a necessidade de exclusão de *Croton* sect. *Astraea* (Klotzsch) Baill.. Nessa condição, o gênero *Croton* é monofilético (Figura 2, Van Ee *et al.*, 2011).

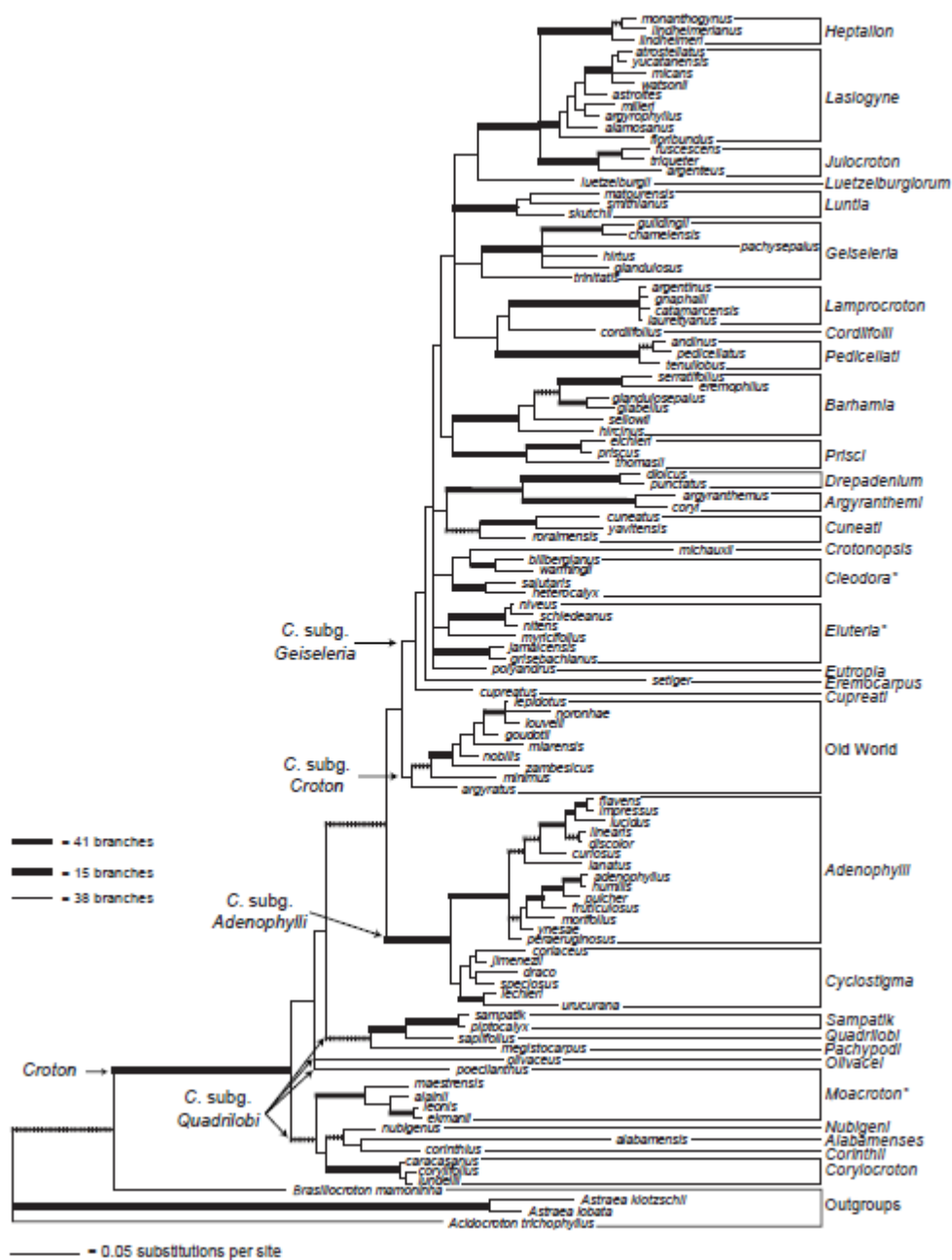


Figura 2: Filogenia de *Croton*, evidenciando a divisão infragenérica em sessões, baseada em sequências de DNA nuclear e do cloroplasto. *Brasilocroton* e *Astraea* figuram como grupos externos (Van Ee *et al.*, 2011).

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 alcalóides e terpenóides. Não é surpreendente, portanto, que *Croton* seja uma fonte abundante de metabólitos secundários, com ampla diversidade de atividades farmacológicas (Salatino *et al.*, 2007).

Na figura 3, pode-se observar o aspecto geral de algumas espécies de *Croton* e uma espécie de *Astraea*.



Figura 3: Flor masculina de *Croton glandulosus* (A), aspecto geral de *Croton campestris* (B), *Croton triqueter* (C) e *Astraea lobata*. Fotos: A por Paleari, L.M., B por Melilo, P. e C e D por Motta, L.B.

4. Diversidade Química

A química de *Croton* é muito diversa. Os constituintes mais frequentes são diterpenóides, com variados esqueletos, como clerodanos (e.g. *trans*-desidrocrotonina), traquilobanos (e.g. traquiloban-7 β ,18-diol), além de labdanos, cauranos, ésteres do forbol (Salatino *et al.*, 2007) e uma nova classe de diterpenos, os sarcopetalanos (e.g. sarcopetal-15-en-3-one-12,13-olídeo), obtidos de *Croton sarcopetalus* (Heluani *et al.*, 2000).

São comuns espécies de *Croton* com óleos voláteis. Entre os muitos componentes de óleos de espécies do gênero, foram relatados monoterpenos, como o cineol e o linalol, sesquiterpenos, como o cariofileno e fenilpropanóides, como o eugenol e o anetol (Salatino *et al.*, 2007).

Várias espécies de *Croton* possuem látex de coloração vermelha. Essas espécies são conhecidas com o nome de sangue-de-adave (Brasil) e sangue-de-drago (países hispano-americanos). Entre as espécies com látex vermelho, estão *C. lechleri*, *C. celtidifolius*, *C. palanostigma* e *C. urucurana*, essas duas últimas nativas do Brasil. Nesse látex, há proantocianidinas (taninos catequínicos) e, em algumas espécies, proantocianidinas e alcalóides. Os alcalóides mais freqüentes de *Croton* são substâncias encontradas também em Ranunculales, como isoboldina e glaucina. Entre os alcalóides obtidos de *C. hemiargireus*, estão a benzilisoquinolina hemiargirina e a morfina salutaridina (Amaral & Barnes, 1998). Até mesmo uma nova classe de alcalóides foi estabelecida (glutarimídicos), com base em substâncias obtidas de *C. muscicapa*, uma espécie do nordeste brasileiro (Araújo *et al.*, 2005).

Os flavonóides obtidos de *Croton* em sua maioria são agliconas de flavonóis altamente metoxilados, como a artemetina, talvez um reflexo dos métodos de extração geralmente usados em química de produtos naturais, que privilegiam solventes menos polares, e não metanol 80%, o solvente de preferência para obtenção de flavonóides, quer os aglicônicos, quer os glicosídicos (Markham, 1982).

Triterpenóides, como o ácido acetil-aleuritólico, e esteróides, como o lofenol, têm sido isolados de espécies de *Croton* (Salatino *et al.*, 2007). Grupos que produzem benzilisoquinolinas e substâncias biossinteticamente relacionadas frequentemente têm representantes que, alternativamente aos alcalóides, produzem lignanas. É o que ocorre com Piperaceae e Lauraceae. Por isso é surpreendente que em *Croton*, até o momento, apenas uma lignana tenha sido relatada. Trata-se de 3',4-O-dimetilcedrusina, obtida de várias espécies com látex vermelho, como *C. erythrochilus*, *C. lechleri* e *C. palanostigma* (Pieters *et al.*, 1993), juntamente com taspina. Os fenilbutanóides representam uma classe de substâncias muito interessante e raramente encontrada. Fenilbutanóides, como 7,9-dimetóxi-rododendrol foram obtidos de *Croton schiedeanus* (Puebla *et al.*, 2005).

São numerosos os artigos que tratam de efeitos de extratos de partes de plantas de *Croton* e de substâncias isoladas. 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, 2002). Entre as substâncias isoladas de espécies de *Croton* a que tem recebido maior atenção em estudos sobre atividade farmacológica é a *trans*-desidrocrotonina, obtida 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). Outras substâncias de *Croton* de grande interesse farmacológico são o alcalóide taspina de *C. lechleri*, que tem atividade citotóxica (Itokawa *et al.*, 1991), e um diterpeno de cadeia aberta, chamado plaunotol (de *C. sublyratus*), que tem atividade potencializadora de drogas contra *Helicobacter pylori* (que causa a úlcera péptica) (Koga *et al.*, 2002) e antiangiogênica (Kawai *et al.*, 2005).

4.1 Óleos Voláteis

Óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules das plantas (Tisserand & Balacs, 1999).

Várias espécies de *Croton* apresentam nos óleos essenciais constituintes ativos como terpenóides e fenilpropanóides, sendo com frequência utilizadas na medicina popular. Algumas espécies possuem propriedades terapêuticas já comprovadas (Santos *et al.*, 2005; Palmeira *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006; Perazzo *et al.*, 2007; Torrico *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2008).

C. zehntneri é usado na medicina popular principalmente como sedativo, como estimulante de apetite e para aliviar distúrbios intestinais (Matos, 2000; Agra *et al.*, 2007; 2008), sendo comprovados o efeito antioxidante (Morais *et al.*, 2006), atividade antinoceptiva (Oliveira *et al.*, 2001) e efeitos depressivos sobre o sistema nervoso central em ratos e camundongos (Batatinha *et al.*, 1995) do óleo essencial de suas folhas.

Croton cajucara, vulgarmente conhecido por “sacaca”, representa um recurso medicinal de grande importância no tratamento de várias doenças, tais como:

diabetes, diarréia, malária, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado, rins, vesículas e no controle de índices elevados de colesterol (Maciel *et al.*, 2002 a, b). O efeito gastroprotetor desta espécie foi correlacionado com os diterpenos do tipo clerodano *trans*-desidrocrotonina (DCTN) e *trans*-crotonina (CTN), bem como com o óleo essencial obtido das cascas de seu caule (Hiruma-Lima *et al.*, 1999 a, b, 2000 a, b). Adicionalmente, estudos já comprovaram que o óleo essencial apresentou efeitos antinociceptivo e antiinflamatório (Bighetti *et al.*, 1999).

4.2 Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem vegetal, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. (Peterson & Dwyer, 1998).

Atualmente, mais de 6000 diferentes flavonóides foram descritos (Marchand, 2002; Yang *et al.*, 2001), sendo suas principais classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonois e chalconas (Cook & Samman, 1996). Essa grande variedade de estruturas resulta da ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica dos flavonóides (Hodek *et al.*, 2002). Devido a esta grande diversidade, os pesquisadores e a indústria de alimentos vêm mostrando, nos últimos dez anos, bastante interesse no estudo de flavonoides e de suas propriedades (Manach *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção de flavonoides. Outros fatores, como poluentes, podem também interferir na síntese de flavonoides (Catherine & Packer, 2003; Degáspari & Waszczynskyj, 2004). O mesmo composto pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (Simões *et al.*, 2000).

Diversos ensaios “in vivo” e “in vitro” vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Segundo Ratty e Das (1998), algumas dessas propriedades farmacológicas já foram

observadas por Szent-Gyorgi em 1936. Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa (esta constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos); atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade antiproliferativa, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Pesquisas recentes demonstraram que alguns flavonóides atuam na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana, HIV (Lin *et al.*1997).

Ainda, a ingestão de flavonóides está associada com a longevidade e redução na incidência de doenças cardiovasculares, o que explica o “paradoxo francês”, uma vez que a dieta mediterrânea é rica em vegetais e vinho tinto (Fórmica & Regelson, 1995).

Tratando-se de um gênero de taxonomia complexa, *Croton* abriga um elevado número de espécies, sendo frequentes os problemas de delimitação específica, nomenclaturais e de polimorfismos, surgindo dificuldades no reconhecimento dos táxons; frequentemente, espécies que são descritas como novas tratam-se na realidade de variantes morfológicas de espécies já reconhecidas (Lucena, 2000).

Dados químicos são amplamente utilizados para resolver problemas botânicos. A quimiotaxonomia é o ramo da ciência que usa as características químicas, em particular os metabólitos secundários (alcalóides, terpenóides, flavonóides, entre outros) de um conjunto de organismos para testar ou refinar a classificação dos táxons em questão (Dominguez, 1973).

Os flavonóides apresentam um esqueleto carbônico com 15 átomos, dos quais nove se originam da via chiquimato e os outros seis a partir da via acetato-malonato. O fato de serem amplamente distribuídos entre as angiospermas, aliado à diversidade estrutural, caracterizada por uma relativa estabilidade molecular, tornam os flavonoides interessantes marcadores taxonômicos (Gershenzon & Mabry, 1983).

5. Atividades Biológicas

5.1 Capacidade Antioxidante

O grande interesse das indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, aliado à receptividade dos consumidores para produtos de origem natural,

transformaram a avaliação sistemática de produtos vegetais em uma ferramenta muito utilizada na busca de novos compostos com atividade antioxidante. Tais compostos são amplamente estudados por serem capazes de proteger os sistemas biológicos, especialmente membranas lipídicas, dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, considerado a principal causa do envelhecimento, das doenças degenerativas e do câncer (Cozzi *et al.*, 1997).

Embora plantas medicinais sejam raramente utilizadas como antioxidantes em medicina tradicional, suas características terapêuticas poderiam ser sustentadas devido, em parte, a sua capacidade sequestradora de radicais livres que podem estar envolvidos em muitas doenças (Spencer *et al.*, 1988). Câncer, enfisema, cirrose, aterosclerose e artrites têm sido correlacionadas com estresse oxidativo. Os organismos em geral são protegidos contra os danos causados pelos radicais livres por enzimas como superóxido dismutase e catalase, ou compostos como ácido ascórbico, tocoferol e glutatona (Morais *et al.*, 2006). Quando os mecanismos da proteção antioxidante se tornam ineficientes por fatores como a idade, a deterioração das funções fisiológicas pode ocorrer, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento. Entretanto, suplementos alimentares antioxidantes podem ser usados para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos (Yang *et al.*, 2000).

Alguns antioxidantes sintéticos como butil-hidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno hidroxitolueno (BHT), bastante utilizados em alimentos, revelaram-se tóxicos em altas doses (Jayaprakasha *et al.*, 2001). Assim a busca por compostos de origem vegetal se torna interessante.

Nardi e colaboradores (2003) afirmaram que frações e subfrações e compostos isolados de *C. celtidifolius* mostraram atividade antioxidante. *C. zenhtneri*, *C. argyrophyloides* e *C. nepetaefolius* têm uso valorizado pela verificação de ação antioxidante (Morais *et al.*, 2006).

5.2 Atividade Antiproliferativa

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no

mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados em países em desenvolvimento (World Health Organization, 2002).

Estima-se que mais de 60% dos fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer sejam derivados de fontes naturais (Newman *et al.*, 2003). Drogas como a vincristina e a vinblastina, isoladas da *Catharantus roseus* (Cragg & Newman, 1999; Carvalhaes *et al.*, 2002) são exemplos de drogas de origem vegetal utilizadas na quimioterapia. Atualmente, a química de produtos naturais constitui uma das principais linhas de pesquisa na busca de novos agentes anticancerígenos (Moura *et al.*, 2001, 2002; Silva *et al.*, 2003).

No ano de 2009, a revista *Pharmacia Brasileira* (Março/Abril) publicou através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, uma lista com 71 espécies vegetais de interesse do SUS (Renusus), cuja finalidade seria orientar estudos e pesquisas que pudessem subsidiar a elaboração de medicamentos fitoterápicos capazes de combater as doenças mais comuns entre os brasileiros. Entre as 71 plantas medicinais listadas na Renisus, na posição 21 encontra-se o gênero *Croton*, cuja maioria de espécies possui um látex de cor avermelhada, conhecido popularmente como sangue-de-dragão (Sandoval *et al.*, 2002).

Espécies de *Croton* são fontes abundantes de substâncias ativas contra o câncer, tais como diterpenóides (clerodano, furoclerodano e diterpenos acíclicos) e alcalóides (por exemplo, taspina) (Salatino *et al.*, 2007).

Diversas espécies de *Croton* já foram citadas na literatura por seu potencial uso contra o câncer, entre elas: *C. lechleri* (Lopes *et al.*, 2004), *C. tiglium*, *C. urucurana* (Randau *et al.*, 2002), *C. palanostigma* (Jones, 2003), *C. hieronymi*, (Catalán *et al.*, 2003), *C. cajucara* (Grynberg *et al.*, 1999) e *C. macrobothrys* (Motta *et al.*, 2011).

Descobertas importantes como essas continuam inspirando muitos cientistas e empresas farmacêuticas na pesquisa de protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de substâncias naturais (Pinto *et al.*, 2002; Koehn &

Carter, 2005; Barbosa-Filho *et al.*, 2005; Amaral *et al.*, 2006; Barbosa-Filho *et al.*, 2006 a, b, c; Barbosa-Filho *et al.*, 2007; Saúde-Guimarães & Faria, 2007).

Cragg e Newman (2005) relatam que o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) reconhece desde 1950 o uso de produtos naturais como agentes contra o câncer, fazendo grandes contribuições para a descoberta de novos agentes cancerígenos naturais.

II OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a composição química dos extratos de folhas e caules de seis espécies nativas, quatro de *Croton* e duas de *Astraea*. As espécies foram selecionadas de acordo com a facilidade de coleta, principalmente quanto à localização, ocorrência e abundância de material. Elas foram analisadas para detecção e identificação de componentes de óleos voláteis e flavonóides. Além dessas análises, o objetivo foi também avaliar as atividades antioxidante e antiproliferativa dos extratos e comparar os resultados entre os gêneros.

III JUSTIFICATIVA

Dada a enorme diversidade biológica e química de espécies de *Croton*, sua grande representatividade na flora brasileira e o intenso uso medicinal de suas espécies em muitos países (inclusive no Brasil), conclui-se que esforços precisam ser concentrados para o levantamento da distribuição de metabólitos secundários potencialmente úteis como fármacos e avaliação de suas atividades farmacológicas. Propostas como a presente são necessárias como ponto de partida para orientar trabalhos voltados ao isolamento de produtos naturais biologicamente ativos.

IV Metodologia

1. Material Botânico

Foram analisadas folhas e caules de espécies brasileiras de *Croton* e *Astraea* conforme tabela 1. As espécies foram identificadas pela Profa. Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo e se encontram depositadas no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (SPF).

Tabela 1: Espécies de *Croton* e *Astraea* e respectivas informações sobre localização infragenérica, testemunhos (voucher) e locais de coleta.

Espécie	Seção	Voucher	Local
<i>A. comosa</i>	-	Cordeiro 3047	Catas Altas - MG, Serra do Caraça
<i>A. lobata</i>	-	LBM 26	Rondonópolis-MT
<i>C. lundianus</i>	<i>Podostachys</i>	Cordeiro 3022	Santana do Riacho – MG
<i>C. glandulosus</i>	<i>Geiseleria</i>	Cordeiro 3023	Santana do Riacho – MG, Serra do Cipó
<i>C. campestris</i>	<i>Velamea</i>	Cordeiro 3024	Santana do Riacho - MG
<i>C. triqueter</i>	<i>Julocroton</i>	Cordeiro 3036	Serro – MG

2. Análises Químicas

2.1 Óleos Voláteis

2.1.1 Extração

As cascas e folhas foram secas em estufa a 30 °C e 1 g de material foi pulverizado com nitrogênio líquido. O material resultante, juntamente com 50 mL de água destilada, foi colocado em balão para destilação e extraído por arraste com vapor em aparelho de Clevenger por 5 horas. O óleo essencial foi em seguida recolhido com 1 mL de éter etílico e mantido em refrigerador até análise química.

2.1.2 Análise

A análise foi realizada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Foi injetado 1 μL de solução etérea dos óleos voláteis em aparelho cromatógrafo Agilent 6850/5975B, dotado de detector de massas e coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) DB-5 HT, usando o hélio como gás de arraste com fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ no modo splitless. A temperatura da coluna foi programada para 1 min a 40 $^{\circ}\text{C}$, elevação de 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 100 $^{\circ}\text{C}$ e de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 200 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura do injetor e do detector foi 250 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV.

2.1.3 Identificação

Os espectros de massas dos constituintes foram comparados com os padrões da biblioteca NIST 05 Ms Library Bundle e dados encontrados da literatura. Os índices de retenção linear (IRL) foram calculados segundo Viegas & Bassoli (2007), com base em padrões de *n*-alcanos. Os utilizados foram Sigma-Aldrich C8-C20. Os alcanos foram dissolvidos em éter etílico e 1 μL foi injetado no sistema CG/EM nas mesmas condições das amostras. Os IRLs dos compostos foram calculados segundo a 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.

A concentração relativa dos componentes dos óleos voláteis foi determinada levando-se em consideração as áreas sob as respectivas bandas nos cromatogramas.

2.2 Flavonóides

A extração e a identificação dos flavonóides foram feitas segundo Furlan e colaboradores (2010), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria de UV/vis (Markham, 1982).

2.2.1 Extração

Cerca de 1 g de folhas e caules secos em estufa foram submetidas a extração em MeOH 80% sob refluxo durante 1 hora. O extrato resultante foi filtrado e armazenado. Esse processo foi realizado 3 vezes. Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório, particionados com tolueno e o resíduo seco ressuspendido em 3 mL (tanto para as folhas como para os caules) em MeOH grau CLAE.

2.2.2 Análise

Alíquotas de 10 μ L das amostras das folhas e 50 μ L dos caules foram analisadas por CLAE em cromatógrafo líquido HP series 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; 5-8 min 12% - 20% de B em A; 8-28 min 20% de B em A; 28-38 min 20% - 50% de B em A; 38- 48 min 50% - 65% de B em A. O fluxo de solvente foi 0,5 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida constante em 40 °C e a detecção através de DAD em $\lambda = 352$ nm.

2.2.3 Identificação

A identificação dos flavonóides foi feita por comparação do tempo de retenção com biblioteca organizada no Laboratório de Fotoquímica (IB-USP), comparação entre espectros UV gerados, análise de espectros de massas obtidos por CLAE/EM e, quando possível, por CLAE/EM/EM, em análises realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP. As análises de CLAE/EM e 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 no nosso laboratório, fluxo de $90 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, voltagem de 4000 V, nebulizador a 27 psi, gás secante a $320 \text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de $7,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Literatura especializada também foi consultada (Mabry *et al.*, 1970; Cuyckens & Claeys, 2004).

2.3 Atividades Biológicas

Obtenção de extrato alcoólico

Cerca de 1 g de folhas e caules, secos em estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foram triturados em gral e pistilo sob nitrogênio líquido. A seguir, foi realizada a extração com 50 mL de metanol sob refluxo por 1 hora. O extrato resultante foi filtrado e armazenado. Esse processo foi realizado 3 vezes. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, diluídos em metanos e armazenados sob forma de solução estoque ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em freezer a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.1 Determinação da capacidade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH•)

A metodologia utilizada foi adaptada de Silva (2008).

A capacidade das substâncias presentes nas amostras em sequestrar o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH, Sigma) foi avaliada. Uma solução metanólica do radical livre DPPH em concentração aproximada de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi preparada, de modo que o controle ($800 \mu\text{L}$ da solução de DPPH + $400 \mu\text{L}$ de metanol) apresentasse absorvância entre 0,7 e 0,8 a 517 nm .

As soluções estoque ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos extratos metanólicos foram diluídas de forma a ficar nas concentrações de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

$400 \mu\text{L}$ dos extratos metanólicos das amostras nas diferentes concentrações foram transferidos para tubos de microcentrífuga. Em seguida, com um minuto de intervalo entre cada amostra, foram adicionados $800 \mu\text{L}$ da solução de DPPH. As amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 20 min. Após esse tempo, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm . Como

branco, foram utilizados 400 µL da amostra em cada uma das concentrações, adicionados a 800 µL de metanol. Como substância de referência, foi utilizada a quercetina, nas mesmas concentrações das amostras. A porcentagem de atividade antioxidante (%Aaox) das amostras foi avaliada de acordo com a equação abaixo (Nieva-Moreno *et al.*, 2000; Duarte-Almeida *et al.*, 2006):

$$\% \text{ Aaox} = \frac{\text{Abs C} - (\text{Abs Am} - \text{Abs B})}{\text{Abs C}} \times 100$$

Na qual, Abs C = absorbância do controle; Abs Am = absorbância da amostra; Abs B = absorbância do branco.

2.3.2 Atividade Antiproliferativa

2.3.2.1 Ensaio antiproliferativo

Os ensaios antiproliferativos foram realizados no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na divisão de Farmacologia e Toxicologia, com a colaboração dos Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Ana Lúcia Ruiz.

2.3.2.2 Células

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes linhagens celulares com densidade de inoculação de $3-6 \times 10^4$ células.mL⁻¹: U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), K562 (leucemia) e uma linhagem controle de VERO (célula epitelial de rim de macaco verde). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®), com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB - Gibco®) à 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

2.3.2.3 Atividade antiproliferativa (Skehan et al., 1990)

Foram inoculados 100 μL de células em RPMI 1640/SFB 10% gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Após 24 horas, as amostras (solubilizadas em dimetilsulfóxico (DMSO) na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionadas em concentrações crescentes de 0,25 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A concentração final de DMSO não afetou a atividade celular. Uma placa (T0) foi preparada para servir como controle no tempo zero. Após 48 h, as células foram fixadas com 50 μL de ácido tricloroacético à 50% a 4 $^{\circ}\text{C}$ e incubadas por 1 hora a 4 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente até a secagem. A coloração foi então realizada pela adição de 50 μL de sulforrodamina B a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%, durante um período de 30 min. As placas foram incubadas a 4 $^{\circ}\text{C}$, lavadas 4 vezes com ácido acético a 1% e secas novamente em temperatura ambiente. O corante foi solubilizado com solução de Trizma base^z (10 μM , pH 10,5) e a leitura realizada em 540 nm em um leitor de microplacas.

Para melhor entendimento, observa-se abaixo na figura 4 um fluxograma das incubações, lavagens e coloração das placas.

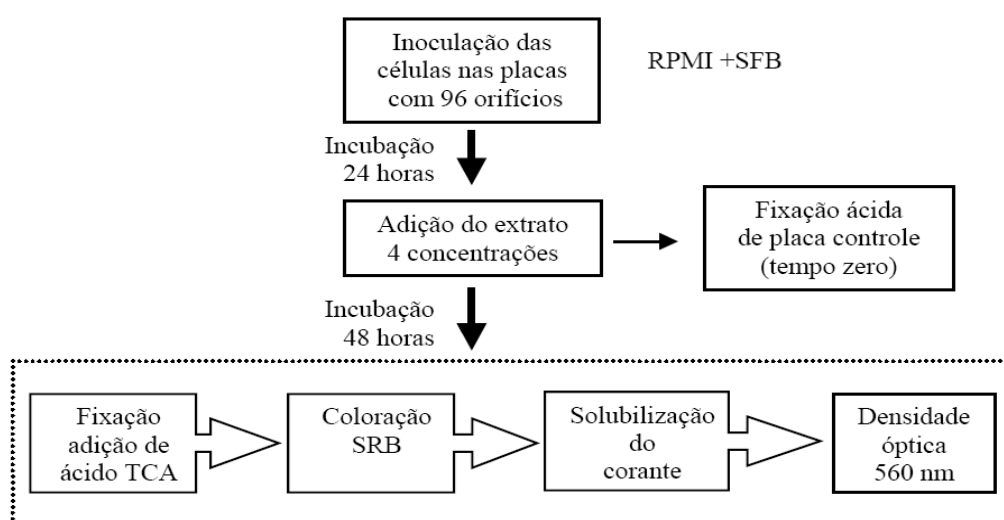


Figura 4: Fluxograma do ensaio antiproliferativo realizado segundo método de Skehan *et al.* (1990)

2.3.2.4 Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos. Por meio da fórmula abaixo, foi determinada a inibição de crescimento (IC).

$$100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)].$$

Os resultados obtidos foram interpretados segundo o seguinte critério:

Se $T > C$, houve estimulação do crescimento celular.

Se $T > = T_0$, mas $< C$, existiu uma atividade citostática

Se $T < T_0$, existiu atividade citocida e a fórmula utilizada foi:

$$100 \times [(T-T_0)/T_0]$$

Onde, T = média da célula tratada, C = controle de célula e T_0 = controle das células no dia de adição das amostras.

Também é possível subtrair o resultado obtido de 100%, obtendo-se a porcentagem de inibição de crescimento (IC). As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose-dependente.

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 programa ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).

A partir dos valores de IC_{50} , foi calculada a atividade média (média do log de IC_{50}) de todos os extratos, utilizando o programa MS Excel. Essa atividade média é um parâmetro proposto pelo National Cancer Institute (NCI), que classifica os extratos como I (inativo) se a média de log $IC_{50} > 1,5$, D (atividade discreta) se a média de log $IC_{50} = 1,1-1,5$, M (atividade moderada) se a média de log $IC_{50} = 0-1,1$, P (atividade potente) se a média de log $IC_{50} < 0$. (Fouche *et al.*, 2008).

V Resultados e Discussão

1. Óleos voláteis

Não foram encontradas substâncias voláteis nas folhas e caules de *A. comosa*, *A. lobata* e *C. triqueter*. As espécies *C. lundianus*, *C. glandulosus* e *C. campestris* apresentaram óleos voláteis nas folhas e, com exceção de *C. campestris*, também nos caules. Na tabela 2 estão apresentadas as substâncias encontradas nas folhas e na tabela 3 as substâncias encontradas nos caules das espécies estudadas.

Foram encontradas, na sua maioria, compostos sesquiterpênicos não oxigenados. Nas folhas, há presença de sesquiterpenos, oxigenados ou não, e ausência de monoterpenos, oxigenados ou não. Nos caules há presença de um monoterpeno não oxigenado (limoneno) em baixa quantidade e sesquiterpenos também não oxigenados, não sendo detectados os monos e sesquiterpenos oxigenados. Segundo Simões & Spitzer (2003) os monoterpenos e sesquiterpenos são os terpenos mais frequentes em óleos voláteis.

Tabela 2: Composição química percentual relativa dos constituintes dos óleos encontrados nas folhas de *Croton lundianus* (3022F), *C. glandulosus* (3023F) e *C. campestris* (3024F).

Substâncias	IRL	Espécies		
		3022F	3023F	3024F
MONOTERPENOS				
Limoneno	1019	-	-	-
TOTAL		0,0	0,0	0,0
MONO OXIGENADOS				
TOTAL		0,0	0,0	0,0
SESQUITERPENOS				
α -cubebeno	1341	17,1	2,5	15,8
α -copaeno	1350	7,2	1,8	-
β -bourboneno	1367	1,6	0,7	-
β -elemeno	1369	2,8	3,3	-
8-isoproprenil-1,5-dimetilciclo-deca-1,5-dieno	1379	-	-	2,6
β -cariofileno	1400	11,1	18,9	43,02
β -gurjuneno	1411	-	-	2,2
aromadendreno	1429	1,8	2,0	-
α -humuleno	1458	3,5	2,5	0,9
γ -muuroloeno	1479	0,7	1	1,3
germacreno D	1480	-	-	2,5
elixeno*	1484	19	-	-
β -selineno	1489	-	-	0,9
δ -cadineno	1524	5,0	1,07	2,5
óxido de cariofileno	1558	11,9	3,3	1,0
TOTAL		81,07	37,07	72,72
SESQUIT. OXIGENADOS				
Espatuleno	1557	-	39,9	-
Ledol	1590	10,5	-	7,0
β -eudesmol	1630	-	-	15,8
τ -cadinol	1631	-	0,87	-
TOTAL		10,5	40,77	22,8
Não identificadas		7,9	22,16	4,48

IRL: Índice de retenção linear comparados com os valores encontrados em Adams (2009). * Referência: Yu *et al.* (2007). 3022F: *C. lundianus*; 3023F: *C. glandulosus*; 3024F: *C. campestris*. Em negrito, os três principais compostos encontrados em cada amostra.

Tabela 3: Composição química percentual relativa dos constituintes dos óleos encontrados nos caules das espécies *C. lundianus* (3022C) e *C. glandulosus* (3023C).

Substâncias	IRL	3022C	3023 C
MONOTERPENOS			
Limoneno	1019	1,1	-
TOTAL		1,1	0,0
MONO. OXIGENADOS			
TOTAL		0,0	0,0
SESQUITERPENOS			
α -cubebeno	1341	7,9	-
β -elemeno	1369	3,2	-
8-isoproprenil-1,5-dimetilciclodeca-1,5-dieno	1379	4,2	-
β -cariofileno	1400	34,5	43,4
Aromadendreno	1429	11,35	25,1
α -humuleno	1458	3,2	3,8
Allo aromadendreno	1470	-	1,2
TOTAL		64,35	73,5
SESQUI. OXIGENADOS			
TOTAL		0,0	0,0
Não identificadas		34,55	26,5

IRL: Índice de retenção linear comparados com os valores encontrados em Adams (2009). 3022C: *C. lundianus*; 3023C: *C. glandulosus*. Em negrito os três principais compostos encontrados em cada amostra.

O sesquiterpeno não oxigenado β -cariofileno (figura 5) foi detectado em quantidade expressiva nas folhas de todas as espécies (figura 6). As concentrações relativas de cariofileno foram: *C. lundianus*: 11,1%; *C. glandulosus*: 18,9%; *C. campestris*: 43,02%. Nos caules, as concentrações foram: *C. lundianus*: 34,5%, e *C. glandulosus*: 43,4%.

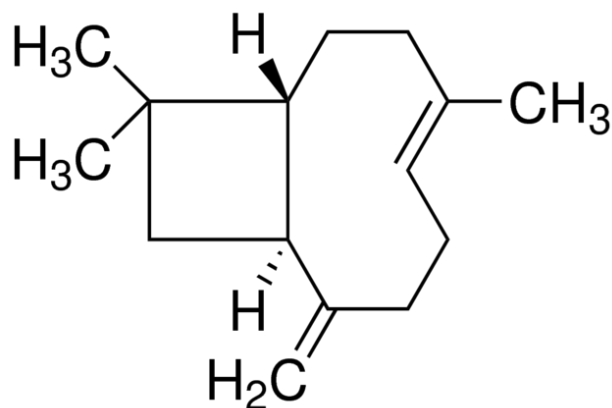


Figura 5: β -cariofileno, sesquiterpeno não oxigenado presente em todas as amostras de *Croton* que revelaram presença de óleo volátil.

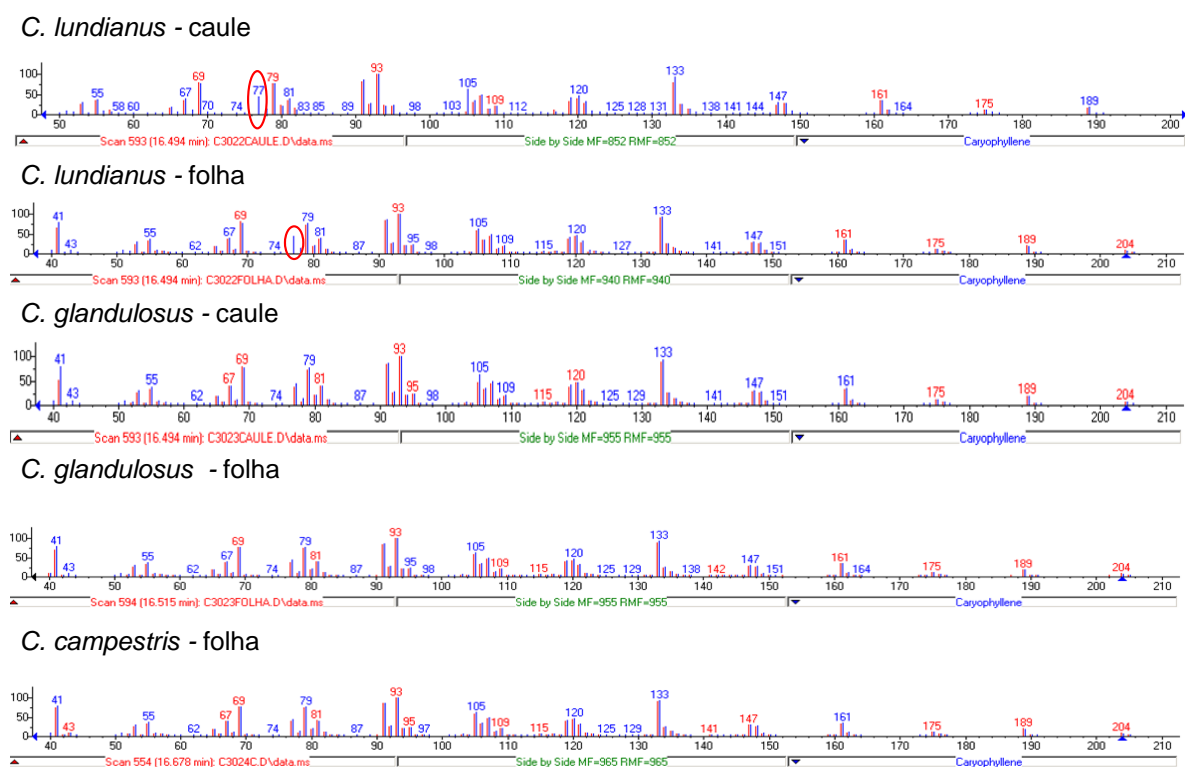


Figura 6: Espectros de massas de β -cariofileno, sesquiterpeno não oxigenado presente em todas as amostras de *Croton* que revelaram presença de óleo volátil.

Segundo Haslam (1996), o β -cariofileno pode ser empregado na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias. Diversas outras atividades biológicas são atribuídas a esse componente, tais como: atividade antimicrobiana

frente a *S. aureus* e *Candida albicans* (Constantin *et al.*, 2001), anestésica (Ghelardini *et al.* 2001), espasmolítica (Cabo *et al.*, 1986) e antiinflamatória (Aleu *et al.*, 2001). Frente a isso, *Croton lundianus*, *C. glandulosus* e *C. campestris* possuem potencial farmacológico, já que apresentam quantidades expressivas de β -cariofileno.

Outros sesquiterpenos não oxigenados merecem destaque por aparecerem em quantidades consideráveis em algumas amostras. O α -cubebeno aparece no caule (7,9%) e nas folhas (17,1%) de *C. lundianus* e nas folhas de *C. glandulosus* (2,5%) e *C. campestris* (15,8%). O aromandendreno, nas folhas foi detectado em quantidade inferior a 2%; nos caules de *C. lundianus* e *C. glandulosus*, 11,35% e 25,1%, respectivamente, dos componentes detectados são representados por essa substância. O óxido de cariofileno foi detectado nas folhas de *C. lundianus* (11,9%), *C. glandulosus* (3,3%) e *C. campestris* (1,0%), não sendo encontrado nos caules. Segundo Zheng *et al.* (1992), o óxido de cariofileno possui atividade anticarcinogênica. O α -humuleno está presente em todas as amostras que forneceram óleos voláteis, porém em quantidades inferiores a 4%. O δ -cadineno aparece nas amostras das folhas em quantidades inferiores a 5%.

No óleo das folhas de *C. glandulosus*, foi detectada uma quantidade expressiva de espatulenol (39,9%) com estrutura representada na figura 7. Segundo Ziaei *et al.* (2010) esse sesquiterpeno oxigenado possui atividade imunomoduladora; segundo Alcântara e col. (2010), ele possui atividade antibacteriana e repelente de formigas cortadeiras de folhas, por impedir o crescimento dos fungos simbioses (Harborne, 1993). Na amostra das folhas *C. glandulosus*, o espatulenol se encontra em quantidade superior às demais substâncias, superior até a quantidade total de todos os demais sesquiterpenos não oxigenados.

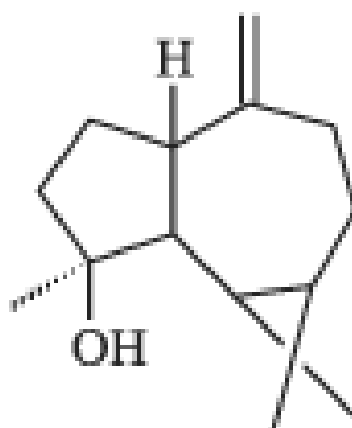


Figura 7: Estrutura do espatulenol, principal composto encontrado nas folhas de *C. glandulosus*.

O sesquiterpeno oxigenado β -eudesmol está presente apenas no óleo das folhas de *C. campestris*, na concentração relativa de 15,8%. Esse composto foi relatado por Marsaro *et al.* (2004) como tendo atividade sobre operárias de formigas *A. sexdens rubropilosa* e *A. laevigata*, por provocar desarranjo das colônias. Marinho *et al.* (2005, 2006) investigaram a ação dessa substância sobre operárias de várias espécies de *Atta*, *Acromyrmex* e *Solenopsis*, a fim de determinar se ela poderia ser utilizada no controle eficiente dessas formigas.

O ledol (figura 8) foi detectado no óleo das folhas de *C. lundianus* (10,5%) e *C. campestris* (7,0%). Até o momento esse composto foi relatado em *Croton* apenas por Moreno *et al.* (2009) e em baixa quantidade (*C. heterocalyx*: 1,6%). Em trabalhos realizados por outros alunos do laboratório de Fitoquímica, essa substância foi detectada em *C. cf. montevidenses*, na proporção de 18,08% nas folhas e 77,41% no caule (Matos, 2011), em *C. dusenii*, *C. eskuhei* e *C. pseudoadipatus*, com 4,47%, 1,52% e 4,76% nas folhas, respectivamente (Feliu, 2011), no caule de *C. erythroxyloides* com 6,66% e nas folhas com 6,65%, nas folhas de *C. myrianthus* com 3,37% e em *C. splendidus* com 4,96% nas folhas (Savietto, 2011).

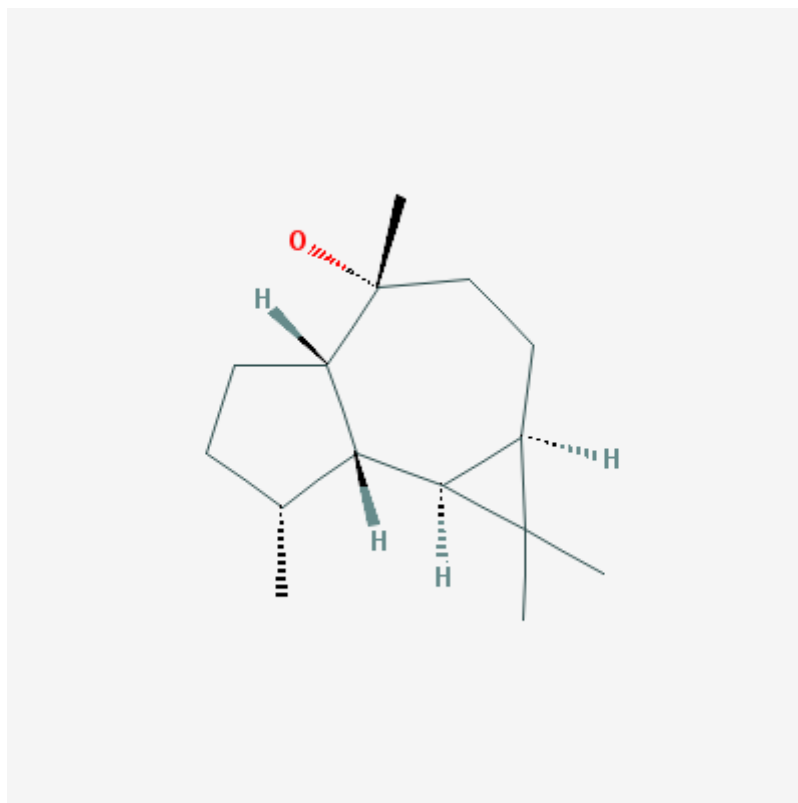


Figura 8: Ledol, composto detectado em várias espécies de *Croton* (ver texto).

Duas substâncias detectadas em material do presente trabalho ainda não foram relatadas para o gênero. São elas o elixeno (Figura 9), presente no óleo das folhas de *C. lundianus* (19%) e 8-isoproprenil-1,5-dimetilciclodeca-1,5-dieno, presente em *C. campestris* (folhas, 2,6%) e *C. lundianus* (caule, 4,2%). Em trabalho de dissertação, Matos (2011) relata a presença de elixeno nas folhas de *C. antisiphiliticus* (98%), *C. grandivelum* (52,67%), *C. cf pycnocephalus* (20,11%), *C. hemiargyreus* (13,43% no caule, 3,28% nas folhas), e a presença de 8-isoproprenil-1,5-dimetilciclodeca-1,5-dieno nas folhas (9,55%) e caule (9,97%) de *C. hemiargyreus* e nas folhas de *C. betulaster* (21,25%).

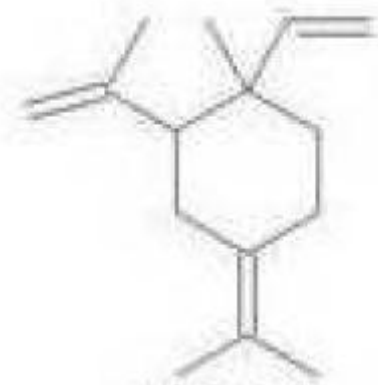


Figura 9: Elixeno, substância detectada em espécies de *Croton* (ver texto).

Os resultados sugerem que as espécies analisadas possuem potencial farmacológico, devido às substâncias encontradas em seus óleos voláteis.

A presença de quimiotipos, a interferência do ciclo vegetativo, fatores ambientais, tais como temperatura, radiação solar, fotoperíodo, regime de ventos e micronutrientes presentes no solo são capazes de influenciar a composição química de óleos voláteis de plantas (Bruneton, 2001).

Segundo trabalho de Moraes *et al.* (2006), a composição química percentual do óleo essencial de *C. zehntneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides* varia ao longo do dia. Por exemplo: em *C. zehntneri* às 6 horas há a presença de canfeno e ausência de estragol. Já às 13 horas, há a presença de estragol e ausência de canfeno. Algo semelhante ocorre nas folhas de *C. nepetaefolius*: às 6 horas, há a presença de 1,8-cineol e ausência de β -elemeno; no período da tarde, a situação se inverte. Em *C. argyrophyloides* a diferença do percentual de α -pineno é acentuada. Na coleta das 6 horas, o componente aparece com 14,23% e na coleta das 13 horas, com 4,48%. O espatulenol aparece com 9,80% às 6 horas e 14,33% às 13 horas. Estudos controlando as variáveis que influenciam a composição química de óleos voláteis são necessários para melhor elucidação da sua composição.

2. Flavonóides

Foram identificadas diversas substâncias fenólicas nas amostras do presente estudo, dentre elas os ácidos quínico e rosmarínico presentes na maioria dos extratos. Foram detectados 26 flavonoides, listados na tabela 4 com os respectivos dados de tempo de retenção, UV/vis e EM.

Tabela 4: Flavonóides detectados em espécies de *Croton* e *Astraea* e respectivos dados de tempo de retenção (TR), espectros de massa (EM) e ultravioleta (UV).

	TR (MIN)	EM	UV	Substância
1	15,143	-	267, 257 om, 345	NI
2	15,406	595 (100) , 271	271, 321	Apigenina di-hexosídeo
3	15,543	-	271, 341	NI
4	16,35	-	283, 269 om, 329	NI
5	16,485	757 (5), 565 (100), 148 (5)	271, 385 om, 335	Derivado de apigenina (triglicosídeo metilado)
6	16,908	-	270,345	Derivado de Apigenina
7	17,838	-	267, 255 om, 349, 293om	Derivado de Apigenina
8	19,532	611(100)	255, 265 om, 353, 295 om	Rutina
9	20,587	433(100)	269, 337	Vitexina
10	21,361	581 (14), 465 (100), 279 (15), 204 (15), 148 (40), 130 (5)	256, 266 om, 353, 297 om	Derivado de quercetina
11	21,913	595 (100), 465 (90), 302 (15), 204 (10), 148 (30)	255, 265 om, 353, 299om	Derivado de quercetina
12	22,43	-	255, 266 om, 349	Derivado de quercetina
13	23,036	-	255, 265 om, 347	Derivado do Campferol
14	24,536	625(15), 595(100),279(15), 204(10), 148 (30), 130(5)	266, 341	Campferol diglicosídeo (hexose, ramnose)
15	25,774	625(100), 479(10), 316(5), 278 (5), 204 (5), 148 (25)	257, 265 om, 351	Derivado de isoramnetina (hexose-ramnose)
16	25,86	-	261, 351, 298 om	Derivado de Quercetina
17	26,535	-	265, 349, 393 om	NI
18	28,255	-	263, 339	NI
19	28,3	-	265, 345	Derivado de Campferol
20	28,776	-	249, 349	NI
21	28,818	-	255, 265 om, 353,295 om	Derivado de quercetina
22	30,448	-	253, 266 om, 353, 295 om	Quercitrina
23	38,925	449(100), 434 (30), 302 (15), 286 (30), 204 (10), 148 (30)	269, 321	Derivado de Luteolina
24	41,009	595(90), 309(100), 287(10), 147 (2)	267, 300 om, 315, 355 om	Tirilósídeo
25	51,122	-	255, 268 om, 351, 290 om	NI
26	52	-	327, 355	NI

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

Com os dados de TR, espectros de UV/vis e massas (inclusive EM/EM) foi possível identificar alguns flavonóides como rutina, vitexina e tirilosídeos e parcialmente outros, como derivados de apigenina, quercetina, campferol e luteolina (tabela 4).

Na tabela 5 estão apresentadas as quantidades relativas de cada substância nos extratos de *A. comosa*, *A. lobata* e *C. triqueter*. Na tabela 6, apresentam-se as quantidades relativas dos flavonoides nos extratos de *C. lundianus*, *C. campestris* e *C. glandulosus*.

Tabela 5: Porcentagem relativa dos flavonóides encontrados em *Astraea comosa*, *Astraea lobata* e *Croton triqueter*.

TR	Substância	L26 C	L26 F	C3047 C	C3047 F	C3036 C	C3036 F
1	15,143 NI	2,98	14,81				
2	15,406 Apigenina di-hexosídeo						
3	15,543 NI						
4	16,35 NI					4	
5	16,485 Derivado de apigenina (triglicosídeo metilado)						
6	16,908 Derivado de Apigenina						
7	17,838 Derivado de Apigenina						
8	19,532 Rutina	2,06		5,49	6,35	16,73	15,1
9	20,587 vitexina		0,8	19,91	8,69		
10	21,361 Derivado de quercetina	12,7		32,1			
11	21,913 Derivado de quercetina	16,57		20,99	42,96		
12	22,43 Derivado de quercetina						
13	23,036 Derivado do Campferol						
14	24,536 Campferol diglicosídeo (hexose, ramnose)						
15	25,774 Derivado de isoramnetina (hexose-ramnose)						
16	25,86 Derivado de Quercetina	5,6					
17	26,535				3,94		
18	28,255 NI						
19	28,3 Derivado de Campferol						3,9
20	28,776 NI						
21	28,818 Derivado de quercetina	14,7					
22	30,448 Quercitrina	11,14					
23	38,925 Derivado de Luteolina						
24	41,009 Tirilosídeo	5,7	6,1	7,29	6,83	7,76	8,16
25	51,122 NI				1,12		
26	52 NI						

TR: tempo de retenção; L26: *A. comosa*; C3074: *A. lobata*; C3036: *C. triqueter*; C: caule e F: folha.

Tabela 6: Porcentagem relativa dos flavonóides encontrados em *Croton campestris*, *Croton glandulosus* e *Croton lundianus*.

TR	Substância	C3022 C	C3022 F	C3023 C	C3023 F	C3024 C	C3024 F
1	15,143 NI		1,94	3,77			
2	15,406 Apigenina di-hexosídeo					7,4	
3	15,543 NI		5,47				
4	16,35 NI						
5	16,485 Derivado de apigenina (triglicosídeo metilado)	18,25	9,42				
6	16,908 Derivado de Apigenina	9,79	13,78				
7	17,838 Derivado de Apigenina	6	9,46				
8	19,532 Rutina	6,13	2,89		1,53		
9	20,587 vitexina	8,31	27,53				
10	21,361 Derivado de quercetina						
11	21,913 Derivado de quercetina		2,25				
12	22,43 Derivado de quercetina		4,93				
13	23,036 Derivado do Campferol				2,65		
14	24,536 Campferol diglicosídeo (hexose, ramnose)		0,54				
15	25,774 Derivado de isoramnetina (hexose-ramnose)		1,29		1,89		
16	25,86 Derivado de Quercetina						
17	26,535 NI						
18	28,255 NI				0,57		
10	28,3 Derivado de Campferol		0,86				
20	28,776 NI				1,42		
21	28,818 Derivado de quercetina						
22	30,448 Quercitrina						
23	38,925 Derivado de Luteolina		2,82		7,46		3,61
24	41,009 Tirilosídeo	31,6	12,51	7,3	30,95	28,66	
25	51,122 NI				0,69		
26	52 NI					2,59	

TR: tempo de retenção; C3022: *C. campestris*; C3023: *C. glandulosus*; C3024: *C. lundianus*; C: caule e F: folha.

O tilirosídeo foi comum a todas as espécies e a rutina só não foi detectada em *C. lundianus*.

O tilirosídeo apresentou dois máximos de absorção, um em 267 nm, relativo ao anel A, e o outro em 315 nm relativo ao anel B, que sofre efeito hipsocrômico, ou seja, sofre redução no comprimento de onda absorvido, pela presença de substituinte acila no resíduo de glucose (Zuanazzi, 2000). É por esta razão que esse flavonol possui banda I inferior a 350 nm. Esse composto foi encontrado pela primeira vez no gênero em *C. gnaphalii* (Lencina *et al.*, 2001), onde o composto foi majoritário nas partes aéreas. O tilirosídeo já foi identificado em outras famílias de plantas e testado em células tumorais, nas quais provocou inibição de crescimento (Bajaj *et al.*, 1986).

A quercetina é conhecida por sua alta capacidade sequestradora de radicais livres, encontrada em grande parte das plantas comestíveis, na forma de glicosídeos, como a rutina (Manach *et al.*, 1997). A rutina foi o componente majoritário dos caules e folhas de *C. triqueter*. Derivados da quercetina foram muito comuns nas amostras.

De Melo e colaboradores (2005) descreveram a vitexina como potente anti-inflamatório dose-dependente em um modelo que mimetiza a inflamação pulmonar. Esse composto foi majoritário no extrato das folhas de *C. lundianus*, em expressiva quantidade no extrato dos caules de *A. comosa* e ainda em quantidades mais baixas nos extratos das folhas de *A. lobata* e *A. comosa* e nos caules de *C. lundianus*.

Apesar de normalmente os caules possuírem menor quantidade de flavonóides, o extrato do caule de *A. comosa* apresentou quantidades relativamente altas de vitexina (19,91%, banda 9) e derivados de quercetina (bandas 10: 32,1%, e 11: 20,99%).

Na faixa entre 38 e 43 minutos, existe um grande número de bandas muito próximas, que correspondem a flavonóides coelundo. Devido a essa circunstância, só foi possível determinar os tempos de retenção e espectros de UV/vis de algumas substâncias (tabela 5, Anexo II). Nesses casos, para um perfil químico mais detalhado dos flavonóides, métodos de separação como cromatografia em coluna ou papel, por exemplo, poderiam auxiliar na obtenção de frações com menor número de substâncias, antes da análise por CLAE/DAD.

Não foi possível detectar uma expressiva diferença química entre os gêneros *Astraea* e *Croton*, baseada em flavonoides, uma vez que não foram detectados componentes exclusivos para cada gênero e em quantidade expressiva. Perfis químicos podem ou não variar de acordo com a espécie ou gênero. Como anteriormente discutido, além de técnicas específicas de separação, um número maior de espécies dos gêneros *Astraea* e *Croton* será necessário analisar para traçar um perfil mais completo.

Na tabela 7, podemos observar as quantidades relativas de cada substância nos diferentes extratos, distribuídos em flavonas e flavonois; na tabela 8, as porcentagens relativas das duas categorias de flavonoides. Nota-se que os flavonois são superiores no total. Em *C. lundianus*, não foi possível identificar nenhum flavonoide nas folhas. Na amostra das folhas de *C. campestris*, a porcentagem de flavonas foi superior à de flavonois.

Apesar da impossibilidade de os flavonoides distinguirem os dois gêneros, os resultados sugerem que eles podem ser úteis na caracterização dos gêneros e na distinção entre as espécies. Por exemplo, vitexina (um C-glicosídeo) é muito abundante em algumas espécies de *Croton* e aparentemente ausente em *Astraea lobata*, *Croton glandulosus* e *C. lundianus*. *Astraea comosa* é aparentemente destituída de flavonas (Tabela 8).

Tabela 7: Porcentagem relativa por extrato dos flavonóides encontrados nas folhas e caules, distribuídos em flavonas e flavonóis.

Bandas	Flavona										Flavonol							não identificados								
	2	5	6	9	12	13	14	19	23	7	8	10	11	15	16	21	22	24	1	3	4	17	18	20	25	26
L26 C %											2,06	12,7	16,6		5,6	15	11,1	5,7	2,98							
L26 F %				0,8														6,1	14,81							
C3047 C %				19,91							5,49	32,1	21					7,29								
C3047 F %				8,69							6,35		43					6,83			3,94				1,12	
C3036 C %											16,7							7,76			4					
C3036 F %								3,9			15,1							8,16								
C3022 C %		18,25	9,79	8,31						6	6,13							31,6								
C3022 F %		9,42	13,78	27,53	4,93		0,54	0,86	2,82	9,46	2,89		2,25	1,29				12,51	1,94	5,47						
C3023 C %																		7,3	3,77							
C3023 F %							2,65			7,46	1,53			1,89				30,95				0,57	1,42	0,69		
C3024 C %	7,4																	28,66								2,59
C3024 F %										3,61																

LBM26: *A. lobata*; C3047: *A. comosa*; C3036: *C. triqueter*; C3022: *C. lundianus*; C3023: *C. glandulosus*; C3024: *C. campestris*; C: caules e F: folhas.

Tabela 8: Proporção da concentração de flavonas, flavonóis e substâncias não identificadas presentes nos extratos estudados.

	%flavona	%flavonol	%ni
L26 C %	0	95,83	4,17
L26 F %	3,68	28,10	68,22
C3047 C %	23,21	76,79	0,00
C3047 F %	12,43	80,33	7,24
C3036 C %	0,00	85,96	14,04
C3036 F %	14,36	85,64	0,00
C3022 C %	45,39	54,61	0,00
C3022 F %	62,58	29,68	7,74
C3023 C %	0,00	65,94	34,06
C3023 F %	21,44	72,88	5,68
C3024 C %	19,15	74,15	6,70
C3024 F %	100,00	0,00	0,00

LBM26: *A. lobata*; C3047: *A. comosa*; C3036: *C. triqueter*; C3022: *C. lundianus*; C3023: *C. glandulosus*; C3024: *C. campstris*; C: caules e F: folhas.

A maioria dos trabalhos realizados anteriormente sobre o gênero *Croton* não focavam especificamente em flavonóides e muitas agliconas metoxiladas foram isoladas das extrações feitas com solventes mais apolares (Salatino *et al.*, 2007). No presente trabalho, não foram identificadas agliconas altamente metoxiladas,. Este trabalho apresenta um perfil de flavonoides de *Croton* distinto, com abundância de glicosídeos de flavonóis e flavonas, fato esse que se deve ao uso de solventes hidroalcoólicos nas extrações.

3. Atividades Biológicas

3.1 Determinação da capacidade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH•)

Os estudos dos radicais livres e dos antioxidantes fenólicos têm aumentado bastante nos últimos anos. A quercetina é um conhecido antioxidante, abundante na natureza. O mecanismo pelo qual a quercetina exerce sua ação como antioxidante resulta de uma combinação de suas propriedades quelante e sequestradora de radicais livres, assim como a inibição da oxidação de membranas (Trueba, 2003). Sendo assim, a quercetina foi utilizada como substância de referência por possuir atividade antioxidante comprovada.

Estão apresentados na tabela 9 os resultados de capacidade de sequestro de radical livre dos extratos metanólicos das folhas de *A. comosa*, *A. lobata*, *C. lundianus*, *C. glandulosus*, *C. campestris* e *C. triqueter*, através do sequestro de radicais livres comparadas com quercetina.

Tabela 9: Valores da capacidade de sequestro (%) dos extratos metanólicos de folhas de espécies de *Astraea* e *Croton*, em diferentes concentrações, pelo método do DPPH.

Amostra	Concentração dos extratos				
	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Quercetina	51,05	80,06	93,08	97,5	99,04
<i>A. comosa</i>	34,89	50,3	63,74	81,99	95,38
<i>A. lobata</i>	30,28	34,5	37,11	43,81	59,22
<i>C. lundianus</i>	51,05	54,02	58,25	80,06	95,03
<i>C. glandulosus</i>	31,03	32,97	34,91	36,52	41,2
<i>C. campestris</i>	33,77	38,34	41,79	47,62	59,98
<i>C. triqueter</i>	35,21	62,6	86,13	96,68	97,19

Nota-se que todos os extratos tiveram atividade superior a 30% com a concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e que em *C. lundianus* a porcentagem da atividade foi igual à substância de referência (51,05%). Quando aumentamos em vinte e cinco vezes essa concentração, o extrato das folhas de *C. triqueter* apresenta-se mais eficiente do que o de *C. lundianus*. Quando aumentamos em cinquenta vezes a concentração (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a espécie que possuiu maior capacidade sequestradora foi *C. triqueter*, seguido de *A. comosa* e então *C. lundianus*. A espécie que possui menor porcentagem de atividade é *C. glandulosus*, pois necessita de concentração do extrato maior que 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para atingir 50% de atividade. Seguem depois de *C. glandulosus*, *A. lobata* e *C. campestris*.

Na figura 10 podemos visualizar graficamente a comparação entre as mesmas concentrações dos extratos com as respectivas atividades de sequestro de DPPH.

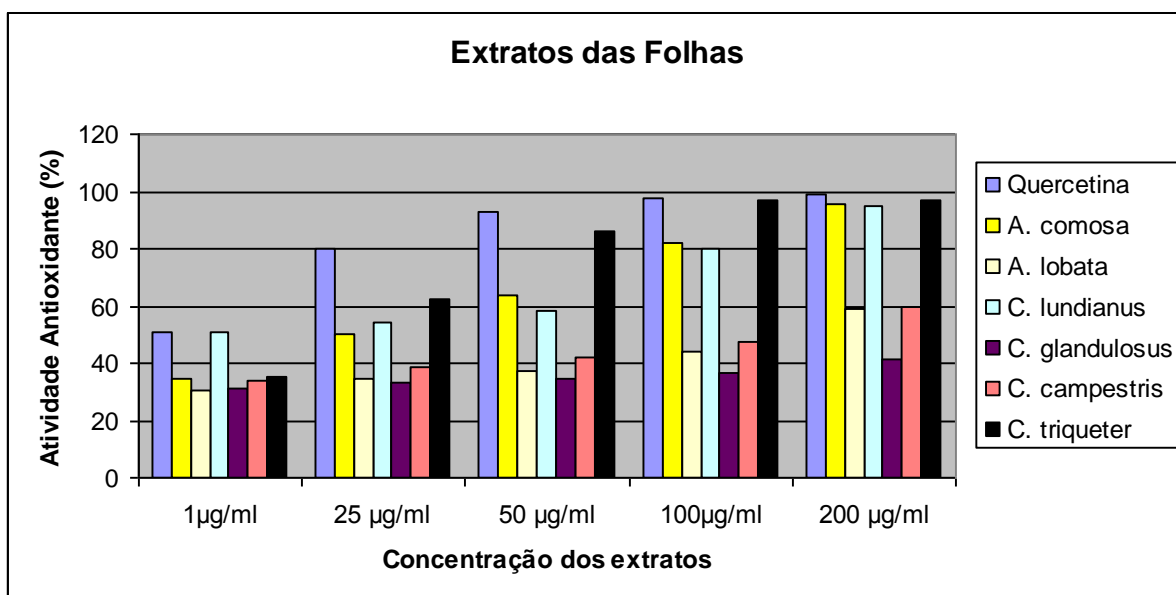


Figura 10: Capacidade de sequestro do radical livre DPPH de extratos de folhas de espécies de *Astraea* e *Croton* em distintas concentrações..

As análise das atividades antioxidante dos extratos dos caules das espécies *A. comosa*, *A. lobata*, *C. lundianus*, *C. glandulosus*, *C. campestris* e *C. triqueter* estão mostrados na tabela 10.

Tabela 10: Valores da atividade antioxidante (%) dos extratos metanólicos dos caules, em diferentes concentrações, pelo método de DPPH de espécies de *Croton* e *Astraea*.

Amostra	Concentrações dos extratos				
	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Quercetina	51,05	80,06	93,08	97,5	99,04
<i>A. comosa</i>	33,41	38,1	44,05	53,1	65,37
<i>A. lobata</i>	29,37	29,76	30,24	33	35,74
<i>C. lundianus</i>	33,78	39,2	45,14	54,86	74,12
<i>C. glandulosus</i>	34,16	34,59	35,2	37,41	41,79
<i>C. campestris</i>	33,22	37,8	42,45	51,36	51,79
<i>C. triqueter</i>	32,41	41,1	50,63	65,6	87,22

Diferente dos extratos das folhas, os extratos de caules precisam de concentrações maiores para atingir 50% de atividade. *C. triqueter* possui o extrato com maior capacidade de sequestro, necessitando de uma concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para atingir 50,63% de atividade. Seguido dele, estão *C. lundianus*, *A. comosa* e *C. campestris*, que necessitam de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para atingir 50% de atividade. Os extratos com menores atividades são os de *A. lobata* que e de *C. glandulosus*, que não atingiram 50% da capacidade.

Podemos visualizar a comparação entre as concentrações e os extratos na figura 11 de modo gráfico.

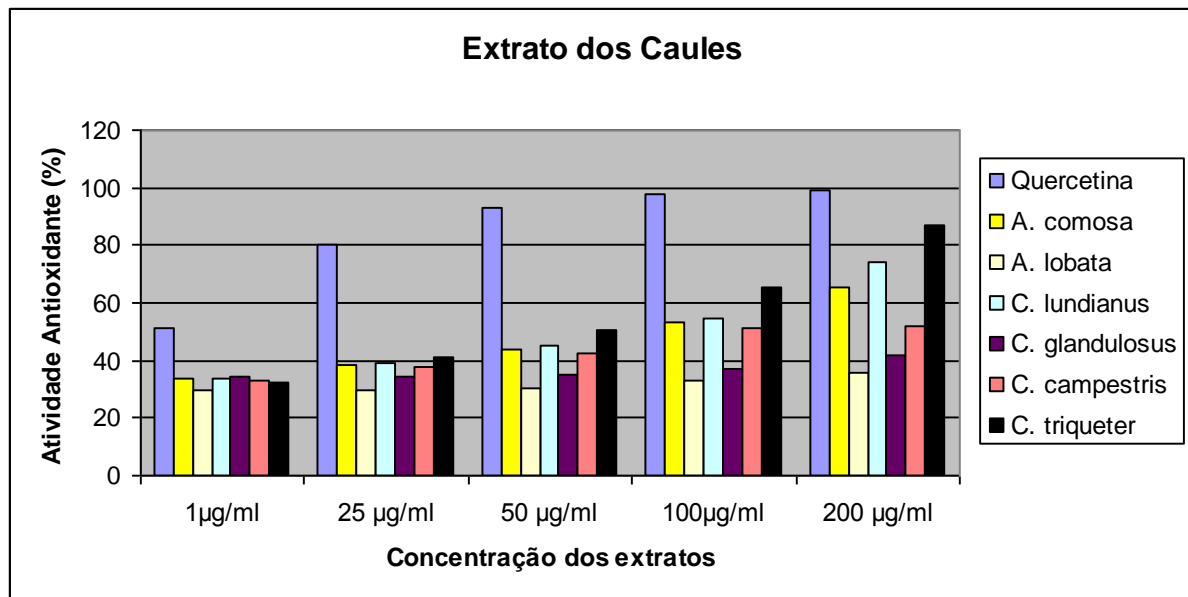


Figura 11: Capacidade de sequestro do radical livre DPPH de extratos de caules de espécies de *Astraea* e *Croton* em distintas concentrações

Os extratos das folhas, de um modo geral, apresentaram-se mais eficientes para as atividades de sequestro de radicais livres comparadas com a substância de referência, a quercetina, do que os extratos dos caules. Isso, em parte, pode ser entendido com base na mais bem sucedida teoria da ecologia bioquímica (alocação de recursos, Coley *et al.*, 1985), segundo a qual a defesa de uma planta pode ser de dois tipos principais, qualitativa e quantitativa (ou redutores da digestibilidade). Em comparação com a folha, o caule possui proteção física conferida pela presença de súber (mais ou menos espesso, dependendo da espécie) e grande quantidade de lignina e, conseqüentemente, de elementos mecânicos. Com maior investimento em defesas físicas e quantitativas, o caule possui menor quantidade de defesas qualitativas do que a folha.

É importante salientar que os extratos utilizados neste experimente são brutos, ou seja, possuem uma mistura complexa de muitos componentes, alguns bioativos, outros não. Muitos artigos publicados relatam abordagens semelhantes à utilizada neste trabalho: a capacidade de sequestro de radical livre do conjunto das substâncias. Nessas abordagens, leva-se em conta a ação combinada de as substâncias do extrato; obtém-se, assim, um parâmetro integrado, que pode revelar

nuanças acerca do delicado equilíbrio redox existente *in vivo* (Vasconcelos *et al.* 2007).

Outro ponto presente em muitas discussões fitoquímicas é a presença de sinergismo entre os compostos. Segundo Melo e Guerra (2002) compostos fenólicos e não fenólicos agem sinergicamente. Comercialmente, tem sido usado em combinação com tocoferóis, observando-se sinergismo entre o alecrim e o α -tocoferol, ou seja, o extrato de alecrim regenera o tocoferol (Madsen e Bertelsen, 1995). Em estudo de atividades antioxidantes de óleos essenciais de espécies de *Croton*, Morais e colaboradores (2006) acreditam que o α -pineno, E-cariofileno e 1,8-cineol, cujas atividades relatadas são baixas, estão agindo sinergicamente.

Contrariamente ao observado com os extratos das folhas, os do caule não mostraram proporcionalidade entre concentração e atividade sequestradora. Seria de se esperar respostas semelhantes entre os extratos das duas partes. Uma revisão do experimento se faz necessária para averiguar qual a razão para essa diferença.

Diante dos resultados do experimento, os extratos de *A. comosa*, *A. lobata*, *C. lundianus*, *C. glandulosus*, *C. campestris* e *C. triqueter* demonstraram potencial biológico antioxidativo, incentivando assim novas pesquisas com essas espécies. Essas análises, como salientado acima precisam ser revistas.

Atividade antioxidante, assim como atividade citotóxica é o primeiro indício de atividade biológica potencialmente útil em farmacologia e medicina. Estudos como esse com plantas nativas são necessários para indicar ou substanciar usos terapêuticos das plantas medicinais da flora brasileira.

3.2 Atividade antiproliferativa

Na tabela 11 estão os resultados de atividade antiproliferativa das folhas e caules de *Astraea comosa*, *A. lobata*, *Croton lundianus*, *C. glandulosus*, *C. campestris* e *C. triqueter* sobre as linhagens celulares de U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K562 (leucemia). Foram comparadas a uma linhagem controle (não tumoral) VERO (célula epitelial de rim de macaco verde).

Nota-se que os extratos das folhas de *C. glandulosos*, *C.campestris*, *A. lobata* e *A. comosa* inibiram 50% do crescimento celular (IC_{50}) com quantidade inferior ou igual a $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das linhagens celulares de pulmão (NCI-H460) e leucemia (K562) e os extratos dos caules de *A. lobata*, *A. comosa* e *C.glandulosus* apresentaram $IC_{50} < 3,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que para *A. comosa* esse índice foi inferior a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para as mesmas linhagens celulares.

O extrato das folhas de *C. campestris* apresentou como resultado o valor de IC_{50} para Mama (MCF-7) igual a $1,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) IC_{50} igual a $2,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a linhagem celular Mama (MCF-7), outros extratos que inibiram em 50% o crescimento celular com baixas concentrações foram os dos caules de *A. comosa*, com $IC_{50} = 2,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, folhas e caules de *C. triqueter*, com valores de IC_{50} respectivamente 1,56 e $1,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 11: Atividade antiproliferativa dos extratos metanólicos de folhas e caules de espécies de *Astraea* e *Croton* sobre diferentes linhagens celulares, representada pela concentração inibitória do crescimento de cultura em 50% (IC₅₀) de diferentes linhagens de células tumorais humanas.

Linhagem de células	Doxorrubicina*	Espécies											
		<i>C. lundianus</i>		<i>C. glandulosus</i>		<i>C. campestris</i>		<i>C. triqueter</i>		<i>A. comosa</i>		<i>A. lobata</i>	
		Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules
U251	0,025	105,42	39,25	13,53	25,72	7,57	>250	>250	113,79	25,1	25,27	126,91	35,6
UACC-62	0,028	67,3	>250	29,56	134,96	26	>250	126,49	31,95	26,74	29,31	128,73	63,74
MCF-7	0,14	65,76	101,86	18,59	48,87	1,34	>250	1,56	1,98	17,78	2,9	135,46	5,73
NCI-ADR/RES 786-0	0,093	16,15	>250	20,65	90,39	2,4	>250	>250	250	27,72	50,54	>250	3,89
NCI-H460	0,034	>250	>250	95,67	>250	27,44	>250	>250	>250	15,74	17,62	30,16	>250
PC-3	<0,025	68,16	83,44	0,31	3,31	1,08	>250	>250	94,75	0,25	0,32	1,04	0,47
OVCAR-3	0,052	73,61	>250	62,41	32,3	26,96	>250	>250	206,72	26,22	36,21	>250	55,44
HT-29	0,12	128,1	>250	61,67	68,26	61,67	>250	>250	118,66	26,42	30,75	>250	131,72
K562	0,033	250	>250	68,58	>250	75,25	>250	>250	98,99	5,66	14,95	38,13	99,8
VERO	0,054	35,93	10,33	2,5	0,49	2,42	>250	81,2	63,63	0,61	0,76	1,49	1,43
	0,66	>250	>250	>250	>250	93,33	>250	>250	>250	25,27	77,51	>250	>250

*: controle positivo

IC₅₀: concentração necessária para inibir 50% de crescimento; calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, em software Origin 7.5.

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 e VERO - célula epitelial de rim de macaco verde (controle);

Em negrito: IC₅₀ inferior a 10 µg.mL⁻¹.

Na tabela 12 estão apresentados os valores individuais das atividades médias dos extratos das folhas e na tabela 13 dos extratos dos caules.

Observa-se na tabela 12, que para a linhagem NCI-H460 de pulmão os extratos de *C. glandulosus* e *A. comosa* são classificados como potentes ($\log IC_{50} < 0$), e para a linhagem K562 de leucemia, *A. comosa* foi classificada como potente, ou seja, com atividade semelhante a doxorrubicina.

Já para os extratos dos caules, tabela 13, *A. comosa* e *A. lobata* possuem atividade potente para a linhagem NCI-H460 de pulmão e *C. lundianus* e *A. comosa* para a linhagem K562 de leucemia.

Tabela 12: Cálculo das atividades médias individuais de cada extrato foliar usado segundo o National Cancer Institute - NCI.

Linhagem de células	Doxorrubicina*	<i>Espécies</i>					
		<i>C. lundianus</i>	<i>C. glandulosus</i>	<i>C. campestris</i>	<i>C. triqueter</i>	<i>A. comosa</i>	<i>A. lobata</i>
U251	-1,6	1,59	1,41	2,40	2,06	1,40	1,55
UACC-62	-1,55	2,40	2,13	2,40	1,50	1,47	1,80
MCF-7	-0,85	2,01	1,69	2,40	0,30	0,46	0,76
NCI-ADR/RES	-1,03	2,40	1,96	2,40	2,40	1,70	0,59
786-0	-1,47	2,40	2,40	2,40	2,40	1,25	2,40
NCI-H460	-1,6	1,92	0,52	2,40	1,98	-0,49	-0,33
PC-3	-1,28	2,40	1,51	2,40	2,32	1,56	1,74
OVCAR-3	-0,92	2,40	1,83	2,40	2,07	1,49	2,12
HT-29	-1,48	2,40	2,40	2,40	2,00	1,17	2,00
K562	-1,27	1,01	-0,31	2,40	1,80	-0,12	0,16
VERO	-0,18	2,40	2,40	2,40	2,40	1,89	2,40

*: controle positivo

IC50: Growth Inhibition 50 – concentração necessária para inibir 50% de crescimento; calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, em software Origin 7.5.

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 e VERO - célula epitelial de rim de macaco verde (controle);

NCI: Critério do National Cancer Institute - NCI (Fouche et al., 2008): 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.

Em negrito: extratos classificados como potentes segundo NCI: atividade potente = Média log IC50 < 0.

Tabela 13: Cálculo das atividades médias individuais de cada extrato dos caules usado segundo o National Cancer Institute - NCI.

Linhagem de células	Doxorrubicina*	<i>Espécies</i>					
		<i>C. lundianus</i>	<i>C. glandulosus</i>	<i>C. campestris</i>	<i>C. triqueter</i>	<i>A. comosa</i>	<i>A. lobata</i>
U251	-1,6	1,59	1,41	2,40	2,06	1,40	1,55
UACC-62	-1,55	2,40	2,13	2,40	1,50	1,47	1,80
MCF-7	-0,85	2,01	1,69	2,40	0,30	0,46	0,76
NCI-ADR/RES	-1,03	2,40	1,96	2,40	2,40	1,70	0,59
786-0	-1,47	2,40	2,40	2,40	2,40	1,25	2,40
NCI-H460	-1,6	1,92	0,52	2,40	1,98	-0,49	-0,33
PC-3	-1,28	2,40	1,51	2,40	2,32	1,56	1,74
OVCAR-3	-0,92	2,40	1,83	2,40	2,07	1,49	2,12
HT-29	-1,48	2,40	2,40	2,40	2,00	1,17	2,00
K562	-1,27	1,01	-0,31	2,40	1,80	-0,12	0,16
VERO	-0,18	2,40	2,40	2,40	2,40	1,89	2,40

*: controle positivo

IC50: Growth Inhibition 50 – concentração necessária para inibir 50% de crescimento; calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, em software Origin 7.5.

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 e VERO - célula epitelial de rim de macaco verde (controle);

NCI: Critério do National Cancer Institute - NCI (Fouche et al., 2008): 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.

Em negrito: extratos classificados como potentes segundo NCI: atividade potente = Média log IC50 < 0.

Na tabela 14, observam-se os resultados da atividade média calculada para cada extrato (exceto nas linhagens VERO-controle), segundo critério do National Cancer Institute (NCI). O cálculo da média do logaritmo de IC₅₀ é importante, pois permite identificar rapidamente quais extratos possuem maior potencial antiproliferativo, ou seja, permite focar os trabalhos em plantas cujos extratos sejam mais promissores.

O extrato da folha de *C. campestris* apresentou atividade moderada, segundo o critério de análise do NCI. Os extratos das folhas e caule de *A. comosa* também apresentaram atividade moderada. Já as folhas de *C. glandulosus* e caules de *A. lobata* apresentaram atividade discreta.

Vale ressaltar que esses resultados se devem, aos valores da concentração que reduz 50% do crescimento celular, vistos na tabela 9.

Tabela 14: Avaliação das atividades antiproliferativas de extratos de folhas e caules de espécies de *Astraea* e *Croton*, baseadas no valor do log de IC₅₀, segundo o National Cancer Institute (NCI; Fouche et al., 2008).

Extratos	Folhas	Classificação Folhas	Caules	Classificação Caules
	Log IC ₅₀		Log IC ₅₀	
<i>C. lundianus</i>	1,9	Inativo	2,09	Inativo
<i>C. glandulosus</i>	1,24	Discreta	1,55	Inativo
<i>C. campestris</i>	0,97	Moderada	2,39	Inativo
<i>C. triqueter</i>	2,09	Inativo	1,88	Inativo
<i>A. comosa</i>	0,94	Moderada	0,98	Moderada
<i>A. lobata</i>	1,67	Inativo	1,27	Discreta
Doxorrubicina	-1,3	Potente	-1,3	Potente

Inativo = Média log IC₅₀ > 1.5; Atividade discreta = Média log IC₅₀ = 1.10-1.5;
 Atividade moderada = Média log IC₅₀ = 0-1.1; Atividade potente = Média log IC₅₀ < 0.

Segundo o NCI, a doxorubicina é capaz de agir sobre as células tumorais por três mecanismos de ação: o primeiro seria pela formação de ligações com os grupos de fosfolípidos da membrana celular, alterando sua fluidez; o segundo seria através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da semiquinona; e o terceiro modo de ação seria a formação de ligações interfilamentares com o DNA e RNA, assim como a diminuição da atividade da enzima topoisomerase II. Sendo assim, a doxorubicina também afeta o crescimento das células não cancerígenas como visto na tabela 11, 12, 13 e 14 para a linhagem VERO. Os extratos utilizados necessitam de uma concentração de no mínimo vinte e cinco vezes maior que a doxorubicina para inibir em 50% o crescimento das células VERO, chegando esse valor, em alguns extratos, a ser a duzentas vezes maior, ou seja, eles não afetaram a linhagem controle.

Manthey & Guthrie (2002) sugerem que extratos com valores de IC₅₀ menores do que 10 µg.mL⁻¹ são considerados com forte atividade antiproliferativa. Então, os extratos das folhas de *A. comosa* possuem forte atividade contra a linhagem HT-29 (cólon) e os extratos do caule de *A. lobata* para as linhagens MCF-7 (mama) e NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos).

Dentre todos os extratos, o de *C. lundianus* foi o que apresentou menor atividade antiproliferativa (tabela 12), o extrato das folhas apresentou atividade discreta para a linhagem NCI-ADR/RES e na tabela 13, o extrato dos caules apresentou atividade moderada para K562.

Dos doze extratos analisados, cinco possuem atividade potente, nove com atividade moderada, oito com atividade discreta e um inativo contra as diversas linhagens celulares e baixa atividade contra a linhagem controle. Os resultados demonstram alta potencialidade para alguns extratos, sugerindo que os estudos sobre eles devem ser aprofundados.

V Considerações finais

Este trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a composição química de seis espécies nativas pertencentes a dois gêneros de Euphorbiaceae e avaliar as atividades antioxidante e antiproliferativa dos extratos. Duas classes de compostos foram o foco desse trabalho: os óleos voláteis e os flavonóides.

Foram encontradas duas substâncias inéditas para o gênero nos óleos voláteis, o elixeno e o 8-isoproprenil-1,5-dimetilciclodeca-1,5-dieno. Para as espécies do gênero *Astraea* e para a espécie da seção *Julocroton* não foram detectadas substâncias voláteis, não sendo possível qualquer evidência química que corrobore a exclusão de *Astraea* e a inclusão de *Julocroton* no gênero. A ausência de compostos voláteis nessas amostras pode não ser consistente, pois sabe-se que a composição de óleos varia conforme a condição ambiental a que essas plantas foram submetidas. É interessante que estudos futuros controlando variáveis que alterem a composição de óleo volátil sejam realizados.

Apesar de não ter sido possível identificar todos os flavonoides detectados, este estudo é útil para a química dos gêneros, pois na maioria dos trabalhos anteriores os flavonóides relatados eram em sua maioria agliconas metoxiladas. Um novo perfil é proposto a partir dos presentes dados, com abundância de glicosídeos de flavonóis e flavonas. Os resultados indicam que o tilirosídeo é uma característica consistente para os dois gêneros e que o perfil de flavonoides é útil para a caracterização de espécies e distinção entre elas.

Os extratos brutos das espécies possuem grande potencial de sequestro de radical livre. Os extratos das folhas apresentaram maior potencial do que os extratos dos caules,. A espécie mais promissora é *C. triqueter*, tanto para os extratos dos caules como pra o das folhas. Os extratos que apresentaram menor atividade foram os de *C. glandulosus* (folha) e *A. comosa* (caule).

Atividade antiproliferativa é outro aspecto promissor nos estudos das seis espécies. Dos doze extratos analisados apenas um não apresentou nenhuma atividade contra as linhagens analisadas. Identificar e isolar as substâncias

responsáveis por tal atividade poderá ser de grande utilidade farmacológica e de alta importância econômica.

O presente trabalho revela aspectos novos sobre o perfil químico do de *Astraea* e *Croton* e sugere que o aprofundamento dos estudos sobre atividades biológicas são altamente relevantes para a busca de novos compostos naturais para o combate ao câncer.

VI RESUMO

Plantas da família Euphorbiaceae, são produtoras de um grande e diversificado número de compostos secundários. Os gêneros *Croton* e *Astraea* são destaque nessa família, pois, possuem grande importância econômica devido ao seu elevado número de metabólitos secundários. O presente trabalho teve por objetivo ampliar o conhecimento sobre a composição química dos extratos de folhas e caules de seis espécies nativas (gêneros *Croton* e *Astraea*) e avaliar as atividades antioxidante e antiproliferativa. Entre os principais compostos encontrados estão α -cubebeno, β -cariofileno, aromadendreno, óxido de cariofileno, espatulenol, β -eudesmol, elixeno e o 8-isoproprenil-1,5-dimetilciclodeca-1,5-dieno e ledol, nos óleos voláteis; e os tilirosídeo, rutina e vitexina em flavonóides. Os extratos das folhas apresentaram maior eficiência antioxidante do que os extratos dos caules. *C. triqueter* foi a espécie que demonstrou maior atividade antioxidante tanto para os extratos das folhas quanto para os extratos dos caules. Todas as espécies demonstraram potencial biológico antioxidativo, incentivando assim novas pesquisas com essas espécies. Dos extratos analisados, os mais promissores para atividade antiproliferativa são os de *C. campestris* (folhas) e *A. comosa* (folhas e caules), pois apresentaram maior potencial antiproliferativo para as linhagens MCF-7 – mama, NCI-H460 – pulmão e K562 – leucemia. Este trabalho ajudou a ampliar o conhecimento químico e das atividades antioxidante e antiproliferativa sobre o gênero *Croton* e o gênero *Astraea*, que possuem enorme potencial biológico e mais de mil espécies distribuídas pelo mundo.

Palavras-Chave:

Euphorbiaceae, óleos voláteis, flavonóides, atividade antioxidante, atividade antiproliferativa, *Croton*, *Astraea*.

VII ABSTRACT

Plants of the family Euphorbiaceae are producers of a great and varied number of secondary compounds. The genus *Croton* and *Astraea* are highlights in this family because they have great economic importance due to their high number of secondary metabolites. This present work aimed to expand the knowledge about the chemical composition of extracts of leaves and barks of six native species (genus *Croton* and *Astraea*) and evaluate the antioxidant and antiproliferative activities. Amongst the main compounds that were found are α -cubebene, β -cariophyllene, aromadendrene, cariophyllene oxide, spathulenol, β -eudesmol, ledol, elixene and 8-isoproprenyl-1,5-dimethyl-cyclodeca-1,5-diene, in the volatile oils; and the X,Y and Z in flavonoids. The extracts of the leaves presented more antioxidant efficiency than the extracts of the barks. *C. triqueter* was the species that demonstrated more antioxidant activity for the extracts of both the leaves and the barks. All the species demonstrated antioxidative biological potential, thereby encouraging new researches with these species.). From the analyzed extracts, the most promising ones for antiproliferative activity are *C. campestris* (leaves) and *A. comosa* (leaves and barks), because they presented the highest antiproliferative potential for the cell lines MCF-7 – mammary, NCI-H460 – lung and K562 – leukemia. This work helped to expand the chemical knowledge and the antioxidant and antiproliferative activities of the genus *Croton* and the genus *Astraea*, that have great biological potential and more than one thousand species distributed around the world.

Palavras-Chave:

Euphorbiaceae, volatile oils, flavonoids, antioxidant activity, antiproliferative activity, *Croton*, *Astraea*.

VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira Farmacognosia* ,17: 114- 140.
- AGRA, M.F., SILVA, K.N., BASÍLIO, I.J.L.D., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 18:472-508.
- ALCÂNTARA, J. M., KAZUMY, K., YAMAGUCHI, D. L., ROCHA, J., SILVA, D. A. 2010. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). *Acta Amazonica*, 40(3) pp. 567-571.
- ALEU, J.; HANSON, J. R.; GALÁN, R. H.; COLLADO, I. G. 2001. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 329.
- AMARAL, A. C. F., BARNES, R. A.1998. A new tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 1445-1447.
- AMARAL, F.M.M., RIBEIRO, M.N.S., BARBOSA-FILHO, J.M., REIS, A.S., NASCIMENTO, F.R.F., MACEDO, R.O. 2006. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira Farmacognosia* 16: 696-720.
- APG III (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- ARAUJO-JUNIOR, V. T., DA SILVA, M. S., DA CUNHA, E. V. L, AGRA, M. D, ATHAYDE-FILHO, P. F., VIEIRA, I. J. C., BRAZ-FILHO, R.,

- BARBOSA-FILHO, J. M. 2005. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, p. 553-557.
- BAJAJ, R., CHANG, C.J., MACLAUGHLIN, J.L., POWELL, R.G., SMITH, J.R. 1986. Tiliroside from the seeds of *Eremocarpus setigerus*. *Journal of Natural products*, v. 49, p. 1174.
- BARBOSA-FILHO, J.M., MARTINS, V.K.M., RABELO, L.A., MOURA, M.D., SILVA, M.S., CUNHA, E.V.L., SOUZA, M.F.V., ALMEIDA, R.N., MEDEIROS, I.A. 2006a. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Revista Brasileira Farmacognosia* 16: 421-446.
- BARBOSA-FILHO, J.M., MEDEIROS, K.C.P., DINIZ, M.F.F.M., BATISTA, L.M., ATHAYDE-FILHO, P.F., SILVA, M.S., CUNHA, E.V.L., ALMEIDA, J.R.G.S., QUINTANS-JÚNIOR, L.J. 2006b. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16: 258-285.
- BARBOSA-FILHO, J.M., PIUVEZAM, M.R., MOURA, M.D., SILVA, M.S., LIMA, K.V.B., CUNHA, E.V.L., FECHINE, I.M., TAKEMURA, O.S. 2006c. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16: 109-139.
- BARBOSA-FILHO, J.M., VASCONCELOS, T.H.C., ALENCAR, A.A., BATISTA, L.M., OLIVEIRA, R.A.G., GUEDES, D.N., FALCÃO, H.S., MOURA, M.D., DINIZ, M.F.F.M., MODESTO-FILHO, J. 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 15: 392-413.

- BATATINHA, M.J.M., SOUZA-SPINOSA, H., BERNARDI, M.M. 1995. Croton zehntneri: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *Journal Ethnopharmacol*, 45: 53-57.
- BERRY, P. E., HIPPI, A. L., WURDACK, K. J., VAN EER, B. & RIINA, R. 2005a. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *American Journal of Botany*, v.92, p. 1520-1534.
- BERRY, P.E., CORDEIRO, I., WIEDENHOEFT, A. C., VITORINO-CRUZ, M. A. & LIMA, L. R. 2005b. *Brasiliocroton*, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae s.s. from eastern Brazil. *Systematic Botany*, v.30, p. 357-365.
- BIANCARELLI, A. *Brasil começa investir na sua "horta"*. Folha de São Paulo, 29/04/2001.
- BIGHETTI, E.J., HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., SOUZA BRITO, A.R.M. 1999. Antiinflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51: 1447-1453.
- BRUNETON, J. 2001. *Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales*. 2a ed. Editora Acribia Zaragoza.
- CABO, J.; CRESPO, M. E.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. 1986. *Planta Medica*, 20, 213.
- CARVALHAES, S.F., COSTA, D.L., MAZZEI, J.L., TADDEI, L.E.M., D'AVILA, L.A. 2002. Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian "vinca rosea" using ion exchange chromatography. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 12(Supl.): 83-84.
- CATALÁN, C.A.N., HELUANI, C.S., KOTOWICZ, C., GEDRIS, T.E., HERZ, W. 2003. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two

peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* 64: 625-629.

CATHERINE, A. R.; PACKER, L. 2003. *Flavonoids in health and disease*. 2ed. New York/ Basel. Copyright, 2003.

CHEN, Z. P., CAI, Y., PHILLIPSON, J. D. 1994. Studies on the antitumor, antibacterial and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Medica*, v. 60, p. 541-545.

COLEY, P. G., BRYANT, J. P., CHAPIN, F. S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, v. 230, p. 895-899.

CONSTANTIN, M.B., SARTORELLI, P., LIMBERGER, R., HENRIQUES, A.T., STEPPE, M., FERREIRA, M.J.P., OHARA, M.T., EMERENCIANO, V.P. & KATO, M.J. 2001. Essential Oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta Medica*, 67: 771-773.

COOK, N. C., SAMMAN, S. 1996. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. *The Journal of Nutrition Biochemistry*. v. 7, n. 1, p. 66-76.

COZZI, R., Ricordy, R., Aglitti, T., Gatta, V., Perticone, P., De Salvia, R. 1997. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis* 18: 223-228.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*, 17: 153-163.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72–79.

CUYCKENS, F., CLAEYS, M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39: 1-15.

- DE MELO, G.O., MUZITANO M.F., LEGORA-MACHADO, A., ALMEIDA, T.A., DE OLIVEIRA, D.B., KAISER, C.R., KOATZ, V.L.G., COSTA, S.S. 2005. C-glycosylflavones from the aerial parts of *eleusine indica* inhibit LPS Induced mouse lung inflammation. *Planta Medica*, 71 (4):362-363.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40.
- DOMÍNGUEZ, X.A. 1973. *Métodos de Investigacion Fitoquímica*. Editorial Limusa, México, 281 p.
- EDWARD-JONES, G., DAVIES, B., HUSSAIN, S. 2000. *Ecological economics*. An introduction. Blackewll, Oxford.
- FELIU, D.A. 2011. *Análise de terpenóides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)*. Dissertação de mestrado. IB-USP.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W. 1995. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*,33(12):1061-80.
- FOUCHE, G., CRAGG, G.M., PILLAY, P., KOLESNIKOVA, N., MAHARAJ, V.J., SENABE, J. 2008. In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 455-461.
- FURLAN, C.M., SANTOS, D.Y.A.C., MOTTA, L.B.,DOMINGOS, M., SALATINO, A. 2010. Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. *Atmospheric Pollution Research* 1: 30-35.
- GERSHENZON, J., MABRY, T. 1983 Secondary metabolites and the higher classification of angiosperms. *Nordic Journal of Botany*, 3: 5-34.
- GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L. D. C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. 2001. *Il Farmaco*, 56, 387

- GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A., LIMA, J. E., PAMPLONA, S. S. R., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. 1999. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, v. 68, p. 687-689.
- GUERRERO, M. F., CARRON, R., MARTIN, M. L., SAN ROMAN, L., REGUERO, M.T. 2001. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 75, p. 33-36.
- HARBORNE, J.B. 1993. *Introduction to ecological biochemistry*. 4ed. Academic Press. London.
- HASLAM, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59: 205-215
- HELUANI, C. S., CATALÁN, C., HERNÁNDEZ, L. R., BURGUENO-TAPIA, E., JOSEPH-NATHAN, P. 2000. Three new diterpenoids based on the novel sarcopetalane skeleton from *Croton sarcopetalus*. *Journal of Natural Products*, v.63: 2220-2225.
- HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., NUNES, D.S., SOUZA BRITO, A.R.M. 1999a. Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 341-346.
- HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., RODRÍGUEZ, J.A., BIGHETTI, E.J.B., GRASSI-KASSISSE, D.M., NUNES, D.S., SOUZA BRITO, A.R.M. 2000a. Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa. *Phytomedicine*, 9: 523- 529.
- HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., RODRÍGUEZ, J.A., HAUN, M., NUNES, D.S., SOUZA BRITO, A.R.M. 2000b. Gastroprotective effects of essential oil from the bark of *Croton cajucara*

Benth(Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 69: 229-234.

HIRUMA-LIMA, C.A., SPADARI-BRATFI, R.C., GRASSI-KASSISSE, D.M., SOUZA BRITO, A.R.M. 1999b. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 65: 325- 330.

HODEK P, TREFIL P, STIBOROVÁ M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico Biological Interactions* ,139(1):1-21.

ITOKAWA, H., ICHIHARA, Y., MOCHIZUKI, M., ENOMORI, T., MORITA, H., SHIROTA, H., INAMATSU, M., TAKEYA, K. 1991. A cytotoxic substance from sangre-de-drago. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.39, p. 1041-1042.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73, n. 3, p. 285-290.

JOLY, A.B. 1976. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 3a. ed. Editora Nacional, São Paulo.

JONES, K. 2003. 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* Med 9: 877-896.

KAWAI, K., TSUNO, N. H., KITAYAMA, J., OKAJI, Y., YAZAWA, K., ASAKAGE, M., YAMASHITA, H., WATANABE, T., TAKAHASHI, K., NAGAWA, H. 2005. *Anti-angiogenic properties of plaunotol*. *Anti-Cancer Drugs*, v.16, p. 401-407.

KOEHN, F.E., CARTER, G.T. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 206-220.

- KOGA, T., INOUE, H., ISHII, C., OKAZAKI, Y., DOMON, H., UTSUI, Y. 2002. Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, p. 133-136.
- LENCINA, C., PIRES, V.S., GOSMANN, G., TAKETA, A.T.C., SCHENKEL, E.P. 2001. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* BAILL. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 11, n. 2, p. 89.
- LIMA, L.R. 2006. *Estudos Taxonômicos em Croton seção Lamprocroton (Müll Arg.) Pax (Euphorbiaceae)*. Tese de doutorado. IB- USP.
- LIN, M., ANDERSON, H., FLAVIN, M.T., PAI, Y.S. 1997. In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal Natural Products*, vol. 60 884-8.
- LOGUERCIO, A. P., BATTISTIN, A., VARGAS, A. C., HENZEL, A., WITT, N. M. 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcóolico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, v. 35, n. 2, p. 371-376.
- LOPES E LOPES, M.I., SAFFI, J., ECHEVERRIGARAY, S., HENRIQUES, M. SALVADOR, J.A.P. 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal Ethnopharmacology*, 95: 437-445.
- LUCENA. M.F.A. 2000. *Estudos taxonômicos sobre o gênero Croton L. Crotonoideae-Euphorbiaceae) nas zonas da Mata e Litoral do Estado de Pernambuco*. Recife, 136p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. 1970. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer Verlag.

- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. 2002a. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, Vol. 25, N. 3, p. 429-438.
- MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA JUNIOR, V.F., MARTINS, J.R., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A., LAPA, A.J., VANDERLINDE, F.A. 2002b. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a modern health system. *Recent Progress In Medicinal Plants: Phytochemistry And Pharmacology II*, 8: 459-475.
- MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, p. 271-277.
- MANACH, C., MORAND, C., DEMIGNE, C., TEXIER, O., REGERAT, F., REMESY, C. 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 409: 12-16.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5):727-47.
- MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N. 2002. Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21): 5837–5843.
- MARCHAND, L. L. 2002. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 296-301.
- MARINHO, C.G.S., DELLA LUCIA, T.M.C., G UEDES, R.N.C., RIBEIRO, M.M.R., L IMA, E.R. 2005. b-eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.117, p.89-93.

- MARINHO, C.G.S., RIBEIRO, M.M.R., DELLA LUCIA, T.M.C., GUEDES, R.N.C. 2006. Aggressive response of pest ant species to b- eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v.47, n.2, p. 445-454.
- MARKHAM, K. R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- MARSARO, JUNIOR, A.L., SOUZA, R.C., DELLA LUCIA, T.M.C., FERNANDES, J.B., S ILVA, M.F.G.F., VIEIRA, P. C. 2004. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, v.30, n.9, p.1771-1780.
- MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D. C. E DIAS J. E. 1998. *Plantas medicinais*. Editora Universidade Federal de Viçosa.
- MATOS, F. J. A. & LORENZI, H. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas*. Instituto Plantarun de Estudos da Flora LTDA.
- MATOS, F.J.A. 2000. *Plantas Medicinais*. 2 ed. Fortaleza:Editora UFC.
- MATOS, L. M.M. 2011. *Química de espécies nativas de Croton L. (Euphorbiaceae)*. Dissertação de mestrado. IB-USP.
- MELO, E.A.; GUERRA, N.B. 2002. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11.
- MONTANARI, I. J. 2005. *Avaliação de genótipos de Pfaffia glomerata (SPRENG) Pedersen visando seu cultivo comercial*. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento vegetal) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas.

- MORAIS, S. M, CATUNDA, F.E.A.J., SILVA, A. R.A., NETO, J. S.M., RONDINA, D., CARDOSO, J. H. L. C. 2006. Atividade Antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Química Nova*, Vol. 29, No. 5, 907-910.
- MOTTA, L.B., FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C., SALATINO, M.L.F., DUARTE-ALMEIDA, J.M., NEGRI, G., CARVALHO, J.E., RUIZ, A.L.T.G., CORDEIRO, I, SALATINO, A. 2011. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Revista brasileira de farmacognosia*, vol 21, no. 6.
- MOURA, M.D., SILVA, J.S., OLIVEIRA, R.A.G., DINIZ, M.F.F.M., BARBOSA-FILHO, J.M. 2002. Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21: 67-74.
- MOURA, M.D., TORRES, A.R., OLIVEIRA, R.A.G., DINIZ, M.F.F.M., BARBOSA-FILHO, J.M. 2001. Natural products inhibitors of models of mammary neoplasia. *British Journal of Phytotherapy*, 5: 124-145.
- MÜLLER, J. 1866. *Euphorbiaceae exceto subordo Euphorbieae*. Prodrromus Systematics Universalis Regni Vegetabilis. (A.P. De Candolle, ed.), v. 15, p. 189-1286.
- MÜLLER, J. 1873. Euphorbiaceae. In: MARTIUS, C.F.P. & EICHLER, A.G. (eds.). *Flora Brasiliensis*, v. 11, p. 1-750, pl. 1-104.
- NARDI, G.M., FELLIPI, 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. 2003. Antiinflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*, 10, 176–184.

- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v.66, p.1022-37.
- OLIVEIRA, A.C., LEAL-CARDOSO, J.H., SANTOS, C.F., MORAIS, S.M., COELHO-DE-SOUSA, A.N. 2001. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1471-1474.
- PALMEIRA, S.F.,J., ALVES, V.L , MOURA, F.S., VIEIRA, L.F.A., CONSERVA, L.M., LEMOS, R.P.L.2006 Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16: 397-402.
- PERAZZO, F.F., CARVALHO, J.C.T., RODRIGUES, M., MORAIS, E.K.L., MACIEL, M.A.M. 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17: 521-528.
- PEREIRA, A. D., CARBONELL, S. A., NETO, F. R. D., AMARAL, A. C. F, BARNES, R. A. 2002. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. *Journal of Chromatography*, v. 947, p. 255-265.
- PETERSON, J., DWYER J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18(12):1995-2018.
- PIETERS, L., DE BRUYNE, T., CLAEYS, M., VLIETINCK, A., CALOMME, M., BERGHE, D. V. 1993. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South-American dragons blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell-proliferation. *Journal of Natural Products*, v.56, p. 899-906.

- PINTO, A.C., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S. 2002. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Quimica Nova* 25: 45-61.
- PUEBLA, P., CORREA, S. X., GUERRERO, R., FELICIANO, A. S. 2005. Phenylbutanoid derivatives from *Croton schiedeanus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, p. 849-854.
- RANAU, K. P., FLORÊNCIO, D. C., FERREIRA, C. P., XAVIER, H. S., 2004. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 14, n. 2, p. 89-96.
- RANAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. 2002. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmótica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, V. 14, n. 2.
- RATTY, A., K., DAS, P. N. 1998. Effects of Flavonoids on Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure-Activity Relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 39, 69-79.
- ROCHA, F.F., NEVES, E.M.N., COSTA, E.A., MATOS, L.G., MÜLLER, A.H., GUILHON G.M.S.P., CORTES, W.S., VANDERLINDE, F.A. 2008. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 18: 344-349.
- ROSSI, D., BRUNI, R., BIANCHI, N., CHIARABELLI, C., GAMBARI, R., MEDICI, A., LISTA, A., PAGANETTO, G. 2003. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomedicine*, v.10, p. 139-144.

- SALATINO, A., SALATINO, M. L. F., NEGRI, G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 11-33.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N. N., CLARK, M., ANGELES, F. M., LAO, J., BUSTAMANTE, S., MILLER, M. J. S. 2002. Sangre de grado *Croton palonostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 121-129.
- SANTOS, P.M.L., SCHRIPSEMA, J., KUSTER, R.M. 2005. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 15: 321-325.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D.A., FARIA, A.R. 2007. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17: 455-465.
- SAVIETTO, J. P. 2011. *Análise fitoquímica e atividade antiproliferativa de espécies nativas de Croton L. (Euphorbiaceae)*. Dissertação de mestrado. IB-USP.
- SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M. L. SAPONINAS. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. DE, MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. 2002. *Farmacognosia; Da planta ao medicamento*. 4 ed. Florianópolis: Ed. Da UFSC, p. 301-330.
- SILVA, C.C.F. 2008. *Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim*. Dissertação de Mestrado. IB-USP.
- SILVA, J.S., MOURA, M.D., OLIVEIRA, R.A.G., DINIZ, M.F.F.M., BARBOSA-FILHO, J.M. 2003. Natural products inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine*, 10: 221-232.

- SIMÕES, C.M.A., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. 2000. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2^a ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC.
- SIMOES, C.M.O., SPITZER, V. 2003. *Óleos Voláteis*. In: Simoes, C.M.O., Schenkel, E.P.,Gosmann, G., Mello, J.C. P., Mentz, L.A. & Petrovick, (orgs). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianopolis: Ed. UFSC. p.467
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN. J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 82: 1107-1112.
- SOUZA, M.A.A., SOUZA, S.R., VEIGA, J.V.F., CORTEZ, J.K.P.C., LEAL, R.S., DANTAS, T.N.C., MACIEL, M.A.M. 2006. Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16 (Supl.): 599-610.
- SPENCER, C. M., CAI, Y., MARTIN, R., GAFFNEY, S. H., GOULDING, P., MAGNOLATO, D., LILLEY, T. H., HASLAM, E. 1988. Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27, 2397–2409.
- TISSERAND, R.; BALACS, T. 1999. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*, Churchill Livingstone: London.
- TORRICO, F., CEPEDA, M., GUERRERO, G., MELENDEZ, F., BLANCO, Z., CANELÓN, D.J., DIAZ, B., COMPAGNONE, R.S., SUÁREZ, A.I. 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-

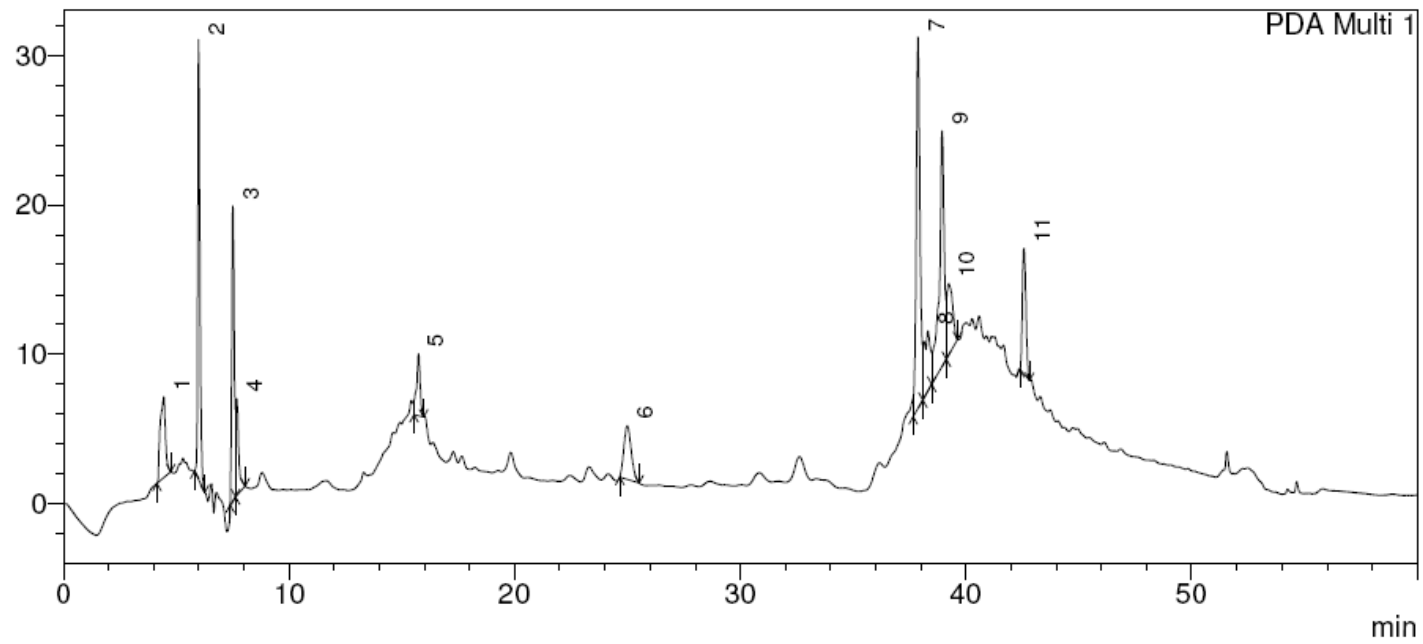
- induced diabetic rats. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17: 166-169.
- TRUEBA, G. P. 2003. *Los Flavonóides: antioxidantes o prooxidantes*. *Revista Cubana Investigaciones Biomedicas*, v. 1, n. 22, p. 48-5.
- VAN Ee, B.W., RIINA, R., BERRY, P. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). 2011. *Taxon*. V. 1, p. 33.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano Oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica nova*, 30, 1323.
- VIEGAS, M.C; BASSOLI, D.G. 2007. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-INNOWAX2007. *Química Nova*, 30(8): 2031-2034.
- WALTER, B. M. T. 2000. *Biodiversidade e recursos genéticos: Questões e conceitos*. Embrapa, doc. 46, 48pp.
- WEBSTER, G.L. 1992. Realignment in American *Croton* (Euphorbiaceae). *Novon*, v. 2, p. 269-273.
- WILSON. S.R., NEUBERT, L.A., HUFFMAN, J.C. 1976. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from *Croton californicus*. *Journal of the American Chemical Society*, 98: 3669-3674.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Revista Panamericana Salud Publica*.,Nov;12(5):366-70.

- WURDACK, K. J., HOFFMANN, P. & CHASE, M. W. 2005. Molecular phylogenetics analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. *American Journal of Botany*, v. 92, p. 1397-1420.
- YANG, C.S., LANDAU, J.M., HUANG, M.-T., NEWMARK, H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, v. 21, p. 381-406.
- YANG, J.H., MAU, J.L., KO, P.T., HUANG, L.C. 2000. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chemistry*, 71, 249–254.
- YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. 2001. *Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental*. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. (eds.). *Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, p.17-46.
- ZHENG, G.Q., KENNEY, P.M., LAM, L.K.T. 1992. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia-caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, 55: 999-1003.
- ZIAEI, A., RAMEZANI, M., WRIGHT, L., PAETZ, C., SCHNEIDER, B., IRGHOFRAM, Z. 2010. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytotherapy Research*, 25(4), 557-562.
- ZUANAZZI, J.A.S. 2000. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.A., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2ª ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 489-516.

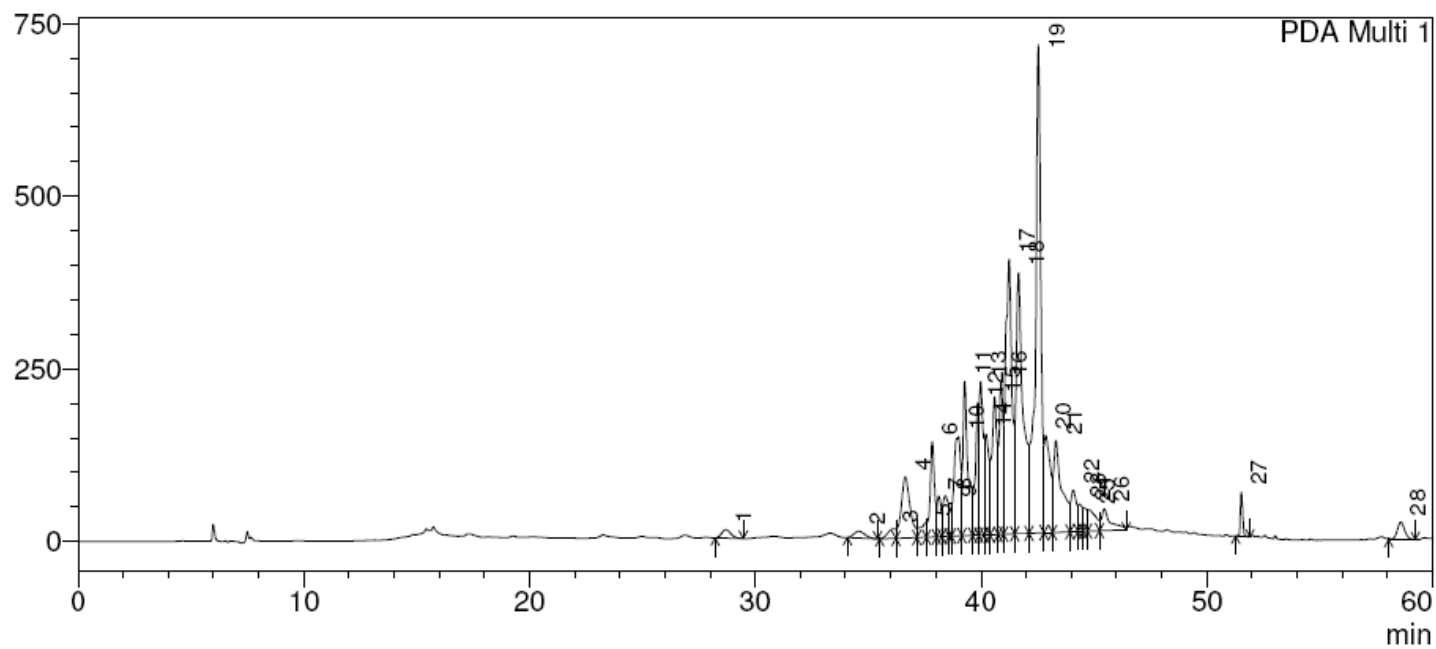
IX ANEXO

ANEXO I - Cromatogramas CLAE/UV de *Croton glandulosus*, *Croton campestris*, *Croton lundianus*, *Astraea lobata*, *Astraea comosa*, *Croton triqueter* de amostras dos caule e das folhas.

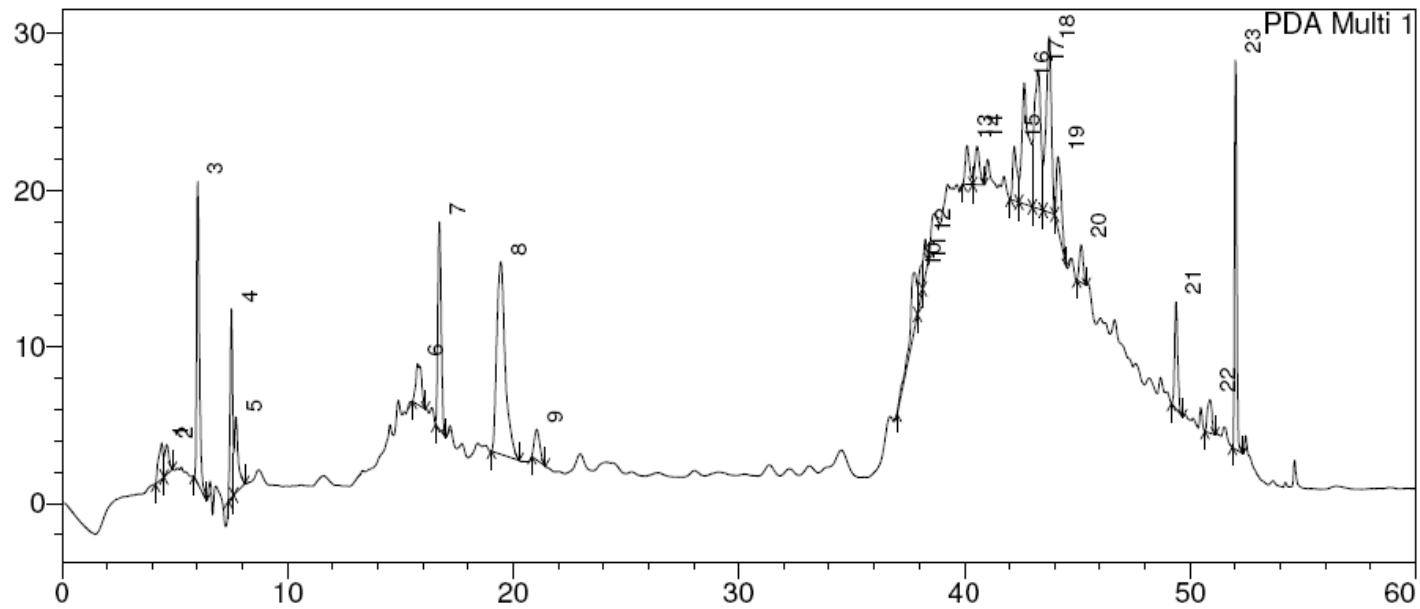
Croton glandulosus - Caule



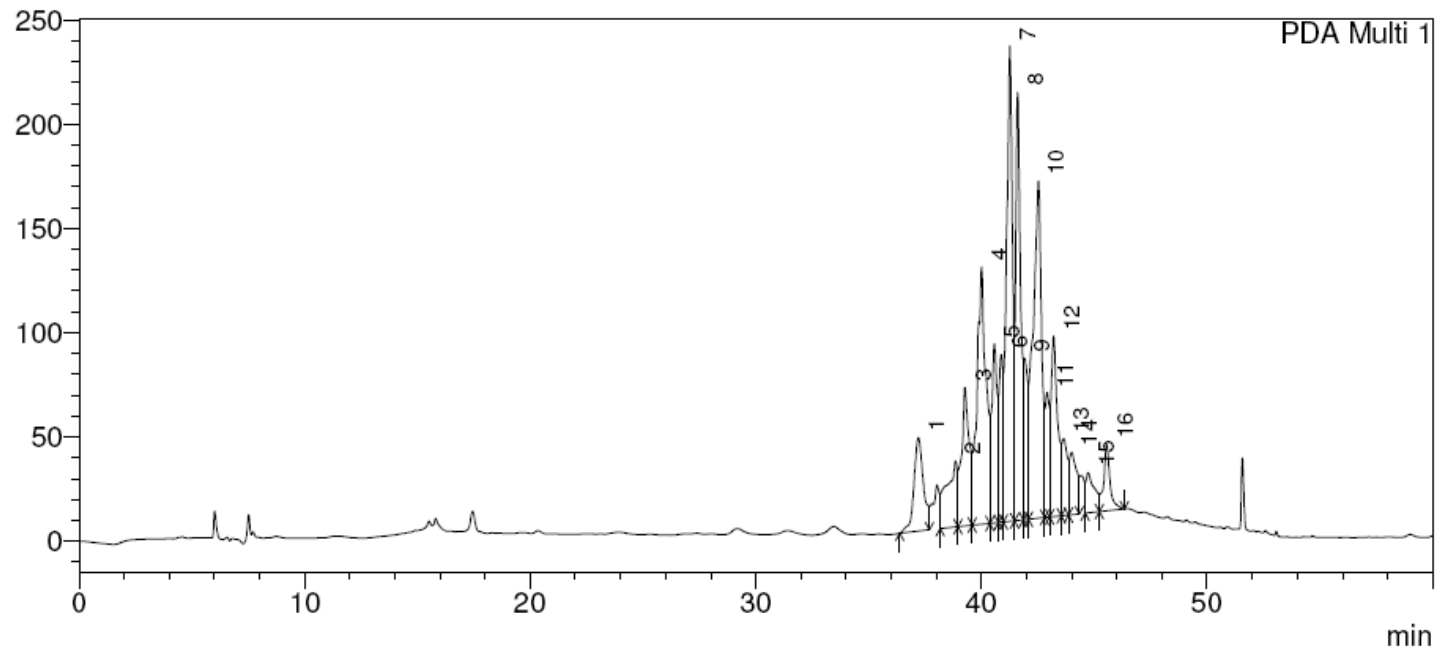
Croton glandulosus - Folha



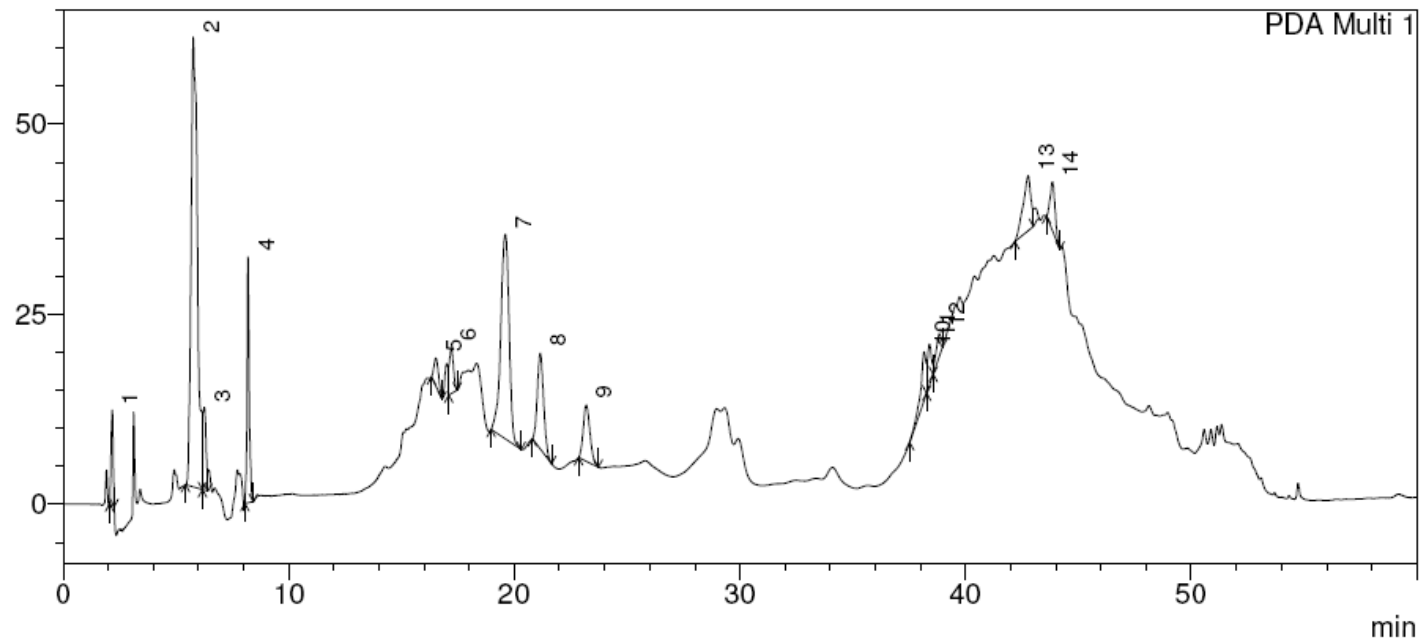
Croton campestris - Caule



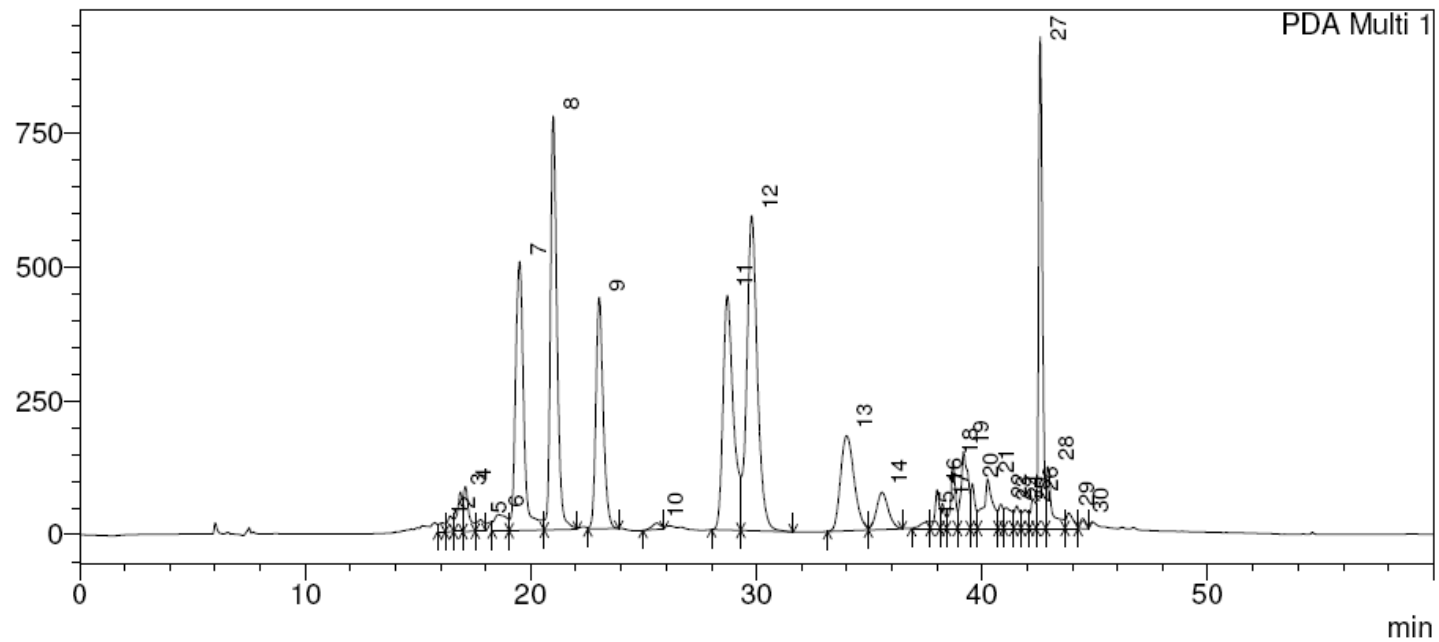
Croton campestris - Folha



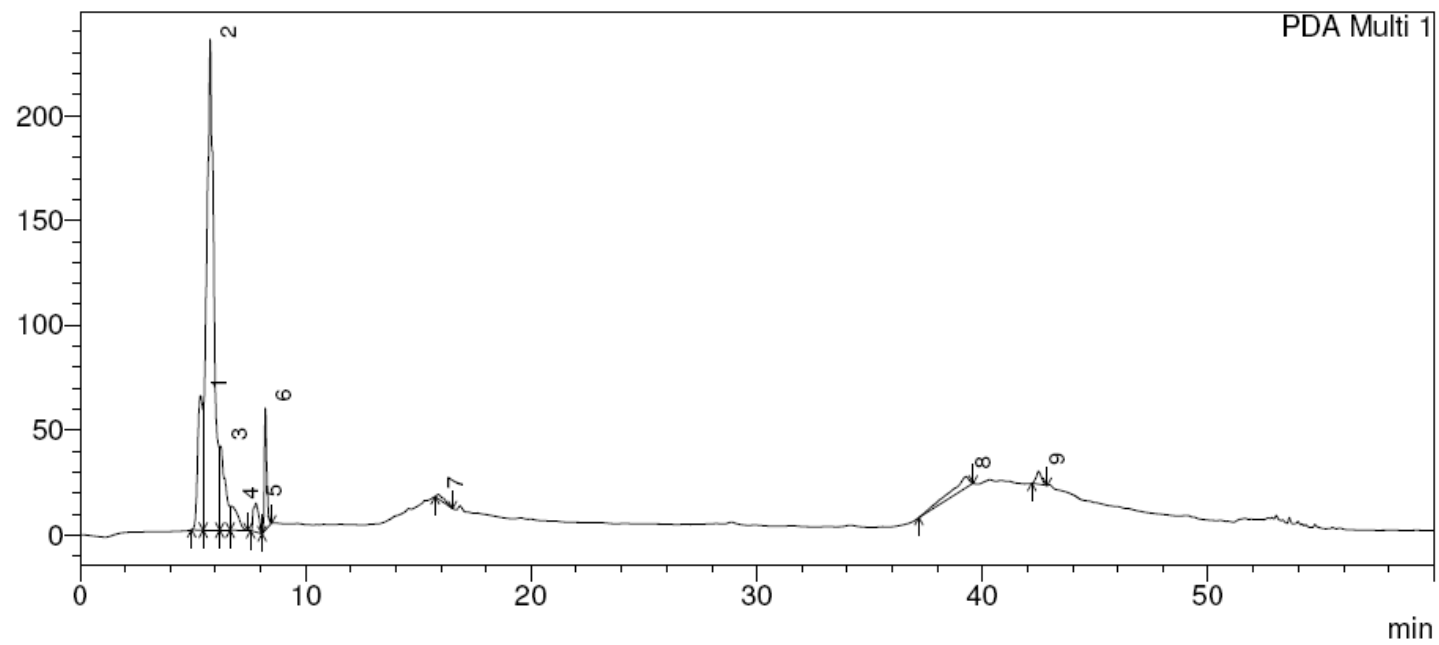
Croton lundianus - Caule



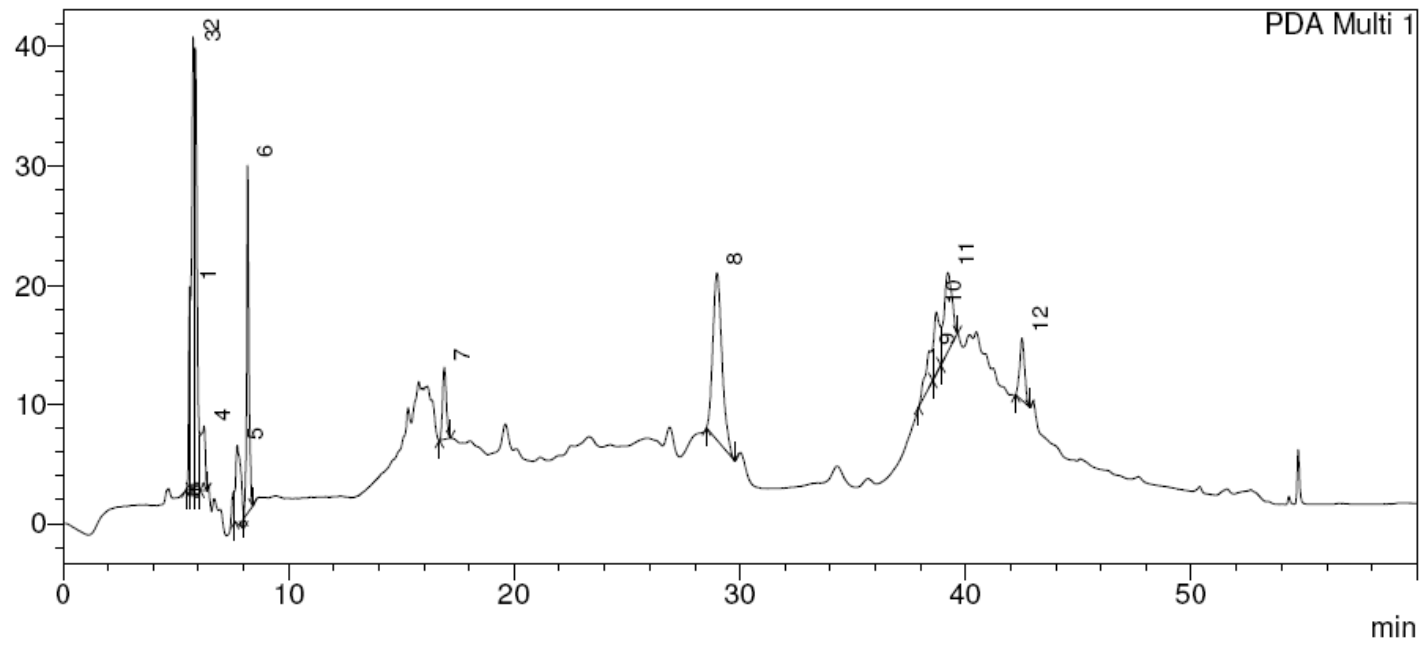
Croton lundianus - Folha



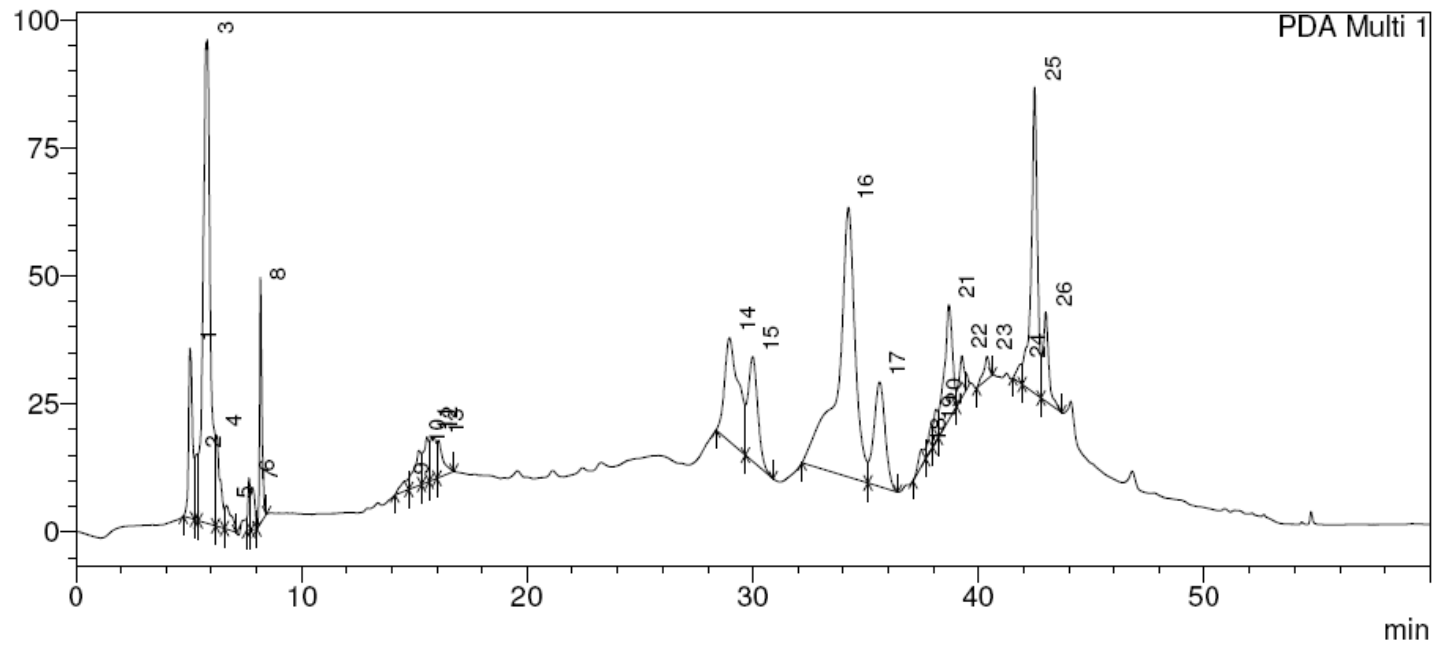
Astraea lobata - Caule



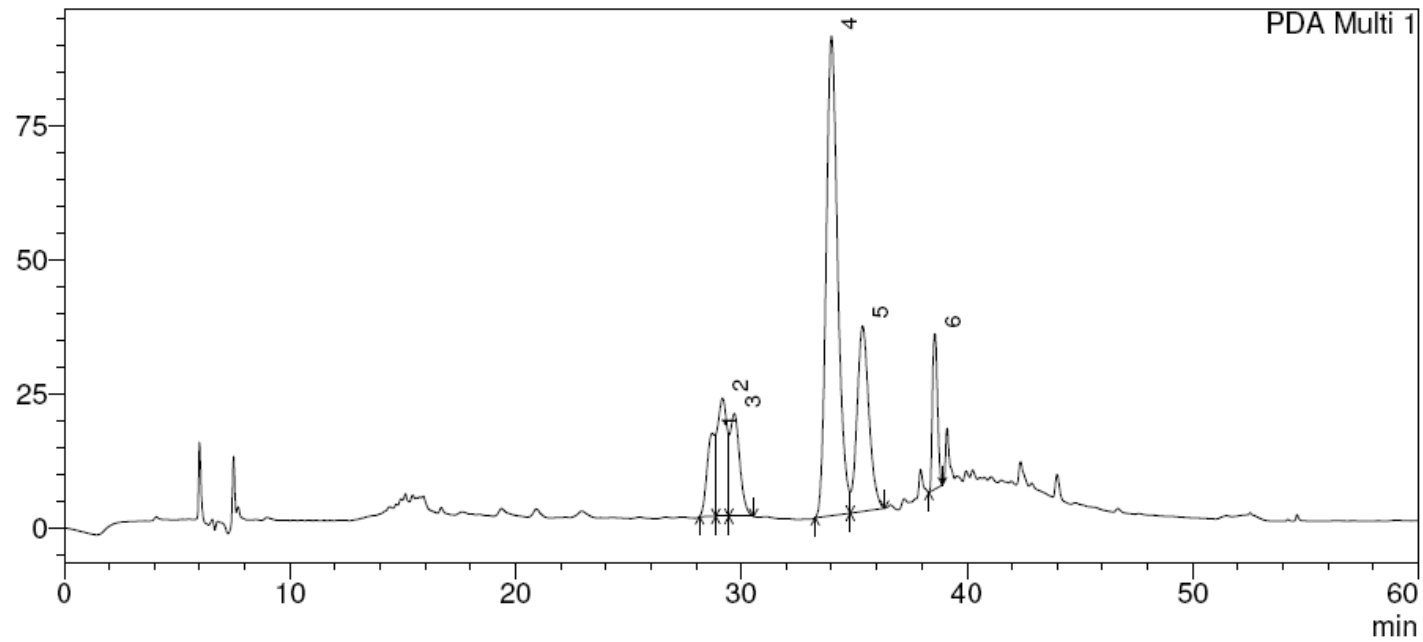
Astraea lobata - Folha



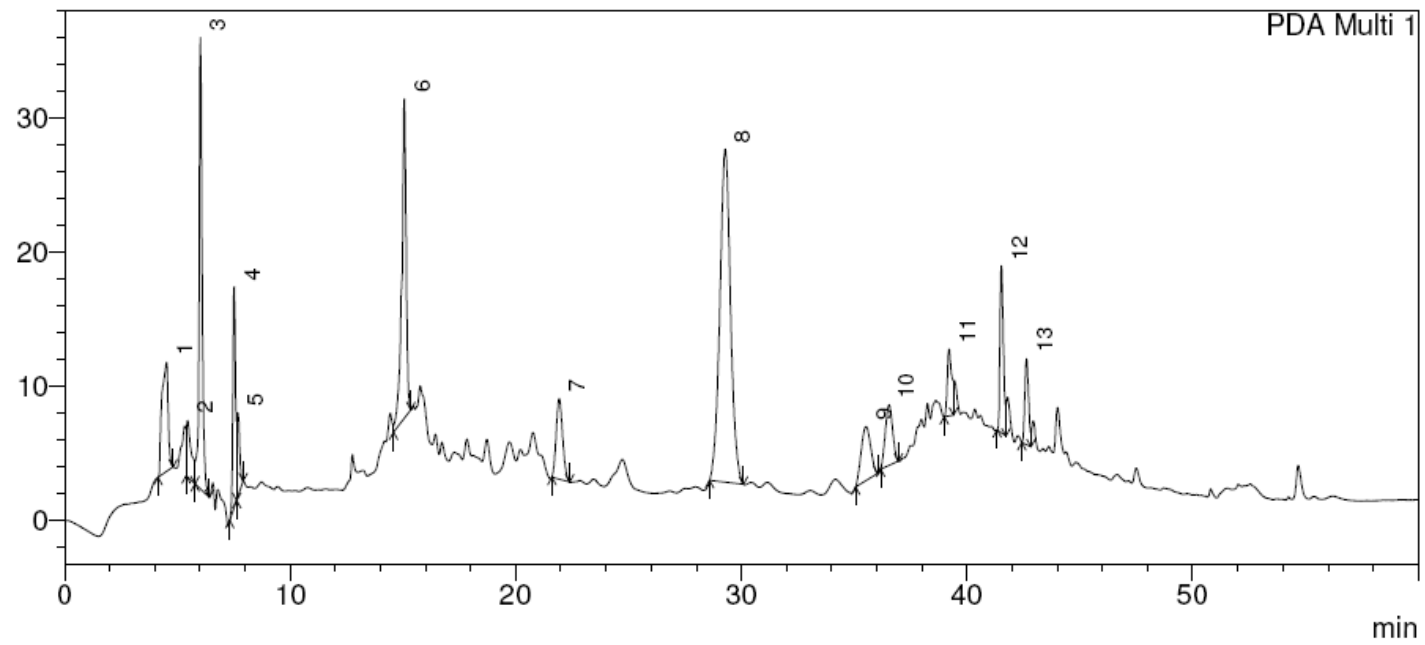
Astraea comosa - Caule



Astraea comosa - Folha



Croton triqueter - Caule



Croton triqueter - Folha

