



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
IASMINE ANDREZA BASILIO DOS SANTOS ALVES

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E ETNOFARMACOLÓGICO DE *Croton cordiifolius* BAIL. (EUPHORBIACEAE)

RECIFE

2017

IASMINE ANDREZA BASILIO DOS SANTOS ALVES

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E ETNOFARMACOLÓGICO DE *Croton cordiifolius* BAIL. (EUPHORBIACEAE)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Co-orientadora: Prof. Dra. Karina Perrelli Randau

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A474e Alves, Iasmine Andreza Basilio dos Santos.
Estudo farmacognóstico e etnofarmacológico de *Croton cordiifolius* Bail.
(Euphorbiaceae) / Iasmine Andreza Basilio dos Santos Alves. – 2017.
128 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Rafael Matos Ximenes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Botânica. 2. Croton. 3. Inflamação. 4. Química. I. Ximenes, Rafael Matos (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-059)

IASMINE ANDREZA BASILIO DOS SANTOS ALVES

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E ETNOFARMACOLÓGICO DE *Croton cordiifolius* BAIL. (EUPHORBIACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: obtenção e avaliação de produtos naturais e bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, para obtenção do grau de doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado em: 13 de janeiro de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes
Departamento de Antibióticos – UFPE

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva
Departamento de Antibióticos – UFPE

Prof^a. Dr^a. Cristiane Moutinho Lagos de Melo
Departamento de Antibióticos – UFPE

Prof^a. Dr^a. Flávia Carolina Lins da Silva
Departamento de Biologia – UFRPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITORA

Profa. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Rafael Matos Ximenes

RECIFE

2017

Dedico este trabalho a Deus, por me conceder a dádiva da vida, aos meus pais, Iasnaia e Roberto, por estarem sempre ao meu lado, à minha irmã, Monique, por ser uma companheira insubstituível, ao meu esposo, Bruno, por toda paciência e amor que tem me dado, ao meu filho, que ainda em meu ventre tem acompanhado as etapas finais do doutorado, e a todos os meus familiares e amigos, cujo apoio foi fundamental no decurso de minha jornada.

AGRADECIMENTOS

À meu orientador, Rafael Matos Ximenes, por todo o incentivo, dedicação, amizade e apoio integral no desenvolvimento deste trabalho e no meu amadurecimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, Karina Perrelli Randau, pelo respaldo científico e pessoal.

A todos os meus colegas de laboratório, pela compreensão, tolerância, amizade e significativa contribuição nas atividades de pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus colegas de trabalho e amigos da Faculdade IBGM, Laércio Guerra, Renata Maia e todos os coordenadores de curso, pelo constante incentivo e apoio.

Aos meus pais, irmã, esposo e familiares, cujo amparo constituiu um dos pilares para a concretização deste trabalho.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

O gênero *Croton* é um dos predominantes na caatinga, destacando-se pela diversidade de constituintes químicos, usos etnofarmacológicos e atividades biológicas comprovadas. *Croton cordiifolius*, apesar de ser amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de inflamação, dor e distúrbios gastrointestinais, ainda não foi caracterizada nos âmbitos botânico, químico e farmacológico. Este trabalho realizou uma padronização farmacognóstica e avaliou as atividades anti-inflamatória e antioxidante das cascas do caule de *C. cordiifolius*. Para a caracterização farmacobotânica, foram analisadas em microscópio lâminas semipermanentes da raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar. O extrato etanólico do caule de *C. cordiifolius* (EECc) foi obtido por maceração numa proporção de 10% p/v e posteriormente fracionado com hexano, acetato de etila e água:metanol. O óleo essencial (OECc) foi extraído por hidrodestilação. A composição química do extrato e óleo essencial das cascas do caule de *C. cordiifolius* foi analisada por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada mediante quantificação de fenólicos totais e flavonoides e pelos métodos do fosfomolibdênio, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺) e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada por cinco modelos agudos de indução de edema em camundongos: forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), ácido araquidônico (AA), fenilpropiolato de etila (EPP), fenol e capsaicina, e pelo modelo crônico de múltiplas aplicações de óleo de cróton. A pesquisa pela fase ativa foi avaliada pelo ensaio do PMA. A caracterização microscópica revelou a presença de esclerênquima circundando o sistema vascular na raiz, núcleos isolados de floema na região medular do caule primário, lâmina foliar hipostomática, tricomas estrelados com base multicelular presentes no caule primário, pecíolo e lâmina foliar. O EECc apresentou alcaloides, mono- e sesquiterpenos, flavonoides, fenilpropanoides, triterpenos, esteroides e cumarinas. Os principais compostos do OECc foram α -pineno (51.76%) e β -pineno (19.08%). O EECc apresentou atividade antioxidante *in vitro* e anti-inflamatória *in vivo*. A padronização farmacobotânica contribuiu na diferenciação de *C. cordiifolius* de outras espécies do gênero. A análise da composição química do óleo e do extrato foi relatada pela primeira vez na literatura. Os resultados das análises *in vitro* e *in vivo* corroboram com a utilização popular de *C. cordiifolius* como um agente anti-inflamatório.

Palavras-chave: Botânica. *Croton*. Inflamação. Química.

ABSTRACT

The genus *Croton* is one of the most predominant in caatinga, standing out for the chemical constituents diversity, ethnopharmacological uses and proven biological activities. *Croton cordiifolius*, although widely used in traditional medicine for the treatment of inflammation, pain and gastrointestinal disorders, has not yet been characterized in the botanical, chemical and pharmacological fields. This work performed a pharmacognostic standardization and evaluated the anti-inflammatory and antioxidant activities of *C. cordiifolius* stem bark. For the pharmacobotanical characterization, semipermanent slides of root, stem, petiole and leaf blade were analyzed under microscope. *C. cordiifolius* bark ethanolic extract (CcEE) was obtained by maceration in a proportion of 10% w/v and later fractionated with hexane, ethyl acetate and water:methanol. The essential oil (CcEO) was extracted by hydrodistillation. The chemical composition of *C. cordiifolius* stem bark extract and essential oil was analyzed by thin layer chromatography and gas chromatography, respectively. The antioxidant activity was evaluated by total phenolics and flavonoids quantification and by phosphomolybdenum, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) methods. The topical anti-inflammatory activity was evaluated by five acute models of edema induction in mice: 12-myristate 13-acetate phorbol (PMA), arachidonic acid (AA), ethylphenylpropiolate (EPP), phenol and capsaicin, and by multiple applications of croton oil model. Research by the active phase was evaluated by PMA assay. Microscopic characterization revealed the presence of sclerenchyma surrounding the vascular system at the root, isolated nuclei of phloem in the medullary region of primary stem, hypostomatic leaf blade, starry trichomes with multicellular base present in primary stem, petiole and leaf blade. The CcEE presented alkaloids, mono- and sesquiterpenes, flavonoids, phenylpropanoids, triterpenes, steroids and coumarins. The main compounds of CcEO were α -pinene (51.76%) and β -pinene (19.08%). CcEE showed *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-inflammatory activity. Pharmacobotanical standardization contributed to the differentiation of *C. cordiifolius* from other species of the genus. The analysis of oil and extract chemical composition was first reported in the literature. The results of *in vitro* and *in vivo* analyzes, in turn, corroborate with *C. cordiifolius* popular use as an anti-inflammatory agent.

Keywords: Botany. Chemistry. *Croton*. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----------|
| Figura 1 - <i>Croton cordiifolius</i> em seu habitat natural – Caatinga nordestina (Salgueiro-PE). | 27 29 |
| Figura 2 - Migração leucocitária no processo inflamatório | |
| Figura 3 - Representação esquemática da pele, em corte transversal. | |
| Figura 4 - Secções transversais da raiz de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 53 |
| Figura 5 - Secções transversais do caule de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 54 |
| Figura 6 - Visão geral da secção transversal do pecíolo de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 55 |
| Figura 7 - Secções transversais do pecíolo de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 56 |
| Figura 8 - Secções paradérmicas da lâmina foliar de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 57 |
| Figura 9 - Secções transversais da lâmina foliar de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 58 |
| Figura 10 - Nervura central visualizada em secção transversal da lâmina foliar de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 59 |
| Figura 11 - Secção transversal da lâmina foliar de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 60 |
| Figura 12 - Maceração da raiz de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 61 |
| Figura 13 - Maceração do caule e folha de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 62 |
| Figura 14 - Maceração da folha de <i>Croton cordiifolius</i> Baill. | 63 |
| Figura 15 - Efeito do Extrato Etanólico das cascas do caule de <i>Croton cordiifolius</i> (EECc; 0,1; 0,3 e 1mg/kg, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no Teste de Edema de Orelha Induzido por Acetato de Forbol Miristato (PMA). | 67 |
| Figura 16 - Efeito do Óleo Essencial das cascas do caule de <i>Croton cordiifolius</i> (OECc; 1; 3 e 10 mg/kg, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no Teste de Edema de Orelha Induzido por Acetato de Forbol Miristato (PMA). | 68 |
| Figura 17 - Análise histológica de edema de orelha induzido por PMA. | 69 |
| Figura 18 - Efeito do Extrato Etanólico das cascas do caule de <i>Croton cordiifolius</i> (EECc; 1mg/orelha, via tópica) e indometacina (0,5 mg/kg, i.p.) no Teste de Edema de Orelha Induzido por Ácido Araquidônico (AA). | 70 |
| Figura 19 - Efeito do Extrato Etanólico das cascas do caule de <i>Croton cordiifolius</i> (EECc; 1mg/orelha, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/orelha) no Teste de Edema de Orelha Induzido por Fenilpropionato de Etila (EPP). | 71 |
| Figura 20 - Efeito do Extrato Etanólico das cascas do caule de <i>Croton cordiifolius</i> (EECc; 1mg/kg, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no Teste de Edema | 72 |

de Orelha Induzido por Fenol.

Figura 21 - Efeito do extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc, 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (acetona) no peso das orelhas no 9º dia após múltiplas aplicações de óleo de cróton (0,1 mg/orelha). 73

Figura 22 - Efeito do extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc, 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase em sobrenadante de orelhas tratadas com óleo de cróton. 74

Figura 23 - Análise histológica de edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton. 75

Figura 24 - Efeito das frações obtidas a partir do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (1 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no teste de edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA). 76

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados na prospecção fitoquímica das cascas de <i>Croton cordiifolius</i> . | 43 |
| Tabela 2 - Prospecção Fitoquímica da Casca do Caule de <i>Croton cordiifolius</i> . | 64 |
| Tabela 3 - Constituição química do óleo essencial de <i>Croton cordiifolius</i> . | 65 |
| Tabela 4 - Atividade antioxidante de <i>Croton cordiifolius</i> nos ensaios de fenólicos totais, flavonoides, capacidade antioxidante, DPPH e ABTS ⁺ . | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| AcOEt | Acetato de Etila |
| HCOOH | Ácido Acético |
| AA | Ácido Araquidônico |
| ABTS ⁺ | 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) |
| AcOH | Ácido Fórmico |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BHT | Hidroxitolueno butilado |
| DPPH | 1,1-difenil-2-picrilhidrasil (DPPH) |
| GC/MS | Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas |
| COX | Cicloxigenase |
| EAG | Equivalente de Ácido Gálico |
| EECc | Extrato Etanólico de <i>Croton cordiifolius</i> |
| EQ | Equivalente de Quercitina |
| EPP | Fenilpropriolato de Etila |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| IL | Interleucina |
| IPA | Instituto Agrônômico de Pernambuco |
| LT | Leucotrieno |
| LOX | Lipoxigenas |
| MeOH | Metanol |
| NO | Óxido nítrico |
| OECc | Óleo Essencial das cascas de <i>C. cordiifolius</i> |
| PAF | Fator ativador de plaquetas |
| PG | Prostaglandina |
| PGI ₂ | Prostaciclina |
| PH | Potencial Hidrogrniônico |
| PMA | Acetato de Forbol Miristato |
| TAC | Capacidade Antioxidante Total |
| TNF | Fator de Necrose Tecidual |
| TX | Tromboxano |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|---------------|
| eV | Eletrovolt |
| Γ | Gama |
| G | Gramas |
| °C | Graus Célsius |
| ± | Mais ou menos |
| m/v | Massa/volume |
| μg | Microgramas |
| Mg | Miligramas |
| μL | Microlitro |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| Nm | Nanômetros |
| p/v | Peso/volume |
| % | Porcentagem |
| Kg | Quilogramas |
| Kv | Quilovolt |
| v/v | Volume/volume |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 21 |
| 2.1 Etnobotânica e Importância da Pesquisa com Plantas Medicinais | 21 |
| 2.2 Família Euphorbiaceae | 22 |
| 2.3 Gênero <i>Croton</i> | 23 |
| 2.3.1 Características botânicas, químicas e farmacológicas | 23 |
| 2.3.2 <i>Croton cordifolius</i> Baill. | 27 |
| 2.4 Inflamação e Mediadores Inflamatórios | 28 |
| 2.4.1 Inflamação aguda | 29 |
| 2.4.2 Inflamação crônica | 30 |
| 2.4.3 Mediadores inflamatórios | 31 |
| 2.4.3.1 Eicosanoides | 31 |
| 2.4.3.2 Citocinas | 33 |
| 2.4.3.3 Fator ativador de plaquetas (FAP) | 33 |
| 2.4.3.4 Aminas vasoativas | 34 |
| 2.4.4 Pele e processo inflamatório | 35 |
| 2.4.4.1 Estrutura e fisiologia da pele | 35 |
| 2.4.4.2 Inflamação cutânea | 37 |
| 2.4.4.3 Doenças inflamatórias cutâneas | 38 |
| 3 OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 Objetivo Geral | 41 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 41 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 4.1 Material Botânico | 42 |
| 4.2 Caracterização Farmacobotânica | 42 |
| 4.3 Preparação do Extrato | 42 |
| 4.4 Preparação das Frações | 42 |
| 4.5 Prospecção Fitoquímica | 42 |
| 4.6 Extração do Óleo Essencial | 45 |
| 4.7 Análise Química do Óleo Essencial – GCMS | 45 |
| 4.8 Determinação da Atividade Antioxidante | 46 |
| 4.9 Animais e Aspectos Éticos | 48 |

| | |
|--|-----|
| 4.10 Análise da Atividade Anti-Inflamatória | 49 |
| 4.10.1 Edema de orelha induzido por PMA | 49 |
| 4.10.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico | 49 |
| 4.10.3 Edema de orelha induzido por fenilpropriolato de etila | 50 |
| 4.10.4 Edema de orelha induzido por fenol | 50 |
| 4.10.5 Edema de orelha induzido por capsaicina | 51 |
| 4.10.6 Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton | 51 |
| 4.10.7 Avaliação das Fases Ativas | 52 |
| 4.11 Análise Histológica | 52 |
| 4.12 Análise Estatística | 53 |
| 5 RESULTADOS | 54 |
| 5.1 Caracterização Farmacobotânica | 54 |
| 5.2 Prospecção Fitoquímica | 64 |
| 5.3 Análise Química do Óleo Essencial | 65 |
| 5.4 Determinação da Atividade Antioxidante | 67 |
| 5.5 Análise da Atividade Anti-Inflamatória | 67 |
| 5.5.1 Edema de orelha induzido por PMA | 67 |
| 5.5.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico | 71 |
| 5.5.3 Edema de orelha induzido por fenilpropriolato de etila | 71 |
| 5.5.4 Edema de orelha induzido por fenol | 72 |
| 5.5.5 Edema de orelha induzido por capsaicina | 73 |
| 5.5.6 Edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton | 73 |
| 5.5.7 Edema de orelha induzido por PMA – avaliação das frações | 77 |
| 6 DISCUSSÃO | 78 |
| 6.1 Caracterização Farmacobotânica | 78 |
| 6.2 Prospecção Fitoquímica | 80 |
| 6.3 Análise Química do Óleo Essencial | 82 |
| 6.4 Determinação da Atividade Antioxidante | 85 |
| 6.5 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória Tópica | 87 |
| 7 CONCLUSÃO | 94 |
| REFERÊNCIAS | 96 |
| APÊNDICE A – Artigo original aceito | 111 |
| APÊNDICE B – Comprovante de aceite do artigo | 113 |
| ANEXO A – Artigo submetido | 114 |

1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está documentado desde as primeiras civilizações (MACIEL et al., 2002; SANDERSAI, 2002). Os papiros egípcios, os escritos chineses nas folhas de bambu e as tábuas de argila dos sumérios estão dentre os primeiros registros. No Brasil, o uso das plantas medicinais está intrinsecamente relacionado com a cultura indígena, apesar de ter havido uma contribuição estrangeira para o aumento do arsenal terapêutico de origem vegetal, com o transporte de espécies nativas da Europa, África e outras partes da América (SIMÕES et al., 2002).

A procura cada vez maior pela utilização de terapias alternativas e complementares para o tratamento ou cura de enfermidades (VEIGA-JUNIOR et al., 2008), aliada à descoberta de vários compostos farmacologicamente ativos de origem vegetal e ao alto faturamento das indústrias farmacêuticas com a venda destes itens têm impulsionado a pesquisa na área de produtos naturais (LIMA et al., 2015; NOVELLO et al., 2012).

Neste contexto, é importante ressaltar que o Brasil apresenta como característica marcante de seu ecossistema a biodiversidade, com habitats específicos para plantas medicinais não encontrados em outras regiões do globo (COSTA-FILHO et al., 2012). Dentre eles merece destaque a caatinga, cuja diversidade química e farmacológica é pouco explorada, em contraposição ao potencial terapêutico de suas fontes vegetais. A diversidade cultural do semiárido nordestino representa uma importante fonte de informações para o desenvolvimento de estudos etnobotânicos, os quais constituem uma importante ferramenta para o maior conhecimento baseado em evidências científicas e aproveitamento adequado dos recursos naturais da região. Estudos etnodirigidos tem demonstrado que as famílias Fabaceae, Lamiaceae, Asteraceae e Euphorbiaceae destacam-se como as mais representativas, no âmbito da sua utilização, na caatinga (CREPALDI et al., 2016).

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 300 gêneros e 7600 espécies, abrangendo árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (CRONQUIST, 1981). Esta família é, quantitativamente, a segunda mais representativa da caatinga, apresentando cerca de 60 espécies do gênero *Croton* (SOUZA; KILL. ARAÚJO, 2012). Este gênero, segundo maior da família, é constituído por cerca de 1200 espécies, das quais 350 encontram-se no Brasil (SILVA et al., 2010a). Apresenta notável potencial ecológico, visto que muitas de suas espécies são pioneiras (LIMA; PIRANI, 2008), e econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido à presença de diversos metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides e terpenoides, os quais conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies e

as caracterizam como fontes promissoras de novos compostos naturais bioativos (RANDAU et al., 2004; SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009).

Na medicina popular, várias espécies do gênero *Croton* são utilizadas no tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Paralelamente, as atividades farmacológicas comprovadas para diversas espécies incluem ações anti-inflamatória (FALCÃO et al., 2005; ROCHA et al., 2008), antiulcerogênica (ALMEIDA et al., 2003), antidiabética (TORRICO et al., 2007), cicatrizante, anticancerígena, antimicótica, antibacteriana e antiviral (PIETERS; DE-BRUYNE, 1995).

Apesar do gênero *Croton* ser amplamente estudado, inclusive em relação a algumas espécies encontradas no semiárido nordestino, nenhum trabalho científico acerca da botânica, química e farmacologia das cascas do caule de *C. cordiifolius* pode ser encontrado nas bases de dados até o presente momento. Em estudo etnobotânico realizado na caatinga, nos municípios de Salgueiro, Terra Nova, Parnamirim e Serrita, esta espécie foi a terceira mais citada como medicinal, sendo utilizada principalmente para o tratamento de inflamação e dor, feridas, distúrbios intestinais e problemas no fígado (NOGUEIRA et al., 2015). Este trabalho se propõe a realizar uma padronização farmacognóstica e avaliar as atividades anti-inflamatória e antioxidante do extrato e fases da referida planta, de forma a determinar a sua eficácia terapêutica e correlacionar sua atividade farmacológica com a utilização popular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Etnobotânica e Importância da Pesquisa com Plantas Medicinais

Os primeiros registros acerca da utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças datam em mais de 2.000 anos a. C. Dentre eles, pode-se destacar a obra chinesa Pen Ts'ao de Shen Nung por volta de 2800 a. C.; a coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral depositada no Museu da Pensilvânia, datada de 2.100 a. C.; o manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus”, de 1.500 a. C., no qual haviam informações sobre 811 prescrições e 700 drogas; a catalogação de 365 ervas pelo imperador chinês Shen Nung (FIRMO et al., 2011).

É notório que a utilização de plantas medicinais pela população mundial tem crescido significativamente nos últimos tempos. A maior parte da população residente nos países em desenvolvimento utiliza a medicina tradicional para cuidados primários em saúde (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010; XIMENES et al., 2013). No Brasil, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, com segurança, eficácia e qualidade (BALBINO; DIAS, 2010).

Em decorrência da produção de inúmeros metabólitos secundários com ampla diversidade química e estrutura complexa, as plantas medicinais constituem uma promissora fonte de substâncias bioativas (SILVA, et al., 2014). Estima-se que mais da metade dos fármacos lançados pela indústria farmacêutica derivam, direta ou indiretamente, de produtos naturais como as plantas medicinais. No âmbito da busca por novos medicamentos de origem vegetal destaca-se a contribuição de diversos conhecimentos, que vão desde aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (BRANDÃO et al, 2010).

A demanda por medicamentos derivados de plantas também tem crescido exponencialmente, fato que pode ser visualizado pelo aumento de aplicações de patentes e pela grande taxa de crescimento (5-15%) para tais medicamentos no mercado mundial; no Brasil, esse crescimento ocorre na ordem de 10 a 15% ao ano (BRANDÃO et al., 2010).

Paralelamente, em detrimento do elevado custo e tempo para o desenvolvimento de fármacos sintéticos ou semi-sintéticos, o interesse pelas plantas medicinais, especialmente aquelas selecionadas por estudos etnodirigidos, com comprovações científicas de sua

eficácia e segurança terapêuticas, tem merecido destaque no âmbito das pesquisas por recursos terapêuticos alternativos (FIRMO et al., 2011).

Nesse contexto, a etnobotânica tem como objeto de estudo a relação entre as pessoas de determinada cultura e o aproveitamento do ambiente botânico ao seu redor, seja na alimentação, na construção civil, no fornecimento de fibras e vestuário, temperos, seja na medicina popular (ALBUQUERQUE, 2005). A etnofarmacologia constitui uma ferramenta útil na validação de diferentes indicações terapêuticas das plantas medicinais por meio de experimentos reprodutíveis em laboratório (HEINRICH et al., 2009). Como consequência da comprovação científica do conhecimento tradicional, a etnobotânica contribui para a descoberta de novas espécies produtoras de moléculas bioativas desconhecidas no meio científico e para a preservação de espécies com alto potencial terapêutico (ALBUQUERQUE, 2005).

Na região do semiárido nordestino estudos etnobotânicos têm identificado as famílias Fabaceae, Lamiaceae, Asteraceae e Euphorbiaceae como as mais amplamente utilizadas no âmbito medicinal. Dentre elas, as espécies de Euphorbiaceae merecem destaque em decorrência da diversidade de usos, particularmente os gêneros *Croton*, *Euphorbia* e *Jatropha* (CARTAXO et al., 2010; CREPALDI et al., 2016).

2.2 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae inclui cerca de 300 gêneros e 7600 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente América e África (CRONQUIST, 1981). Abrange cinco subfamílias, incluindo táxons uni e biovulares: *Phyllanthoideae*, *Oldfieldioideae*, *Acalyphoideae*, *Crotonoideae* e *Euphorbioideae*. Quanto ao número de espécies, os principais gêneros são *Euphorbia*, *Croton*, *Phyllanthus*, *Acalypha*, *Macaranga*, *Antidesma*, *Drypetes*, *Jatropha*, *Manihot* e *Tragia* (WEBSTER, 1994).

Esta família compreende espécies de hábito variado, desde ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras, com folhas alternas, opostas ou verticiladas, simples, lobuladas ou palmato-lobadas, de margem denteada, com espículas livres e, muitas vezes, glândulas foliares evidentes. Apresentam inflorescências racemosas ou cimosas, terminais ou axilares, com flores de perianto com segmentos livres, tricarpelados, diclinas actinomorfas, com estigmas proeminentes. Seus frutos são esquizocarpáceos ou capsulídeos e sua semente apresenta-se distribuída apenas uma por lóculo (WEBSTER, 1994).

Euphorbiaceae, segunda família mais representativa da Caatinga brasileira, foi inventariada por Lucena (2009) em áreas selecionadas como prioritárias para a conservação do referido bioma. Lucena e Alves (2010) realizaram uma atualização do número de táxons, adicionando 5 gêneros e 29 espécies na região Nordeste, em relação à listagem apresentada por Cordeiro e Carneiro-Torres (2006), das quais 6 espécies são do gênero *Croton*, endêmico na região: *Croton acradenius*, *C. lachnocladus*, *C. parodianus* Croizat, *C. laceratoglandulosus* Caruzo & Lamb, *C. pulegioides* e *C. tenuifolius*. Os três primeiros são considerados raros devido à sua baixa ocorrência em coleções locais, coleções restritas a alguns locais ou coleções antigas. Seus membros geralmente apresentam inflorescências do tipo ciátio, flores unissexuais e frutos do tipo cápsula (TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

2.3 Gênero *Croton*

2.3.1 Características botânicas, químicas e farmacológicas

O gênero *Croton* foi proposto por Linnaeus em 1753 quando descreveu as espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Sequencialmente, Baillon (1858), Mueller (1865; 1866; 1873), Bentham (1880) e Webster (1992; 1993; 1994; 2001) desenvolveram estudos sobre o gênero, especialmente o último, cuja classificação infragenérica é atualmente considerada (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009). Abrange espécies distribuídas na América do Sul, América do Norte (WEBSTER, 1994), África e Madagascar (WEBSTER, 1993). É um dos gêneros mais representativos do Nordeste brasileiro, apresentando um alto padrão de diversidade de espécies, principalmente no bioma caatinga (CARNEIRO-TORRES, 2009; RAMOS, 2013).

Este gênero é o segundo maior da família Euphorbiaceae, composto por cerca de 1200 espécies, das quais 350 estão presentes no Brasil (SILVA et al., 2010b) e cerca de 60 localizam-se na caatinga (CORDEIRO et al., 2015). Apresenta potencial ecológico notável, uma vez que muitas de suas espécies são pioneiras (LIMA; PIRANI, 2008), e econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido à presença de muitos metabólitos secundários, tais como alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos e saponinas, que conferem propriedades terapêuticas para muitas espécies (SANTOS et al., 2015).

Devido ao elevado número de espécies e problemas com a nomenclatura, polimorfismo e delimitação específica de seus representantes, o gênero *Croton* é considerado de difícil classificação taxonômica (WEBSTER, 1993). Neste contexto, desde a

revisão de Mueller em 1873, obras isoladas propuseram vários novos táxons de *Croton*, o que dificulta a identificação de espécies devido a conflitos na taxonomia do gênero (ANGÉLICO, 2011).

Suas espécies podem ser monoicas ou dioicas, com tricomas de formatos diversos (estrelados, escamiformes, entre outros). Suas folhas têm revestimento piloso, inteiro ou raramente trilobado com estípulas, especialmente nos ramos jovens. Eles têm tricomas estrelados, lepidotos ou escamosos. As flores de ambos os sexos são pequenas, esbranquiçadas e dispostas em cachos por vezes especiformes. As flores masculinas, geralmente mais numerosas, estão dispostas na parte apical, ao passo que as femininas são observadas na porção basal. As pétalas são livres e em número de 5. O número de estames varia de acordo com a espécie, nunca sendo inferior a 5. O fruto é uma cápsula triococa de 2 a 6 mm de diâmetro e as sementes são geralmente escuras e oleaginosas (CRAVEIRO, 1981).

Lucena e Alves (2010) descreveram as características botânicas de *C. acradenius*, *C. pulegioides* e *C. tenuifolius*, e os relatou como novos táxons presentes na Caatinga nordestina em comparação com o estudo de Cordeiro e Carneiro-Torres (2006). *C. acradenius* caracteriza-se pela presença de ramos ferruginosos e folhas com tricomas estrelados, folhas estreitas e elípticas, cachos terminais, sépalas, pétalas e ovários com tricomas estrelados longo-estipitados. É considerada rara na Caatinga devido à sua presença em poucos locais. *C. pulegioides* Müll. Arg. In Mart., popularmente conhecida como velandinho, barba-de-bode, mede de 1-2 m de altura, ramos dicotômicos, aroma mentolado e folhas membranosas com 2-4 glândulas cilíndricas (nectários extraflorais), stipitadopateliformes ou forma de cálice na base da lâmina. Morfologicamente semelhante a *C. pulegioides* Müll. Arg. In Mart., sendo necessária mais investigações para melhor delimitação entre os táxons. *Croton tenuifolius* Pax & K. Hoffm. é caracterizado por possuir ramos quadrangulares, di-tricotômicos, um par de estípulas linear a setácea, folhas elípticas e membranosas, com um par de nectários extraflorais stipitato-pateliformes. A superfície adaxial das folhas apresenta tricomas simples e estrelados. Outros caracteres que ajudam o seu reconhecimento são as sépalas de flores pistiladas linear-lanceoladas e a ocorrência de sementes foveolares. A semelhança com *Croton betaceus* Baill. Sugere que estudos adicionais são necessários para revelar a correta identidade de ambos (LUCENA; ALVES 2010).

Novello e colaboradores (2012) descreveram as características botânicas de *C. echioides*, que se distingue das outras espécies de *Croton* da caatinga por apresentar folhas

com a margem inteira, a presença de duas glândulas curtas-estipitadas entre pecíolo e lâmina da folha, flores estaminadas com pétalas espatuladas e flores pistiladas que são sésseis e esparsamente dispostas ao longo da inflorescência. *C. heliotropiifolius* é distinguido de *C. campestris* pelas folhas concolor, inflorescência glandular, sementes lisas e ramos com tricomas dendríticos (SÁTIRO; ROQUE, 2008).

Na medicina popular, plantas do gênero *Croton* são utilizadas para tratar infecções fúngicas, doenças gastrointestinais, hipertensão, febre, malária, inflamação, diabetes, dor, doenças do trato respiratório e como cicatrizante (ALBUQUERQUE et al., 2007; COSTA et al., 2008; ROCHA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2009, SONG et al., 2015).

Dentre as atividades farmacológicas comprovadas pode-se destacar as ações antioxidante (MORAIS et al., 2006; SHUKLA et al., 2009; ROCHA et al., 2008), anti-inflamatória e anti-nociceptiva, leishmanicida (LIMA et al., 2015) citotóxica, antimicrobiana, antiviral, anti-hiperlipidêmica e antidiabética (RODRIGUES et al., 2012; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; VEIGA-JUNIOR et al., 2008).

Devido aos compostos químicos já descritos para muitas espécies do gênero *Croton*, o mesmo pode ser caracterizado como uma fonte promissora de moléculas bioativas e como um notável potencial para a investigação (RANDAU et al., 2004). O crescente interesse em estudar as várias espécies do gênero *Croton* resultou no isolamento e identificação de mais de 100 compostos conhecidos atualmente no Brasil (ANGÉLICO, 2011; TORRES et al., 2008). Além disso, apesar de o gênero vir sendo amplamente estudado, inclusive em relação a algumas espécies encontradas no semi-árido do Nordeste brasileiro, muitas de suas espécies não foram estudadas ou tem sido pouco exploradas. Neste contexto, estudos botânicos, químicos e farmacológicos das principais espécies do gênero *Croton* na Caatinga brasileira contribuirão para fundamentar e direcionar futuras pesquisas.

Muitas espécies do gênero *Croton* são aromáticas e têm sido relatadas na literatura devido à presença de compostos voláteis em óleos essenciais, propriedade que desempenha no vegetal um papel importante no combate a fitopatógenos e que está correlacionada com a produção de terpenos, tais como alfa-pineno, limoneno e mirceno. Fenilpropanóides, tais como derivados de anetol e eugenol, foram reportados como componentes majoritários dos óleos essenciais presentes em espécies de *Croton* distribuídas em diferentes partes do mundo, tais como *C. zenhtneri* e *C. nepetaefolius* no Brasil (MORAIS et al., 2006), *C. Molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ et al., 2005), *C. pseudonivenus* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR et al., 2007). Dentre os terpenos produzidos por

espécies desse gênero também se destacam α -pineno, limoneno e mirceno (VIEGAS-JUNIOR, 2003). Radulovic e colaboradores (2006), por sua vez, relataram que a maioria das espécies de *Croton* apresentam β -cariofileno e α/β -pineno. A co-ocorrência de α e β -pineno, β -cariofileno e linalol são provavelmente características do gênero *Croton* (ALMEIDA et al., 2015).

O óleo essencial de folhas de *C. adenocalyx* apresentou 24 compostos, com monoterpenos e sesquiterpenos como constituintes principais (DE LIMA et al., 2010). O óleo essencial de *C. conduplicatus* é caracterizado pela presença majoritária de monoterpenos (ALMEIDA et al., 2015). Fontenelle e colaboradores (2008) relataram que o óleo essencial de *C. nepetaefolius* apresenta metil-eugenol e biciclogermacreno como os componentes principais, enquanto os principais constituintes do óleo de *C. argyrophyllodes* são espatulenol e biciclogermacreno, e para *C. zehntneri* são estragol e anetol. Além de diferenças na constituição do óleo essencial de espécies distintas do gênero *Croton*, vários autores têm demonstrado a constituição distinta do óleo essencial de diferentes partes da mesma espécie de *Croton* (BRASIL et al., 2009; DE LIMA et al., 2010; MORAIS et al., 2006; NEVES; CAMARA, 2012). Neves e Camara (2012) relataram pela primeira vez os constituintes dos óleos essenciais de *C. pulegioides* e *C. rhamnifolius* do bioma Caatinga. Além disso, a presença de compostos encontrados apenas em espécies brasileiras da Caatinga nordestina poderia estar relacionada com a existência de quimiotipos desta espécie encontradas apenas nesse bioma (ANGÉLICO, 2011).

Diterpenoides de vários esqueletos, tais como cembranoides, clerodanos, neoclerodanos, halimanos, isopimaranos, cauranos, secocauranos, labdanos, forbois e traquilobânicos são encontrados no gênero *Croton* (ALMEIDA et al., 2015; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007) e são correlacionados com atividades antitumorais (SILVA et al., 2014). Um diterpeno, epímero do ácido caurenico, foi isolado das raízes de *C. antisiphiliticus*, mas esta espécie requer novas investigações fitoquímicas (PEREIRA et al., 2012). Dois novos diterpenos do tipo casbano foram isolados do caule de *C. argyrophyllus* (SILVA-FILHO et al., 2011). Diterpenoides traquilobânicos e cauranos foram isolados a partir da casca da raiz de *C. floribundus* e um dos compostos mostrou atividade citotóxica (UCHÔA et al., 2013).

Uma cumarina, a 6-metoxi-7-hidroxicumarina foi identificada em *Croton adenocalyx* e *C. sonderianus* e as suas atividades biológicas incluem hipotensora, anti-espasmódica e relaxante (DE LIMA et al., 2010; MARTINS et al., 2000).

Flavonoides tem sido isolados a partir de espécies de *Croton* em todo o mundo e alguns têm sido relatados como sendo responsáveis por efeitos hipotensivo e vasorrelaxante. No Nordeste brasileiro, ianina foi encontrada em *Croton adenocalyx* (DE LIMA et al., 2010). Rodrigues e colaboradores (2006) encontraram flavonoides, antocianidinas e alcaloides nas partes aéreas de *C. argenteus*, mas não foi isolado qualquer composto. Os flavonoides 5-hidroxi-7,4'-dimetóxi-flavona, casticina e penduletina, foram isolados de *Croton betulaster* por Coelho e colaboradores (2016).

Benzoil-metilpoliois, isolados de *Croton betulaster* e *C. luetzelburgii*, foram descritos por Barbosa e colaboradores (2004) pela primeira vez para o gênero *Croton*. A presença de compostos fenólicos, tais como o ácido gálico, catequinas, ácido clorogénico, ácido cafeico, epicatequina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina e campferol foi relatada para *C. campestris* (BRITO-JÚNIOR et al., 2014).

Os usos tradicionais de *Croton* spp. têm sido frequentemente confirmados por ensaios farmacológicos. No Brasil, entre os membros da família Euphorbiaceae, este gênero apresenta o maior número de utilizações etnofarmacológicas, seguido de *Euphorbia* e *Jatropha* (TRINDADE; LAMEIRA, 2014). As atividades biológicas estudadas para os metabólitos de *Croton* incluem ações anti-hipertensiva, anti-cancro, anti-plasmódio, anti-inflamatória, anti-nociceptiva, cicatrizante de feridas, anti-diabética, antiulcerogênica, antimalárica, antimicrobiana, anti-espasmódica, anti-úlceras, anti-viral, mio-relaxante e citotóxica (DE LIMA et al., 2010; MELO et al., 2013) e são devidas, principalmente, aos compostos aromáticos.

2.3.2 *Croton cordiifolius* Baill.

Croton cordiifolius (Figura 1), popularmente conhecido como quebra-faca, é utilizada na medicina popular no tratamento de inflamação, dor e distúrbios gastrointestinais (CARTAXO et al., 2010). Em estudo etnobotânico realizado na caatinga, nos municípios de Salgueiro, Terra Nova, Parnamirim e Serrita, esta espécie foi a terceira mais citada como medicinal, sendo utilizada para o tratamento de inflamação e dor, feridas, distúrbios intestinais, problemas no fígado, prurido, gripe, problemas renais, febre, impotência, problemas no estômago, sinusite, hemorragia e diabetes (NOGUEIRA et al., 2015).

Há apenas um estudo na literatura científica que evidenciou a composição química e a atividade farmacológica do óleo essencial obtido das folhas da referida espécie vegetal. Dentre os seus constituintes majoritários, destacam-se os monoterpenos 1,8-cineol, α -

felandreno e β -cimeno, além dos sesquiterpenos γ -elemeno, espatulenol e β -cariofileno. Os monoterpenos, oxigenados ou não, representam a maior parte do óleo, perfazendo 69,15% do total. Quanto à atividade farmacológica do mesmo, observou-se um possível efeito antinociceptivo mediado pelo sistema glutamatérgico, sem a participação do sistema opioide e de canais TRPV1 (NOGUEIRA et al., 2015).

Figura 1 – *Croton cordiifolius* em seu habitat natural – Caatinga nordestina (Salgueiro-PE).



Fonte: Autor.

2.4 Inflamação e Mediadores Inflamatórios

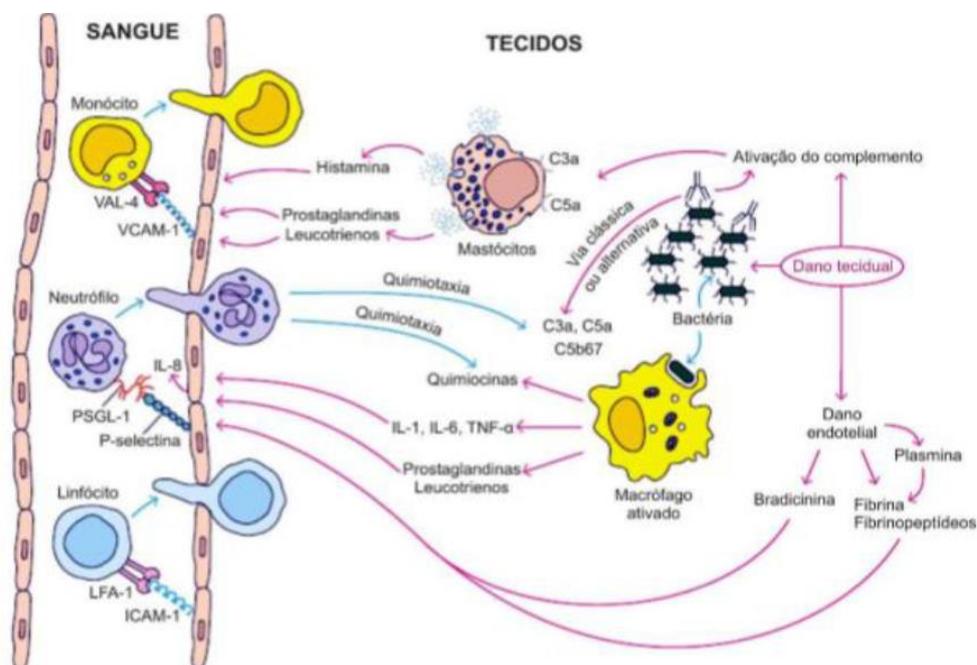
A inflamação caracteriza-se como uma resposta tecidual a agentes agressores, sejam eles físicos, químicos ou biológicos (COSTA et al., 2012; KULINSKY, 2007), que resulta na liberação de citocinas, aminas (serotonina, histamina), metabólitos do ácido araquidônico, prótons e adenosina trifosfato (ATP), dentre outros mediadores inflamatórios (DRAY, 1995; COSTIGAN; WOOLF, 2000), cujo objetivo é a eliminação da causa da lesão ou minimização dos danos causados (SILVA et al., 2014).

2.4.1 *Inflamação aguda*

A reação inflamatória pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. Na primeira fase, os sinais cardinais da inflamação são visualizados em decorrência de eventos vasculares e celulares: o rubor é consequência da vasodilatação das pequenas arteríolas, mediada pela histamina, bradicinina, prostaglandinas da série E, e prostaciclina; o calor ocorre devido ao aumento do fluxo sanguíneo após a vasodilatação; o edema é resultado do aumento da permeabilidade vascular e consequente acúmulo de conteúdo extravascular rico em proteínas induzida pelo fator ativador de plaquetas (PAF), histamina e bradicinina; a dor é ativada por prostaglandinas, prótons e ATP, além de outras proteínas inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN, 2005; RANG et al., 2011; WOOLF, 1983).

Em decorrência do aumento da permeabilidade, observa-se, ainda, o fenômeno de adesão e migração leucocitária para o local da lesão, mediado por quimioatratores, cujos representantes iniciais são os neutrófilos. Durante a quimiotaxia e fagocitose, esses agentes podem liberar substâncias tóxicas e proteases no meio extracelular, causando lesão tecidual. Dentre elas, destacam-se histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos. O NO atua como radical livre, apresentando propriedades citotóxicas para alguns microrganismos e células tumorais (SAEED et al., 2012; RANG et al., 2011; ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 2000; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). Os neuropeptídeos, como a substância P e a neurocinina A, atuam sobre os mastócitos promovendo a liberação de histamina e outros mediadores (Figura 2) (MAGGI, 1996).

Figura 2 – Migração leucocitária no processo inflamatório.



Fonte: KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008.

2.4.2 Inflamação crônica

A inflamação crônica é caracterizada por áreas de resolução e de focos inflamatórios concomitantes, com permanência do processo inflamatório por um período muito longo, tempo de duração de meses a anos e está atrelada a alterações histológicas, com presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (COLLINS, 1999; PATEL et al., 2014; RANG et al., 2011; RUBIN et al., 2006).

A resolução da resposta inflamatória, cujo objetivo é manter a homeostasia, pode ser mediada por vários mecanismos: a presença contínua de neutrófilos que, ao fagocitar, diminuem a presença de antígenos e liberação de citocinas pró-inflamatórias; a produção local e liberação de substâncias supressoras, como IL-10 e o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), por fibroblastos, macrófagos e linfócitos, que começam a finalizar o processo inflamatório (BRAD, 2000).

O TGF- β atua inibindo a expressão de moléculas co-estimulatórias sobre as células apresentadoras de antígenos, suprimindo a secreção de citocinas inflamatórias e fatores de sobrevivência das células inflamatórias, estimulando a proliferação de fibroblastos, com

consequente produção de matriz e colágeno para reparar os danos teciduais causados pela inflamação (BRAD, 2000; DEBENEDICTIS et al., 2001).

Caso o agente inicial não seja erradicado dentro de alguns dias, a inflamação prolongada resulta na formação de abscessos e cicatrizes. Nesse processo, sob estímulo das citocinas IL-4 e IL-10, os macrófagos se aglutinam e inicia-se uma resposta granulomatosa com o recrutamento de fibroblastos, culminando em fibrose cicatricial do tecido danificado (DEBENEDICTIS et al., 2001).

A inflamação crônica, ao persistir por semanas, meses ou anos, pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (LAWRENCE; GILROY, 2007). Dentre elas, que têm como patogênese uma resposta inflamatória alterada ou intensificada, pode-se destacar a doença de Crohn, esclerose múltipla, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico e vasculite sistêmica (GILROY et al., 2004).

2.4.3 Mediadores inflamatórios

Os mediadores da inflamação e substâncias correlatas compreendem o grupo dos autacoides. Nele estão integrados os eicosanóides, citocinas, cininas, fator de ativação das plaquetas, óxido nítrico, histamina, serotonina. Estes desempenham funções fisiológicas e patológicas no organismo cujo efeito pode se pronunciar na forma parácrina ou autócrina (CLAUDIANO et al., 2013).

2.4.3.1 Eicosanoides

Eicosanoides constituem o grupo das prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI₂), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e lipoxinas. As PGs compreendem três subclasses, indo do A ao J com diferentes estruturas moleculares. Todas essas substâncias são produzidas a partir da liberação do ácido araquidônico presente na membrana celular, em decorrência da atividade da enzima fosfolipase A₂. A ativação dessa enzima pode ser dada através da ação de agentes químicos, biológicos, físicos ou mecânico (SILVA, 2006; GREENE et al., 2011).

Uma vez liberado (dos fosfolipídios da membrana), o ácido araquidônico é metabolizado pela ação das enzimas cicloxigenases (COX I e COX II). Estas enzimas se expressam no organismo de forma constitutiva ou induzida, respectivamente (SILVA, 2006; GREENE et al., 2011). Elas são responsáveis pela produção das prostaglandinas (PGE₂,

PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂), tromboxanos (TX_A e TX_B) que podem atuar de como agonistas ou antagonistas no organismo (NICOLAOU, 2013; BATLOUNI, 2010).

As lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) são uma segunda classe de enzimas capazes de metabolizar o ácido araquidônico e são responsáveis pela produção dos diferentes leucotrienos (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄), lipoxinas e substâncias correlatas. Cada um desses mediadores atuará em receptores específicos presentes na membrana celular. A inativação dos eicosanóides é realizada através da enzima 15-PGDH dentre outras enzimas por meio de uma ou duas passagens pela circulação sanguínea (SILVA, 2006; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

Todavia, muitos desses mediadores produzidos têm ação reguladora por atuarem como agonista e/ou antagonista promovendo assim a defesa e reparo dos tecidos ou área lesada. As prostaglandinas (PGD₂, PGE₂ e PGI₂) atuam de um modo geral, como vasodilatadoras, aumentando com isso o fluxo sanguíneo e induzindo a dor, tendo sua ação inibida pela PGF_{2α} e TXA₂, substâncias responsáveis por causar a vasoconstrição (CLAUDIANO et al., 2013; BATLOUNI, 2010). Além da ação vasoconstritora promovida pelo TXA₂, ele atua como potente iniciador da agregação plaquetária, ao passo da PGI₂ pode atuar inibindo sua ação. Ambos TXA₂ e PGI₂ contribuem na homeostase do organismo por ter ação reguladora uma por iniciar a agregação e a outra por inibir (SILVA, 2006).

As prostaglandinas são responsáveis por diferentes respostas fisiológicas e fisiopatológicas. No trato gastrointestinal, as PGE₂ e PGI₂ (citoprotetora), estimulam a formação de muco, reduzem as secreções ácidas e elevam o fluxo de sangue na mucosa. Nas vias aéreas, PGD₂, PGF_{2α} e TXA₂ são broncoconstritores enquanto PGI₂ e PGE₂ atuam como broncodilatadores. No sistema cardiovascular, a PGD₂, PGE₂ e PGI₂ são vasodilatadores e reduzem a pressão arterial (SILVA, 2006).

Os leucotrienos (LTC₄, LTD₄) tem ação vasoconstritora e são responsáveis pela broncoconstrição. Além disso, o LTB₄ atua como agente quimiotático promovendo a migração de neutrófilos, leucócitos e desencadeando a geração de superóxido. No entanto, além da ação vasoconstritora e broncoconstritora, os leucotrienos ainda apresentam ação no aumento da permeabilidade da parede vascular, promovendo o extravasamento do plasma, portanto a formação do edema, tendo sua ação reforçada pelas PGs (WERZ; STEINHILBER, 2006).

2.4.3.2 Citocinas

As citocinas são polipeptídios (IL, TNF, dentre outras) multifuncionais, os quais desempenham importantes papéis no sistema imune e na resposta inflamatória causados por infecções e lesões (POSTAL; APPENZELLER, 2015; CALIXTO et al., 2004). São liberadas por diferentes células e agem principalmente nos macrófagos e linfócitos. Algumas têm efeito pleiotrópico por agirem em células-alvos distintas e apresentarem diferentes respostas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Suas ações podem se expressar de forma autócrina, parácrina e endócrina, portanto podem agir local e sistematicamente. Uma das principais características apresentadas pelas citocinas é o efeito sinérgico. Por isso são primordiais na formação das cascatas de reações inflamatórias, além de estimular a produção de novas citocinas. Deste modo, as citocinas, são tidas como segundo mensageiros proteicos que influenciam e interligam o sistema imune com outros sistemas fisiológicos (SILVA, 2006; RUBIN et al., 2006).

Essas proteínas exibem um amplo espectro de ação apresentando diferentes funções. Em local onde há lesão do tecido são responsáveis por regular a resposta inflamatória, por promover o aumento da permeabilidade celular e atuar na restauração do tecido. A IL-1 pode participar de quadros patológicos como artrite reumatoide, choque séptico, doenças autoimunes dentre outras. Além disso, algumas citocinas podem ter ação pró-inflamatória (IL-1 β , IL-2, IL-18, INF- γ e TNF- α) por iniciar a cascata de inflamação, bem como anti-inflamatória como (IL-4, TGF- β e IL-1RA) (JAIN et al., 2013; CALIXTO et al., 2004; SILVA, 2006).

A liberação e a produção dessas proteínas podem ser observadas durante a formação de um processo inflamatório agudo, onde há produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2 e TNF- α , além de eicosanoides, na qual dá início a uma série de reações durante o processo inflamatório. Além disso, as citocinas são responsáveis por potencializar a ação das PGE₂ responsáveis por causar dor e febre (SAEED et al., 2012).

2.4.3.3 Fator ativador de plaquetas (PAF)

Oriundo de diferentes células, o PAF é derivado a partir da metabolização de alquilacilglicero-fosfolinas através da ação de duas enzimas fosfolipase A₂ e acetil-CoA. A produção do PAF por essa via leva também a formação do ácido araquidônico e, conseqüentemente, à liberação de outros mediadores. Outra via que pode levar à produção

do PAF é através da metabolização do 1-alkil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfato por meio da ação enzimática da fosfocolina transferase (SILVA, 2006).

O PAF é um mediador pró-inflamatório multifuncional que pode agir de forma rápida ou permanecer no local da inflamação por um tempo maior. Além disso, o PAF promove a agregação plaquetária, broncoconstrição, vasoconstrição nos pulmões, estimula o aumento da permeabilidade vascular levando a formação de edema tanto na pele como nos rins e pulmões (SINGH, et al., 2013; SILVA, 2006). Deste modo, o PAF pode ser encontrado em diferentes sistemas tais como: gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, renal e reprodutor. Assim, o mesmo, produzido em excesso, contribui no surgimento de diferentes patologias como aterosclerose, asma, choque, anafilaxia, insuficiência respiratória aguda e crônica, artrite reumatoide (SINGH et al., 2013; SATON; EBINA, 2013).

2.4.3.4 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas são representadas pela histamina e serotonina. A histamina é produzida através da histidina em reação catalisada pela enzima L-histidina descarboxilase na presença de fosfato. Uma vez produzida, a histamina é armazenada em grânulos presentes em monócitos e basófilos, estando presente em diversos tecidos na forma pré-formada, sendo encontrada em maior concentração na pele, pulmão e mucosa intestinal (SILVA, 2006).

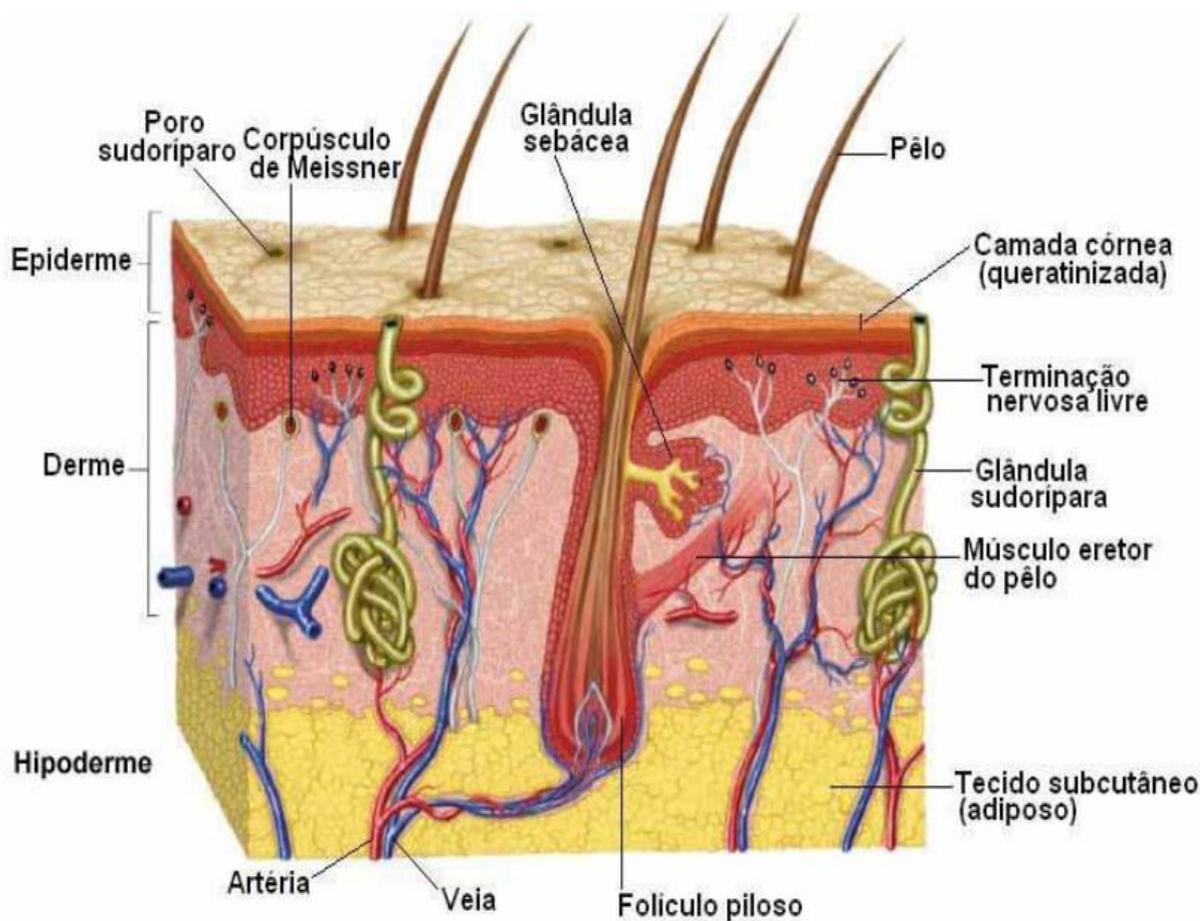
Quando há liberação da histamina por meio da degranulação (mastócitos ou basófilos) através de estímulo que pode ser imunológico, químico ou mecânico, a mesma poderá atuar sob diferentes ações a depender do órgão ou do local em que se encontra. Além disso, uma vez liberada, ela contribui para a formação do edema por ter ação vasodilatadora, promovendo o aumento da permeabilidade vascular e induzindo a dor (TING et al., 2007). No estômago, a histamina estimula a secreção de ácido gástrico. No cérebro, ela pode responder como neurotransmissor (neuroendócrino), além de atuar como regulador cardiovascular, ter ação termorreguladora e influenciar no estado de vigília (TABAREAN et al., 2012). A serotonina é um mediador com ação semelhante à histamina por promover o aumento na permeabilidade celular, porém é armazenada em plaquetas. Sua liberação é realizada por meio da formação da agregação plaquetária.

2.4.4 Pele e processo inflamatório

2.4.4.1 Estrutura e fisiologia da pele

A pele é um órgão complexo, constituída por três camadas de estrutura e propriedades distintas – epiderme, derme e hipoderme – que isola e recobre a superfície corpórea, representando cerca de 15% do peso corporal (Figura 3). Juntamente com os derivados epidérmicos, desempenha diversas funções: protege contra lesões físicas, químicas e biológicas, promove as sensações de dor, pressão, tato e temperatura, sintetiza certos hormônios e vitaminas, evita a perda de água e promove a regulação térmica, metaboliza xenobióticos e excreta certas substâncias através das glândulas sudoríparas (CHUONG et al., 2002; SAMPAIO; CASTRO; RIVITTI, 2000).

Figura 3 – Representação esquemática da pele, em corte transversal.



Fonte: VILELA, A.L.M. Pele e o sentido do tato. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/sentidos10.asp>>. Acesso em 20 de dezembro, 2016.

A epiderme, camada superior da pele, é constituída por quatro camadas: estrato córneo, estrato granuloso; estrato espinhoso e estrato basal. Dentre os tipos celulares presentes na mesma, 80-85% são queratinócitos, 10-13 %, melanócitos, 4%, células de langerhans e 1%, células de Merckel (KOSTER; ROOP, 2004; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Os queratinócitos são responsáveis pela produção de queratina, manutenção da integridade da estrutura epidérmica e estão envolvidos na resposta imunológica do tecido cutâneo, uma vez que expressam diferentes citocinas, quimiocinas e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC-II) (CHAN, 2004; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Os melanócitos, localizados na camada basal da epiderme, produzem melanina, contribuindo para a coloração da pele e para a proteção contra a radiação ultravioleta (UV) (HAASS; HERLYN, 2005). Além da pele, também estão presentes no epitélio de mucosas, no bulbo capilar, no sistema nervoso central, na retina e no aparelho ocular (SAMPAIO; CASTRO; RIVITTI, 2000). As células de langerhans, visto que possuem vários receptores de membrana envolvidos no processo imunológico, são responsáveis pelo reconhecimento, captação, processamento e apresentação de antígenos solúveis e haptenos aos linfócitos T. Em decorrência disso, se tornam mais abundantes em certas doenças inflamatórias cutâneas, como na dermatite de contato e em processos alérgicos (NORRIS, 2004).

As células de Merckel, próximas ou em contato com nervos não-mielinizados, onde formam sinapses com terminações nervosas periféricas, atuam como mecanoreceptores e também contribuem no desenvolvimento do plexo nervoso na porção superior da derme (NORRIS, 2004).

Dentre as células que migram para a epiderme em resposta a diversos estímulos e que constituem elementos da resposta de defesa inata ou adquirida, destacam-se os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (RANG et al., 2011; NORRIS, 2004).

A derme, tecido conectivo com espessura superior e densidade celular inferior à epiderme, proporciona elasticidade, força tensil e resistência mecânica à pele. É constituída por polissacarídeos, substância fundamental, material fibrilar, receptores sensoriais, células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (SAMPAIO; CASTRO; RIVITTI, 2000). Durante o processo inflamatório ou de cicatrização observa-se um aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos, produtores de colágeno e elastina, devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (SORRELL; CAPLAN, 2004).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, pronta e efetivamente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta, extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (BURBACH; ANSEL; ARMSTRONG 2000).

Nesse contexto, a pele não compreende apenas uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também uma extensão do sistema imunológico, com macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, citocinas e quimiocinas, atuando na resposta imune inata, bem como células dendríticas especializadas (células de langerhans) e linfócitos T helper (Th1 e Th2), atuando na resposta imune adquirida (NORRIS, 2004; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

2.4.4.2 Inflamação cutânea

Estímulos externos, como patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e resposta autoimune, desencadeiam uma resposta imediata de proteção ao organismo – a resposta inflamatória – que tem como objetivo eliminar o agente agressor, de forma a evitar sua disseminação a outras regiões do organismo, promover o reparo tecidual e restabelecer a homeostasia da pele (FIRESTEIN, 2004).

Os queratinócitos constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do corpo contra a agressão desencadeada por diversos agentes devido à produção de vários mediadores pro-inflamatórios, como as citocinas, as quais também são produzidas por fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos (BURBACH; ANSEL; ARMSTRONG 2000). Dentre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, as primárias (IL-1 α , IL-1- β e TNF- α) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (DEBENEDICTIS et al., 2001).

A exposição celular às citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) resulta na ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases (PKC, PKA) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), resultando na estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Estes fatores de transcrição, quando ativados, induzem a transcrição gênica de diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF β 1 - fator de crescimento tumoral), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios como a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e

ciclooxigenase-2 (COX-2) (PASCUAL; GLASS, 2006; WINYARD; WILLOUGHBY, 2003).

Além de desencadear a resposta inflamatória inata e de atuar como uma molécula co-estimulatória da resposta imunológica, o TNF- α desempenha um papel importante no processo de remodelação do tecido após um dano, pois atua como fator angiogênico e como fator de crescimento dos fibroblastos (BURBACH; ANSEL; ARMSTRONG 2000).

Além das citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostanoides) também desempenham um papel importante no processo inflamatório cutâneo (DEBENEDICTIS et al., 2001). A prostaglandina E2 (PGE2) promove o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo assim na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. Juntamente com a PGD₂, ela induz a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de lipoxinas, eicosanoides envolvidos na fase de resolução do processo inflamatório (SERHAN; SAVILL, 2005; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A histamina, por sua vez, também é relevante nesse processo visto que a sua liberação, após a degranulação dos mastócitos, promove a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (RANG et al, 2011). Serotonina, substância P e neurocinina A também participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo assim na resposta inflamatória cutânea (BRAD, 2000).

2.4.4.3 Plantas medicinais no tratamento tópico de doenças inflamatórias cutâneas

As doenças inflamatórias da pele afetam vários indivíduos no mundo e a sua prevalência tem duplicado nos últimos 10 a 15 anos (LI; ARMSTRONG, 2011). Cerca de 20% da população mundial, principalmente Europa e América, sofre de dermatite de contato (PEISER et al., 2012; THYSSEN et al., 2007). A dermatite atópica apresenta taxas de prevalência que variam de 1 a 20%, onde a Nigéria, Reino Unido, Nova Zelândia e América Latina merecem destaque (DA VEIGA, 2012). A prevalência da psoríase varia de 0 a 2,1%, em crianças, e de 0,91 a 8,5%, em adultos (PARISI et al., 2013). A patogênese das doenças inflamatórias cutâneas envolve mecanismos distintos, sendo algumas iniciadas por um processo alérgico ou irritativo (FIRESTEIN, 2004; LEUNG et al., 2004). Uma vez que há diferentes vias e cascatas envolvidas no processo inflamatório presente nas doenças inflamatórias cutâneas, diversos são os alvos moleculares que, quando antagonizados ou

neutralizados conduzem a um efeito anti-inflamatório e/ou imunossupressor (SIMMONS, 2006).

Os fármacos anticitocinas representam um dos maiores avanços no tratamento de doenças inflamatórias crônicas graves nos últimos anos (RANG et al., 2011). Esses fármacos têm como alvo moléculas de superfície das células T (epor exemplo, Efalizumab e Alefacept) ou bloqueiam a ação de citocinas como, por exemplo, agentes anti-TNF α (Etanercept), sendo efetivos no tratamento da psoríase e da dermatite de contato. No entanto, os mesmos apresentam custo elevado, o que limita seu uso (TAN et al., 2007; SIMMONS, 2006).

Além disso, alguns medicamentos, principalmente aqueles de uso sistêmico, não atingem a eficácia desejada, em decorrência de não se conseguir quantidades adequadas do fármaco na pele após administração sistêmica, ou comprometem a resposta imunológica (RANG et al., 2011). A administração tópica de fármacos é frequentemente utilizada quando objetiva-se um efeito local, visto que formulações cujo sítio de ação é restrito à superfície da pele ou às primeiras camadas são capazes de manter concentrações efetivas do fármaco no tecido alvo e o risco de indução de efeitos secundários em decorrência de exposição sistêmica não ocorre (ALENCASTRE et al., 2006; WILLIAMS, 2006; NANAYKKARA et al., 2005).

Apesar das patologias inflamatórias terem sua etiologia e fisiopatologia melhor conhecidas atualmente, as terapias clássicas utilizadas para tratá-las causam uma infinidade de efeitos colaterais indesejáveis (MAN et al., 2008; BOLLER et al., 2010). Portanto, é crescente o interesse pela busca de novos fármacos para tratar os distúrbios inflamatórios cutâneos. As plantas, nesse ínterim, tornam-se uma importante fonte de busca para novos componentes ativos no controle de exacerbações inflamatórias cutâneas (SEELIGER et al., 2003; CALIXTO et al., 2004; BOLLER et al., 2010).

Sabe-se que uma parcela da população utiliza plantas medicinais para tratar patologias cutâneas e que muitos produtos provenientes da medicina tradicional têm sido utilizados no tratamento de diferentes condições dermatológicas. Entretanto, apesar de muitas preparações já terem sua eficácia comprovada e seu uso tradicional validado, como *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea sp.*, *Hammamelis virginiana*, *Aloe vera*, dentre outras, significativa parcela das plantas medicinais utilizadas tradicionalmente ainda não foi submetida a estudos que comprovem suas atividades farmacológicas e que determinem sua segurança de uso (RAUH et al., 2011).

Nesse contexto, a pesquisa com plantas que apresentam potencial atividade anti-inflamatória tópica, principalmente aquelas já citadas em estudos etnobotânicos, como *Croton cordiifolius*, representa uma estratégia relevante no âmbito da busca por novos fármacos a serem utilizados no tratamento de afecções dermatológicas, que apresentem maior eficácia e menos efeitos colaterais quando comparados àqueles disponíveis no arsenal terapêutico atual.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar estudo farmacognóstico e farmacológico do extrato e óleo essencial das cascas do caule de *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae).

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização farmacobotânica da matéria-prima vegetal;
- Avaliar o perfil fitoquímico do extrato vegetal e a composição química do óleo essencial do caule de *C. cordiifolius*;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato das cascas de *C. cordiifolius*;
- Determinar a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* de extrato/frações e óleo essencial das cascas de *C. cordiifolius*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

O material vegetal foi coletado no município de Parnamirim – PE, na fazenda Vassouras, próxima à BR-232, no mês de abril de 2014, 2015 e de 2016. Para cada espécime coletado foi confeccionada uma exsicata, identificada e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) sob o número IPA89211-89214. Após secagem à temperatura ambiente, as cascas do caule de *Croton cordiifolius* foram pulverizadas em triturador industrial.

4.2 Caracterização Farmacobotânica

Quatro espécimes de *Croton cordiifolius* foram utilizados para realizar este estudo. Secções transversais na região mediana da raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar fixadas em FAA 50% foram obtidas à mão livre, utilizando uma lâmina de barbear comum (JOHANSEN, 1940). Para a lâmina foliar também foram realizadas secções paradérmicas. Todas as secções foram diafanizadas em solução de hipoclorito de sódio a 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997) e coradas de acordo com a técnica descrita por Bukatsch (1972), com safranina e azul de astra. Em seguida, foram preparadas lâminas histológicas semipermanentes contendo as secções de material botânico, seguindo procedimentos padrão de anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951). A maceração foi realizada de acordo com o método de Jeffrey (JOHANSEN, 1940), utilizando fragmentos de raiz, caule e folha que foram desintegrados com a mistura de ácido nítrico a 10% e ácido crômico a 10% (1:1). A análise das lâminas histológicas semipermanentes preparadas foi realizada com um microscópio óptico (Alltion) equipado com uma câmara digital.

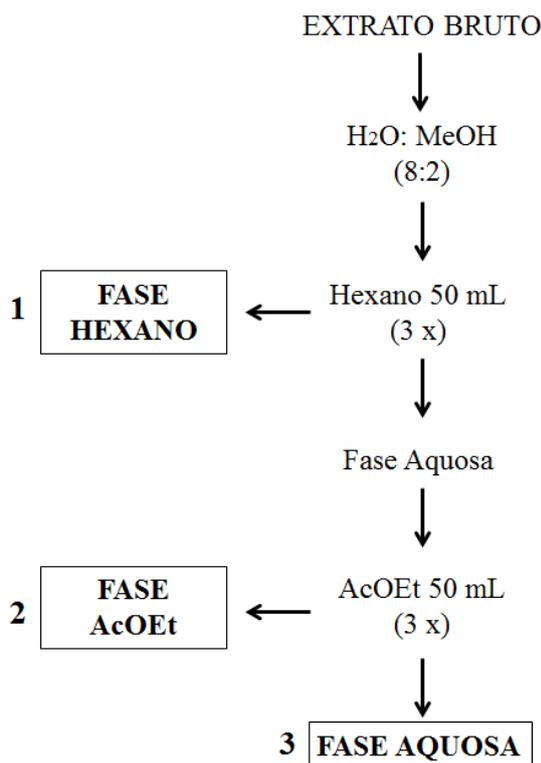
4.3 Preparação do Extrato

O extrato das cascas do caule de *Croton cordiifolius* foi obtido por maceração em etanol numa proporção de 10% (p/v), por um período de 24 horas. O macerado foi filtrado e submetido ao processo de evaporação em evaporador rotativo sob vácuo até a obtenção do extrato fluido, o qual foi armazenado em frasco de vidro dentro de dessecador para a completa eliminação do solvente.

4.4 Preparação das Fases

As fases foram obtidas a partir do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius*, as quais foram preparadas pela técnica de extração líquido-líquido, em funil de separação, utilizando-se os solventes hexano, acetato de etila e água:metanol (8:2), separadamente. Inicialmente, 1g do extrato foi dissolvido com 10 mL de água:metanol (8:2). A partir dessa solução, foi realizada a partição com 3 volumes de hexano e, em seguida, com 3 volumes de acetato de etila. Após a evaporação, foram visualizados os rendimentos de 35 % para a fração hidroalcoólica, 37 % para a fração acetato de etila e 28 % para a fração hexânica (Esquema 1).

Esquema 1 – Preparação das fases hexânica, acetato de etila e aquosa, a partir do extrato bruto das cascas do caule de *Croton cordiifolius*.



Fonte: Autor.

4.5 Prospecção Fitoquímica do Extrato

Para o ensaio fitoquímico, o extrato da casca do caule de *Croton cordiifolius* foi preparado por maceração com etanol a 10% (p/v), por um período de 5 minutos, e submetido

a cromatografia em camada delgada, em consonância com os procedimentos descritos por Harbone (1998) e Wagner e Bladt (1996). As análises foram efetuadas aplicando-se alíquotas (15 µL) dos extratos em placas cromatográficas de gel de sílica (F254), empregando-se diversos sistemas eluentes, padrões e reveladores adequados (Tabela 1). Para pesquisa de saponinas, realizou-se o teste de afrogenicidade, no qual a presença de espuma abundante e persistente por mais de 15 minutos, após forte agitação da solução durante 30 segundos seguida de repouso, foi o critério para determinar a presença de saponósidos (COSTA, 2001).

Tabela 1 – Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados na prospecção fitoquímica das cascas de *Croton cordifolius*.

| Classe de metabólito | Sistema de Eluição | Padrão | Revelador |
|-----------------------------------|--|---|-----------------------------|
| Alcaloides | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹ | Pilocarpina | Dragendorff |
| Mono e Sesquiterpenos | Tolueno-AcOEt ² | Timol | Vanilina Sulfúrica |
| Triterpenos e Esteroides | Tolueno-AcOEt ³ | β-sitosterol | Liebermann Buchard |
| Cumarinas | n-Hexano-AcOEt ⁴ | Umbeliferona | KOH 10% em EtOH |
| Flavonoides e Fenilpropanoides | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹ | Quercetina, rutina e ácido clorogênico | NEU + UV |
| Taninos Condensados | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ⁵ | Epicatequina | Vanilina clorídrica |
| Proantocianidinas | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹ | Catequina | Vamilina clorídrica |
| Antraquinonas | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ⁵ | Aloína | KOH 10% em H ₂ O |
| Saponinas | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹ | - | Lieberman- Burchard |

¹100:11:11:27 v/v; ²97:3 v/v; ³90:10 v/v; ⁴95:5 v/v; ⁵100:3:3:3 v/v; ⁶97:3 v/v; AcOEt = Acetato de Etila; HCOOH = Ácido Acético; AcOH = Ácido Fórmico; H₂O = Água; CHCl₃ = Clorofórmio; MeOH = Metanol; UV = Ultravioleta.

4.6 Extração do Óleo Essencial

50 g da casca do caule de *Croton cordiifolius* foram submetidos à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 3 horas (CRAVEIRO et al., 1981). O material vegetal, devidamente triturado, foi colocado em balão de fundo redondo contendo água destilada, mantido sob aquecimento. Ao atingir o ponto de ebulição, vapores de água arrastam os compostos voláteis da amostra, conduzindo-os em direção ao condensador, onde, através de troca de calor com a água de refrigeração, são condensados. Em seguida, o óleo essencial e a água, na forma líquida, podem ser visualizados no tubo separador do extrator. Em decorrência de menor densidade, quando comparado à água, o óleo essencial é observado na fase superior, podendo ser realizada a separação de óleo e água.

Após este procedimento, o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio com o objetivo de remover os resíduos de água. O mesmo foi armazenado em recipiente âmbar, mantido sob proteção da luz e congelado a -20°C até o uso.

4.7 Análise Química do Óleo Essencial – GCMS

Os óleos obtidos foram analisados por GC/MS em um cromatógrafo gasoso da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), modelo 7890A, equipado com detector de ionização de chama, detector de massa seletivo, modelo 5975C e coluna capilar Agilent J&W HP-5MS ((5% fenil) –metilpolisiloxano), com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e revestimento com espessura de 0,25 μm .

A temperatura de aquecimento foi programada para 70°C com um aumento de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 280°C , e mantida por 15 minutos. O gás carreador utilizado foi o hélio, com fluxo constante de 1,4 mL/min. A temperatura da fonte de ionização foi mantida em 280°C , energia de ionização de 70 eV e corrente de 0,7kV. Os espectros de massa foram registrados de 30 a 450 m/z.

Os componentes foram identificados individualmente em comparação com os espectros de massa 70 eV com a base de dados do espectrômetro, utilizando a biblioteca L-Built da Wiley e comparando os índices de retenção com os da NIST (STEIN et al., 1997) e com padrões de fragmentação relatados na literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção também foram comparados com a queles obtidos por Craveiro e colaboradores (1981) para outras espécies de Euphorbiaceae e simulados utilizando o método descrito por Alencar e colaboradores (1990).

4.8 Determinação da Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante do extrato das cascas do caule de *Croton cordiifolius*, foram realizados cinco ensaios embasados em metodologia espectrofotométrica.

Fenólicos Totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu segundo metodologia descrita Hua-Bin Li e colaboradores (2008), com algumas modificações. Diferentes concentrações de ácido gálico foram dissolvidas em metanol. Para cada tubo foram adicionados 1mL da solução de Folin-Ciocalteu diluída na proporção de 1:10 (v/v) e 0,2 mL das amostras diluídas a 1 mg/mL em metanol. Após 3 minutos no escuro, 0,8 ml de carbonato de sódio a 7,5% foi adicionado. A solução foi deixada por mais 120 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Após esse período, as absorvâncias das amostras foram lidas a 765 nm contra um branco (reagente adicionado ao metanol ao invés da amostra). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorvância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ($Y = 0,0121x + 0,032$, $R^2 = 0,9967$). A concentração de fenol total na amostra foi determinada a partir da curva de calibração. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (EAG/mg de extrato).

Flavonoides Totais

Para estimativa de flavonoides foi utilizada a técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky e Salatino (1998), com algumas modificações. Diferentes concentrações de quercetina foram dissolvidas em metanol, as quais foram usadas como padrão. Em cada tubo foi adicionado 0,5 mL do reagente de cloreto de alumínio (2g de cloreto de alumínio diluído em etanol a 2%), misturado a 0,5 mL da amostra. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 minutos. A absorvância das amostras foi lida a 420 nm contra um branco. A curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorvância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ($y = 0,0486x + 0,0417$, $R^2 = 0,997$). A concentração de flavonoides foi determinada a partir da

curva de calibração. O teor de flavonoides totais no extrato foi expresso como equivalente de Quercitina (EQ/ mg de extrato). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

Capacidade Antioxidante Total pelo Método do Fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total (CAT) do EECc foi determinada pelo método do fosfomolibdênio. Os extratos foram diluídos para concentração de 1 mg/mL em metanol. Foi misturado 0,1 mL de cada amostra a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente incubados em água a 95 °C por 90 minutos. Após voltarem à temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do metanol) (PIETRO et al., 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico, calculada pela fórmula abaixo e comparada com a atividade do BHT (hidroxitolueno butilado) e Ácido Gálico.

$$CAT (\%) = \frac{(Aa - Ac)}{(Aaa - Ac)} \times 100$$

Onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

Atividade Sequestrante de Radicais Livres de DPPH

Outra metodologia utilizada foi a determinação da atividade sequestrante de radicais livres pelo método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Neste ensaio, a atividade sequestradora de radicais livres do extrato foi medida em termos de doação de hidrogênio (BLOIS, 1958). Foram misturados 250 µL da solução de DPPH (1 mM) em 40 µL de diferentes concentrações dos extratos e isolado (31,25; 62,5; 125; 500 e 1000 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. Ácido gálico e BHT foram usados como compostos de referência e o controle foi o DPPH adicionado a 40 µL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH foi calculada pela fórmula:

$$\text{Eliminação [DPPH]} (\%) = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs = Absorbância.

Ensaio ABTS

Diluiu-se 3mg do extrato das cascas do caule de *C. cordiifolius* em 3ml de etanol como solução-mãe. As amostras, preparadas em triplicata, foram acondicionadas em local protegido de luz, às quais foi adicionado o reagente 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). As proporções utilizadas foram: 2ml do reagente para 20 µL de amostra. Esperou-se 6 minutos e em seguida as amostras foram levadas ao *vortex* para agitação por cerca de 10 segundos. Em seguida, elas foram levadas ao espectrofotômetro para leitura a 734 nm (RE et al., 1999). A eliminação de radicais de ABTS⁺ foi calculada pela fórmula:

$$\text{Eliminação [ABTS}^+ \text{] (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs = Absorbância.

4.9 Animais e Aspectos Éticos

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco e receberam parecer favorável de acordo com o protocolo nº 23076.016724/2016-62 da CEUA/UFPE.

4.10 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória

4.10.1 Edema de orelha induzido por 13-acetato de forbol 12-miristato (PMA)

O edema de orelha foi induzido mediante aplicação de 20 µL de PMA (2 µg/orelha) diluído em acetona na orelha direita dos camundongos (n=8). Nos grupos testes foi adicionada à solução de acetona, dexametasona (0,1 mg/orelha) – droga de referência – extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc) (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha) ou óleo essencial de *C. cordiifolius* (EOCc) (1, 3 e 10 µL/orelha) – droga teste –, os quais foram administrados topicamente após a aplicação do PMA. Na orelha esquerda dos animais de todos os grupos foi aplicado o mesmo volume de acetona:etanol (8:2), caracterizando o controle negativo (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985).

Seis horas após o tratamento, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os dois fragmentos. Os fragmentos foram fixados em formaldeído tamponado (pH 7,4) e processados para análise histológica.

4.10.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA)

O ácido araquidônico (AA) é metabolizado pelas enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, levando à formação de mediadores inflamatórios, responsáveis pela formação de edema. Após anestesia dos animais com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), o edema de orelha foi induzido mediante aplicação de 20 µL de AA (2 mg/orelha) diluído em acetona na superfície interna e externa da orelha direita dos camundongos (n=8), caracterizando o grupo controle negativo. Além deste, foram utilizados no experimento mais 2 grupos: o grupo controle positivo, no qual foi adicionada à solução de acetona, a indometacina (0,5 mg/orelha), que é a droga de referência; e o grupo teste, que consiste no extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc) (1 mg/orelha). Ambos foram administrados topicamente após a aplicação do ácido araquidônico. Na orelha esquerda dos animais de todos os grupos foi aplicado o mesmo volume de acetona:etanol (8:2), caracterizando um controle negativo (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985).

Uma hora após o tratamento, momento em que observa-se o pico da inflamação, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e um fragmento de 6 mm de

diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os fragmentos da orelha direita e esquerda (YOUNG, et al., 1984; CRUMMEY, et al., 1987).

4.10.3 Edema de orelha induzido por fenilpropionato de etila (EPP)

O edema de orelha foi induzido mediante aplicação de 20 µL de fenilpropionato de etila a 5% (EPP) diluído em acetona na superfície interna e externa orelha direita dos camundongos (n=8), caracterizando o grupo controle negativo. No grupo controle positivo foi adicionada à solução de acetona, droga de referência dexametasona (0,1 mg/orelha) e no grupo teste foi administrado o extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc) (1 mg/orelha), cuja aplicação ocorreu 18 horas antes da indução do edema. Na orelha esquerda dos animais de todos os grupos foi aplicado o mesmo volume de acetona:etanol (8:2), caracterizando um controle negativo (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985).

Trinta minutos após a aplicação do agente flogístico, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os fragmentos das orelhas direita e esquerda.

4.10.4 Edema de orelha induzido por fenol

O edema de orelha foi induzido mediante aplicação de 20 µL de fenol a 10% (v/v) diluído em acetona na superfície interna e externa da orelha direita dos camundongos (n=8), caracterizando o grupo controle negativo. Nos grupo controle positivo foi adicionada à solução de acetona, a droga de referência dexametasona (0,1 mg/orelha). No grupo teste foi administrado o extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc) (1 mg/orelha), o qual foi administrado concomitantemente ao fenol. Na orelha esquerda dos animais de todos os grupos foi aplicado o mesmo volume de acetona:etanol (8:2), caracterizando um controle negativo (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985). Antes da aplicação do agente flogístico, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.).

Uma hora após o tratamento, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o

auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os fragmentos da orelha direita e esquerda (GABOR, 2000).

4.10.5 Edema de orelha induzido por capsaicina

O edema de orelha foi induzido mediante aplicação de 20 μ L de capsaicina (0,25 mg/orelha) diluído em acetona na superfície interna e externa da orelha direita dos camundongos (n=8). No grupo controle positivo, os animais foram pré-tratados com vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.), 30 minutos antes da aplicação da capsaicina. No grupo teste, o extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc) (1mg/orelha) foi administrado juntamente com a capsaicina. Na orelha esquerda dos animais de todos os grupos foi aplicado o mesmo volume de acetona:etanol (8:2), caracterizando um controle negativo (OPAS; BONNEY; HUMES, 1985). Antes das aplicações tópicas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.).

Trinta minutos após o tratamento, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia e imediatamente pesados. A formação do edema foi avaliada através da diferença de peso entre os dois fragmentos (GABOR, 2000; GABOR; RAZGA, 1992).

4.10.6 Edema de orelha crônico induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

Para avaliar a atividade anti-inflamatória crônica do extrato das cascas do caule de *Croton cordiifolius*, foi utilizado o modelo de múltiplas aplicações de óleo de cróton. Um processo inflamatório crônico foi induzido em camundongos swiss (n=10/grupo) mediante aplicação de 20 μ L de óleo de cróton a 5% (v/v) em acetona, em dias alternados, durante 9 dias. O extrato (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) foram aplicados topicamente durante 5 dias, 2 vezes ao dia, a partir do 5º dia do experimento. No 9º dia, os animais foram eutanasiados e fragmentos circulares com espessura de 6 mm foram removidos de cada uma das orelhas com o auxílio de um *punch* de biópsia, para avaliação do edema (STANLEY et al., 1991).

Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido. Para a avaliação da atividade desta enzima foi utilizada a metodologia descrita por Bradley e colaboradores (1982) com modificações. As amostras de 6 mm do tecido das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram adicionadas a 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. Alíquotas (10 µL) do sobrenadante foram distribuídas em placas de 96 poços, e adicionou-se 200 µL da solução de *O*-dianisina (16,7 mg de *O*-dianisidina [Sigma], 90 mL de água desionizada, 10 mL de tampão de fosfato de potássio, 50 µL de peróxido de hidrogênio a 1%). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas na absorvância de 450 nm e expressa como DO/mg de proteína.

4.10.7 Avaliação das Fases Ativas

Após a realização de todos dos ensaios de edema induzido por diferentes agentes flogísticos, visando elucidar o mecanismo de ação do EECc, o edema de orelha induzido por PMA foi novamente utilizado para determinar qual(is) a(s) fase(s) ativa(s) do mesmo (hexânica, acetato de etila e/ou hidroalcolica). Com esse objetivo, foram utilizadas as concentrações de 1 mg/orelha de cada fase e 0,1 mg/orelha do controle positivo.

4.11 Análise Histológica

Amostras de 6 mm de tecido de orelhas de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram preservadas em formaldeído tamponado por 24 horas. Logo após, as amostras foram lavadas em solução tampão, desidratadas e, álcool em série crescente de concentração e incluídas em parafina. Os cortes de 4 µm foram obtidos em micrótomo (Leica[®]) modelo RM 2245 equipado com navalha de vidro, distendidos em água destilada e colocados sobre lâminas, levados para secagem em estufa a 60°C por 1 minuto e submetidos às técnicas de coloração pela (HE). As lâminas em duplicatas/animal foram analisadas em microscópio de luz, da marca Leica[®] modelo DM500 e fotografadas mediante o uso de câmera Leica modelo EC3

acoplada ao microscópio, bem como do software Leica Application Suite (LAS) EZ para análise histopatológica (ALMEIDA et al., 2014).

4.12 Análise Estatística

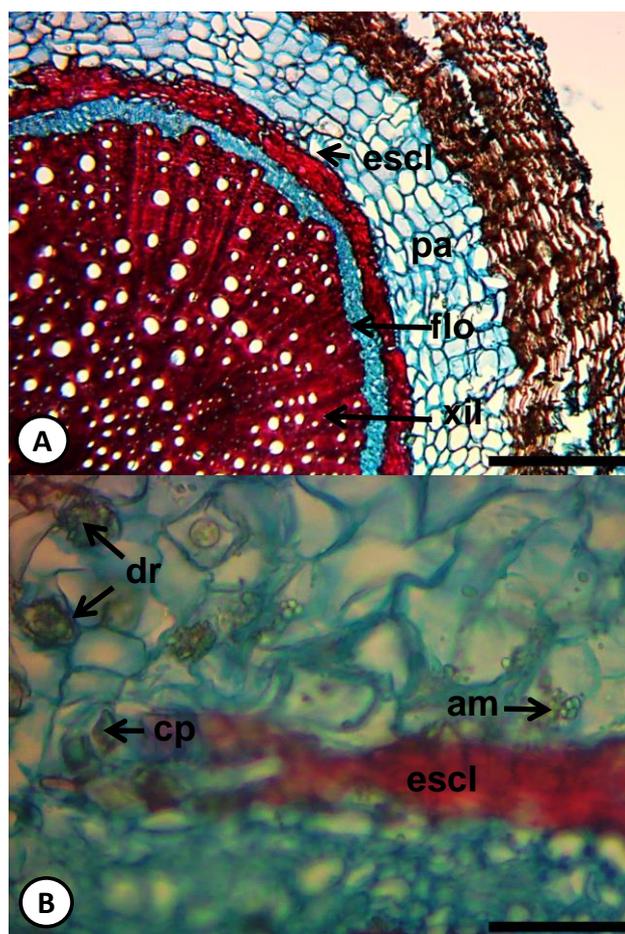
Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet. O limite de significância foi considerado a partir de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism[®] 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Farmacobotânica

A raiz secundária, em secção transversal, mostra contorno cilíndrico, apresentando periderme. A região cortical é composta por cerca de sete camadas de células parenquimáticas.. O sistema vascular é formado pelo xilema ocupando a região central da raiz e pelo floema circundando o xilema. Uma camada contínua de esclerênquima delimita o sistema vascular (Figura 4A). Amido pode ser visualizado na camada parenquimática. Cristais prismáticos e drusas são exibidos no floema, esclerênquima e nas células da região cortical localizada próxima ao esclerênquima (Figura 4B).

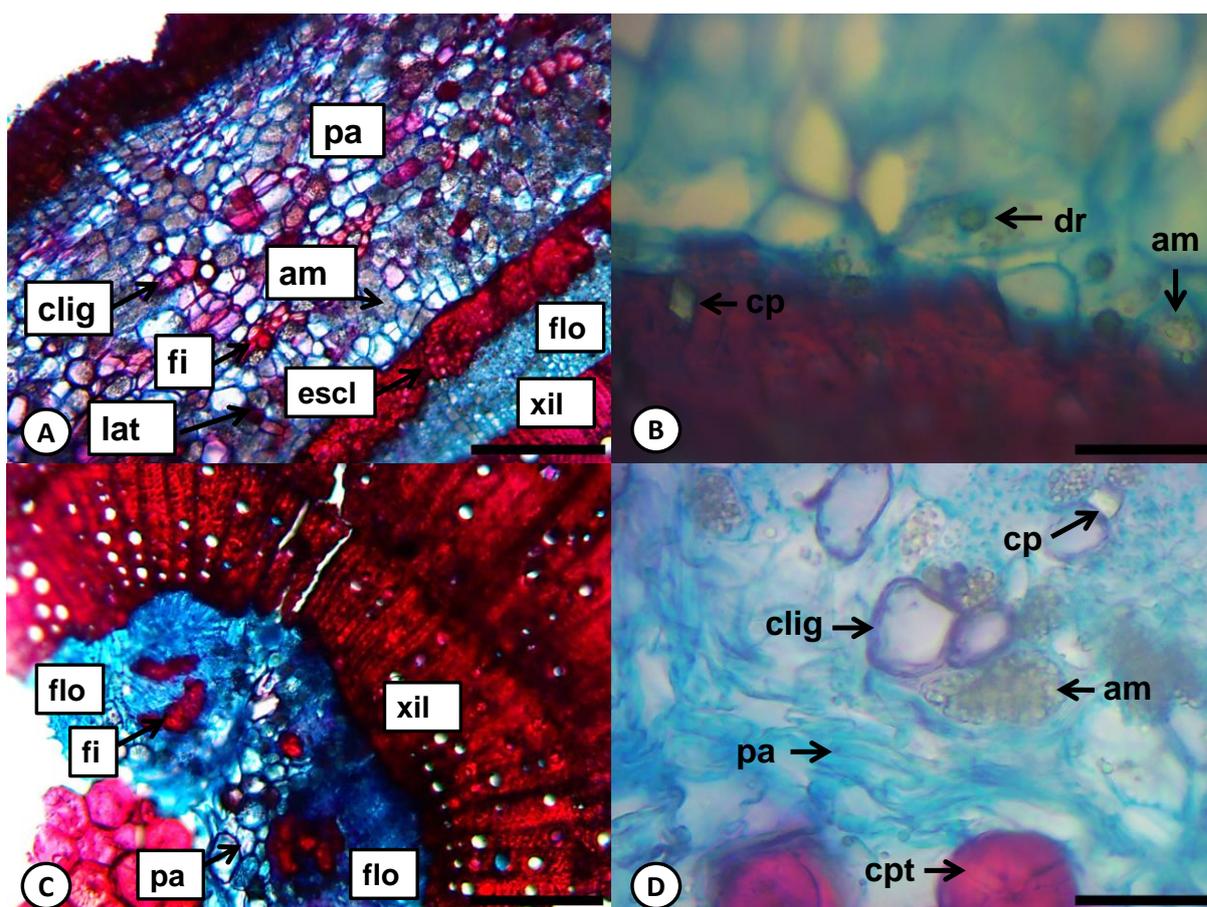
Figura 4 – Secções transversais da raiz de *Croton cordifolius* Baill.



A. visão geral da raiz. **B.** cristais e amido próximos ao esclerênquima na raiz. **am:** amido, **cp:** cristal prismático, **dr:** drusa, **escl:** esclerênquima, **flo:** floema, **pa:** parênquima, **xil:** xilema. Barras: A: 200 μ m. B: 50 μ m.

O caule secundário, em secção transversal, apresenta contorno cilíndrico e periderme. A região cortical é formada por parênquima, onde são encontradas células lignificadas, grupos isolados de fibras, laticíferos (Figura 5A), cristais prismáticos, drusas (Figura 5B) e amido (Figura 5A, B). Os cristais prismáticos são geralmente visualizados próximos ao esclerênquima circundando o sistema vascular e no próprio esclerênquima (Figura 5B), bem como no floema e na região medular (Figura 5D). Os cristais prismáticos são mais frequentes do que as drusas. O floema está situado externamente ao xilema, formando um anel contínuo, bem como internamente ao xilema, disposto na forma de núcleos isolados na região medular. No floema interno estão presentes grupos de fibras isoladas (Figura 5C). Na medula são encontrados células parenquimáticas (Figura 5C, D), células lignificadas, células pétreas, cristais prismáticos, drusas e amido (Figura 5D).

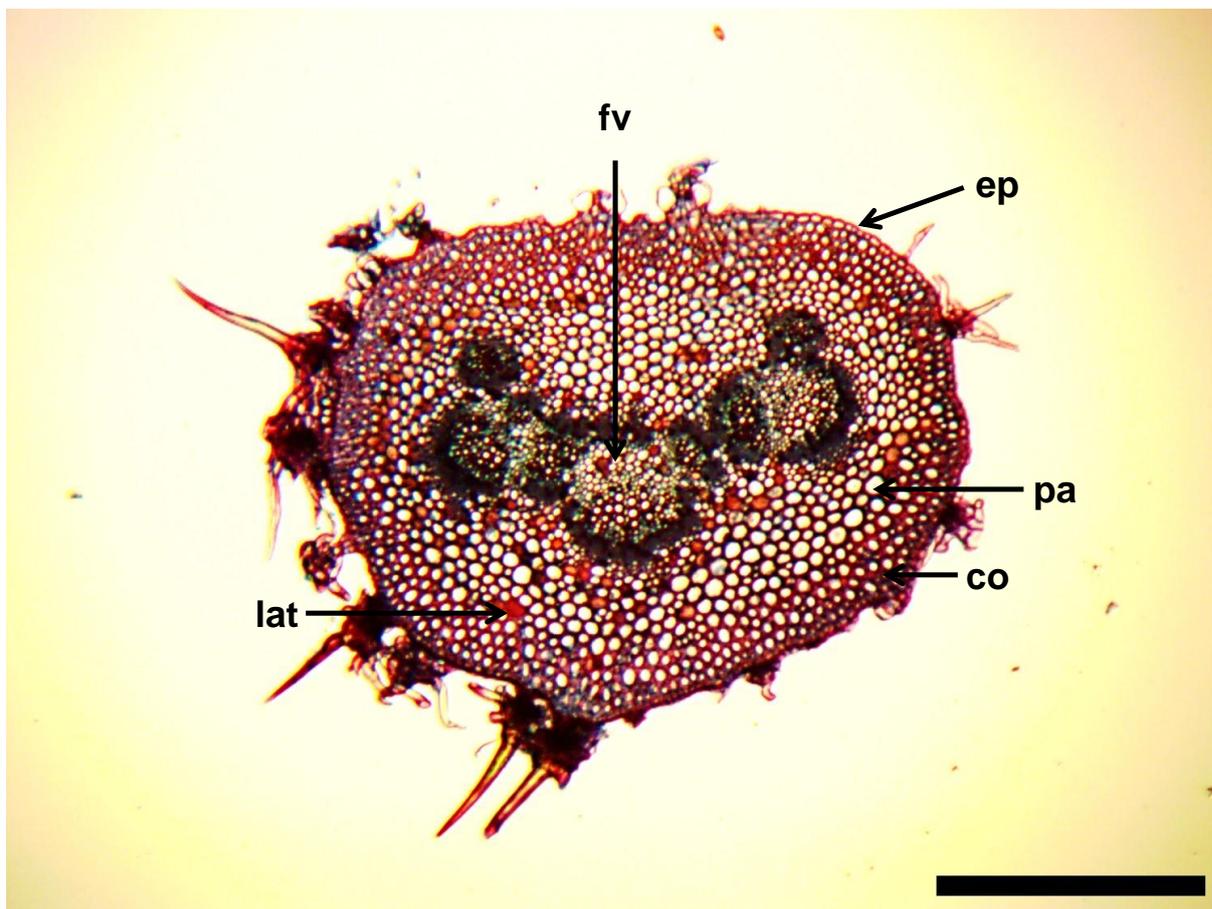
Figura 5 – Secções transversais do caule de *Croton cordifolius* Baill.



A. visão geral da região cortical e do sistema vascular do caule. **B.** cristais e amido próximos ao esclerênquima no caule. **C.** visão geral da região medular e sistema vascular do caule. **D.** detalhe das estruturas presentes na região medular do caule. **am:** amido, **clig:** célula lignificada, **cp:** cristal prismático, **cpt:** célula pétreas, **dr:** drusa, **escl:** esclerênquima, **fi:** fibra, **pa:** parênquima, **flo:** floema, **xil:** xilema. Barras: A, C: 200 μ m. B, D: 50 μ m.

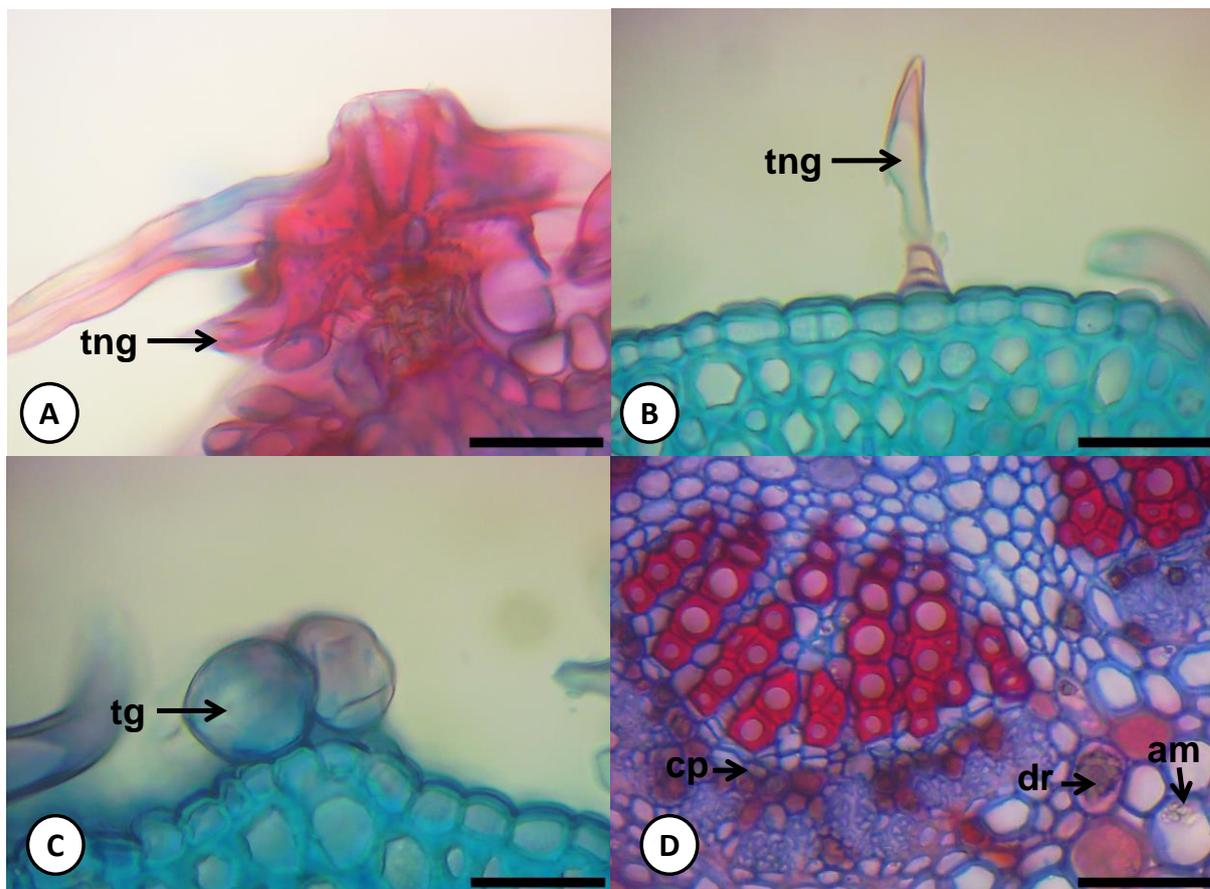
Em seção transversal, o pecíolo também apresenta também contorno cilíndrico. A epiderme é uniseriada, revestida por uma fina camada de cutícula. Na posição subepidérmica são visualizadas cerca de quatro camadas de colênquima do tipo angular. A região central do pecíolo é preenchida por parênquima, na qual são inseridos vários feixes vasculares colaterais (Figura 6). São observados tricomas glandulares e não-glandulares. Os tricomas não-glandulares podem ser de dois tipos: tricomas estrelados com haste multicelular (Figura 7A) e tricomas simples (Figura 7B). Os tricomas glandulares possuem uma cabeça unicelular (Figura 7C). Junto aos feixes vasculares são visualizados laticíferos (Figura 6), cristais prismáticos, drusas e amido (Figura 7D). Diferente do que ocorre no caule secundário, no pecíolo as drusas são mais frequentes que os cristais prismáticos.

Figura 6 – Visão geral da secção transversal do pecíolo de *Croton cordifolius* Baill.



co: colênquima, **ep:** epiderme, **fv:** feixe vascular, **lat:** laticífero, **pa:** parênquima. Barra: 500 μm .

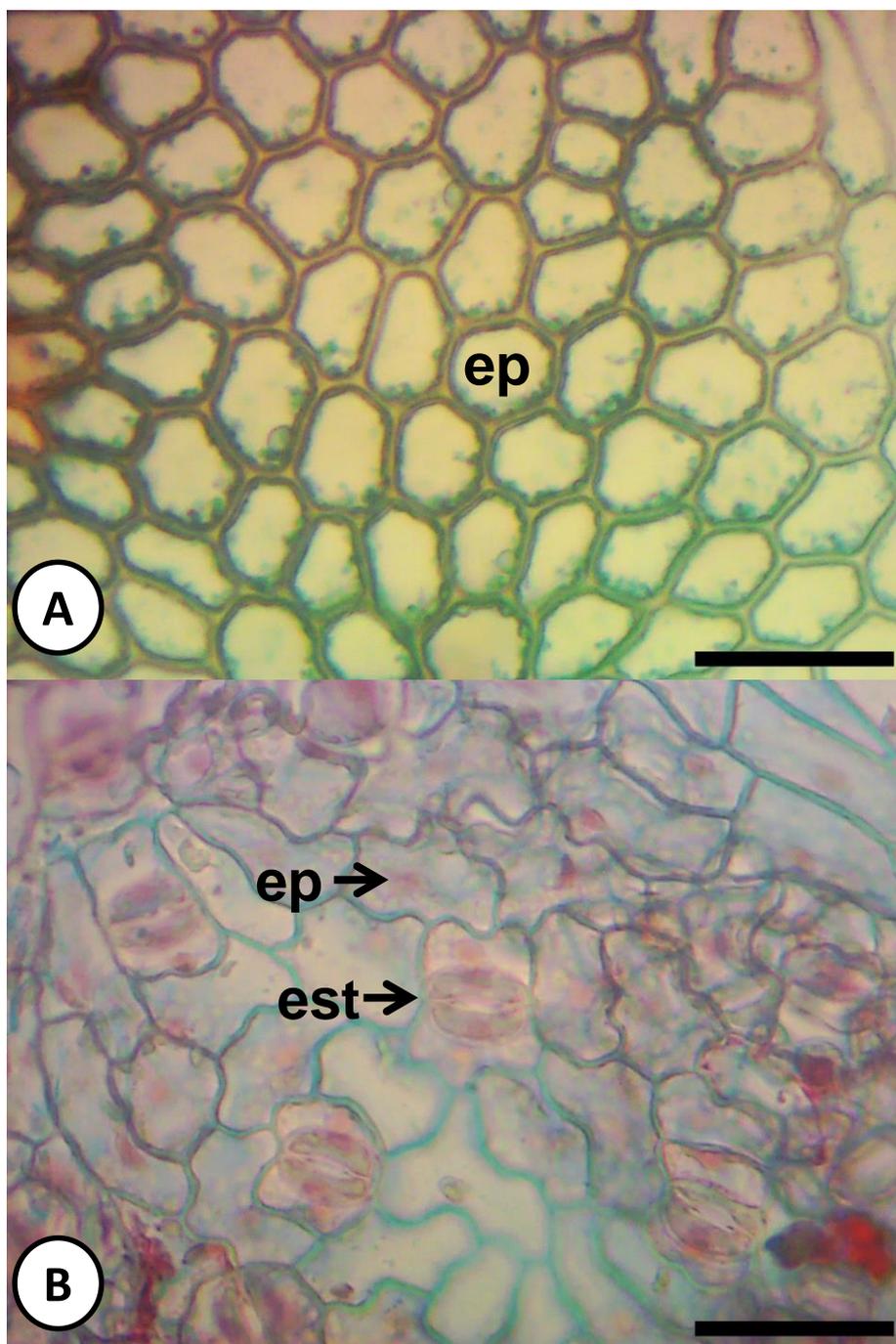
Figura 7 – Secções transversais do pecíolo de *Croton cordiifolius* Baill.



A. tricoma estrelado não glandular no pecíolo. **B.** tricoma simples não glandular no pecíolo. **C.** tricoma glandular no pecíolo. **D.** cristais e amido próximos ao esclerênquima no pecíolo. **am:** amido, **cp:** cristal prismático, **dr:** drusa, **tg:** tricoma glandular, **tng:** tricoma não glandular. Barras: 50 µm.

A lâmina foliar, em vista frontal, apresenta células com paredes retas ou ligeiramente sinuosas na face adaxial (Figura 8A) e células de paredes sinuosas na face abaxial. A lâmina foliar é hipoestomática, com estômatos paracíticos (Figura 8B).

Figura 8 – Secções paradérmicas da lâmina foliar de *Croton cordifolius* Baill.

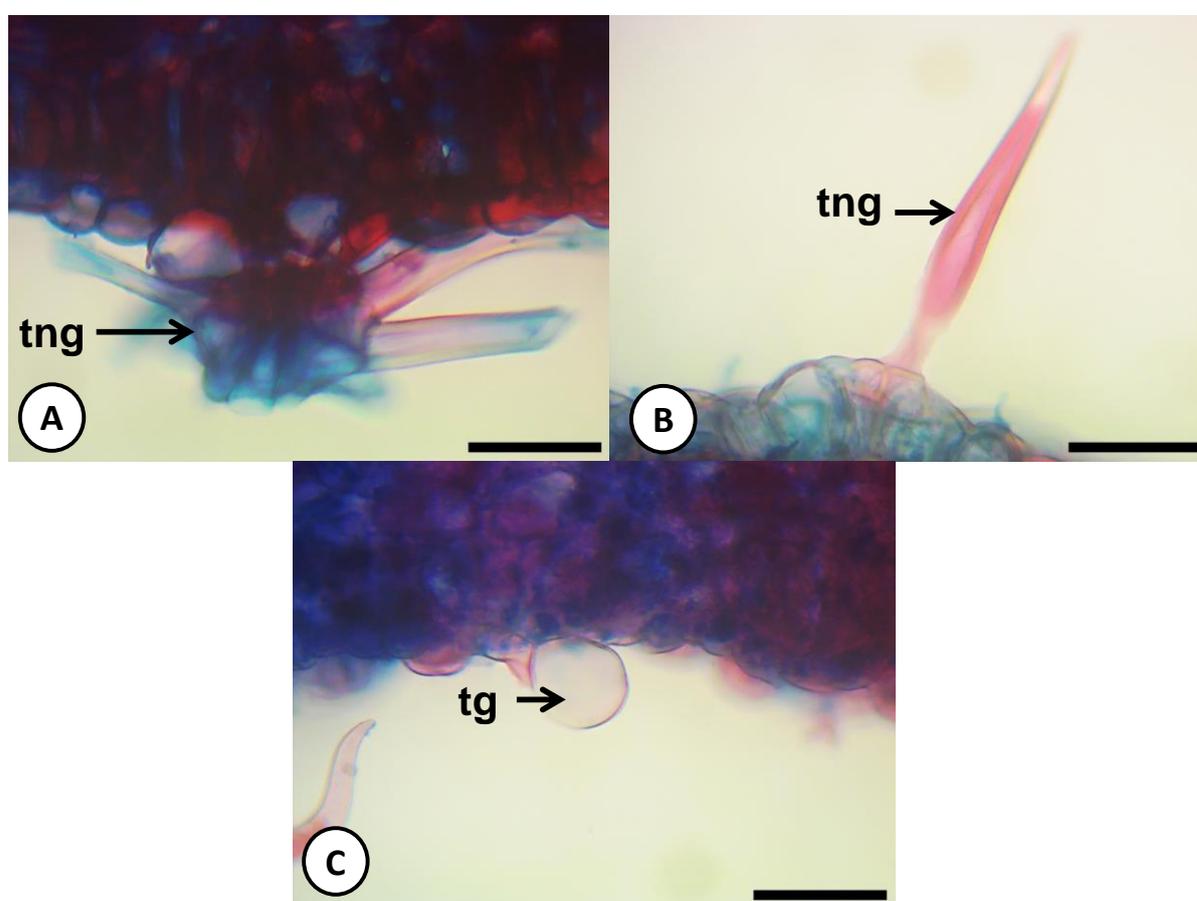


A. face adaxial. **B.** face abaxial. **ep:** epiderme, **est:** estômatos. Barras: 50 µm.

Em secção transversal, a lâmina foliar apresenta os mesmos tipos de tricomas descritos para o pecíolo (Figura 9 A, B, C). A nervura central apresenta um contorno côncavo-convexo. A epiderme é composta por uma única camada de células e é revestida por uma fina cutícula. O colênquima é formado por cerca de três a quatro camadas, localizadas na face adaxial. O sistema vascular é composto por um feixe vascular colateral

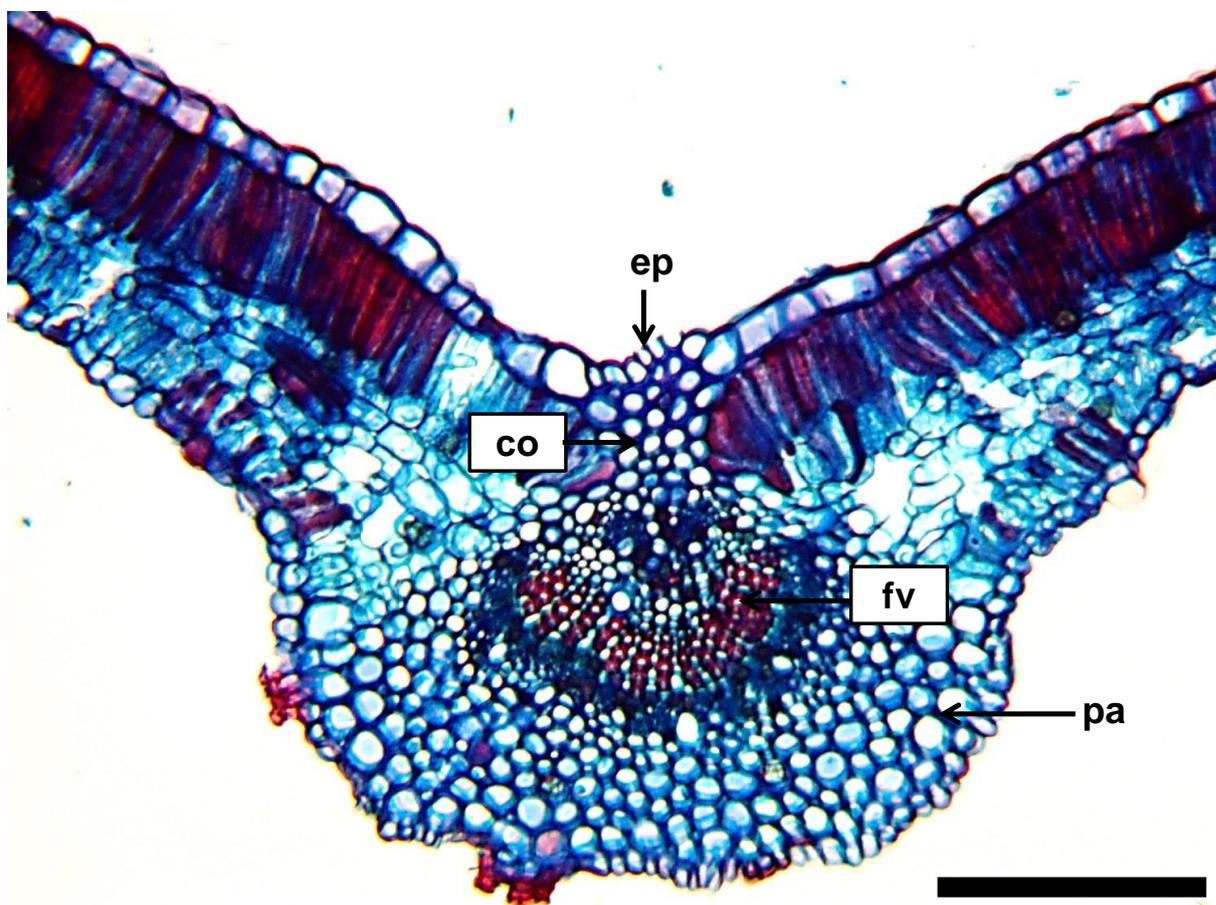
maior voltado para a face abaxial e feixes vasculares colaterais menores em direção à face adaxial. Os laticíferos estão presentes no parênquima (Figura 10). No floema encontram-se cristais prismáticos e drusas (Figura 11A), sendo as drusas mais abundantes, como ocorre no pecíolo. As drusas também podem ser encontradas no parênquima da nervura central, bem como no mesofilo. O mesofilo é isobilateral, com uma camada de parênquima paliçádico voltada para cada face da epiderme e cerca de duas a três camadas de parênquima lacunoso entre os tecidos paliçádicos (Figura 11B).

Figura 9 – Secções transversais da lâmina foliar de *Croton cordifolius* Baill.



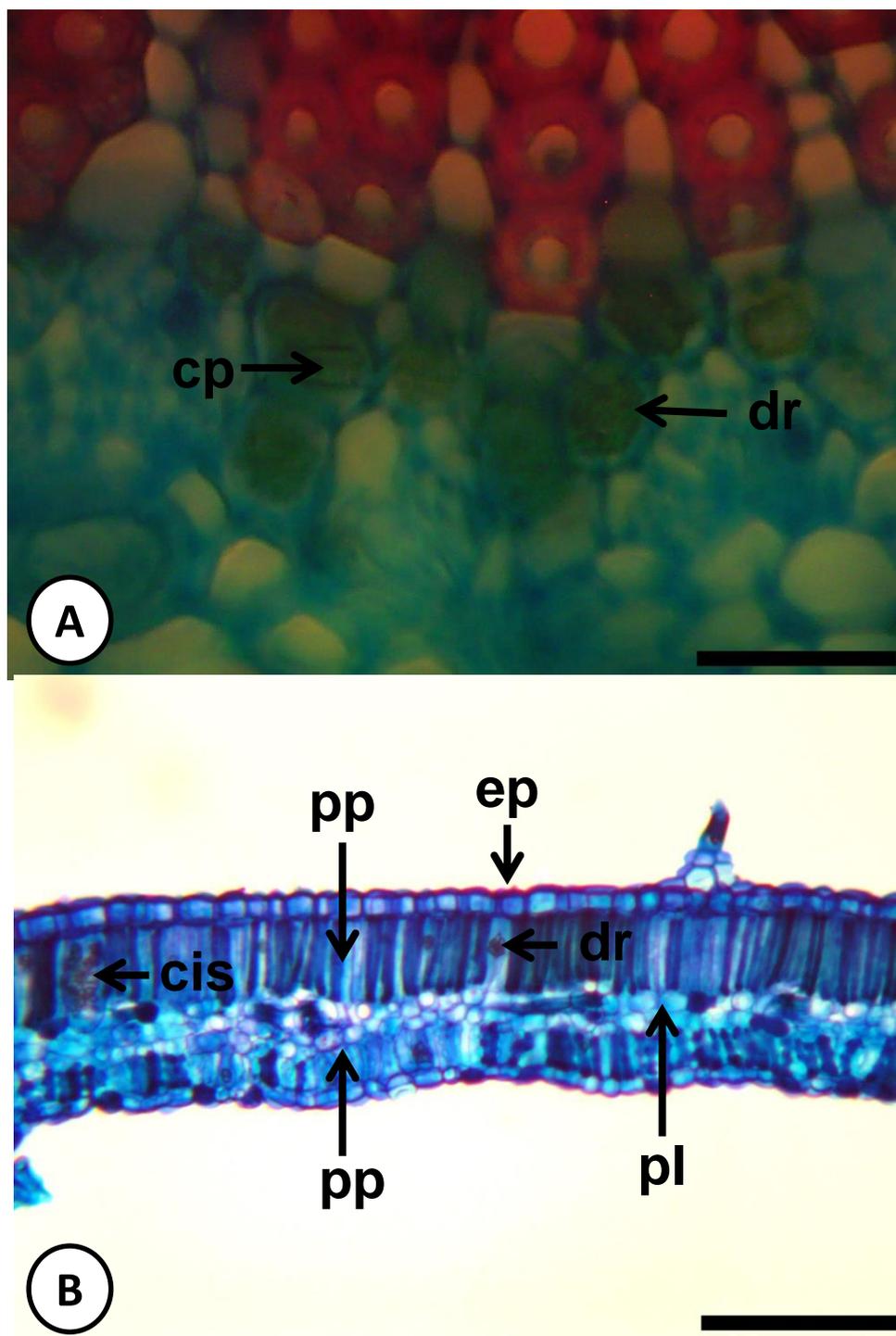
A. Tricoma estrelado não glandular. **B.** Tricoma simples não glandular. **C.** Tricoma glandular. **tg:** tricoma glandular, **tng:** tricoma não glandular. Barras: 50 µm.

Figura 10 – Nervura central visualizada em secção transversal da lâmina foliar de *Croton cordiifolius* Baill.



co: colênquima, **ep:** epiderme, **fv:** feixe vascular, **pa:** parênquima. Barra: 200 μ m.

Figura 11 – Secção transversal da lâmina foliar de *Croton cordifolius* Baill.

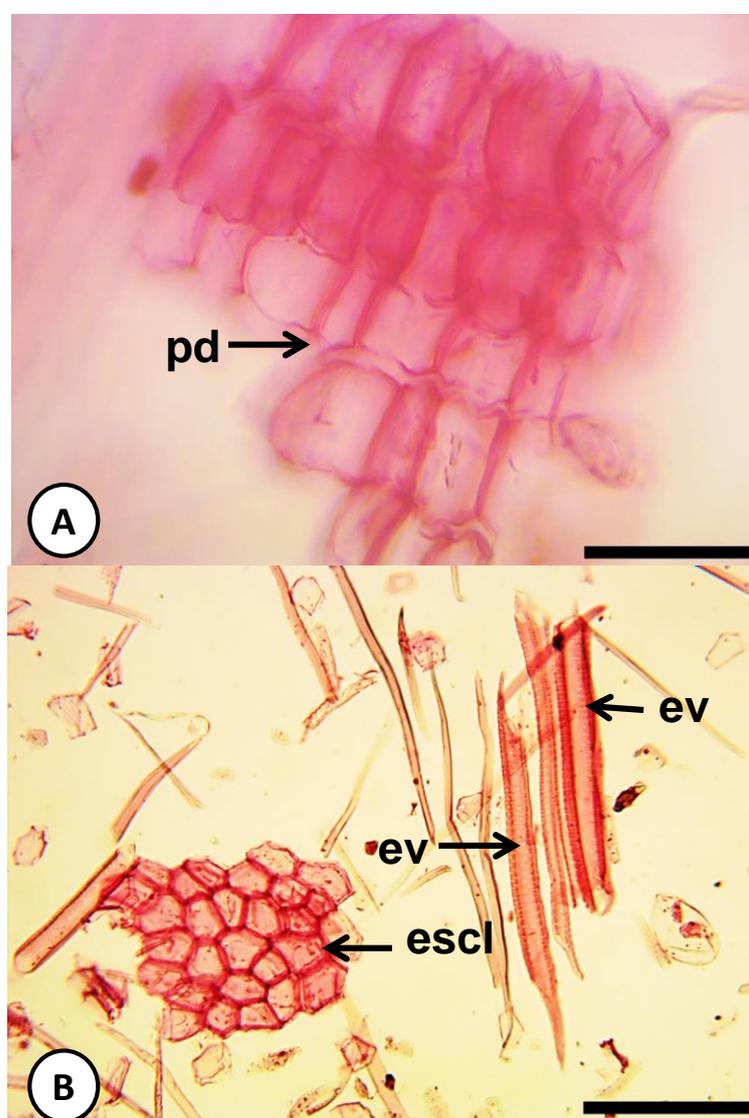


A. cristais na nervura central. **B.** mesofilo. **cis:** cistólito, **cp:** cristal prismático, **dr:** drusa, **ep:** epiderme, **pa:** parênquima, **fv:** feixe vascular, **pl:** parênquima lacunoso, **pp:** parênquima paliçádico. Barras: A. 20 μ m. B. 200 μ m.

Através da maceração foi possível verificar alguns dos caracteres observados nas seções transversais e paradérmicas dos órgãos analisados. Na maceração da raiz são observados fragmentos de periderme (Figura 12A), esclerênquima e elementos de vaso com

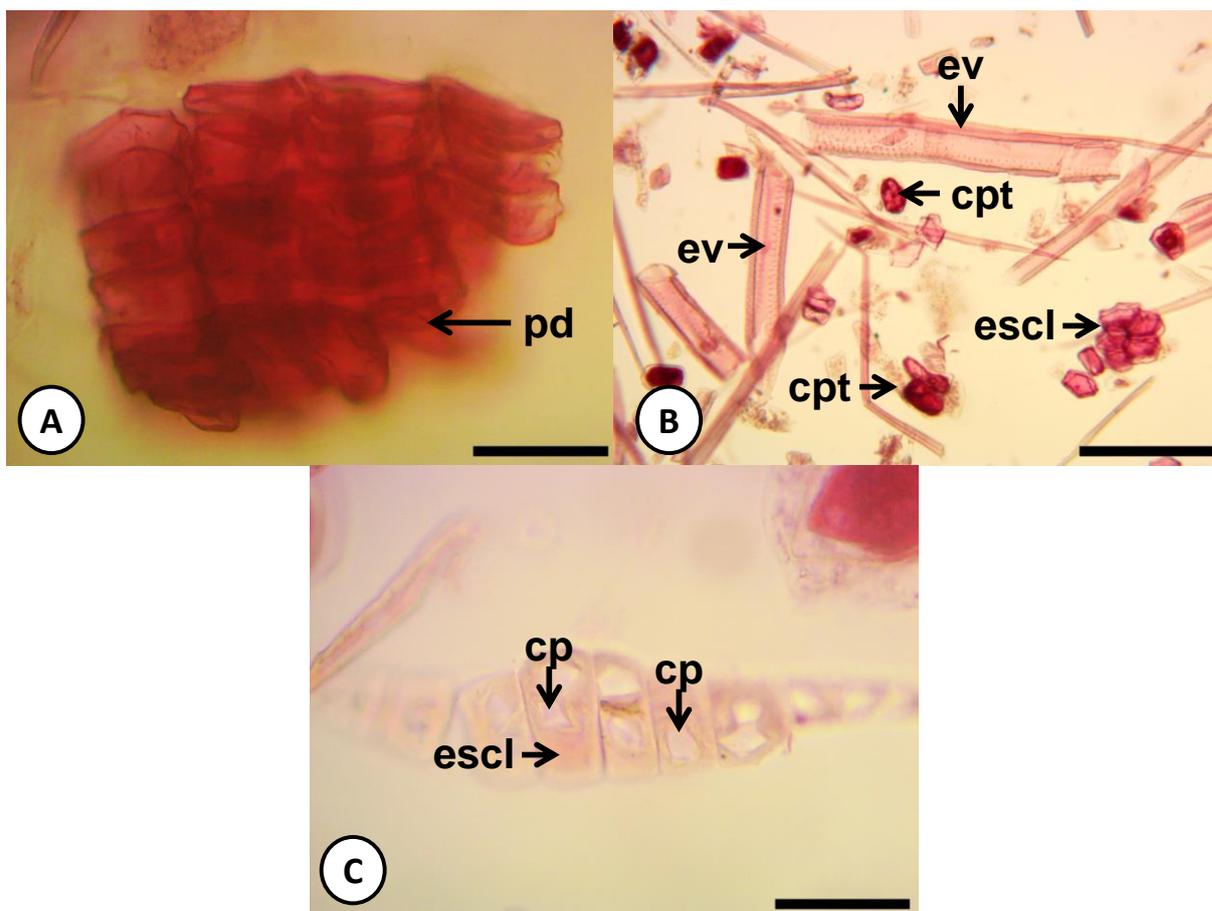
pontoações alternadas (Figura 12B). Na maceração do caule também são observados fragmentos de periderme (Figura 13A), esclerênquima e elementos de vaso com pontoações alternadas, além de células pétreas (Figura 13B) e tecido esclerênquimático com cristais prismáticos (Figura 13C). Na maceração da folha encontram-se fragmentos da face adaxial (Figura 14A) e da face abaxial (Figura 14B), na qual os estômatos são visualizados. Os tricomas estrelados ou sua base são identificados nos fragmentos da epiderme (Figura 14A, B). Os outros tricomas são difíceis de visualizar na maceração. Para a folha verifica-se também que os elementos do vaso são do tipo helicoidal (Figura 14C).

Figura 12 – Maceração da raiz de *Croton cordiifolius* Baill.



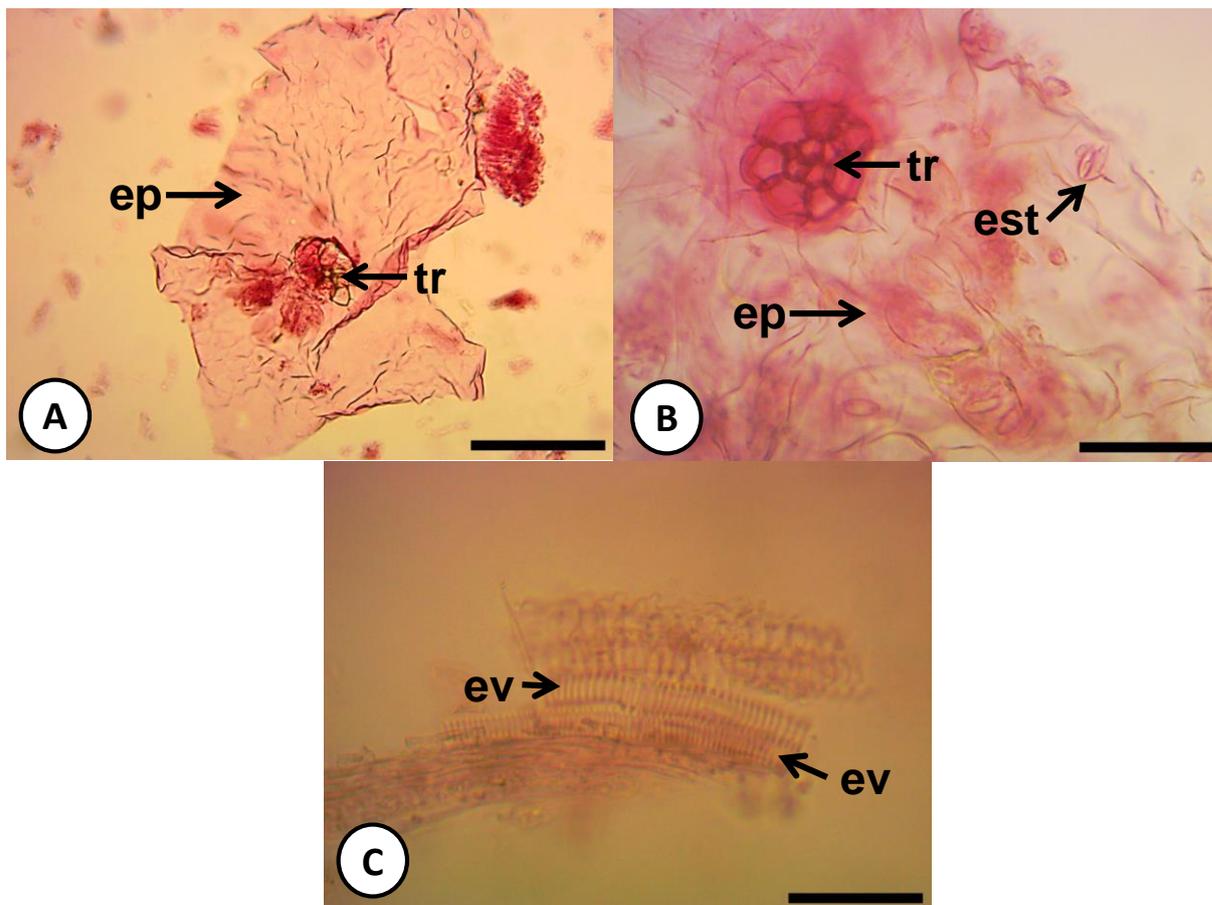
A. periderme da raiz. **B.** parênquima e elementos de vaso da raiz. **pd:** periderme, **escl:** sclerênquima, **ev:** elemento do vaso. Barras: A. 50 µm. B. 200 µm.

Figura 13 – Maceração do caule de *Croton cordifolius* Baill.



A. periderme do caule. **B.** Parênquima, células pétreas e elementos de vaso do caule. **C.** cristais prismáticos no esclerênquima do tronco. **cpt:** célula pétrea, **pd:** periderme, **escl:** sclerênquima, **ev:** elemento do vaso. Barras: A, C. 50 µm. B. 200 µm.

Figura 14 – Maceração da folha de *Croton cordiifolius* Baill.



A. face adaxial da lâmina foliar. **B.** face abaxial da lâmina foliar. **C.** elementos de vaso da folha. **ep:** epiderme, **est:** estômatos, **ev:** elemento do vaso, **tr:** tricoma. Barras: A. 200 μm . B, C. 50 μm .

5.2 Prospecção Fitoquímica do Extrato

A triagem fitoquímica do extrato de *Croton cordiifolius* revelou a presença de flavonoides, fenilpropanoides e derivados cinâmicos, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, alcaloides. Não foram encontrados taninos hidrolisáveis e condensados, antraquinonas, cumarinas e saponinas. Na fração hexânica, foram observados mono- e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides e cumarinas. Na fração acetato de etila, mono- e sesquiterpenos, flavonoides, fenilpropanoglicosídeos e derivados cinâmicos, triterpenos e esteroides. Na fração hidroalcolica, foi possível visualizar alcaloides, flavonoides, fenilpropanoglicosídeos e derivados cinâmicos (Tabela 2).

Tabela 2 – Prospecção Fitoquímica da Casca do Caule de *Croton cordiifolius*.

| Metabólitos | Casca do Caule | Fase Hexânica | Fase Acetato de Etila | Fase Aquosa |
|---|----------------|---------------|-----------------------|-------------|
| Alcaloides | + | - | - | + |
| Mono e Sesquiterpenos | ++ | ++ | ++ | - |
| Flavonoides | ++ | - | ++ | + |
| Fenilpropanoglicosídeos e Derivados Cinâmicos | + | - | + | +++ |
| Triterpenos e Esteroides | +++ | +++ | ++ | - |
| Cumarinas | + | + | - | - |
| Taninos Condensados | - | - | - | - |
| Taninos Hidrolisáveis | - | - | - | - |
| Antraquinonas | - | - | - | - |
| Saponinas | - | - | - | - |
| Proantocianidinas e Leucoantocianidinas | - | - | - | - |

(-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte.

5.3 Análise Química do Óleo Essencial

A análise química do óleo essencial do caule de *Croton cordiifolius*, cujo rendimento foi de 0,81%, permitiu identificar 97,92% de seus constituintes, dentre os quais destacam-se monoterpenos, oxigenados ou não, além de sesquiterpenos. α - e β -pineno constituem os componentes majoritários, conforme disposto na Tabela 3. É importante destacar que os monoterpenos são os mais representativos do óleo, perfazendo 91,13% do total. Destes, os monoterpenos não oxigenados são os majoritários, contemplando 82,24% desse total.

Tabela 3 – Constituição química do óleo essencial de *Croton cordiifolius*.

| Pico | Composto | Tempo de Retenção (min) | IR^a | IR^b | Área Relativa (%) |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | NI | 5.092 | - | - | 0.51 |
| 2 | α -pineno | 5.405 | 938 | 932 | 51.76 |
| 3 | Canfeno | 5.781 | 943 | 946 | 9.71 |
| 4 | β -pineno | 6.573 | 968 | 974 | 19.08 |
| 5 | Mirceno | 6.917 | 978 | 988 | 0.39 |
| 6 | Cimeno | 7.992 | 1011 | 1020 | 0.29 |
| 7 | Limoneno | 8.158 | 1022 | 1024 | 1.01 |
| 8 | NI | 8.242 | - | - | 0.21 |
| 9 | NI | 10.192 | - | - | 0.23 |
| 10 | NI | 10.583 | - | - | 0.58 |
| 11 | Cânfora | 12.203 | 1121 | 1141 | 4.37 |
| 12 | Borneol | 13.017 | 1148 | 1165 | 4.52 |
| 13 | NI | 13.425 | - | - | 0.26 |
| 14 | NI | 13.908 | - | - | 0.28 |
| 15 | β -cariofileno | 22.075 | 1434 | 1417 | 4.31 |
| 16 | β -selineno | 23.175 | 1479 | 1489 | 0.50 |
| 17 | α -muuroloeno | 24.675 | 1480 | 1500 | 1.08 |
| 18 | Óxido Cariofileno | 27.267 | 1567 | 1582 | 0.90 |
| Total identificado | | | | | 97.92 |
| Monoterpenos não oxigenados | | | | | 82.24 |
| Monoterpenos oxigenados | | | | | 8.89 |
| Sesquiterpenos não oxigenados | | | | | 5.89 |
| Sesquiterpenos oxigenados | | | | | 0.90 |

^aConstituintes descritos de acordo com a ordem de eluição na coluna cromatográfica.

^bÍndice de Retenção de Kovats de acordo com n-alcanos (C8-C-26).

Índice de Retenção de Kovats simulado pela equação $IK = 16,267RT + 711,48$.

5.4 Determinação da Atividade Antioxidante

O doseamento de fenólicos totais do extrato das cascas de *C. cordiifolius* revelou a presença de $135,8 \pm 7,62$ mg EAG/g extrato. O teor de flavonoides, por sua vez, foi expresso em $21,24 \pm 0,37$ mg de EQ/g de extrato. O ensaio de determinação da atividade antioxidante total, realizado pelo método do fosfolibdênio, demonstrou uma capacidade antioxidante total de $26,88 \pm 2,83\%$ em comparação com o ácido ascórbico. A atividade sequestradora de radicais livres de DPPH variou de 4,54 a 44,63%, a depender da concentração da amostra. A CI_{50} (concentração que inibe 50% de DPPH) para o extrato foi maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$ de extrato, conforme pode ser observado na Tabela 4. A capacidade antioxidante, realizada através do ensaio ABTS foi de 20,76% na concentração de 1 mg de extrato, conforme também pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antioxidante de *Croton cordiifolius* nos ensaios de fenólicos totais, flavonoides, capacidade antioxidante, DPPH e ABTS⁺.

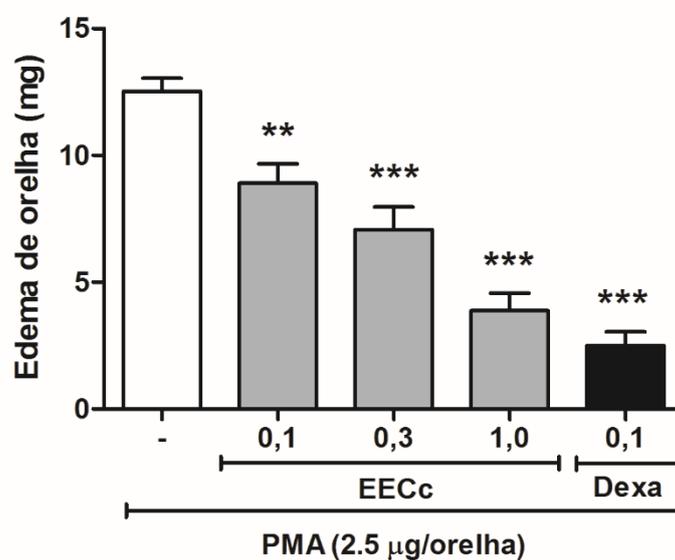
| | Fenólicos totais (mgEAG/g) | Flavonoides (mgEQ/g) | Capacidade antioxidante total (%) | DPPH* (CI_{50} $\mu\text{g/mL}$) | ABTS ⁺⁺ (%) |
|--------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| EECc | $135,8 \pm 7,62$ | $21,24 \pm 0,37$ | $26,88 \pm 2,83$ | >1000 | $20,76 \pm 2,37$ |
| Ácido gálico | - | - | $5,49 \pm 0,98$ | 8.654 (7.903 a 9.477) | - |
| BHT | - | - | $33,62 \pm 3,12$ | 35.04 (32.72 a 37.51) | - |

5.5 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória Tópica

5.5.1 Edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA)

O extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc), nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1 mg/kg, inibiu significativamente o edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA), da mesma forma que o fármaco padrão, a dexametasona, conforme pode ser observado na Figura 15.

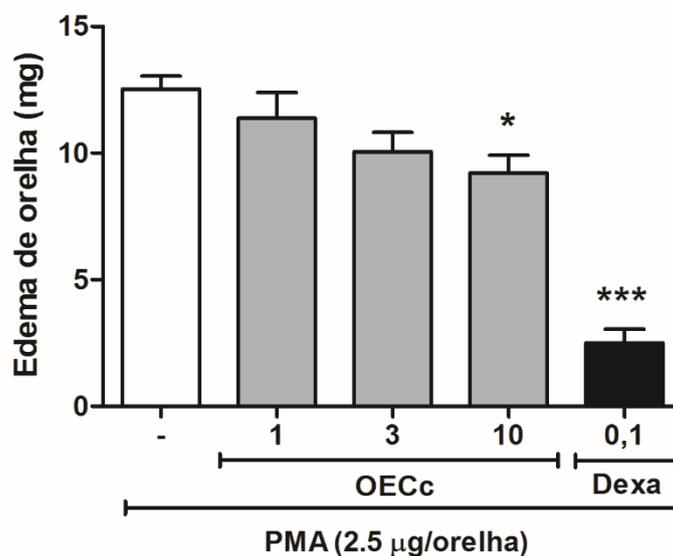
Figura 15 – Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (EECc; 0,1; 0,3 e 1mg/kg, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no teste de edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA).



Resultados expressos como média \pm EPM (n = 8), com nível de significância ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

O óleo essencial das cascas de *C. cordiifolius* (OECc), nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/kg, também foi submetido ao teste de edema de orelha induzido por PMA, mas não apresentou resultados tão promissores quanto o extrato etanólico. Conforme pode ser observado na Figura 16, o óleo essencial apresentou atividade estatisticamente significativa apenas na maior concentração, o que direcionou a continuidade dos demais testes etnofarmacológicos apenas com o EECc.

Figura 16 – Efeito do óleo essencial das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (OECc; 1; 3 e 10 mg/kg, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no teste de edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA).

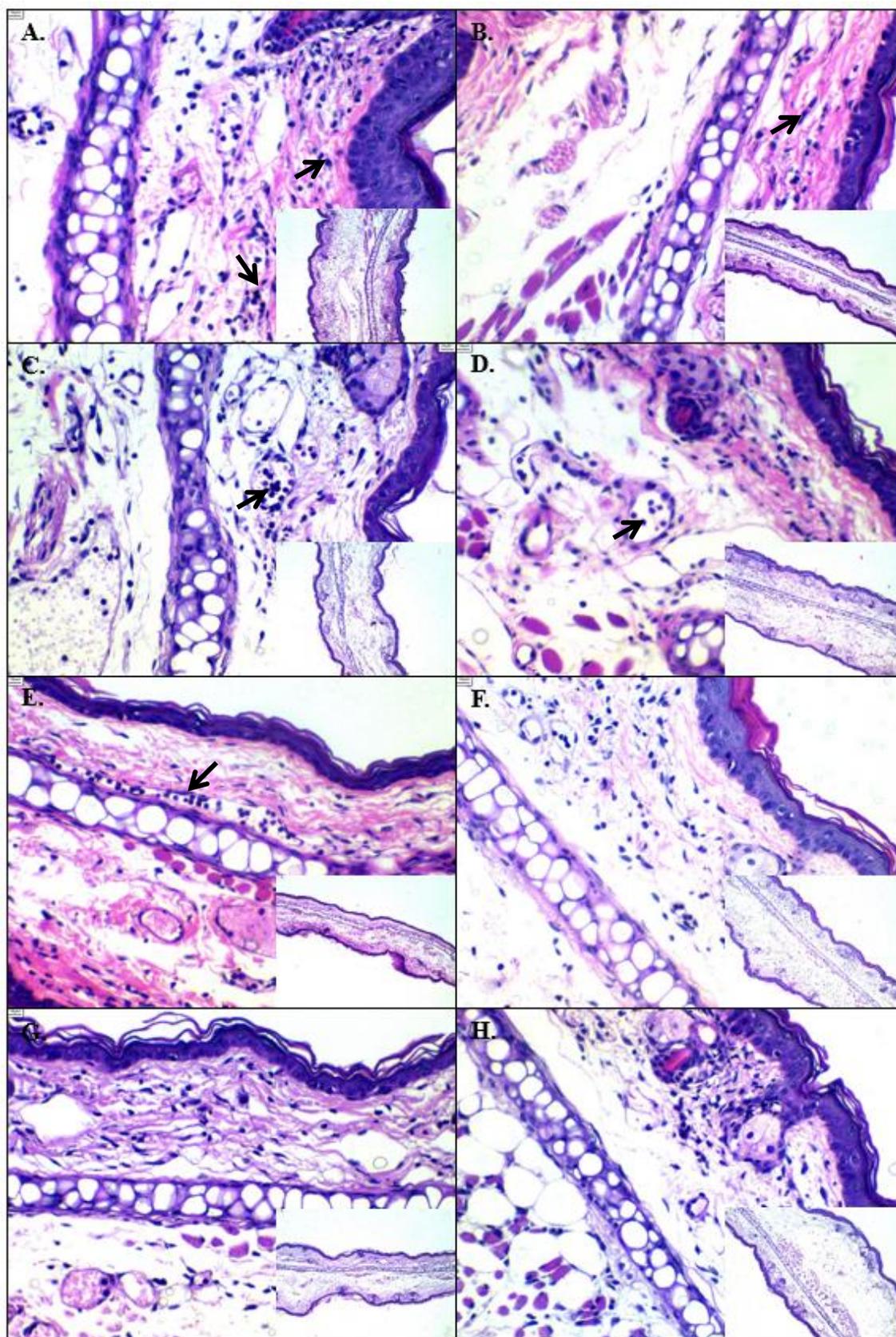


Resultados expressos como média \pm EPM (n = 8), com nível de significância * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

Análise Histológica

Observou-se que a aplicação tópica do PMA promoveu um aumento na infiltração celular, culminando na formação do edema. A partir dos cortes histológicos foi possível a visualização da ação do EECc (1,0 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação tópica de PMA. A Figura 17 mostra fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos animais.

Figura 17 – Análise histológica de edema de orelha induzido por PMA.



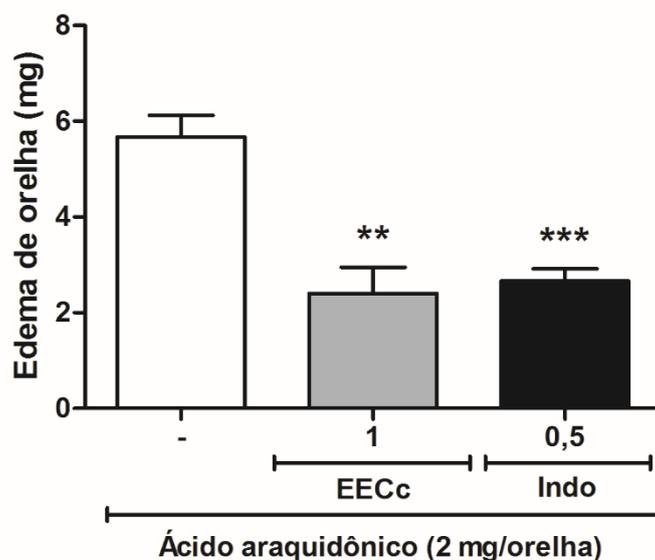
A. Grupo controle negativo. **B.** Grupo tratado com dexametasona (0,1 mg/orelha). **C, E, G.** Grupo tratado com extrato etanólico de *Croton cordifolius* (EECc 0,1; 0,3 e 1 mg/orelha,

respectivamente). **D, F, H.** Grupo tratado com óleo essencial de *Croton cordiifolius* (1, 3 e 10 μL /orelha, respectivamente). As orelhas foram coradas com hematoxilina e eosina. As secções do tecido foram observadas sob microscopia de luz nos aumentos de 100x e 400x (detalhe). Setas apontam para polimorfonucleares. As barras de escala representam 10 μm .

5.5.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA)

A Figura 18 demonstra a inibição estatisticamente significativa tanto do EECc (1 mg/orelha) quanto da indometacina (0,5 mg/orelha) no edema de orelha induzido por AA, em comparação com o controle negativo.

Figura 18 – Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (EECc; 1mg/orelha, via tópica) e indometacina (0,5 mg/kg, i.p.) no teste de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA).

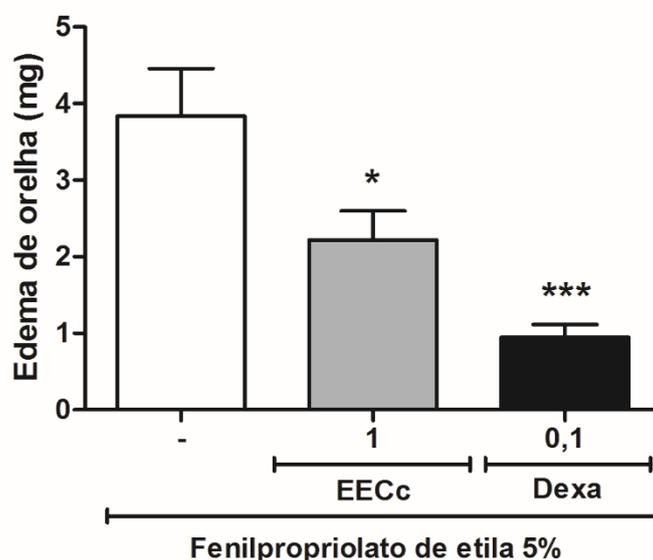


Resultados expressos como média \pm EPM (n = 8), com nível de significância ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

5.5.3 Edema de orelha induzido por fenilpropiolato de etila (EPP)

No modelo de edema de orelha induzido por fenilpropiolato de etila (EPP), o extrato etanólico de *Croton cordiifolius* reduziu significativamente o edema, assim como o fármaco padrão utilizado no controle positivo, conforme pode ser visualizado na Figura 19.

Figura 19 – Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (EECc; 1mg/orelha, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/orelha) no teste de edema de orelha induzido por fenilpropiolato de etila (EPP).

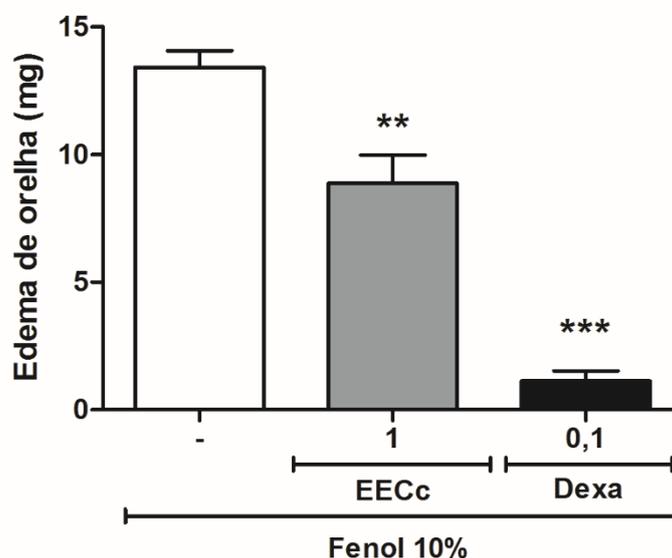


Resultados expressos como média \pm EPM (n = 8), com nível de significância * $p < 0,05$. *** $p < 0,001$.

5.5.4 Edema de orelha induzido por fenol

O EECc 1mg/kg aplicado por via tópica reduziu significativamente o edema de orelha após 1 hora da aplicação do fenol a 10% em acetona, em comparação com o grupo tratado apenas com o veículo, conforme pode ser visualizado na Figura 20. No grupo de controle positivo, tratado com indometacina, também foi observada uma redução significativa no referido edema.

Figura 20 – Efeito do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (EECc; 1 mg/kg, via tópica) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no teste de edema de orelha induzido por fenol.



Resultados expressos como média \pm EPM (n = 8), com nível de significância **p<0,01. ***p <0,001.

5.5.5 Edema de orelha induzido por capsaicina

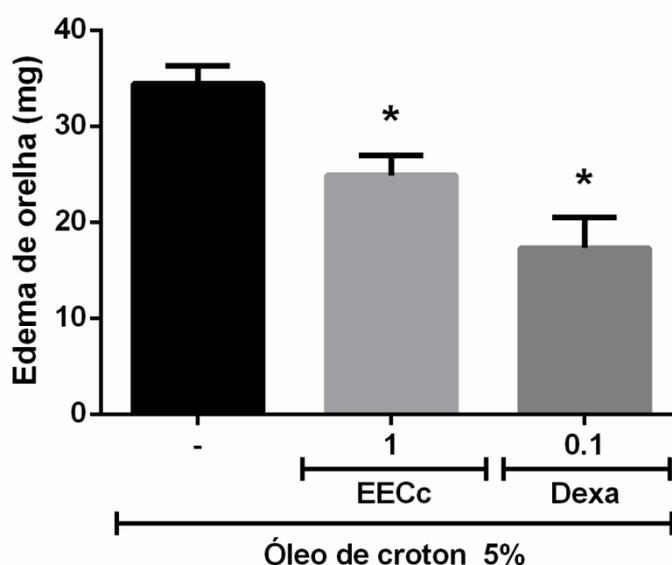
O EECc não reduziu significativamente o edema induzido por capsaicina.

5.5.6 Edema de orelha crônico induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton

As múltiplas aplicações do óleo de cróton 5% (20 μ L/orelha, tópico) induziram a formação do edema na orelha dos camundongos 6 horas após a primeira aplicação, aumentando nos dias seguintes e atingindo o efeito máximo no quinto dia, quando comparado ao grupo veículo (acetona). Os tratamentos (duas vezes por dia, 12 h/12 h, tópico) foram realizados do 5º ao 9º dia do experimento. A aplicação do corticoide dexametasona (0,1 mg/orelha), utilizado como controle positivo, foi capaz de impedir a formação do edema desde o 1º dia de tratamento até o final do experimento, quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado com o EECc (1,0 mg/orelha) também mostrou uma redução na formação do edema durante todo o tratamento, quando comparado ao grupo controle.

Ao final do experimento (9º dia) as repetidas aplicações de óleo de cróton promoveram um aumento significativo no peso da orelha dos camundongos do grupo controle ($34,45 \pm 1,85$ mg) quando comparado aos grupos que receberam o EECc ($24,88 \pm 2,11$ mg) e dexametasona ($17,33 \pm 3,18$ mg). É possível observar que o EECc e o controle positivo causaram redução no peso das orelhas em 27,78 % e 49,7 %, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figura 21).

Figura 21 – Efeito do extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc, 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (acetona) no peso das orelhas no 9º dia após múltiplas aplicações de óleo de cróton (0,1 mg/orelha).



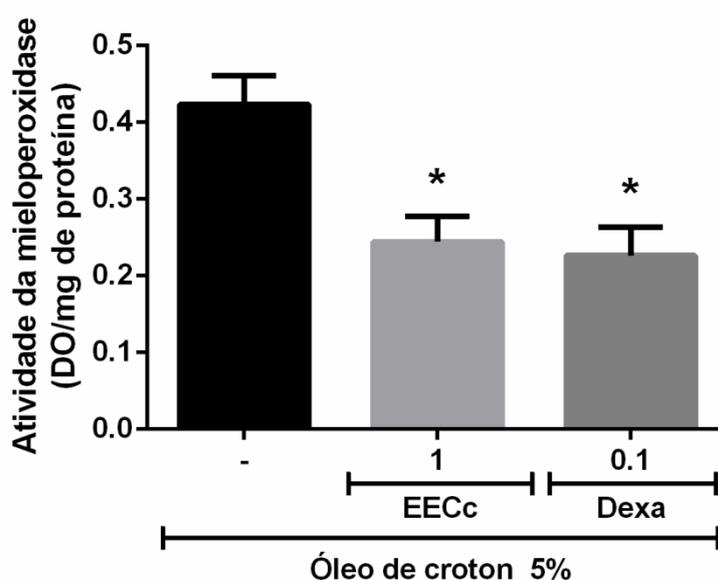
* $p < 0,05$.

Avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é um marcador de leucócitos polimorfonucleares e a determinação da sua atividade indica de forma indireta a infiltração leucocitária no tecido lesionado. Como esperado, o tratamento repetido com óleo de cróton na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo na atividade da MPO no grupo controle ($0,42 \pm 0,04$ DO/Biópsia), quando comparado aos grupos que receberam o EECc ($0,24 \pm 0,03$ DO/Biópsia) e dexametasona ($0,22 \pm 0,04$ DO/Biópsia). Nesse contexto, nas orelhas tratadas com o EECc (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha) a atividade da MPO

foi reduzida em 42,86 % e 47,62 %, respectivamente, em comparação ao grupo controle (Figura 22).

Figura 22 – Efeito do extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc, 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase em sobrenadante de orelhas tratadas com óleo de cróton.



* $p < 0,05$.

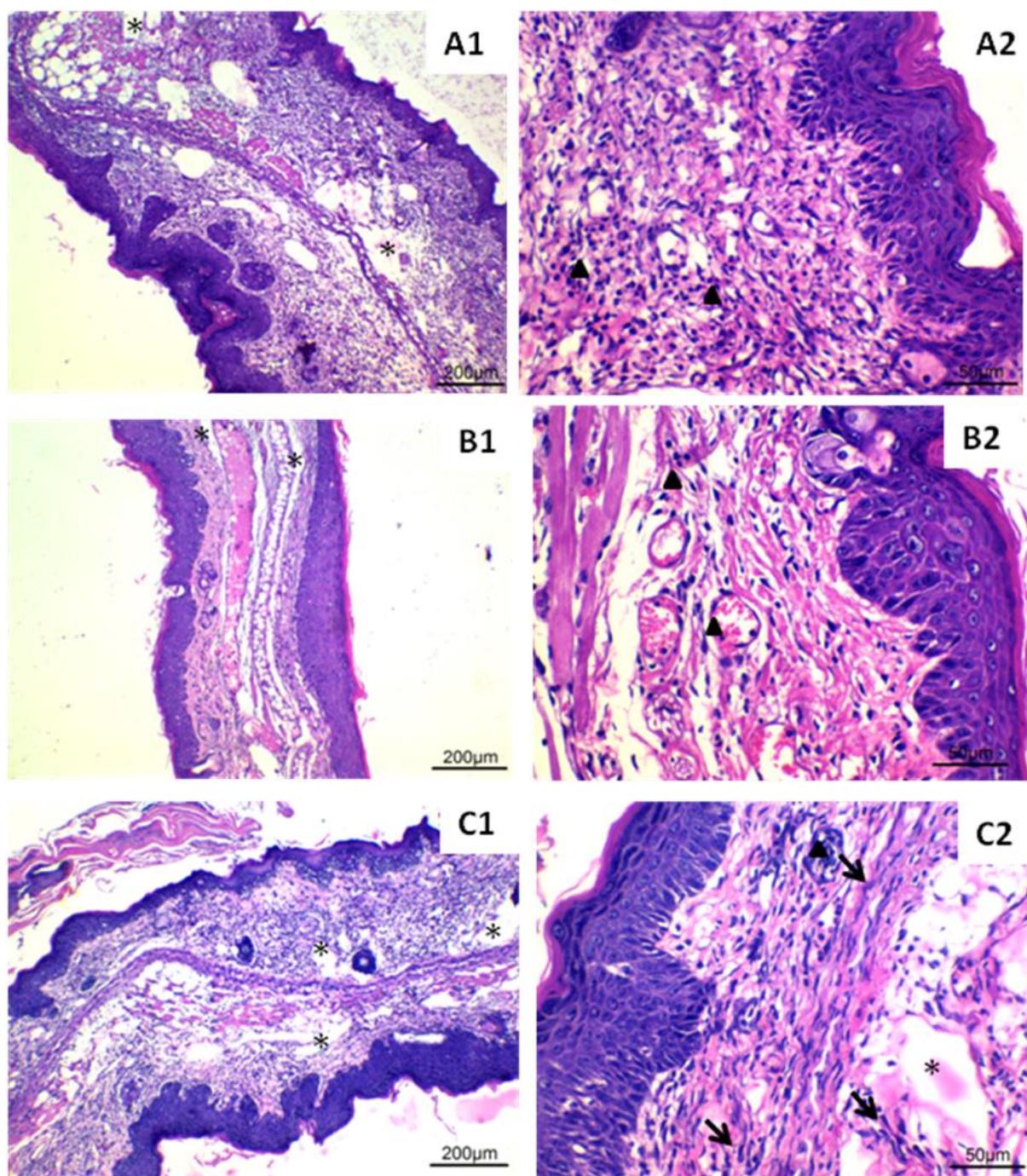
Análise Histológica

A análise histológica do tecido das orelhas após o tratamento repetido com óleo de cróton (Figura 23) permitiu a avaliação da infiltração leucocitária, assim como hiperproliferação de fibroblastos da epiderme, caracterizando remodelamento. A múltipla aplicação tópica do óleo de cróton promoveu aumento da espessura da orelha e da infiltração celular na derme com a presença de alteração epidermal caracterizada por hiperplasia epitelial (acantose) associada com hipergranulose e hiperqueratose compacta. A partir dos cortes histológicos foi possível a visualização da ação do extrato EECc (1,0 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton.

Tanto a dexametasona quanto o extrato foram capazes de reduzir a migração celular quando comparados ao grupo controle. A múltipla aplicação tópica de óleo de cróton também gerou um aumento na espessura da epiderme dos animais do grupo controle em

relação aos grupos que receberam o EECc (1,0 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha).

Figura 23 – Análise histológica de edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton.



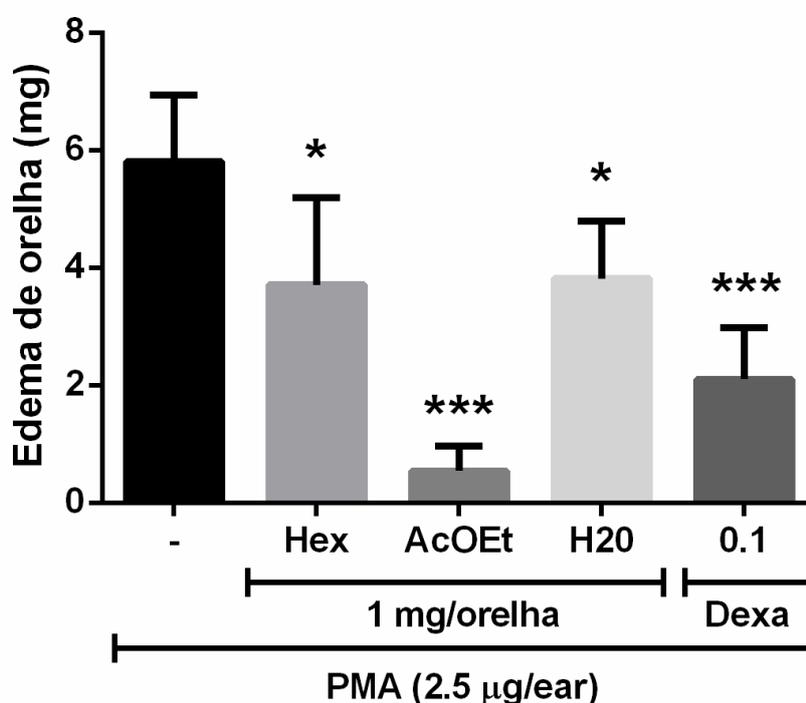
Fotomicrografias de corte transversais de orelha de camundongos experimentais, corados com hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscopia de luz (escalas 200 μ m e 50 μ m). (A) Grupo Controle negativo. A1 (100X) e A2 (400X). Evidencia infiltrado inflamatório intenso de polimorfonucleares (cabeças de seta), edema moderado (asterisco).

(B) Grupo controle positivo. B1 (100X) e B2 (400X). Mostra infiltrado inflamatório moderado de polimorfonucleares (cabeças de seta), edema leve (asterisco). (C) Grupo Tratado. C1 (100X) e C2 (400X). Mostra infiltrado inflamatório moderado de polimorfonucleares (cabeças de seta), edema moderado (asterisco) e presença de remodelamento, com intensa presença de fibroblastos (setas).

5.5.7 Edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA) – Avaliação das fases

Verificou-se que as três fases, hexano, acetato de etila e água, apresentaram atividade estatisticamente significativa no modelo de edema de orelha induzido por PMA. Entretanto, a fase acetato de etila demonstrou a melhor atividade, conforme pode ser visualizado na Figura 24.

Figura 24 – Efeito das fases obtidas a partir do extrato etanólico das cascas do caule de *Croton cordiifolius* (1 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/kg, i.p.) no teste de edema de orelha induzido por acetato de forbol miristato (PMA).



Resultados expressos como média ± EPM (n = 8), com nível de significância * p < 0,05. ** p < 0,01 *** p < 0,001

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização Farmacobotânica

Os laticíferos estão distribuídos em vários gêneros da família Euphorbiaceae (METCALFE; CHALK, 1950). Eles podem ser encontrados em todos os órgãos vegetativos, como no caso de espécies de *Euphorbia* (GALES; TOMAS, 2007). De acordo com Rudall (1989) em espécies de *Croton* os laticíferos são não-articulados e sua abundância depende do meio ambiente. Randau e colaboradores (2002) não mencionaram a presença de laticíferos nas raízes de *Croton rhamnifolius* e *C. rhamnifolioides*, como também não foi identificado neste estudo. Assim como característica comum a ambas as espécies de *Croton* analisadas por Randau e colaboradores (2002) em *C. cordiifolius* é descrito um córtex parenquimático na raiz. No entanto, em *C. rhamnifolius* foram verificadas fibras gelatinosas no floema e em *C. rhamnifolioides* foi visto periciclo. Nenhuma destas características está presente em *C. cordiifolius*.

O periciclo também foi visualizado no caule de *C. rhamnifolioides* (RANDAU et al., 2002). É possível distinguir o caule de espécies de *Croton* pelo tipo de tecido que forma a região cortical e as estruturas encontradas nestes tecidos. Em *C. rhamnifolius*, a região cortical é composta por colênquima e parênquima, enquanto que em *C. rhamnifolioides*, *C. draco* e *C. cordiifolius* somente o parênquima é encontrado (RANDAU et al., 2002; FARIAS et al., 2009). No entanto, no parênquima cortical de *C. rhamnifolioides* foram observadas fibras, laticíferos e amido (RANDAU et al., 2002), enquanto no parênquima cortical de *C. draco* foram encontrados cristais (FARIAS et al., 2009), além dos outros elementos citados para *C. rhamnifolioides*. Neste estudo também foi verificada a presença de todos estes elementos anteriormente mencionados para a região cortical das outras espécies de *Croton*, no entanto, também é observada a presença de células lignificadas.

Hayden e Hayden (1994) observaram floema interno em *C. glandulosus*, mas não mencionaram a ocorrência de fibras associadas ao mesmo, como ocorre em *C. cordiifolius*. Em *C. draco* foi relatada a presença de fibras no floema externo (FARIAS et al., 2009). Farias e colaboradores (2009) também observaram cristais no esclerênquima. De acordo com Franceschi e Nakata (2005), a morfologia dos cristais produzidos pode ser de um único tipo em toda a planta, ou de vários tipos sendo cada um específico para um órgão particular, ou de vários tipos dentro do mesmo órgão. Verificou-se que este último caso ocorre em *C. cordiifolius*.

Tadavil e Bhadane (2014) investigaram a anatomia da ráquis, pecíolo e peciólulo em 43 espécies e 20 gêneros de Euphorbiaceae e observaram que a variação na distribuição de esclerênquima, colênquima e padrões vasculares, além das formas observadas na secção transversal, podem ser utilizadas para a diferenciação das espécies. Sá-Haiad e colaboradores (2009) analisaram dez espécies de *Croton*. Em três espécies, o contorno do pecíolo era circular; em seis espécies o contorno era aproximadamente circular, com uma depressão na face adaxial; e em uma espécie o contorno era côncavo-convexo. *Croton rhamnifolius* e *C. rhamnifolioides* exibem um contorno plano-convexo (RANDAU et al., 2002), diferindo do contorno exibido por *C. cordiifolius*. Além disso, as espécies de *Croton* também podem ser diferenciadas pelos tipos de tricomas que estão presentes no pecíolo. Em *C. rhamnifolius* e *C. rhamnifolioides* foram verificados tricomas dendríticos e glandulares (RANDAU et al., 2002), em *C. cajucara* foi identificado o tricoma multirradiado (MENDONÇA; ILKIU-BORGES; SOUZA, 2008), enquanto em *C. cordiifolius* são vistos tricomas estrelados, simples e glandulares.

Lucena e Sales (2006) caracterizaram os tipos de tricomas presentes na lâmina foliar de 14 espécies de *Croton* como estrelado, fasciculado, multirradiado, dendrítico, lepidoto, simples e glandular. Os autores afirmaram que o tipo de tricoma é uma característica importante para a taxonomia do gênero. De acordo com Sá-Haiad e colaboradores (2009), são caracteres comuns nas lâminas foliares de espécies de *Croton*: folhas anfiestomáticas, estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral e nervura central biconvexa, com feixes vasculares colaterais. No entanto, em *C. cordiifolius* as folhas são hipostomáticas, o mesofilo é isobilateral e a nervura central tem um contorno côncavo-convexo. Mas algumas dessas características de *C. cordiifolius* já foram descritas em outras espécies de *Croton*, como as folhas hipostomáticas em *C. lanjouwensis* (AGUIAR; PREISINGER, 2000) e o mesofilo isobilateral em *C. rhamnifolioides* (RANDAU et al., 2002). *Croton rhamnifolius* apresenta a nervura central com um contorno plano-convexo (RANDAU et al., 2002).

Não foram encontrados estudos na literatura sobre a maceração dos órgãos de espécies de *Croton*. No entanto, os estudos de Luchi (2004) sobre a raiz de *C. urucurana* e sobre o caule de *C. urucurana* e Hayden e Hayden (1994) sobre o caule de *C. glandulosus* descreveram que os elementos do vaso têm pontoações alternadas.

Os caracteres descritos neste estudo são importantes para a diferenciação de *C. cordiifolius* das outras espécies do gênero *Croton*. Alguns caracteres, como os tricomas não-glandulares na lâmina foliar, e os cristais, como as drusas, demonstram a adaptação da espécie em ambientes xéricos.

6.2 Prospecção Fitoquímica

O gênero *Croton* é caracterizado pela diversidade química. Diante das descrições existentes acerca da composição química de muitas de suas espécies, este gênero pode ser caracterizado como uma fonte promissora de moléculas bioativas com um potencial notável para a descoberta de novas atividades biológicas. O crescente interesse pelo estudo de espécies de *Croton* resultou no isolamento e identificação de mais de 100 compostos químicos atualmente conhecidos no Brasil (ANGÉLICO, 2011; SONG et al., 2015).

Terpenoides, em especial os diterpenos com esqueleto do tipo cembranoide, clerodano, neoclerodano, halimano, isopimarano, caurano, secocaurano, labdano, forbol e traquilobano, são os metabólitos secundários predominantes no gênero. Mono e sesquiterpenos, encontrados em óleos essenciais, além de triterpenos, alcaloides e compostos fenólicos, como flavonoides, lignoides e proantocianidinas, são frequentemente relatados para espécies de *Croton* (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Terpenos e esteroides são constituintes químicos de interesse em decorrência de suas atividades anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiviral, hepatoprotetora e hormonal (GUPTA et al., 1969; MAHATO et al., 1988; MATOS, 2011). Diterpenos clerodanos são frequentemente encontrados na casca do caule de espécies de *Croton*, como *C. cajucara*, *C. urucurana*, *C. lechleri*, mas pouco encontrados em espécies de caatinga, como *C. brasiliensis*, de cujas folhas e caule foram isolados os novos clerodanos crotobrasilinas A e B (PALMEIRA-JÚNIOR et al., 2005). Os diterpenos com o novo esqueleto de sarcopetalano, além dos esqueletos labdano, traquilobano, cembranoide e halimano, não são encontrados em espécies de Caatinga.

A presença de triterpenos e esteroides em *C. cordiifolius*, identificada neste estudo, corrobora com os achados para as folhas, caule e raízes de *C. muscicarpa*, dos quais foram isolados 6 α -metoxi-cipereno, ácido acetil aleuritólico, espatulenol, dammaradienol e esqualeno, sendo estes 2 últimos relatados pela primeira vez na família Euphorbiaceae (BARRETO et al., 2013); para as folhas e caule de *C. regelianus*, dos quais foram encontrados o bisnorditerpeno rel-(5b,8a,10a)-8-hidroxi-13-metilpodocarpa-9(11),13-dieno-3,12-diona e o sesquiterpeno guaiano rel-(1R,4S,6R,7S,8aR)-decahidro-1-(hidroximetil)-4,9,9-trimetil-4,7-(epoximetano)azulen-6-ol (TORRES et al., 2010); e para as folhas e caule de *C. sellowii*, dos quais foram isolados sitosterol, estigmasterol, cicloart-25-eno-3 β ,24 α -diol, cicloart-25-eno-3 β ,24 α -diol e ácido betulónico (PALMEIRA-JÚNIOR et al. 2006).

Cumarinas, que são raras na família Euphorbiaceae e no gênero *Croton*, foram encontradas em *C. cordiifolius* neste estudo. Este resultado corrobora com aqueles reportados por Lima e colaboradores (2010), que relataram a presença de uma cumarina em *C. adenocalyx*, representando um papel importante na diferenciação quimiotaxonômica dessas espécies. Randau e colaboradores (2004) realizaram um estudo fitoquímico do extrato de diferentes partes de *C. rhamnifolioides*, também conhecido como “quebra-faca” e comumente confundido com *C. cordiifolius*. Observou-se a presença de alcaloides, triterpenos e esteroides, açúcares, flavonoides e fenilpropanoglicosídeos. Portanto, a presença de cumarinas no extrato da casca do caule de *C. cordiifolius* pode ser considerada um marcador útil na diferenciação dessas espécies.

Apesar de não ser comum na família Euphorbiaceae, algumas espécies de *Croton* merecem destaque pela presença de diferentes classes de alcaloides (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Seigler (1994) destacou a relevância dos alcaloides como ferramenta quimiotaxonômica em Euphorbiaceae. A identificação desse grupo de metabólitos secundários neste estudo em *C. cordiifolius* corrobora com vários estudos para outras espécies do mesmo gênero. Farnsworth e colaboradores (1969) relataram, em revisão de literatura, 21 tipos de alcaloides isolados de 8 espécies de *Croton*. Salatino e colaboradores (2007), em revisão mais recente, descreveram 35 tipos de alcaloides para 14 espécies.

Dentre as espécies presentes na caatinga brasileira, os alcaloides beta-carbólicos 2-etoxicarboniltetrahydroharmana e 6-hidroxi-2-metiltetrahydroharmana foram isolados das partes aéreas de *Croton moritibensis* (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2004); anabasina e os alcaloides do tipo guaiano, muscicapinas A, B e C foram descritos para as raízes de *C. muscicapa* (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2005). Alcaloides também foram identificados nas raízes de *C. campestris* (BRITO-JÚNIOR et al., 2014), raízes de *C. rhamnifolius*, folhas, caule e raízes de *C. rhamnifolioides* (RANDAU et al., 2004), *C. linearifolius* (BRITO, 2014), mas nenhum composto foi isolado. Tetrahydroprotoberberina e alcaloides de glutarimida não foram encontrados em espécies de *Croton* da Caatinga.

Flavonoides constituem uma classe de polifenóis amplamente distribuídos nas plantas, inclusive do gênero *Croton*. Diferentes estudos relataram atividades antioxidante, analgésica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antialérgica e antiparasitária para esses metabólitos (COELHO et al., 2016). Entre as espécies de *Croton*, ainda não foi possível estabelecer um padrão para os flavonoides. Embora alguns compostos já tenham sido isolados a partir de extratos hexânicos, etanólicos e metanólicos de espécies

de *Croton*, a maioria das investigações não é direcionada à caracterização do perfil de flavonoides apresentado pela planta. Uma análise padronizada dos flavonoides presentes em diferentes espécies de *Croton* pode ser uma ferramenta auxiliar na diferenciação de subgrupos deste gênero.

Neste contexto, a presença de flavonoides e fenilpropanoides nas cascas do caule de *C. cordiifolius*, verificada neste estudo, é consistente com os achados de Palmeira Júnior e colaboradores (2005; 2006) para folhas e caule de *C. sellowii*, os quais contém os flavonoides artemetina, crisosplenetina, casticina, penduletina, tilirosida e o fenilpropanoide treo-7-etoxi-8-hidroxi-dihidroanol; e para as folhas e caule de *C. brasiliensis*, que contém casticina, penduletina, crisosplenol-D e artemetina; de Moraes e colaboradores (1988) para as partes aéreas de *C. mucronifolius*, que encontraram flavonoides polihidroxilados; de Barreto e colaboradores (2013) para as folhas, caule e raízes de *C. muscicarpa*, que contém os flavonoides retusina, 3,7,4'-trimetoxi campferol, ombuína, pachipodol, campferol, casticina, 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona e artemetina; de Coelho e colaboradores (2016) para as folhas de *C. betulaster*, que isolaram 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, casticina e penduletina; e de Lopes e colaboradores (2012) para folhas de *C. pedicellatus*, que encontraram sete flavonoides: tilirosida 6"-O-p-cumaroil- β -galactopiranosil-campferol, 6"-O-p-cumaroil- β -glicopiranosil-3"-metoxi-campferol, caempferol, 3-glicopiranosil-quercetina e alpinumisoflavona, bem como ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico.

Embora os taninos sejam polifenóis ubíquos em plantas, somente as proantocianidinas foram relatadas para espécies de *Croton*, especificamente aquelas que contidas no látex vermelho, como em *C. urucurana*, *C. lechleri* e *C. panamensis*. Estes metabólitos não foram encontrados em espécies de Caatinga (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007), inclusive em *C. cordiifolius*.

6.3 Análise Química do Óleo Essencial

Óleos essenciais já foram descritos para várias espécies do gênero *Croton* (ALMEIDA et al., 2015; LIMA et al., 2010; LEITE et al., 2015; MELO et al., 2013; MORAIS et al., 2006; NEVES; CAMARA, 2012; RAMOS, 2013; TURIEL et al., 2016). Nogueira e colaboradores (2015) descreveram os constituintes do óleo essencial de folhas de *C. cordiifolius*, que é rico em mono- e sesquiterpenos e cujos principais compostos foram os monoterpenos 1,8-cineol e α -felandreno. Em contraposição, os constituintes majoritários do

óleo essencial da casca do caule de *Croton cordiifolius* foram os monoterpenos α - e β -pineno.

O α -pineno também foi o composto majoritário do óleo essencial das partes aéreas de *C. argyrophyloides* (MORAIS et al., 2006), da casca do caule de *C. conduplicatus* (ALMEIDA et al., 2015) e das folhas de *C. adenocalyx* (DE LIMA et al., 2010). Alguns autores tem especulado que a co-ocorrência de α - e β -pineno é uma característica do gênero *Croton*. Outros afirmam que o β -cariofileno e linalol são constituintes majoritários igualmente frequentes (ALMEIDA et al., 2015).

Assim como observado no óleo essencial das cascas de *C. cordiifolius*, o óleo de *C. conduplicatus* também é caracterizado pela presença majoritária de monoterpenos (ALMEIDA et al., 2015). Turiel e colaboradores (2016), por sua vez, compararam a composição química de quatro espécies *Croton*, as quais apresentaram sesquiterpenos como a classe mais proeminente, apesar de monoterpenos também terem sido identificados. Linalol, 1,8-cineol, β -elemeno, (*E*)-cariofileno, epi- α -cadinol, cubenol, α -copaeno, germacreno D, epi-cubenol, selin-11-en-4 α -ol, óxido de cariofileno, espatulenol e α -, β - e γ -eudesmol consistem nos terpenoides mais comumente encontrados em espécies de *Croton* (BRASIL, et al., 2009), alguns dos quais também foram identificados no óleo essencial das cascas do caule de *C. cordiifolius* na análise química.

Apesar de apenas um estudo determinar a composição do óleo essencial de *Croton cordiifolius*, a constituição química e atividades farmacológicas do óleo de várias outras espécies de *Croton* tem sido objeto de estudo. Fenilpropanoides tais como derivados de anetol e eugenol, foram reportados como os principais componentes dos óleos essenciais presentes em espécies de *Croton* distribuídas em diferentes partes do mundo, como *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius* no Brasil (MORAIS et al., 2006), *C. Molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ et al., 2005), *C. pseudonivensus* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR et al., 2007).

O óleo essencial das folhas de *C. adenocalyx* apresentou 24 compostos, com monoterpenos e sesquiterpenos como principais constituintes (DE LIMA et al., 2010). Fontenelle e colaboradores (2008) relataram que o óleo essencial de *C. nepetaefolius* apresenta metil-eugenol e biciclogermacreno como componentes mais relevantes, enquanto os principais constituintes do óleo de *C. argyrophyloides* são espatulenol e biciclogermacreno, e para *C. zehntneri* são estragol e anetol.

Além de diferenças na constituição de óleos essenciais entre espécies distintas do gênero *Croton*, vários autores têm demonstrado distintas composições de óleo essencial de

diferentes tecidos da mesma espécie (BRASIL et al., 2009, MORAIS et al., 2006, NEVES; CAMARA, 2012). Em geral, os óleos essenciais de espécies brasileiras de *Croton* apresentam mono e sesquiterpenos como componentes principais, com exceção de *C. zehntneri*, no qual predominam os fenilpropanoides eugenol e anetol (CRAVEIRO et al., 1981).

A maioria dos estudos acerca da constituição química do óleo essencial de espécies de *Croton* refere-se às folhas ou partes aéreas. Dentre os estudos que relatam a constituição do óleo essencial do caule, pode-se destacar o realizado por Neves e Camara (2012) para *C. pulegioides*, com o α -calacoreno como principal composto, e para *C. heliotropiifolius*, com guaiol como principal composto; por Almeida e colaboradores (2015) para *C. conduplicatus*, com α -pineno como o principal composto; e por Suárez e colaboradores (2005) para *C. molambo*, com metileugenol como o principal composto.

A composição química das espécies de *Croton* pode estar correlacionada com a sua distribuição geográfica. Um exemplo disto são os diterpenos do tipo labdano e caurano, que ainda não foram relatados para espécies do Novo Mundo; alcaloides, que só foram encontrados em espécies americanas; e as espécies aromáticas, que também são prevalentes na América (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Além disso, a presença de compostos encontrados somente em espécies de caatinga brasileiras pode indicar a existência de quimiotipos únicos dentro de espécies de *Croton* encontradas somente nesse bioma (ANGÉLICO, 2011).

Croton cordiifolius, *C. heliotropiifolius*, *C. conduplicatus* e *C. rhamnifolioides* são popularmente conhecidos como "quebra-faca" devido à rigidez de seu caule (RANDAU et al., 2004). Essas espécies também apresentam usos populares semelhantes: *C. cordiifolius* é usado para tratar inflamação em geral, dor e distúrbios gastrointestinais (NOGUEIRA et al., 2015); *C. heliotropiifolius* é usado como um remédio popular para o tratamento de feridas, inflamação e câncer (NEVES, CAMARA, 2012); a decocção das folhas e casca do caule de *C. conduplicatus* é usada na medicina popular para tratar a gripe, dor de cabeça, indigestão, problemas de estômago e dor de estômago (ALMEIDA et al., 2015); há relatos de utilizações de *C. rhamnifolioides* para o alívio da dor de estômago, mal-estar gástrico, vômitos, diarreia sanguinolenta e para aliviar a febre (RANDAU et al., 2004).

Neste contexto, a diferenciação de sua composição química e atividades farmacológicas, juntamente com sua caracterização botânica, constituem uma ferramenta de diagnose para a espécie. Neves e Camara (2012) estudaram a composição química do óleo essencial da casca do caule de *C. heliotropiifolius*, observando um perfil característico do

gênero pela presença de β -cariofileno como um dos principais constituintes. Difere do óleo essencial de casca do caule de *C. cordiifolius* pela presença de sesquiterpenos e derivados fenilpropanoides. Almeida e colaboradores (2015) descreveram pela primeira vez a constituição química do óleo essencial de casca de caule de *C. conduplicatus*, cujos principais compostos foram α -pineno, β -pineno, cânfora e (*E*)-cariofileno. A composição química do óleo essencial de casca de caule de *C. cordiifolius* é muito similar, com α - e β -pineno como constituintes majoritários. A principal diferença é a presença do monoterpene canfeno como o terceiro maior constituinte em *C. cordiifolius*.

Apesar da existência de alguns estudos que apontam para padrões químicos no gênero, dada a sua variabilidade e a pequena amostragem de espécies estudadas quimicamente, conclusões definitivas não podem ser atribuídas para as relações químicas entre as espécies de *Croton* (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

6.4 Determinação da Atividade Antioxidante

O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre a presença de radicais livres, classificados como espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, e a capacidade antioxidante do organismo (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014), seja em decorrência do aumento na produção dos radicais seja por uma competência reduzida em contrapor o ataque oxidativo contra as biomoléculas alvo. Este fenômeno está relacionado com a patogênese e fisiopatologia de diversas doenças crônicas como as neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), enfisemas, câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (MAULIK et al., 2013; TODA, 2011).

Apesar de os radicais livres desempenharem um importante papel nos processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas, as espécies reativas de oxigênio constituem os principais agentes responsáveis pelas reações oxidativas deletérias. (LOPEZ-ALARCONA; DENICOLA, 2013; LUSHCHAK, 2014).

Muitas espécies vegetais do nordeste brasileiro têm sido amplamente estudadas em decorrência de sua potencialidade como antioxidantes naturais (CATUNDA-JÚNIOR et al., 2002). Moraes e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Croton zenhtneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophylloides*. Esta atividade é provavelmente devida à presença da *E*-anetol, em *C. zenhtneri*, metileugenol, em *C. nepetaefolius*, α -pineno, *E*-cariofileno e 1,8-cineol em *C. argyrophylloides*.

Angélico (2011) relatou a atividade antioxidante dos extratos de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*, atribuindo à mesma a possível presença de compostos fenólicos pertencentes às classes de taninos e flavonoides. O doseamento de fenólicos totais do extrato das cascas de *C. cordiifolius* revelou a presença de $135,8 \pm 7,62$ mg EAG/g extrato. Esses compostos, que incluem fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, apresentam a atividade antioxidante ao inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. Essas propriedades são devidas à sua estrutura química e capacidade redutora (SÁ et al., 2012).

O teor de flavonoides, por sua vez, foi expresso em $21,24 \pm 0,37$ mg de EQ/g de extrato. Os mecanismos de ação antioxidante desses metabólitos secundários abrangem a supressão da formação de espécies reativas de oxigênio através de inibição enzimática ou quelatação de elementos envolvidos na produção de radicais livres; a neutralização das espécies reativas de oxigênio e o aumento ou proteção do sistema de defesa antioxidante (SÁ et al., 2012).

A capacidade antioxidante total, determinada pelo método do fosfolibdênio, que fundamenta-se na redução de molibdênio VI em molibdênio V, ocorrida na presença de determinadas substâncias antioxidantes, com formação de complexo verde, foi maior quando comparada a *Croton nummularius* (NETO et al., 2016).

O ensaio do sequestro do radical livre estável DPPH baseia-se na capacidade de determinadas substâncias em doar um átomo de hidrogênio ao radical, reduzindo-o à hidrazina, provocando mudança de coloração, de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010). Neste teste, quando comparados os valores de percentagem de sequestro de radical livre (%SRL) do extrato da casca de *C. cordiifolius* em relação aos padrões, verifica-se que o mesmo apresentou uma atividade antioxidante moderada, com percentual de sequestro do radical DPPH abaixo de 50% na concentração de 1000 µg/mL. Diferentemente, o extrato das folhas de *C. cajucara* apresentou forte atividade sequestradora de radicais livres pelo método do DPPH, com valores de até 75% (TIEPO et al., 2006), assim como a fração acetato de etila, obtida a partir do extrato etanólico do caule de *C. linearifolius*, a qual apresentou percentuais de inibição de até 89,9% (BRITO, 2014). É importante ressaltar que, para *C. linearifolius*, a fração acetato de etila apresentou melhor atividade antioxidante quando comparada com o extrato bruto visto que as moléculas polares, responsáveis pela atividade, estão mais puras e podem reagir sem a possível interferência de outros compostos

(NDHLALA et al., 2013). O mesmo fator possivelmente contribuiu para a atividade antioxidante moderada visualizada para o extrato das cascas do caule de *C. cordiifolius*.

Paralelamente, sabe-se que o óleo essencial de espécies de *Croton* apresenta uma boa atividade antioxidante contra radicais livres. Morais e colaboradores (2006) demonstraram uma boa atividade antioxidante para os óleos essenciais das partes aéreas de *C. zehntneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides* pelo método modificado do ácido tiobarbitúrico. O óleo essencial das folhas de *C. conduplicatus*, conhecido como “quebra-fraca” da mesma forma que *C. cordiifolius*, apresentou uma significativa atividade antioxidante pelo método do DPPH (ALMEIDA et al., 2014), assim como o óleo essencial das cascas do caule de *Croton urucurana* (SIMIONATTO et al., 2007).

Uma vez que a atividade antioxidante de produtos naturais está relacionada a três grandes grupos – ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos, e carotenoides como antioxidantes lipofílicos – o ensaio ABTS⁺ mostra-se útil visto que é capaz de determinar a atividade de compostos tanto de natureza hidrofílica quanto lipofílica. Nesse contexto, os resultados expressos para *Croton cordiifolius* corroboram com os estudos de Almeida e colaboradores (2014) para o óleo essencial das folhas de *C. conduplicatus*, e de Sánchez e colaboradores (2015) para *C. leptostachyus*.

6.5 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória Tópica

A resposta inflamatória tópica pode ser desencadeada por diversos mecanismos, os quais podem ser elucidados mediante pesquisa em modelos animais de edema induzido por diferentes agentes flogísticos. Esses modelos permitem identificar compostos que apresentam absorção cutânea apropriada a qual resulta no alcance de concentrações adequadas para exercer efeito farmacológico (BOUCLIER et al., 1990).

Nesse contexto, foram utilizados cinco modelos com o objetivo de estabelecer os mecanismos anti-inflamatórios do extrato etanólico de *Croton cordiifolius*, onde destacaram-se os seguintes agentes flogísticos: o acetato de forbol miristato (PMA), um éster de forbol ativador da proteína quinase C que produz resposta inflamatória caracterizada pela ação de prostaglandinas (AQUILA et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2009); o ácido araquidônico (AA), componente biológico da membrana celular que, através de seu metabolismo e consequente produção de prostaglandinas e leucotrienos, promove a inflamação (HERNÁNDEZ et al., 2009); o fenilpropiolato de etila (EPP), que é responsável pela liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (NUALKAEW et al.,

2009); o fenol, cuja aplicação resulta em inflamação mediante a liberação de citocinas (Fator de Necrose Tumoral α , Interleucina-1 α , Interleucina-8), as quais também induzem a produção e liberação de prostaglandinas, leucotrienos e espécies reativas de oxigênio (WILMER, et al., 1994; MURRAY, et al., 2007; LIM; PARK; KIM, 2004); e a capsaicina, que ativa uma inflamação neurogênica mediada pela liberação de neuropeptídeos e substâncias pró-inflamatórias a partir da ativação de receptores TRPV-1 (INOUE; NAGATA; KOSHIARA et al., 1993; ZEGARSKA; LELIŃSKA; TYRAKOWSK, 2006).

O modelo de edema promovido por PMA, cujo mecanismo inflamatório é mediado principalmente pela prostaglandina E₂, permite identificar inibidores da biossíntese de prostaglandinas (SILVA et al., 2005). Nesse contexto, o EECc provavelmente inibiu o edema por interferir diretamente na ação das prostaglandinas e/ou por inibir enzimas como cicloxigenase ou fosfolipase A. De acordo com Nair e colaboradores (2006), o flavonoide quercetina diminuiu a produção e a expressão da citocina pró-inflamatória TNF α em cultura de mononucleares de humanos estimulados por acetato de forbol miristato (PMA). Este efeito foi associado à inibição do NF- κ B. Outros flavonoides, como santina e ermanina também inibiram o desenvolvimento de edema de orelha induzido por PMA em camundongos, sendo mais ativos do que indometacina, fármaco controle, na mesma concentração (3 mg/orelha, via tópica) (MARTINEZ et al., 1997). Nesse contexto, a presença de flavonoides demonstrados na prospecção fitoquímica e quantificados por espectrofotometria poderia contribuir para essa atividade.

O processo inflamatório mediado pelo ácido araquidônico (AA) resulta da atividade de mediadores que constituem seus metabólitos tais como prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrieno C₄ (LTC₄), leucotrieno D₄ (LTD₄) (HUMES et al., 1986). O modelo de edema induzido por AA caracteriza-se por ser sensível à identificação de inibidores das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, buscando verificar substâncias capazes de inibir a ação dos mediadores responsáveis pela formação do edema (CRUMMEY, et al., 1987; OPAS; BONNEY; HUMES, 1985; HUMES, et al., 1986). Este modelo não é sensível a inibidores de PLA₂ tais como glicocorticoides. O EECc provavelmente inibiu o edema neste modelo ao impedir o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas e leucotrienos ou a ação de seus metabólitos. Na literatura não foi evidenciada, para espécies do gênero *Croton*, atividade anti-inflamatória tópica com o referido modelo.

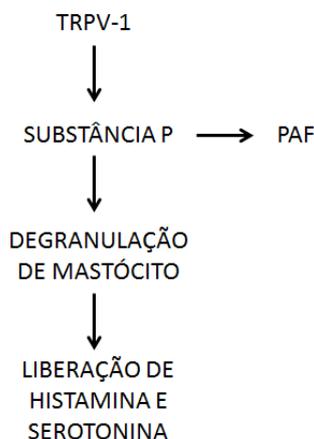
Uma vez que o fenilpropionato de etila (EPP) é responsável pela liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (NUALKAEW et al., 2009), pode-se inferir que o extrato etanólico de *Croton cordiifolius* possivelmente também interfere na

liberação desses mediadores inflamatórios. Por outro lado, o edema de orelha induzido por fenol mimetiza o processo de dermatite de contato visualizado em humanos (LIM; PARK; KIM et al., 2004). A intensa irritação decorrente da aplicação deste agente flogístico é consequência do rompimento da membrana plasmática de queratinócitos, onde verifica-se a liberação de interleucina-1 α (IL-1 α) pré-formada, IL-8, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), radicais livres e mediadores inflamatórios tais como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico.

Apesar de esse processo ocorrer independentemente dos metabólitos do ácido araquidônico, as referidas citocinas (IL-1 α , IL-8, TNF- α) podem induzir a sua produção e liberação assim como de espécies reativas de oxigênio (WILMER, et al., 1994; MURRAY, et al., 2007; LIM; PARK; KIM, 2004). Diferentemente do PMA, o fenol utiliza fatores de transcrição nuclear através de vias dependentes de vias de proteína quinase C para induzir as citocinas inflamatórias. Apesar de utilizar vias distintas, ambos os modelos produzem metabólitos do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio na resposta inflamatória (WILMER et al., 1994). Nesse contexto, pode-se ressaltar a atuação do EECc na redução da produção de mediadores inflamatórios e citocinas através de vias dependentes de proteína quinase C.

A capsaicina, alcaloide obtido de espécies pertencentes ao gênero *Capsicum*, é um agente flogístico que medeia reação inflamatória neurogênica caracterizada pela formação do edema em virtude da vasodilatação, do aumento do fluxo sanguíneo e extravasamento do plasma, além de sensibilizar nociceptores responsáveis pelo surgimento da dor, quando em contato com a mucosa ou pele (ZEGARSKA; LELIŃSKA; TYRAKOWSK, 2006). Neste processo, os receptores TRPV-1 são ativados, resultando na liberação de neuropeptídios, como a substância P, a qual é responsável pela formação de eritema e pápulas, e na degranulação de macrófagos liberando substâncias como histamina e serotonina (Esquema 2) (INOUE; NAGATA; KOSHIARA et al., 1993).

Esquema 2 – Liberação de histamina e serotonina a partir da ativação dos receptores TRPV-1.



Fonte: Autor

A aplicação tópica de capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida) promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios que resultam em vasodilatação e eritema como resposta imediata, seguidos da formação de edema, com pico máximo atingido até 30 minutos após sua administração (GÀBOR; 2000; ZEGARSKA; LELIŃSKA; TYRAKOWSK, 2006). Visto que o EECc não reduziu significativamente o edema induzido por capsaicina, sugere-se que o mesmo não atua nos receptores TRPV-1, não interferindo, assim, na desgranulação dos mastócitos assim como na liberação de histamina e serotonina, mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade celular e formação do edema (INOUE; NAGATA; KOSHIARA, 1993).

O óleo de cróton, utilizado no ensaio crônico, é uma mistura de lipídeos extraídos da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), conhecida por sua atividade flogística. O componente ativo presente no mesmo é o éster de forbol miristato acetato (PMA), cuja aplicação tópica na epiderme de camundongos causa uma série de alterações das atividades biológicas e bioquímicas, resultando em estimulação do metabolismo do ácido araquidônico, acúmulo de neutrófilos e resposta inflamatória acentuada (JANG; PEZZUTO, 1998).

A resposta inflamatória aguda causada pelo uso tópico do PMA apresenta eritema, vasodilatação e edema, além da infiltração de neutrófilos para o tecido (STANLEY et al., 1991; OTUKI et al., 2005). Já a múltipla aplicação do óleo de cróton na pele induz uma reação inflamatória persistente caracterizada por aumento do peso da orelha, infiltração leucocitária e hiperplasia epidermal (STANLEY et al., 1991; ALFORD et al., 1992).

Nesse contexto, o modelo crônico permite a avaliação do efeito anti-inflamatório do EECc num processo já estabelecido e crônico, assemelhando-se com a clínica das desordens inflamatórias cutâneas, visto que o tratamento é inserido normalmente após a instalação do processo inflamatório (STANLEY et al., 1991; ALFORD et al., 1992).

Outra característica marcante da resposta inflamatória induzida por PMA é a infiltração leucocitária. O acúmulo de leucócitos na pele é uma característica de processos inflamatórios dérmicos, sendo importante para a manutenção da reação inflamatória, assim como para aumentar a quantidade de mediadores inflamatórios, como as enzimas COX e espécies reativas de oxigênio. O extravasamento de leucócitos para a área inflamada envolve uma interação complexa entre os leucócitos e o endotélio através da expressão de moléculas de adesão na superfície, como a P-selectina, cuja atividade resulta na diminuição da velocidade destas células no leito vascular, no estabelecimento de fortes ligações entre as integrinas e os neutrófilos com o endotélio, e na consequente diapedese dos neutrófilos em direção ao tecido lesado (SÁNCHEZ; MORENO, 1999).

Os neutrófilos possuem em seus grânulos azurófilos a enzima mieloperoxidase (MPO). Esta, quando liberada dos grânulos, na presença de íons cloro, transforma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante citotóxico que está relacionado a atividade antimicrobiana e dano tecidual causado pelos neutrófilos na inflamação (ARATANI et al., 1999). Logo, a MPO é um importante marcador indireto da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido lesado e a avaliação de sua atividade está relacionada à quantidade de células que migraram para o tecido inflamado (CABRINI et al., 2011).

Os resultados deste estudo, no modelo crônico, demonstram um aumento na atividade enzimática da MPO nos grupos controle, indicando o aumento da migração leucocitária para o tecido inflamado após a indução do agente flogístico. A dexametasona, utilizada como controle positivo, inibiu a atividade enzimática da MPO.

Portanto, ao inibir a migração de leucócitos polimorfonucleares, o extrato pode auxiliar na redução dos sintomas causados por estas células e mediadores, contribuindo assim para a resolução do processo inflamatório em várias doenças inflamatórias crônicas. Os resultados deste estudo indicam que o EECc esteja inibindo o influxo de polimorfonucleares.

Um estudo com o extrato etanólico de *Vernonia scorpioides* mostrou que o mesmo inibiu a atividade da MPO frente ao modelo de indução por aplicação tópica de óleo de cróton (RAUH et al., 2011). Outros trabalhos que demonstraram inibição da atividade

enzimática da MPO foram com os extratos de *Glehnia littoralis* (YOON et al, 2010); *Egletes viscosa* (CALOU et al., 2008) e *Vitis rotundifolia* (BRALLEY et al., 2007), todos indicando o efeito anti-inflamatório dos extratos testados, sendo uma das ações a provável inibição da infiltração de células polimorfonucleares no tecido lesado.

A partir dos cortes histológicos pode-se visualizar a ação do EECc sobre a migração leucocitária, assim como avaliar a hiperproliferação celular. As análises dos cortes histológicos no modelo agudo demonstraram o aumento da espessura da orelha e do infiltrado celular no grupo controle, indicando a instalação de um processo inflamatório induzido pelo PMA. Percebe-se que os grupos tratados com a dexametasona e com EECc reduziram a migração leucocitária e também a espessura da orelha.

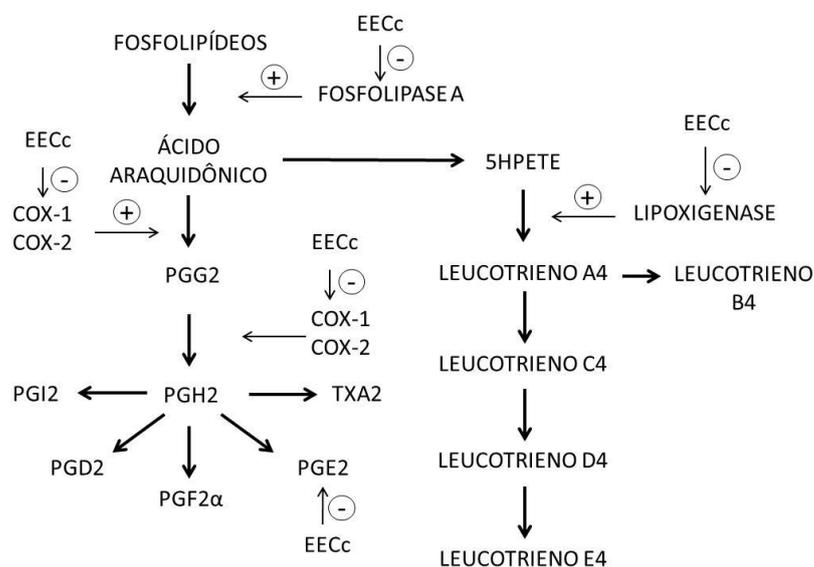
A análise histológica do modelo crônico também demonstrou aumento do infiltrado celular, além do aumento da espessura da epiderme no grupo controle. Os resultados indicam que os tratamentos com a dexametasona e com o EECc reduziram não somente o infiltrado celular, mas também inibiram o aumento da espessura da epiderme. Esta redução no infiltrado celular confirma o resultado obtido com a inibição da MPO, pois significa que a ação anti-inflamatória do EECc pode estar relacionada a uma redução na migração de polimorfonucleares para o tecido lesado.

Após a elucidação dos mecanismos de ação do EECc (Esquema 3) e com o objetivo de estabelecer a fração ativa e os possíveis metabólitos secundários responsáveis pela atividade farmacológica, foi possível observar que todas as frações reduziram significativamente o edema induzido por PMA. Entretanto, a fração acetato de etila mereceu destaque, inclusive quando comparada com o fármaco padrão, a dexametasona, ao interferir diretamente na ação das prostaglandinas ou por inibir enzimas como cicloxigenase ou fosfolipase A. Foi possível observar uma redução de 90,69 % do edema nos animais testados com esta fração, em comparação com uma diminuição de 63,75% para o grupo que recebeu a dexametasona.

Os resultados da prospecção fitoquímica da fração acetato de etila mostram que os flavonoides constituem a classe de metabólitos secundários predominante, os quais podem estar correlacionados com a atividade mais proeminente da mesma, corroborando com diversos estudos que tem determinado a atividade anti-inflamatória dos flavonoides (COELHO et al., 2016). Ainda, sabe-se que a margem de segurança para o uso terapêutico de flavonoides em humanos é muito grande, o que facilita a sua utilização em processos terapêuticos (HVSTEEN, 2002). Nesse contexto, pesquisas voltadas para o isolamento e elucidação estrutural de moléculas bioativas presentes nesta fração são promissoras e podem

subsidiar o desenvolvimento de fármacos tópicos a serem utilizados em doenças inflamatórias cutâneas.

Esquema 3 – Mecanismos de ação do extrato etanólico de *Croton cordiifolius* (EECc).



Fonte: Autor

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que:

A caracterização farmacobotânica, realizada pela primeira vez para a espécie *Croton cordiifolius*, permitiu a identificação de caracteres úteis na sua identificação e diferenciação de outras espécies do gênero, principalmente daquelas também conhecidas popularmente como “quebra-faca” no semi-árido nordestino, as quais incluem *C. heliotropiifolius*, *C. conduplicatus* e *C. rhamnifolioides*.

Dentre as principais características farmacobotânicas, destaca-se a presença de esclerênquima circundando o sistema vascular na raiz; núcleos isolados de floema na região medular do caule primário e sua ausência no caule secundário; pecíolo com sistema vascular formado por vários feixes vasculares descontínuos; lâmina foliar hipostomática, com estômatos paracíticos; mesofilo isobilateral; tricomas estrelados com base multicelular presentes no caule primário, pecíolo e lâmina foliar; presença de cristais prismáticos de drusas em todos os órgãos estudados e canais laticíferos em caule, pecíolo e lâmina foliar.

A prospecção fitoquímica do extrato das cascas do caule de *Croton cordiifolius* demonstrou a presença de flavonoides, alcaloides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, corroborando com os achados para outras espécies do mesmo gênero. A presença de cumarinas mostrou-se importante como possível marcador quimiotaxonômico visto que esta classe de metabólitos não é comum para o gênero.

A caracterização do óleo essencial das cascas do caule de *Croton cordiifolius*, também realizada pela primeira vez, demonstrou monoterpenos como a principal classe, com α - e β -pineno representando os constituintes majoritários. Também foram identificados sesquiterpenos, oxigenados ou não. A determinação de seus constituintes permitiu diferenciar o óleo das cascas do caule desta espécie do óleo das demais do mesmo gênero, além de direcionar futuros estudos de atividade farmacológica.

Observou-se também uma moderada atividade antioxidante no extrato, a qual está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos. Entretanto, quando comparada a algumas espécies do gênero, a mesma é relativamente inferior. Nesse contexto, alguns constituintes do extrato bruto podem ter interferido na atividade.

Quanto aos testes de atividade anti-inflamatória *in vivo*, os resultados obtidos demonstraram que provavelmente o óleo essencial das cascas de *C. cordiifolius* não é efetivo. Entretanto, o extrato apresentou diferentes mecanismos de ação, visto que os

resultados foram significativos em quatro dos cinco testes realizados. Nesse sentido, pode-se considerar que o extrato interfere na biossíntese de prostaglandinas, na liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina, radicais livres e mediadores inflamatórios tais como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, através de vias dependentes de proteína quinase C. Por outro lado, não foi observada atividade do EECc nos receptores TRPV-1 bem como na desgranulação dos mastócitos.

Também foi observada uma significativa atividade anti-inflamatória crônica para o extrato das cascas do caule de *Croton cordiifolius*, o que corrobora com a sua utilização popular no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas e que subsidia futuros estudos voltados ao desenvolvimento de formulações para o tratamento dessas doenças.

Dentre as frações enriquecidas do extrato das cascas do caule de *Croton cordiifolius*, a de acetato de etila mostrou-se a mais eficaz na inibição do edema de orelha induzido por PMA, o que possivelmente correlaciona a atividade biológica da planta a compostos fenólicos e permite direcionar pesquisas de isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários responsáveis pela sua atividade anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

AGUIAR, M.O.; PREISINGER, H. Traits of leaf anatomy of *Croton lanjouwensis* Jablonski (Euphorbiaceae) in different strata of the plant. In: GERMAN-BRAZILIAN WORKSHOP ON NEOTROPICAL ECOSYSTEMS, 2000, Hamburg. **Achievements...** Hamburg: OCLC, 2000. p. 3-8.

ALBUQUERQUE, A.P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol**, v. 110, p. 76-91, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P. **Introdução à etnobotânica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005.

ALENCAR, J.W. et. al. Kovats indices simulation in essential oil analysis. **Quim. Nova** 13:282–284, 1990.

ALENCASTRE, J.B. et al. A study of the characteristics and *in vitro* permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v. 42, p. 69-76, 2006.

ALFORD, J. G. et al. Temporal infiltration of leukocyte subsets into mouse skin inflamed with phorbol ester. **Agent. Act.**, v. 37, n. 3-4, p. 260-267, 1992.

ALMEIDA, A.B.A. et al. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic croton in obtained from *Croton cajucara* Benth. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 472, n. 11, p. 205-212, 2003.

ALMEIDA J.R.G.S. et al. Chemical composition of essential oils from the stem barks of *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) native to the Caatinga Biome. **African J. Pharm. Pharmacol.**, v. 9, n. 4, p. 98-101, 2015.

ALMEIDA, J. et al. Chemical composition of essential oils from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) in two different seasons. **J. Essent. Oil Bear. Plants**, v. 17, n. 6, p. 1137-1145, 2014.

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

ANGÉLICO, E.C. **Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antioxidante de *Croton Heliotropifolius* Kunt e *Croton Blanchetianus* Baill.** 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

- AQUILA, S. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **J. Ethnopharmacol.**, v.121, p.333-37, 2009.
- ARATANI, Y. et al. Severe Impairment in Early Host Defense against *Candida albicans* in Mice Deficient in Myeloperoxidase. **Infec. Immun.**, v. 67, n. 4, p. 1828-1836, 1999.
- ARAÚJO-JÚNIOR, V.T. et al. Alkaloids and Diterpenes From *Croton moritibensis*. **Pharm. Biol.** v. 42, n.1, p. 62-67, 2004.
- ARAÚJO-JÚNIOR et al. Muscicapines, a New Class of Guaiane-Type Sesquiterpene Alkaloids from *Croton muscicapa*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 3b, p. 553-557, 2005.
- BAILLON, H. **Etude Générale du Grupo dès Euphorbiacées**. Paris: Victor Masson, 1858.
- BALBINO, E.E.; DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.
- BARBOSA, P.R. et al. Benzoyl-methylpolyols from *Croton* species (Euphorbiaceae). **Arkivoc.**, v. 2004, p. 95-102, 2004.
- BARRETO, M.B. et al. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Quim. Nova**, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.
- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatorios Nao Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cerebro-Vasculares e Renais. **Arqu. Bras. Card.**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BENTHAM, G. Note on Euphorbiaceae. **Bot. J. Linnean. Soc.**, v. 37, p. 185-267, 1880.
- BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BOLLER, S. et al. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 130, n. 2, p. 262-266, 2010.
- BOUCLIER, M. Et al. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 42, p. 127-154, 1990.
- BRAD, S. The cutaneous citadel: A holistic view of skin and immunity. **Life Sci.**, v. 67, n. 5, p. 477-502, 2000.
- BRALLEY, E. E. et al. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **J. Med. Food**, v. 10, n. 4, p. 636-642, 2007.
- BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL, D.S. et al. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 6, p. 1188-1192, 2009.

BRITO-JÚNIOR, F.E. et al. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **J. Ethnopharmacol.**, v. 153, p. 469-477, 2014.

BRITO, M.S. **Prospecção química e avaliação da atividade antioxidante de extratos dos caules de *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

BUKATSCH F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 255, 1972.

BURBACH, G. J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: **the Biology of the Skin**. 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

CABRINI, D.A. et al. Analysis of the Potential Topical Anti-Inflammatory Activity of *Averrhoa carambola* L. in Mice. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, 2011.

CALIXTO, J.B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.**, v.70, p. 93-103. 2004.

CALOU, I.B. et al. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate and oxazolone. **Biol. Pharm. Bull.**, V. 31, P. 1511-15166, 2008.

CARNEIRO-TORRES, D.S. **Diversidade de *Croton* no Bioma Caatinga**. 2009. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

CARTAXO, S.L. et al., Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 13, p.326-342, 2010.

CATUNDA-JÚNIOR, F.E.A. et al. Atividade antioxidante de óleo essenciais de plantas do nordeste do Brasil. **Cienc. Tecnol.**, v. 4, p. 23-29, 2002.

CHAN, L.S. **Animal model of human inflammatory skin diseases**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

CHUONG, C.M. et al. What is the “true” function of skin? **Exp. Dermatol.**, v. 11, p. 159-187, 2002.

CLAUDIANO, G. S. et al. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 34 , p.1057 – 1062, 2013.

COELHO, P.L.C. et al. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 26, p. 34-43, 2016.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. **Robbins: As bases patológicas da doença**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D.S. Euphorbiaceae. In: M.R.V. Barbosa, C. Sothers, S. Mayo, C.F.L. Gamarra & A.C. Mesquita. (orgs.). **Checklist das plantas do Nordeste brasileiro v.1: Angiospermas e Gymnospermas**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, p.71-74, 2006.

CORDEIRO, I. et al. *Croton* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 17 Nov. 2015.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COSTA, G. et al. Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. **Curr. Med. Chem.**, v.19, p. 2876-2900. 2012.

COSTA, J.G.M. et al. Composição Química e Avaliação da Atividade Antibacteriana e Toxicidade do Óleo Essencial de *Croton zehntneri* (Variedade Estragol). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n. 4, p. 583-586, 2008.

COSTA-FILHO, L.O. et al. Foliar cuticular n-alkane of some *Croton* species from Brazilian semiarid vegetation. **Biochem. System. Ecol.**, v. 41, p. 13-5, 2012.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C.J. Pain: Molecular Mechanisms. **The J. Pain**, v. 1, p. 35-44, 2000.

CRAVEIRO, A.A. et al. Volatile constituents of Brazilian Euphorbiaceae genus *Croton*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, p. 602-608, 1981.

CREPALDI, C.G. et al. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South Afr. J. Bot.**, v. 102, p. 157-165, 2016.

CRONQUIST, D.C. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Nova Iorque: **Columbia Univers. Press**, 1981.

CRUMMEY, A. et al. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

DA VEIGA, S.P. Epidemiology of atopic dermatitis: a review. **Allergy Asthma Proc.** v. 33, n. 3, p. 227-234, 2012.

DEBENEDICTIS, C. et al. Immune functions of the skin. **Clin.Dermatol.**, v. 19, n. 5, p. 573-585, 2001.

DE LIMA, S.G. et al. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. Adenocalyx* baill – Euphorbiaceae. **Rev. Latinoam. Quim.**, v. 38, n. 3, p. 133-144, 2010.

DRAY, A. A inflammatory mediators of pain. **Brit. J. Anaesthesiol.**, v. 75, p. 125-131, 1995.

FALCÃO, H.S. et al. Review of the Plants with Anti-inflammatory Activity Studied in Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

FARIAS, F.R. et al. Bark anatomy in *Croton draco* var. *draco* (Euphorbiaceae). **Am. J. Bot.**, v. 96, n. 12, p. 2155-67, 2009.

FARNSWORTH, N.R. et al. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **Lloydia**, v. 32, p. 1-28, 1969.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

FIRMO, W.C.A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. especial, 2011.

FRANCESCHI, V.R.; NAKATA, P.A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v. 56, n. 1, p. 41-71, 2005.

FONTENELLE, R.O.S. et al. Antifungal activity of Essential Oils of *Croton* Species from the Brazilian Caatinga Biome. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1383:1390, 2008.

GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GABOR, M.; RAZGA, Z. "Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin." **Agents Actions**, v. 36, n. 1-2, p. 83-86. 1992.

GALES, R.C.; TOMAS, C. Comparative anatomy of the organs of some *Euphorbia* species (Euphorbiaceae JUSS.) from the Romanian flora. **Rom. J. Biol.**, v. 51-52, p. 39-47, 2007.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory Resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.

GREENE, E. R. et al. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prostagland. Other Lipid Med.**, v.96, p. 27- 36, 2011.

GUPTA, M.B. et al Anti-inflammatory activity of natural products (I) triterpenoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 6, p. 67-70, 1969.

HAASS, N.K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **JID Symp. Proceed.**, v.10, p. 2, 2005.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods**. 2. Ed. London: Chapman & Hall. 1984.

HAYDEN, S.M.; HAYDEN, W.J. Stem development, medullary bundles, and wood anatomy of *Croton glandulosus* var. *septentrionalis* (Euphorbiaceae). **Iawa J.**, v. 15, n. 1, p. 51-63, 1994.

HEINRICH, M. Et al. Estudos de campo etnofarmacológicos: uma avaliação crítica de sua base conceitual e métodos. **J. Ethnopharmacol.**, v.124, p. 1-17, 2009.

HERNÁNDEZ, I. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids derived from *Heliopsis longipes* roots. **J. Ethnopharmacol.**, v.124, p.649- 52, 2009.

HUA-BIN, L. et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT.**, v. 41, p. 385–390, 2008.

HUMES, J.L. et al. Regulation of macrophage eicosanoid production by hydroperoxy and hydroxy-eicosatetraenoic acids. **Biochem. J.**, v.233, p. 199-206, 1986.

HVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therap.**, v. 96, p. 67-202, 2002.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear edema. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, p. 1614-1620, 1993.

JANG, M.; PEZZUTO, J. M. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. **Canc. Lett.**, v. 134, n. 1, p. 81-89, 1998.

JAIN, S. et al. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Tabernaemontana divaricata* leaf extract on male albino mice. **Chin. J. Nat. Med.**, v. 11, p. 0472–0476. 2013.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw-Hill, 1940.

KINDT, T.J. GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

KOSTER, M.I.; ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **Europ. J. Cel. Biol.**, v.83, p. 625-629, 2004.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KULINSKY, V.I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry**, v. 72, p. 595-607, 2007.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int. J. Exp. Pat.**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LEITE, T.R. et al. Allelopathic Activity and Chemical Analysis of the Essential Oil of *Croton limae* A. P. S. Gomes, M. F. Sales & P. E. Berryc (Euphorbiaceae). **J. Agr. Sci.**, v. 7, n. 11, p. 90, 2015.

LEUNG, D.Y.M. et al. New insights into atopic dermatitis. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 651-657, 2004.

LI, K.; ARMSTRONG, A.W. A Review of Health Outcomes in Patients with Psoriasis. **Dermatol. Clin.**, v. 30, n. 1, p. 61-72, 2011

LIMA, G.S. et al. Antileishmanial Activity and Trypanothione Reductase Effects of Terpenes from the Amazonian Species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, p. 1133-1137, 2015.

LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). **Biota Neotrópica**, v. 8, p.177-231, 2008.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Arch. Pharmacol. Res.**, v. 27, p. 442-448, 2004.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum**. Stockholm: Facsimile, London, adland & Son, v. 1, p. 1007, 1753.

LOPES, E.L. et al. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 2169-2172, 2012.

LOPEZ-ALARCONA, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidante capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Anal. Chim. Acta.**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LUCENA, M.F.A. **Diversidade de Euphorbiaceae sensu lato no Nordeste do Brasil**. 2009. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LUCENA, M.F.A.; ALVES, M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l.do Nordeste do Brasil. **Hoehnean**, v. 71, n. 1, p. 71-85, 2010.

LUCENA, M.F.A.; SALES, M.F. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Rodriguésia**, v. 57, n. 1, p. 11-25, 2006.

LUCHI, A.E. Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. **Rev. Bras. Bot.**, v. 27, n. 2, p. 271-80, 2004.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, dez. 2014.

MACIEL, M. A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGGI, C.A. Pharmacology of the efferent function of primary sensory neurons. In: GEPPERTI, P. ; HOLZER, P. (eds) **Neurogenic Inflammation**. London: CRC Press, 1996.

MAHATO, S.B. et al. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 37, p. 3037-3067, 1988.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism – State of the art and results of the aging research in the German

National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experim. Gerontol.**, v. 42, n. 9, p. 879-886, 2007.

MAN, M.Q. et al. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Exp. Dermatol.**, v. 17, n. 8, p. 681-687, 2008.

MARTINEZ, J. et al. Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-induced ear edema inhibitors. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 2, p. 142-144, 1997.

MARTINS, A.P. et al. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Bark Oil of *Croton stellulifer*, an Endemic Species from S. Tome e Principe. **Planta Med.**, v. 66, p. 647-650, 2000.

MATOS, L.M.M. **Química de espécies nativas de *Croton L.* (Euphorbiaceae)**. 2011, Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAULIK, N. et al. Antioxidants in longevity and medicine. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2013, p. 1-3, 2013.

MELO, G.F.A. et al. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n 4, p. 1189-1194, 2013.

MENDONÇA, M.S.; ILKIU-BORGES, F.; SOUZA, M.C. Anatomia foliar de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 10, n. 2, p. 18-25, 2008.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950.

MORAIS, S.M. et al. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de *Croton* no Nordeste do Brasil. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORAIS S.M.; MATOS, J.A.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico de *Croton mucronifolius* Muell. Arg. (Velaminho). **Supl. Acta Amazonica**, v. 18, n. 1-2, p. 471-472, 1988.

MUELLER, J. Euphorbiaceae. **Linnaea**, v. 34, p. 77-142, 1865.

MUELLER, J. *Croton*. In Candolle AP **Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**. Paris: Victor Masson, v. 15, p. 511-708, 1866.

MUELLER J. *Croton*. In Martius CFP, Eichler AG 1873. **Flora Brasiliensis**. Lipsiae: Felischer, v. 11, p. 81-274, 1873.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflatórios nao-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiát.**, v.16, n.4, p.186-190, 2009.

MURRAY, A.R. et al. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, p. 77- 1769, 2007.

- NAIR, M.P. et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. **Clin. Vacc. Immunol.**, v. 13, p. 319-328, 2006.
- NANAYKKARA, G.R. et al. The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants. **Int. J. Pharm.**, v. 301, p. 129-139, 2005.
- NDHLALA, A.R. et al. Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related *Croton* species. **Molecules**, v. 18, n. 2, p.1916-1932, 2013.
- NETO, J.R.L. et al. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **J. Med. Plants Res.**, v. 10, n. 27, p. 409-416, 2016.
- NEVES, I.A.; CAMARA, C.A.G. Volatile Constituents of Two *Croton* Species from Caatinga Biome of Pernambuco – Brasil. **Rec. Nat. Prod.**, v. 6, n. 2, p. 161-165, 2012.
- NICOLAOU, A. Eicosanoids in skin inflammation. **Prostagland. Leukotr. Essent. Fat. Ac.**, v. 88, p.131–138. 2013.
- NOGUEIRA, L.M. et al. Antinociceptive Effect of the Essential Oil Obtained from the leaves of *Croton cordifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in Mice. **Evidence-Based Comp. Altern. Med.**, v. 2015, p. 1-7, 2015.
- NORRIS, D.A. Structure and function of the skin. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 2444-2446, 2004.
- NOVELLO, C.R. et al. Morphoanatomy and pharmacognostic study of the wood of *Croton echioides*, the Northeastern Marapuama. **Rev. Bras. Farmacognos.**, v. 22, n. 5, p. 946-956, 2012.
- NUALKAEW, S. et al. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Memecylon edule* Roxb. **J. Ethnopharmacol.**, v.121, p.278- 81, 2009.
- OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. HUMES, J.L. Prostaglandin and Leukotriene Synthesis in Mouse Ears Inflamed by Arachidonic Acid; **J. Invest. Dermatol.**, v.84, p.253–256, 1985.
- OTUKI, M. F. et al. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **Europ. J. Pharmacol.**, v. 507, n. 1-3, p. 253-259, 2005.
- PALMEIRA JUNIOR, S.F. et al. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1420-1424, 2005.
- PALMEIRA JUNIOR S.F. et al. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton selowii*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 397-402, 2006.
- PARISI, R. et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, n. 2, p. 377-185, 2013.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trend. Endocrinol. Metab.**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PATEL, RR. et al. Stroma: Fertile soil for inflammation. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 28, p. 565-576. 2014.

PEISER, M. et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, *in vitro* methods and regulatory aspects. **Cel. Mol. Life Sci.**, v. 69, p. 763-781, 2012.

PEREIRA, S. et al. An ent-kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, p. 8851-8858, 2012.

PEREZ-AMADOR, M.C. et al. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C. suberosus* (Euphorbiaceae) Species. **Phyton**, v. 53, p. 109-112, 2007.

PERSSON, T.; POPESCU, B.O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidante therapy fail. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

PIETERS, L.A.; DE-BRUYNE, T. In vivo wound healing activity the drago's blood (*Croton* spp): A Tradicional Americans Drug and Constituents. **Phytomed.**, v. 2, p. 12-22, 1995.

PIETRO, P. et al. Spectrophotometric quantification of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analyt. Biochem.**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

POSTAL, M.; APPENZELLER, S. The importance of cytokines and autoantibodies in depression. **Autoimmun. Rev.**, v. 14, p. 30-35. 2015.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Exp. Dermatol.**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

RADULOVIC, N. et al. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 34, p. 648-653, 2006.

RAMOS, J.M.O. **Identificação dos Constituintes químicos e Estudo Farmacológico do Óleo Essencial das Folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Sergipe, Aracaju.

RANDAU, K.P. et al. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacognos.**, v.14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RANDAU, K.P. et al. Padronização botânica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farm.** v. 83, n. 1-4, p. 3-7, 2002.

RANG, H.P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RAUH, L. K. et al. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract Against skin inflammatory processes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 138, n.2, p.390-397, 2011.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

ROBBINS, S.L.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, K. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROCHA, F.F. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Larnj. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 344-9, 2008.

RODRIGUES, G.R. et al. Treatment with Aqueous Extract from *Croton cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

RUBIN, E. et al. **Patologia; Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUDALL, P. Laticifers in vascular cambium and wood of *Croton* spp. (Euphorbiaceae). **Iawa Bull.**, v. 10, n. 4, p. 379-83, 1989.

SAEED, M.N. et al. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 264, p.84–93, 2012.

SÁ-HAIAD, B.S. et al. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). **Plant Syst. Evol.**, v. 283, p. 179-202, 2009.

SÁ, P.G.S. et al. Fenóis totais, flavonoids totais e atividade antioxidante de *Selaginella convolute* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev. Cienc. Farm. Bás. Apl.**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Tradicional Uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* Species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SAMPAIO, S. A.P; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia Básica**, 2 ed. São Paulo: Artes médicas, p. 1-5, 2000.

SÁNCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SÁNCHEZ, W. et al. Phytochemical screening, free radical scavenging and anti-inflammatory activity of *Croton leptostachyus* Kunth leaf extracts. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v. 8, n. 5, p. 190-194, 2015.

- SANDERSAI, V. Herbal medicines: poisons or potions? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 139, p. 343-348, 2002.
- SANTOS, H.S. et al. Diterpenos Casbanos e Acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, 2008.
- SANTOS, H.S. et al. Cytotoxic Diterpenoids from *Croton argyrophylloids*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, n. 10, p. 1884-1887, 2009.
- SANTOS, K.P. et al. Antiproliferative Activity of Flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **Biomed. Res. Internat.**, v. 2015, p. 1-7, 2015.
- SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College Press, 1951.
- SÁTIRO, L.N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.
- SATON, A.; EBINA, K. Common mechanism in endothelin-3 and PAF receptor function for anti-inflammatory responses. **Europ. J. Pharmacol.**, v. 718, p. 30-33. 2013.
- SEELIGER, S. et al. Pro-inflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **The FASEB J.**, v. 17, n. 13, p. 1871-1885, 2003.
- SERHAN, N.C.; SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6 (12), p. 1191-1197, 2005.
- SEIGLER, D.S. Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v. 81, p. 380-401, 1994.
- SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract. Res. Clin. Anesthesiol.**, v. 18 (3), p. 385-405, 2004.
- SHUKLA S. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 1848-51, 2009.
- SILVA, A.O. et al. O. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia ongiflora* (Desf.) Müll.Arg. **J. Ethnopharmacol.**, v. 154, p. 319-329, 2014.
- SILVA, J.S.; SALES, M.F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 879-901, 2009.
- SILVA, J.S. et al. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 441-53, 2010.a
- SILVA, M.A. et al. Uso de óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, 2010.b

SILVA, M.G. et al. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 533-537, 2005.

SILVA-FILHO, F.A. et al. Structure elucidation of casbane diterpenes from *Croton argyrophyllus*. **Magn. Reson. Chem.**, v. 49, n. 6, p. 370-373, 2011.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMIONATTO, E. et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 5., p. 879-888, 2007.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2002.

SIMMONS, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Disc. Tod.**, v.11, n. 5-6, p. 210-219, 2006.

SINGH, P. et al. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. **Fitoterapia**, v. 84, p.180–201, 2013.

SONG, J.T. et al. Diterpenoids from the Twigs and Leaves of *Croton caudatus*. **Fitoterapia**, v. 107, p. 54-59, 2015.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 667-675, 2004.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto do controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUZA, R.C.; KILL, L.H.P.; ARAÚJO, J.L.P. Fenologia de Espécies Nativas da Caatinga de Potencial Medicinal na Região de Petrolina, PE. In: Anais da VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido e I Jornada de Iniciação Científica Da Facepe/Univasf, 1., 2012, Petrolina. **Anais Eletrônicos da VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido e I Jornada de Iniciação Científica Da Facepe/Univasf**. Petrolina: Embrapa, 2012. Disponível em: < <http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 07 out. 2013.

STANLEY, P. L. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol.**, v. 4, n. 4, p. 262-271, 1991.

STEIN, S. et al. **NIST MS Library database**. NIST, Gaithersburg, 1997.

SUÁREZ, A.I. et al. Essential oil Composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **J. Flavour Frag.**, v. 20, p. 611-614, 2005.

TABAREAN, V. I. et al. Mechanism of H2 histamine receptor dependent modulation of body temperature and neuronal activity in the medial preoptic nucleus. **Neuropharmacol.**, v. 63, p.171-180. 2012.

TADAVIL, S.C.; BHADANE, V.V. Taxonomic significance of the rachis, petiole and petiolule anatomy in some Euphorbiaceae. **Biolife**, v. 2, p. 850-7, 2014.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Lead. Edge Rev. Cell**, v. 140, p. 805–820. 2010

TAN, J. K. et al. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proceed.**, v. 12, p. 38-45, 2007.

THYSSEN, J.P. et al. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. **Contact Dermatitis**, v. 57, n. 5, p. 287-299, 2007.

TIEPO, M. et al. *Croton cajucara* Benth. leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 1, p. 161-165, 2006.

TING, E. et al. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci.**, v. 81, p. 765–771, 2007.

TODA, S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. **Chin. Med.**, v. 2, p. 29-31, 2011.

TORRES, M.C.M. et al. Larvicidal and Nematicidal Activities of the Leaf Essential Oil of *Croton regelianus*. **Chem & Biodiv.**, v. 5, p. 2724-2728, 2008.

TORRES, M.C.M. et al. Terpenoids from *Croton regelianus*. **Helvet. Chim. Acta**, v. 93, p. 375-381, 2010.

TORRICO, F. et al. Hypoglycaemic Effect of *Croton cuneatus* in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, p.166-169, 2007.

TRINDADE, M.J.S.; LAMEIRA, O.A. Espécies Úteis da Família Euphorbiaceae no Brasil. **Rev. Cub. Plantas Med.**, v. 19, n. 4, p. 1-17, 2014.

TURIEL, N.A. et al. Variability in Essential Oil Composition of *Croton* Species with Occurrence in the Eastern Brazilian Amazon. **Rec. Nat. Prod.**, v. 10, n. 3, p. 380-384, 2016.

UCHÔA, P.K.S et al. Trachylobane and Kaurane Diterpenes from *Croton floribundus* Spreng. **Quim. Nova**, v. 36, n. 6, p. 778-782, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2008.

VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 519-528, 2003.

VILELA, A.L.M. Pele e o sentido do tato. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/sentidos10.asp>>. Acesso em 20 de dezembro, 2016.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2. Ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WEBSTER, G.L. Realignments in american *Croton* (Euphorbiaceae). **Novon.**, v. 2, p. 269-273, 1992.

WEBSTER, G.L. A provisional Synopsis of the Section of the Genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon.**, v. 42, p. 793-823, 1993.

WEBSTER, G.L. Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Bot. Garden*, v. 81, p. 1-144, 1994.

WEBSTER, G.L. Synopsis of *Croton* and *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in Western Tropical Mexico. **Contr. Univ. Michigan Herb.**, v. 23, p. 353-388, 2001.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacol. Therap.**, v.112, p.701–718. 2006.

WILLIAMS, F.M. *In vitro* – how good are they at replacing *in vivo* studies for measurement of skin absorption. **Environm. Toxicol. Parmacol.**, v. 21, p. 199-203, 2006.

WILMER, J. L. et al. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, p. 915-922, 1994.

WINYARD, P.G.; WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, 2003.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apicult. Res.**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, v. 306, p. 686-688, 1983.

YOON, T. et al. Anti-inflammatory effects of *Glehnia littoralis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** v. 32, n. 4, p. 663-670, 2010.

YOUNG, J. M. et al. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J. Invest. Dermatol.**, v. 82, p. 367- 371, 1984.

ZEGARSKA, B.; LELIŃSKA, A.; TYRAKOWSK, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic imflammation. **Pharmacol. Rep.**, v. 58, p. 13-21, 2006.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL ACEITO

Chemical composition, antioxidant and topical anti-inflammatory activities of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae)

Aceito pelo Journal Medicinal Plants Research, Qualis Capes B3.

Chemical composition, antioxidant and topical anti-inflammatory activities of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae)

Iasmine Andreza Basilio dos Santos Alves¹, Simone Maria dos Santos¹, Raudiney Frankilin Vasconcelos Mendes¹, José Welinton da Silva¹, Bárbara de Azevedo Ramos², Márcia Vanusa da Silva², Maria Teresa dos Santos Correa², Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório³, Roberta Jeane Bezerra Jorge⁴, René Duarte Martins⁴, Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque¹, Rafael Matos Ximenes^{1*}

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

³Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁴Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

Full Length Research Paper

Chemical composition, antioxidant and topical anti-inflammatory activities of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae)

Iasmine Andreza Basilio dos Santos Alves¹, Simone Maria dos Santos¹, Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes¹, José Wellington da Silva¹, Maria de Fátima Rodrigues¹, Bárbara de Azevedo Ramos², Márcia Vanusa da Silva², Maria Tereza dos Santos Correia², Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório³, Roberta Jeane Bezerra Jorge⁴, René Duarte Martins⁴, Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque¹, Karina Perrelli Randau⁵ and Rafael Matos Ximenes^{1*}

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

³Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁴Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

⁵Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Received 8 November, 2016; Accepted 23 December, 2016

APÊNDICE B – COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO

04/01/2017

ms.academicjournals.net/manuscript/acceptance_cert/110843

academicJournals

OPEN ACCESS JOURNALS
<http://www.academicjournals.org/JMPR>**Journal of Medicinal Plants
Research**

Acceptance Certificate

Date: 04-Jan-2017
Manuscript Number JMPR08.11.16/6294
Manuscript Title: Chemical composition, antioxidant and topical anti-inflammatory activities of *Croton cordifolius* Baill. (Euphorbiaceae)
Corresponding Author: Ximenes Rafael Matos

Corresponding Author Email rafael.ximenes@ufpe.br

Author(s): TENÓRIO FERNANDA DAS CHAGAS ANGELO MENDES
ALBUQUERQUE JULIANA FERREIRA CAVALCANTI XIMENES
RAFAEL MATOS

Date Accepted: 23-Dec-2016



NOTICE

In the event of general queries relating to this document please email your enquiry to the below address

helpdesk@academicjournals.org

ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO

ARTIGO 3 - Microscopic characterization of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) –
Submetido à Pharmacognosy Journal

Microscopic characterization of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae)

Iasmine Andreza Basilio dos Santos Alves¹, Rafaela Damasceno Sá², Marília Barbosa
Cadena², Rafael Matos Ximenes¹, Karina Perrelli Randau^{2*}

¹ Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de
Pernambuco, Avenida Professor Arthur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.

² Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade
Federal de Pernambuco, Avenida Professor Arthur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE,
Brazil.

* Author for Correspondence: krandau@hotmail.com

ABSTRACT

Background: *Croton cordiifolius* Baill. is popularly known as “quebra-faca” in the Brazilian Northeast and is used to treat general inflammation, pain, and gastrointestinal disturbances. **Objective:** This paper aims to study the anatomical characteristics of *C. cordiifolius*. **Materials and Methods:** Cross-sections and paradermic sections of root, stem, petiole and leaf blade were obtained by hand and submitted to double staining with astra blue and safranin process for the anatomical study. Maceration was performed according to the method of Jeffrey. **Results:** The secondary root has peridermis, parenchymatic cortex, collateral vascular system surrounded by sclerenchyma. The secondary stem has peridermis, cortical region with lignified cells, isolated groups of fibers, laticifers, prismatic crystals, druses and starch. The vascular system of the stem is bicollateral. The petiole and the leaf

blade have stellate, simple and glandular trichomes. The leaf blade is hypostomatic, with paracytic stomata. The mesophyll is isobilateral and the midrib shows a concave-convex contour. Laticifers occur in stem, petiole and leaf blade. Prismatic crystals and druses are found in all organs analysed. Through the maceration it was possible to identify the type of vessel elements. **Conclusion:** The anatomical features are useful for differentiation of other species of *Croton* and provide support to their quality control.

KEYWORDS: Pharmacobotany, Plant anatomy, Quebra-faca.

INTRODUCTION

Caatinga ecosystem, covering almost one million km² in Brazilian Northeast, is characterized by xerophytic vegetation affected by long and irregular drought, high temperatures and elevated ultraviolet radiation. It is an exclusively Brazilian biome and its plants are widely used in folk medicine of local communities, whose socio-demographic conditions favor this reality.^[1-2]

Euphorbiaceae family includes about 300 genera and 7600 species, including trees, shrubs, herbs and creepers.^[3] This family is, quantitatively, the second most representative of Brazilian Caatinga, with about 68 species of *Croton* genus.^[4] This genus, which presents a high pattern of species diversity and is the second largest in Euphorbiaceae family, consists of about 1200 species, of which 350 are present in Brazil.^[4-5] It is considered of difficult taxonomic classification due to the high number of species, problems with the nomenclature, polymorphism and specific delimitation of its representatives.^[6]

Traditional uses of *Croton* spp. have often been confirmed by pharmacological tests. In Brazil, among Euphorbiaceae Family members, this genus has the highest number of ethnopharmacological uses, followed by *Euphorbia* and *Jatropha*.^[7] Among the proven pharmacological activities can be highlighted antioxidante,^[2,8] anti-inflammatory and anti-

nociceptive,^[9] leishmanicidal,^[10] cytotoxic, antimicrobial, antiviral, antihyperlipidemic, antidiabetic and weight loss actions.^[11-13]

Due to the chemical compounds already described for many *Croton* species, such as mono and sesquiterpenes, diterpenoids, flavonoids, tannins and alkaloids, it can be characterized as a promising source of bioactive molecules and as a remarkable potential for research.^[14] The growing interest in studying the various species of the *Croton* genus has resulted in the isolation and identification of more than 100 compounds currently known in Brazil.^[15]

Croton cordiifolius, popularly known as “quebra-faca” in the Brazilian Northeast, is used to treat general inflammation, pain, and gastrointestinal disturbances.^[16-17] Nogueira and collaborators^[18] described the antinociceptive activity and chemical composition of its leaf’s essential oil.

Although the *Croton* genus is widely studied, including some species found in the semi-arid northeast, no studies characterizing the botany of *C. cordiifolius* have been published. Since the correct species identification is a relevant step for researches reproducibility and the standardization of morphoanatomic markers is one of the parameters required for quality control of herbal raw material or drugs, this paper aims to study the anatomical characteristics of the root, stem, petiole and leaf blade of *C. cordiifolius*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Adult specimens of *Croton cordiifolius* were collected in the city of Salgueiro, Pernambuco, Brazil. The voucher specimen was deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima, of the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), under registration number 89211.

Anatomical characterization

Several individuals of the same species were used to conduct this study. Various cross-sections at the middle region of the root, stem, petiole and leaf blade fixed in FAA 50% were obtained by freehand,^[19] using a common razor blade. For leaf blade were also performed paradermal sections. All sections were clarified in sodium hypochlorite solution (50%)^[20] and were stained according to the technique described by Bukatsch,^[21] with safranin and astra blue. Then, semipermanent histological slides were prepared containing the sections botanical material, following common plant anatomy procedures.^[19,22] The maceration was performed according to the method of Jeffrey,^[19] using fragments of root, stem and leaf that were disintegrated with the mixture of 10% nitric acid and 10% chromic acid (1:1). The analysis of the semipermanent histological slides prepared were conducted with a light microscope (Alltion) equipped with a digital camera.

RESULTS

Anatomical characterization

The secondary root, in cross-section, shows cylindrical contour, presenting peridermis (Figure 1A). The cortical region is composed of about seven layers of parenchymatic cells (Figure 1A), some of them containing starch (Figure 1B). The vascular system is formed by xylem occupying the central region of the root, and by phloem surrounding the xylem (Figure 1A). A continuous band of sclerenchyma delimits the vascular system (Figure 1A).

Prismatic crystals and druses are displayed in the phloem, sclerenchyma and in the cells of the cortical region located near the sclerenchyma (Figure 1B).

The secondary stem, in cross-section, exhibits cylindrical contour and peridermis (Figure 1C). The cortical region is formed by parenchyma, where are found lignified cells (Figure 1C), isolated groups of fibers (Figure 1C), laticifers (Figure 1C), prismatic crystals (Figure 1D), druses (Figure 1D) and starch (Figure 1C,D). The prismatic crystals and druses are usually visualized near the sclerenchyma surrounding the vascular system and in the sclerenchyma itself (Figure 1D), as well as in the phloem and in the medullar region (Figure 1F). The prismatic crystals are more frequent than the druses. The phloem is situated externally to the xylem, forming a continuous ring, as well as internally the xylem, arranged in the form of isolated nuclei in the medullar region (Figure 1E). In the internal phloem are present groups of isolated fibers (Figure 1E). In the pith are found parenchyma (Figure 1E,F), lignified cells, stone cells, prismatic crystals, druses and starch (Figure 1F).

FIGURE 1

In cross-section, the petiole also presents cylindrical contour (Figure 1G). The epidermis is uniseriate, coated with a thin cuticle layer (Figure 1G). There are non-glandular trichomes and glandular trichomes. The non-glandular trichomes can be of two types: stellate trichome with multicellular stalk (Figure 1H) and simple trichome (Figure 1I). The glandular trichome has a unicellular head (Figure 1J). In subepidermal position appears about four layers of collenchyma (Figure 1G). The central region of the petiole is filled by parenchyma, in which are inserted several collateral vascular bundles (Figure 1G). Next to the bundles are visualized laticifers (Figure 1G), prismatic crystals, druses and starch (Figure 1K).

Different what occurs in the secondary stem, in the petiole the druses are more frequent than the prismatic crystals.

The leaf blade, in frontal view, has cells with straight or slightly sinuous walls on the adaxial face (Figure 2A) and cells of sinuous walls on the abaxial face (Figure 2B). The leaf blade is hypostomatic, with paracytic stomata (Figure 2B).

In cross-section, the leaf blade presents the same types of trichomes described for the petiole (Figure 2C,D,E). The midrib shows a concave-convex contour (Figure 2F). The epidermis is composed of a single layer of cells and is covered by a thin cuticle (Figure 2F). The collenchyma is formed by about three to four layers, located in the adaxial face (Figure 2F). The vascular system is composed of a larger collateral vascular bundle towards to the abaxial face and smaller vascular collateral bundles towards the adaxial face (Figure 2F). Laticifers are presents in the parenchyma (Figure 2F). In the phloem are found prismatic crystals and druses (Figure 2G), being the druses more abundant, as occurs in the petiole. The druses can also be found in the parenchyma of the midrib, as well as in the mesophyll (Figure 2H). The mesophyll is isobilateral, with a layer of palisade parenchyma facing each face of the epidermis and around two to three layers of spongy parenchyma between the palisade tissue (Figure 2H).

FIGURE 2

Through the maceration it was possible to verify some of the characters observed in the cross-sections and paradermic sections of the analyzed organs. In maceration of the root are observed fragments of peridermis (Figure 3A), sclerenchyma and vessel elements with alternating pits (Figure 3B). In the maceration of the stem are also observed fragments of peridermis (Figure 3C), sclerenchyma and vessel elements with alternating pits (Figure 3D),

besides stone cells (Figure 3D) and sclerenchymatic tissue with prismatic crystals (Figure 3E). In the maceration of the leaf are found fragments of the adaxial face (Figure 3F) and abaxial face (Figure 3G), where in the latter the stomata are visualized. The stellate trichome or their stalk are identified in the fragments of epidermis (Figure 3F,G). The other trichomes are difficult to see in maceration. In the maceration of the leaf it is also seen that the vessel elements are of the helical type (Figure 3H).

FIGURE 3

DISCUSSION/ CONCLUSION

Anatomical characterization

The laticifers are distributed in several genera of Euphorbiaceae^[23]. They can be found in all vegetative organs, as in the case of species of *Euphorbia*^[24]. According to Rudall^[25] in *Croton* the laticifers are non-articulated and their abundance depends on the environment. Randau *et al*^[26] did not mention the presence of laticifers in the roots of *Croton rhamnifolius* and *C. rhamnifolioides*, as it is also not identified in this study. Also as a common feature with both species of *Croton* analyzed by Randau *et al*,^[26] in *C. cordifolius* is described a parenchymatic cortex in the root. However, in *C. rhamnifolius* were verified gelatinous fibers in the phloem and in *C. rhamnifolioides* was seen pericycle. None of these characteristics is present in *C. cordifolius*.

The pericycle was also visualized in the stem of *C. rhamnifolioides*.^[26] It is possible to distinguish the stem of the species of *Croton* by the type of tissue that forms the cortical region and the structures found in these tissues. In *C. rhamnifolius* the cortical region is

composed by collenchyma and parenchyma, while in *C. rhamnifolioides*, *C. draco* and *C. cordiifolius* only parenchyma is found.^[26-27] However, in the cortical parenchyma of *C. rhamnifolioides* were observed fibers, laticifers and starch,^[26] while in the cortical parenchyma of *C. draco* were found crystals,^[27] besides the other mentioned elements for *C. rhamnifolioides*. In this study is also verified the presence of all these elements previously mentioned for the cortical region of the other species of *Croton*, however, it is also noted the presence of lignified cells.

Hayden and Hayden^[28] noted internal phloem in *C. glandulosus*, but did not mention the occurrence of fibers associated with the internal phloem, as occur in *C. cordiifolius*. In *C. draco* was reported the presence of fibers in the external phloem.^[27] Farías *et al*^[27] also observed crystals in the sclerenchyma. According to Franceschi and Nakata,^[29] the morphology of the crystals produced can be of a single type throughout the plant, or several types being each specific for a particular organ, or several types within the same organ. It was verified that this last case occurs in *C. cordiifolius*.

Tadavil and Bhadane^[30] investigated the anatomy of rachis, petiole and petiolule in 43 species and 20 genera of Euphorbiaceae and observed that the variation in the distribution of sclerenchyma, collenchyma and vascular patterns, besides the shapes observed in the transverse section, can be used for differentiation of the species. Sá-Haiad *et al*^[31] analyzed ten species of *Croton*. In three species, the outline of the petiole was circular; in six species the outline was approximately circular, with a depression in the adaxial face; and in one species the outline was concave-convex. *Croton rhamnifolius* and *C. rhamnifolioides* exhibit a plane-convex contour,^[26] differing from the contour displayed by *C. cordiifolius*. In addition, the species of *Croton* can also be differentiated by the types of trichomes that are present in the petiole. In *C. rhamnifolius* and *C. rhamnifolioides* were verified dendritic and

glandular trichomes,^[26] in *C. cajucara* was identified the multiradiate trichome,^[32] while in *C. cordifolius* is seen stellate, simple and glandular trichomes.

Lucena and Sales^[33] have characterized the types of trichomes presents in leaf blade of 14 species of *Croton* as stellate, fasciculate, multiradiate, dendritic, lepidote, simple and glandular. The authors have stated that the type of trichome is an important feature for the taxonomy of the genus. According to Haiad *et al.*,^[31] are common characters in leaf blades of *Croton* species: amphistomatic leaves, paracytic stomata, dorsiventral mesophyll and biconvex midrib, with collateral vascular bundles. Nevertheless, in *C. cordifolius* the leaves are hypostomatic, the mesophyll is isobilateral and the midrib has a concave-convex contour. But, some of these characteristics of *C. cordifolius* have already been described in other species of *Croton*, such as hypostomatic leaves in *C. lanjouwensis*^[34] and isobilateral mesophyll in *C. rhamnifolioides*.^[26] *Croton rhamnifolius* presents midrib with a plan-convex contour.^[26]

No studies were found in the literature on the maceration of the organs of species of *Croton*. However, the studies of Luchi^[35] on the root of *C. urucurana*, Luchi^[36] on the stem of *C. urucurana* and Hayden and Hayden^[28] about the stem of *C. glandulosus* described that the vessel elements have alternating pits.

The characters described in this study are important for the differentiation of *C. cordifolius* from the other species of the genus *Croton*. Some characters, such as the non-glandular trichomes in the leaf blade, and the crystals, as the druses, demonstrate the adaptation of the species in xeric environments

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks to CAPES and CNPQ for financial support in the form of fellowship awards.

REFERENCES

1. Roque AA, Rocha RM, Loiola MIB. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, Município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). *Rev Bras Pl Med*. 2010;12(1):31-42.
2. Morais SM, Catunda-Júnior FEA, Silva ARA, Martins-Neto JS. Atividade antioxidante de óleos essenciais de *Croton* no Nordeste do Brasil. *Quim Nova*. 2006;29(5):907-10.
3. Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press; 1981.
4. Costa-Filho LO, Silva MHM, Almeida-Cortez JS, Silva SI, Oliveira AFM. Foliar cuticular n-alkane of some *Croton* species from Brazilian semiarid vegetation. *Biochem System Ecol*. 2012;41:13-5.
5. Silva JS, Sales MF, Gomes APS, Carneiro-Torres DS. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2010;24(2):441-53.
6. Webster GL. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*. 1993;42:793-823.
7. Trindade MJS, Lameira OA. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. *Rev Cub Plantas Med*. 2014;19(4):1-17.
8. Shukla S, Mehta A, John J, Singh S, Mehta P, Vyas SP. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:1848-51.

9. Rocha FF, Neves MN, Costa EA, Matos LG, Müller AH. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Larnj. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18(3):344-9.
10. Lima GS, Castro-Pinto DB, Machado GC, Maciel MAM, Echevarria A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Phytomedicine.* 2015;22:1133-7.
11. Rodrigues GR, Di Naso FC, Porawski M, Marcolin E, Kretzmann NA, Ferraz ABF, et al. Treatment with aqueous extract from *Croton cajucara* Benth reduces hepatic oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012: 1-7.
12. Salatino A, Salatino MLF, Negri G. Tradicional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc.* 2007;18(1):11-33.
13. Veiga-Júnior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Quím Nova.* 2008;28(3):519-28.
14. Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP, Xavier HS. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 2004;14(2):89-96.
15. Torres MCM, Assunção JC, Santiago GMP, et al. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. *Chem & Biodiv.* 2008;5:2724-8.
16. Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential use in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2010;131(2):326-42.
17. Monteiro JM, Ramos MA, Araújo EDL, Amorim ELC, Albuquerque UP. Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). *Environ Monitor Assessm.* 2011;178(1-4):179-202.

18. Nogueira LM, Silva MR, Santos SM, Albuquerque JFC, Ferraz IC, Albuquerque TT, et al. Antinociceptive effect of the essential oil obtained from the leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in mice. *Ev-Bas Comp Alt Med*. 2015;2015:1-7.
19. Johansen DA. *Plant microtechnique*. New York: MacGraw-Hill; 1940.
20. Kraus JE, Arduin M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR; 1997.
21. Bukatsch F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*. 1972;61:255.
22. Sass JE. *Botanical microtechnique*. 2nd Ed. Ames: Iowa State College Press; 1951.
23. Metcalfe CR., Chalk L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950.
24. Gales RC, Toma C. Comparative anatomy of the organs of some *Euphorbia* species (Euphobiaceae JUSS.) from the Romanian flora. *Rom J Biol*. 2006-2007;51-52:39-47.
25. Rudall P. Laticifers in vascular cambium and wood of *Croton* spp. (Euphorbiaceae). *Iawa Bulletin*, 1989;10(4):379-83.
26. Randau KP, Xavier HS, Pinna GFAM, Albuquerque UP. Padronização botânica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farm*. 2002;83(1/4):3-7.
27. Farías FR, Williamson JS, Rodriguez SV, Angeles G, Portugal VO. Bark anatomy in *Croton draco* var. *draco* (Euphorbiaceae). *Am J Bot*. 2009;96(12):2155-67.
28. Hayden SM, Hayden WJ. Stem development, medullary bundles, and wood anatomy of *Croton glandulosus* var. *septentrionalis* (Euphorbiaceae). *Iawa J*. 1994;15(1):51-63.
29. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol*. 2005;56(1):41-71.

30. Tadavil SC, Bhadane VV. Taxonomic significance of the rachis, petiole and petiolule anatomy in some Euphorbiaceae. *Biolife*. 2014;2:850-7.
31. Sá-Haiad BS, Serpa-Ribeiro ACC, Barbosa CN, Pizzini D, Leal DO, Senna-Valle I, et al. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotonae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). *Plant Syst Evol*. 2009;283:179-202.
32. Mendonça MS, Ilkiu-Borges F, Souza MC. Anatomia foliar de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. *Rev Bras Pl Med*. 2008;10(2):18-25.
33. Lucena MFA, Sales MF. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). *Rodriguésia*. 2006;57(1):11-25.
34. Aguiar MO, Preisinger H. Traits of leaf anatomy of *Croton lanjouwensis* Jablonski (Euphorbiaceae) in different strata of the plant. *German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems – Achievements and Prospects of Cooperative Research Hamburg*, 2000;3-8.
35. Luchi AE. Anatomia do lenho de raiz de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. *Hoehnea*. 2004;31(3):243-50.
36. Luchi AE. Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. *Rev Bras Bot*. 2004;27(2):271-80.

Figure 1: Cross-sections of the root, stem and petiole of *Croton cordiifolius* Baill.

A. general view of the root. **B.** crystals and starch near the sclerenchyma in the root. **C.** general view of the cortical region and vascular system of the stem. **D.** crystals and starch near the sclerenchyma in the stem. **E.** general view of the medullar region and vascular system of the stem. **F.** detail of the structures present in the medullar region of the stem. **G.** general view of the petiole. **H.** non-glandular stellate trichome in the petiole. **I.** non-glandular simple trichome in the petiole. **J.** glandular trichome in the petiole. **K.** crystals and starch near the sclerenchyma in the petiole. co: collenchyma, dr: druse, ep: epidermis, fi: fiber, gt: glandular trichome, lat: laticifer, lic: lignified cell, ngt: non-glandular trichome, pa: parenchyma, pc: prismatic crystal, pd: peridermis, ph: phloem, scl: sclerenchyma, sta: starch, stc: stone cell, vb: vascular bundle, xy: xylem. Bars: **A,C,E:** 200 μm . **B,D,F,H,I,J,K:** 50 μm . **G:** 500 μm .

Figure 2: Cross-sections and paradermic sections of the leaf blade of *Croton cordiifolius* Baill.

A. adaxial face. **B.** abaxial face. **C.** non-glandular stellate trichome. **D.** non-glandular simple trichome. **E.** glandular trichome. **F.** midrib. **G.** crystals in the midrib. **H.** mesophyll. co: collenchyma, cys: cystolith, dr: druse, ep: epidermis, gt: glandular trichome, lat: laticifer, ngt: non-glandular trichome, pa: parenchyma, pc: prismatic crystal, pp: palisade parenchyma, sp: spongy parenchyma, st: stomata, vb: vascular bundle. Bars: **A,B,C,D,E.** 50 μm . **F,H.** 200 μm . **G.** 20 μm .

Figure 3: Maceration of the root, stem and leaf of *Croton cordiifolius* Baill.

A. peridermis of the root. **B.** parenchyma and vessel elements of the root. **C.** peridermis of the stem. **D.** parenchyma, stone cells and vessel elements of the stem. **E.** prismatic crystals in the sclerenchyma of the stem. **F.** adaxial face of the leaf blade. **G.** abaxial face of the leaf blade. **H.** vessel elements of the leaf. ep: epidermis, pc: prismatic crystal, pd: peridermis, scl: sclerenchyma, st: stomata, stc: stone cell, tr: trichome, ve: vessel element. Bars: **A,C,E,G,H.** 50 μm . **B,D,F.** 200 μm .

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 03 de junho de 2016.

Ofício nº 50/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Rafael Matos Ximenes**
Departamento de Antibióticos
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016724/2016-62

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de *Croton cordifolius* Bail (Euphorbiaceae) – Quebra-faca**".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

| |
|--|
| <p>Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos – CB/UFPE; Animais: camundongos Swiss webster; Idade: 60 dias; Peso: 25-35g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 120. Vigência da autorização: 12 meses.</p> |
|--|

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584