



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
Departamento de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências-Farmacêuticas



NAIARA CÁSSIA GANCEDO

**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DA CASCA CAULINAR DE *Croton*  
*floribundus***

Maringá  
2019

NAIARA CÁSSIA GANCEDO

**Avaliação etnofarmacológica da casca caulinar de *Croton floribundus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Maringá  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Gancedo, Naiara Cássia

G195a      Avaliação etnofarmacológica da casca caular de *Croton floribundus* / Naiara Cássia Gancedo. - Maringá, 2019.

89 f. : il., figs., tabs.

Orientador (a): Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências-Farmacêuticas, 2019.

1. Câncer de próstata. 2. *Croton floribundus* - Casca caular - Controle de qualidade. 3. Euphorbiaceae. 4. Fitoquímica. 5. Farmacognosia. I. Mello, João Carlos Palazzo, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 615.32

MAS-CRB 9/1094

**Naiara Cássia Gancedo**

**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DA CASCA CAULINAR DE  
*Croton floribundus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de janeiro de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

  
João Carlos Palazzo de Mello  
*Universidade Estadual de Maringá*

  
Admilton Gonçalves de Oliveira Junior  
*Universidade Estadual de Londrina*

  
Danielle Lazzarin Bidóia  
*Universidade Estadual de Maringá*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica PALAFITO - bloco K80 e bloco T22, Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP) - bloco B09 e no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármaco e Cosmético – bloco B09 da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR. Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo fornecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

**Partes deste trabalho foram apresentadas em Congressos:**

GANCEDO, N.C.; LIMA, C.B.; SOUZA, T.H.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MELLO, J.C.P. Avaliação qualitativa dos metabólitos secundários presentes nas cascas de *Croton floribundus*, resumo expandido apresentado na forma de painel no X Encontro Internacional de Produção Científica da UNICESUMAR, Maringá, 2017.

GANCEDO, N.C.; LIMA, C.B.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MELLO, J.C.P. Morpho-anatomical study of *Croton floribundus* bark, resumo apresentado na forma de painel no VIII Seminário Anual do PCF, recebendo o prêmio de melhor painel, UEM, Maringá, 2017.

GANCEDO, N.C.; LIMA, C.B.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MELLO, J.C.P. Pharmacognostic quality control of *Croton floribundus* bark, resumo apresentado na forma de apresentação oral no IX Seminário Anual do PCF e I International Meeting of Pharmaceutical Sciences, UEM, Maringá, 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ailton e Maria, que me deram a vida, à minha irmã Samara, aos meus familiares e aos meus avós paternos Manoel Gancedo e Alzira Gancedo (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado força, saúde e nunca ter me abandonado durante esta caminhada na busca pelo conhecimento.

Aos meus queridos pais, Ailton e Maria, pelo amor, carinho, auxílio, compreensão, por sempre me incentivarem a estudar e a nunca desistir dos meus sonhos, acreditando na minha capacidade e não me deixando cair nos momentos mais difíceis, sendo a minha força e refúgio.

À minha irmã Samara e meu cunhado Vinicius, pela torcida e por estarem sempre presentes.

A toda a minha família e, em especial, aos meus avós Manoel e Alzira (*in memoriam*), Antônio e Elza, pelo carinho, apoio e orações.

Ao meu namorado, Leonardo, que sempre esteve presente, dando força, conselhos e aguentando os meus “choros”.

Aos meus amigos, pelo carinho e motivação.

Ao professor João, pela orientação, amizade, ensinamentos, confiança, apoio e por sempre acreditar na minha capacidade. Serei sempre grata pelas oportunidades e por tudo que me proporcionou.

À professora Dora, pela amizade e parceria nos trabalhos desenvolvidos.

Agradeço a todos os membros do Laboratório Palafito, pela ajuda e amizade.

Ao Admir e Helena, por estarem sempre à disposição, nos socorrendo sempre que precisamos.

Ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármaco e Cosmético, em especial a mestrandia Raíssa e o professor Celso, pelo apoio e parceria.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo suporte fornecido durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a vencer este desafio, os meus sinceros agradecimentos!

*"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."*

*Albert Einstein*

## BIOGRAFIA



**Naiara Cássia Gancedo** nasceu em Dourados, MS, em 5 de setembro de 1994. Filha de Ailton Valdir Gancedo e Maria Aparecida Motta Gancedo. Se mudou com a família para Terra Boa, PR, aos 5 anos de idade. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual Professor Léo Kohler e médio no Colégio Estadual Helena Kolody, onde se formou em 2011. Em 2012 ingressou no curso de Farmácia na Universidade Estadual de Maringá – UEM. Participou de projetos de extensão na Farmácia Ensino da UEM (2012-2014), sob orientação do Prof. Dr. Marco Antônio Costa e no Museu Dinâmico Interdisciplinar da UEM (MUDI) (2013), sob orientação da Profa. Dra. Sônia Trannin de Mello. Atuou como monitória no ambiente Plantas Medicinas do MUDI (2013) e na disciplina de Toxicologia (2014), sob orientação da Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierre e Profa. Dra. Simoni Aparecida Galerani Mossini. Participou de projetos de iniciação científica no Laboratório de Biologia Farmacêutica – PALAFITO da UEM (2013-2017), sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e coorientação da Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierre. Entre 2015 e 2016 foi membro do grupo Conselho Regional de Farmácia Junior (CRF-Jr) da UEM. Em 2016 realizou os estágios de vocacionado e de indústria no Laboratório PALAFITO, onde também desenvolveu seu trabalho de conclusão de curso. Desde 2017 é associada da Sociedade Brasileira de Farmacognosia e realiza seu trabalho de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (2017-2019).

GANCEDO, N. C. 2019. Avaliação etnofarmacológica da casca caulinar de *Croton floribundus*. Projeto de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 89p.

## RESUMO

*Croton floribundus* Spreng., Euphorbiaceae, conhecida popularmente na região Sul do Brasil como “capixingui” é uma árvore nativa encontrada no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica. Na medicina popular é relatada a atividade do chá da casca caulinar de *C. floribundus* para o tratamento de leucemia, tumores e sífilis, além de relatos do uso popular das cascas para o tratamento de câncer de próstata. As plantas do gênero *Croton* são ricas em metabólitos secundários da classe dos diterpenos, alcaloides, taninos e flavonoides. O objetivo deste trabalho foi estabelecer parâmetros para o controle de qualidade da casca caulinar de *C. floribundus*, determinar o melhor solvente extrator, avaliar *in vitro* a capacidade antiproliferativa dos extratos brutos e o perfil químico do extrato com melhor índice de seletividade. Diferentes ensaios foram realizados, incluindo a análise organoléptica, tendo a amostra apresentado odor de mentol, cânfora e sabor amargo. As principais características macroscópicas foram a presença de periderme delgada e de estriações. As principais características microscópicas distintivas da espécie são: fibras gelatinosas calibrosas, idioblastos com conteúdo característico, esclereides, numerosos idioblastos com drusa presentes por todo o córtex, mas especialmente sendo abundantes nos raios parenquimáticos do floema, e ausência de laticíferos nas amostras de cascas com mais de 4 mm de espessura. A análise granulométrica indicou fragmentos com tamanho médio de 0,3 mm. Os ensaios qualitativos indicaram resultado positivo para os metabólitos secundários: taninos condensados, lactonas sesquiterpênicas e glicosídeos saponínicos, com índice afrosimétrico de 200. Os ensaios quantitativos indicaram teor de polifenóis totais de  $6,33\% \pm 0,02$  (CV%0,39). A pureza da amostra foi determinada pelo teor de cinzas totais ( $3,97\% \pm 0,19$ , CV%4,78), teor de umidade ( $10,32\% \pm 0,27$ , CV%2,69) e ausência de matéria estranha. O teor de extrativos foi de  $9,61\% \pm 0,01$  (CV%0,16). A análise dos extratos brutos preparados com solventes de diferentes polaridades frente ao radical DPPH revelou ser a acetona 70% o melhor líquido extrator, apresentando melhor capacidade antioxidante ( $CE_{50} = 24,51 \pm 0,11$  µg/mL, CV%0,41) e maior teor de resíduo seco (0,30 g RS/g DV). O extrato acetona 70% foi o extrato bruto com melhor capacidade antiproliferativa ( $CI_{50} = 42,11 \pm 6,32$  µg/mL e IS 3,20 (PC-3);  $CI_{50} = 21,5 \pm 2,99$  µg/mL e IS 6,27 (LNCaP)). A análise de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas, sugeriu a presença majoritária de diterpenos e sesquiterpenos, no extrato bruto acetona 70%. Com os resultados das análises, foi possível contribuir com futuros estudos fitoquímicos, farmacognósticos e do potencial biológico de *C. floribundus*.

**Palavras-chave:** Câncer de Próstata; Controle de Qualidade; Euphorbiaceae; Fitoquímica; Farmacognosia.

GANCEDO, N. C. 2019. Ethnopharmacological evaluation of *Croton floribundus* bark. Master Degree Project, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 89p.

## ABSTRACT

*Croton floribundus* Spreng., Euphorbiaceae, popularly known in South region of Brazil as "capixingui" is a native tree found in the phytogeographic domain of the Atlantic Rainforest. It is reported in folk medicine the tea activity of *C. floribundus* bark for the treatment of leukemia, tumors and syphilis as well as reports of the folk use of the bark for the treatment of prostate cancer. Plants of the genus *Croton* are rich in secondary metabolites of the class of diterpenes, alkaloids, tannins, and flavonoids. The aim of this work was to establish parameters for the quality control of *C. floribundus* bark, to determine the best extraction solvent, in vitro evaluation of the antiproliferative capacity of the crude extracts and the chemical profiling of the extract with the best selectivity index. Different assays were performed, including organoleptic analysis, with the sample showing menthol, camphor and bitter taste. The main macroscopic features were the presence of thin peridermis and striations. The main distinctive microscopic features of the species are: calibrous gelatinous fibers, idioblasts with characteristic content, sclereids, numerous idioblasts with druse present throughout the cortex, but specially being abundant in the parenchyma rays of the phloem and absence of laticifers in the samples of bark with more than 4 mm of thickness. The granulometric analysis indicated fragments with a mean size of 0.3 mm. Qualitative assays indicated a positive result for the secondary metabolites: condensed tannins, sesquiterpene lactones and saponin glycosides, with an afrosimetric index of 200. Quantitative assays indicated a total polyphenol content of  $6.33\% \pm 0.02$ , RSD%0.39. The purity of the sample was determined by total ash content ( $3.97\% \pm 0.19$ , RSD%4.78), water content ( $10.32\% \pm 0.27$ , RSD%2.69) and absence of foreign matter. The water-soluble extractives content was  $9.61\% \pm 0.01$ , RSD%0.16. Analysis of the crude extracts prepared with solvents of different polarities against the DPPH radical revealed that 70% acetone was the best extractive liquid, presenting better antioxidant capacity ( $EC_{50} = 24.51 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ , RSD%0.41) and higher content of dry residue (0.30 g DR/g HD). The 70% acetone extract was the crude extract with the best antiproliferative capacity ( $IC_{50} = 42.11 \pm 6.32 \mu\text{g/mL}$  and SI 3.20 (PC-3);  $IC_{50} = 21.5 \pm 2.99 \mu\text{g/mL}$  and SI 6.27 (LNCaP)). The analysis of liquid chromatography coupled with mass spectrometry suggested the presence of diterpenes and sesquiterpenes in the 70% acetone crude extract. With the results of the analyzes, it was possible to contribute with future phytochemical, pharmacognostic and biological studies of *C. floribundus*.

**Keywords:** Prostate Cancer; Quality control; Euphorbiaceae; Pharmacognosy; Phytochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

| FIGURA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | PÁGINA |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Mapa de biomas do Brasil, onde ocorrem espécies de Euphorbiaceae. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 23     |
| 2. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Croton cajucara</i> . Cajucarinolídeo (A), Isocajucarinolídeo (B), <i>Trans</i> -desidrocrotonina (C), <i>Trans</i> -crotonina (D), Cajucarinolida (E), <i>Cis</i> -cajucarina B (F); <i>Trans</i> -cajucarina B (G), Isosacacarina (H) e Cajucarina A (I).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 26     |
| 3. Estruturas químicas das substâncias isoladas do caule de <i>Croton zehntneri</i> . Metileugenol (A), metilisoeugenol (B), estragol (C) e cariofileno (D). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 27     |
| 4. Estruturas químicas das substâncias isoladas das folhas de <i>Croton sonderianus</i> . 1,8-cineol (A); espatulenol (B); $\alpha$ -pineno (C) e óxido de cariofileno (D). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 27     |
| 5. Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Croton lechleri</i> . Taspina (A); isoboldina (B); norisoboldina (C); magnoflorina (D); catequina (E), epicatequina (F), galocatequina (G); epigalocatequina (H); korberina a (I) e b (J); ácido crolequínico (K); sitosterol (L); sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (M) e $\beta$ -sitosterol (N). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 29     |
| 6. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca de <i>Croton echinoides</i> . Diterpenos do tipo clerodano: 15,16-epóxi-3,13(16),14- <i>neo</i> -clerodatrien-17,18-dicarboxilato de metila (A); 15,16-epóxi-3,13(16),14- <i>neo</i> -clerodatrien-17-carbóxi-18-carboxilato de metila (B); 3-oxo-15,16-epóxi-13(16),14- <i>neo</i> -clerodadien-17,18-dicarboxilato de metila (C); ptychonal-hemiacetal (D1) e ptychonal (D2); éster metílico do ácido hardwichico (E); o sesquiterpeno <i>trans</i> -1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (F) e o triterpeno lupeol (G). ....                                                                                                                    | 30     |
| 7. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca de <i>Croton echinoides</i> . $\beta$ -sitosterol (A), estigmasterol (B) e $\beta$ -sitosterol glicosilado (c). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 31     |
| 8. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca de <i>Croton echinoides</i> . Alcaloides indólicos: <i>n-trans-p</i> -coumaroil-triptamina (a); <i>n-trans-p</i> -coumaroil-5-hidroxitriptamina (b); <i>n-trans</i> -4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina (c); <i>n-trans</i> -feruloil-5-hidroxitriptamina (d) e <i>n-trans</i> -feruloil-3,5-dihidroindolin-2-ona (e). Flavonoides: 3- <i>o</i> -metilcanferol (f); 3- <i>o</i> -metilquercetina (g); 3-7-di- <i>o</i> -metilquercetina (h) e 3-3'-di- <i>o</i> -metilquercetina (i). Derivados do ácido benzóico: 4-hidróxi ácido benzóico (j); 4-hidróxi-3-metóxi ácido benzóico (k) e 4-hidróxi-3,5-dimetóxi ácido benzóico (l). .... | 31     |
| 9. <i>Croton floribundus</i> . Detalhe da inflorescência (A) e da diversidade das folhas discolors, face adaxial (B) e abaxial (C). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32     |
| 10. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca caular de <i>Croton floribundus</i> . Diterpenos: ácido caur-16-en-19-oico (A), candol B (B), 6-hidróxicaur-16-en-19-ol (C), 16-hidróxi-19-cauranoato de metila (D), ácido 16 $\alpha$ ,17-di-hidróxi-19-cauranoico (E) e o esteroide: 3-O- $\beta$ -glicopiranosil sitosterol (F). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 34     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca da raiz de <i>Croton floribundus</i> . Ácido <i>ent</i> -traquiloban-19-oico (a), ácido <i>ent</i> -15 $\alpha$ -hidroxitraquiloban-19-oico (b), <i>ent</i> -traquiloban-19-ol (c), <i>ent</i> -traquiloban-18,19-diol (d), ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico (e), <i>ent</i> -caur-16-en-6 $\alpha$ ,19-diol (f) e ácido <i>ent</i> -16 $\alpha$ -hidroxicaur-11-en-19-oico (g). ....                                                                                                                                                                                                                   | 34 |
| 12. Localização da glândula prostática. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 35 |
| 13. Tipos de crescimento celular.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 36 |
| 14. Variação internacional das taxas de incidência de câncer de próstata, 2012*.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 37 |
| 15. Incidência de câncer de próstata por região do Brasil, 2016*.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 39 |
| 16. Etapas do preparo dos extratos brutos da casca caular de <i>Croton floribundus</i> . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 54 |
| 17. Análise macroscópica de <i>Croton floribundus</i> . Aspecto geral do espécime de sombra (seta) (A). Detalhe das estriações longitudinais anastomosadas de ramos maduros (B). Aspecto da face externa e interna da casca caular madura (C) e (D). Secções transversais de ramo jovem (E) e maduro com mais de 0,5 cm de diâmetro (F), com exsudado de látex na região da casca e medula.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60 |
| 18. Secções anatômicas de ramos de <i>Croton floribundus</i> em MO. Epiderme (ep), colênquima (co) e células do parênquima (pa) presentes no primeiro (A), segundo (B) e terceiro nó (C), em secção transversal, contendo idioblastos com drusas (ic) e cloroplastos (cl) (B). Tricoma glandular (tg) pluricelular, em secção longitudinal tangencial (D). Laticíferos articulados não ramificados, em secção longitudinal tangencial (F) (setas pontilhadas). Aspecto geral do córtex, feixes vasculares (fv) do tipo colateral, medula (md) e detalhe do canal secretor (cs) interno (F). câmbio vascular (cv), floema (fl), xilema (xi), tricoma tector (tt). .... | 61 |
| 19. Casca caular de <i>Croton floribundus</i> . Súber (su), parênquima cortical externo (pex) e interno (pin), idioblasto cristalífero (setas) (ic) e fibra gelatinosa (fg) em secções longitudinais (A e B). Aspecto geral do córtex em secção transversal (C) e detalhe em secção longitudinal (D) de esclereides (es) e idioblastos com polifenóis (ip). A, C e D: em MO; B: em MEV.                                                                                                                                                                                                                                                                               | 63 |
| 20. Casca caular de <i>Croton floribundus</i> . Grupos de fibras gelatinosas (fg) (A) e esclereides (esc) (B), em secção transversal. Detalhe do idioblasto cristalífero (ic) (C) e amiloplasto (D). Ip: idioblastos com polifenóis. A, C e D: em MEV, B: em MO.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 63 |
| 21. Espectro da análise de espectroscopia de energia dispersiva de raio-X de cristais da casca caular de <i>Croton floribundus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 64 |
| 22. Secções da casca caular de <i>Croton floribundus</i> após testes histoquímicos. Reação do súber (su) e idioblastos (setas) ao cloreto férrico (A) (setas pontilhadas). Identificação de amido (setas compactas) ao lugol (B). Reorganização de cristais aciculares de sulfato de cálcio (setas tracejadas) após exposição das drusas de oxalato de cálcio à solução de cloral hidratado com ácido sulfúrico (C).....                                                                                                                                                                                                                                              | 64 |

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 23. Fragmentos do pó reidratado da casca caular de <i>Croton floribundus</i> contendo fibra (fb) (A), esclereides (es) (B), grãos de amido (am) (C) ou idioblastos com drusas (ic) (D e E).<br>..... | 65 |
| 24. Curva da porcentagem de retenção e de passagem acumulada após análise granulométrica do pó da casca caular de <i>Croton floribundus</i> . ....                                                   | 66 |
| 25. Capacidade antioxidante dos extratos da casca caular de <i>Croton floribundus</i> ..                                                                                                             | 68 |
| 26. Perfil cromatográfico do extrato bruto acetona 70% de <i>Croton floribundus</i> , 1 mg/mL, 210 nm. ....                                                                                          | 76 |
| 27. Perfil cromatográfico do extrato bruto acetona 70% de <i>Croton floribundus</i> , 1 mg/mL, 280 nm. ....                                                                                          | 76 |
| 28. Cromatograma do extrato bruto acetona 70% de <i>Croton floribundus</i> , obtido por análise UPLC/EM, modo positivo. ....                                                                         | 77 |

## LISTA DE TABELAS

| TABELA                                                                                                                                  | PÁGINA |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 - PSA ajustado à idade. ....                                                                                                          | 41     |
| 2 - Classificação TNM, 7ª edição. ....                                                                                                  | 43     |
| 3 - Grupo prognósticos, 7ª edição TNM. ....                                                                                             | 43     |
| 4 - Grupo de risco para recidiva de câncer de próstata (D'Amico). ....                                                                  | 44     |
| 5 - Opções de hormônio terapia no câncer de próstata e suas propriedades.....                                                           | 45     |
| 6 - Padronização dos tubos de ensaio para determinação do índice afrosimétrico (IA).51                                                  |        |
| 7 - Massa e rendimento dos extratos brutos da casca caulinar de <i>Croton floribundus</i> .66                                           |        |
| 8 - Teor de cinzas totais, umidade e de extrativos da casca caulinar de <i>Croton floribundus</i> .<br>.....                            | 67     |
| 9 - Teor de resíduo seco dos extratos brutos da casca caulinar de <i>Croton floribundus</i> .70                                         |        |
| 10 - Reações químicas de caracterização dos metabólitos secundários presentes na casca<br>caulinar de <i>Croton floribundus</i> . ....  | 72     |
| 11 – Citotoxicidade dos extratos brutos da casca caulinar de <i>Croton floribundus</i> . .....                                          | 74     |
| 12 – Índice de seletividade dos extratos brutos da casca caulinar de <i>Croton floribundus</i> .<br>.....                               | 74     |
| 13 - Compostos identificados no extrato bruto acetona 70% de <i>Croton floribundus</i> , sugeridos<br>por espectrometria de massas..... | 77     |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µM - Micromolar

Abs – Absorvância

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RA - Receptor de andrógenos

CaP – Câncer de próstata

CAT - Catalase

CAT% - Capacidade antioxidante em porcentagem

CE<sub>50</sub> – Concentração efetiva para reduzir 50%

CG/EM - Cromatografia gasosa/ Espectrometria de massas

CI<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da proliferação celular

CIM – Concentração inibitória mínima

CL/EM – Cromatografia líquida/ Espectrometria de massas

CV% - Coeficiente de variação em porcentagem

DCTN - Diterpeno *trans*-desidrocrotonina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DV – Droga vegetal

EBs – Extratos brutos

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FDA - *Food and Drug Administration*

GnRH - Hormônio de liberação das gonadotropinas

GPx - Glutathione peroxidase

HCl - Ácido clorídrico

HO<sub>2</sub>• - Radical hidroperoxila

IA - Índice afrosimétrico

IE – Índice de espuma

IS – Índice de seletividade

LH – Hormônio luteinizante

m/m – Massa/massa

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MO – Microscopia óptica

N - Normal

NO• - Óxido nítrico

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> - Radical superóxido

OH• - Radical hidroxila

p/v – Peso/volume

PBS – Solução salina tamponada com fosfatos

pH – Potencial hidrogeniônico

PSA - Antígeno prostático específico

PT – Polifenóis totais

RS – Resíduo seco

SBF – Soro bovino fetal

SOD - Superóxido dismutase

ST - Solução Teste

TFA – Ácido trifluoroacético

## SUMÁRIO

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                     | 21 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                          | 23 |
| 2.1 ASPECTOS GERAIS .....                                                             | 23 |
| 2.1.1 Euphorbiaceae Juss. ....                                                        | 23 |
| 2.1.2 <i>Croton</i> L.....                                                            | 24 |
| 2.1.3 Fitoquímica e Etnofarmacologia de espécies de <i>Croton</i> L.....              | 25 |
| 2.1.4 <i>Croton floribundus</i> Spreng. ....                                          | 32 |
| 2.2 GLÂNDULA PROSTÁTICA .....                                                         | 35 |
| 2.2.1 Anatomia, Histologia e Função .....                                             | 35 |
| 2.3 CÂNCER DE PRÓSTATA .....                                                          | 36 |
| 2.3.1 Incidência.....                                                                 | 36 |
| 2.3.2 Etiologia, Sintomas e Diagnóstico .....                                         | 39 |
| 2.3.3 Tratamento .....                                                                | 44 |
| 3 OBJETIVOS.....                                                                      | 47 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....                                                              | 47 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                       | 47 |
| 4. METODOLOGIA .....                                                                  | 48 |
| 4.1 MATERIAL VEGETAL .....                                                            | 48 |
| 4.2 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL .....                                                 | 48 |
| 4.2.1 Secagem e Moagem.....                                                           | 48 |
| 4.3 ENSAIOS DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL.....                                     | 48 |
| 4.3.1 Granulometria .....                                                             | 48 |
| 4.3.2 Estudo Morfoanatômico .....                                                     | 48 |
| 4.3.2.1 Caracterização Macroscópica .....                                             | 49 |
| 4.3.2.2 Caracterização Microscópica .....                                             | 49 |
| 4.3.2.4 Análise do pó .....                                                           | 50 |
| 4.3.2.5 Análise Organoléptica.....                                                    | 50 |
| 4.3.3 Reações Químicas de Caracterização de Metabólitos Secundários .....             | 50 |
| 4.3.4 Doseamento do Teor de Polifenóis Totais (PT).....                               | 51 |
| 4.4 VERIFICAÇÃO DA PUREZA DO MATERIAL VEGETAL.....                                    | 52 |
| 4.4.1 Pesquisa de Matéria Estranha .....                                              | 52 |
| 4.4.2 Determinação do Teor de Extrativos (TE) .....                                   | 52 |
| 4.4.3 Determinação do Teor de Cinzas Totais .....                                     | 52 |
| 4.4.4 Determinação do Teor de Umidade: Balança por Infravermelho .....                | 53 |
| 4.5 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS (EBs).....                                            | 53 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES PARA DETERMINAR O MELHOR LÍQUIDO EXTRATOR ..... | 54 |
| 4.6.1 Resíduo Seco (RS) .....                                                         | 54 |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6.2 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo Método de Sequestros de Radicais Livres (DPPH*) ..... | 54 |
| 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                                                           | 55 |
| 4.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....                                                            | 55 |
| 4.8.1 Cultura de Células .....                                                                           | 55 |
| 4.8.2 Ensaio de Viabilidade e Citotoxicidade celular: Vermelho Neutro .....                              | 56 |
| 4.8.3 Índice de Seletividade (IS) .....                                                                  | 56 |
| 4.9 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....                                                 | 57 |
| 4.9.1 Preparo da amostra .....                                                                           | 57 |
| 4.9.2 Equipamento e condições cromatográficas para a análise por CLAE .....                              | 57 |
| 5 ANÁLISE ESTRUTURAL .....                                                                               | 57 |
| 5.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM) .....                                                                  | 57 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                           | 59 |
| 7 CONCLUSÕES.....                                                                                        | 78 |
| 8 REFERÊNCIAS .....                                                                                      | 79 |

APÊNDICE A – ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DO PÓ DA CASCA CAULINAR DE *Croton floribundus*.

APÊNDICE B - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DA CASCA CAULINAR DE *Croton floribundus* COMPARADOS COM OS PADRÕES.

## 1 INTRODUÇÃO

*Croton floribundus* Spreng, Euphorbiaceae, é conhecido popularmente como “capixingui”, árvore nativa, não endêmica do Brasil e com distribuição no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2018a). De acordo com Bratti et al. (2013), dados de levantamentos etnobotânicos relatam o uso do chá da casca de *C. floribundus* para o tratamento de leucemia, tumores e sífilis. Além disso, existem relatos do uso popular do chá das cascas desta espécie para o tratamento do câncer de próstata (CaP).

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado das células, podendo acometer qualquer parte do corpo e, até mesmo, invadir o tecido circundante, levando a metástases. É considerado um problema mundial de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade, possuindo um impacto econômico elevado. A estimativa para o Brasil, no biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais incidentes em homens brasileiros serão o câncer de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%) (INCA, 2017a).

Quando o câncer é diagnosticado precocemente, uma proporção significativa dos pacientes pode ser curada, seja por cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a combinação destes procedimentos (WHO, 2018b). Entretanto, apesar do progresso nos tratamentos disponíveis, tanto a quimioterapia e a radioterapia causam efeitos colaterais desagradáveis, prejudicando a qualidade de vida do paciente (YATES et al., 2005).

Quando se buscam tratamentos mais seletivos ou intervenções terapêuticas mais eficientes, uma fonte extremamente valiosa são as plantas medicinais. De acordo com Kooti et al. (2017), atualmente, mais de 60% dos compostos anticancerígenos são obtidos a partir de fontes vegetais, marinhas e de micro-organismos. O efeito de substâncias derivadas de plantas no tratamento do câncer tem sido amplamente estudado e tem mostrado bons resultados (KOOTI et al., 2017), como a descoberta de novos compostos utilizados como terapia complementar ou com atividade anticâncer, entre eles os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina; o taxano paclitaxel; os flavonoides quercetina, catequina, curcumina e canferol; o triterpeno cucurbitacina; os monoterpênicos timol, carvacrol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, mirceno e o  $\beta$ -sitosterol (ASADI-SAMANI et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde reconhece que plantas usadas há séculos são um importante recurso terapêutico (BRANDÃO, 2017). Dessa forma, a busca por medicamentos com menores efeitos colaterais e um maior interesse em estudar e desenvolver produtos a partir da biodiversidade brasileira, tem como aliado uma importante ferramenta e fonte de informação, a etnofarmacologia, que é definida como a exploração científica interdisciplinar

de substâncias biologicamente ativas, tradicionalmente empregadas ou observadas pelo homem (ELISABETSKY e SOUZA, 2004).

Segundo Trindade e Lameira (2014), muitas espécies do gênero *Croton* utilizadas na medicina popular, ainda não foram estudadas do ponto de vista farmacológico (TRINDADE; LAMEIRA, 2014). Dessa forma, uma avaliação fitoquímica, farmacognóstica e da capacidade antiproliferativa da casca caular de *C. floribundus*, poderá contribuir com futuros estudos desta espécie.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS

#### 2.1.1 Euphorbiaceae Juss.

Descrita por Antoine Laurent de Jussieu, a família Euphorbiaceae, pertence a ordem Euphorbiales, é considerada uma importante fonte de espécies medicinais, com ampla distribuição e ocorrência não endêmica no Brasil (HIRUMA-LIMA et al., 2002). Nesta família ocorrem árvores, arbustos, ervas, lianas e subarbustos que comumente possuem células especializadas na produção de látex e se desenvolvem em diferentes substratos, podendo ser aquáticas, epífitas, rupícolas ou terrícolas. É encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (Figura 1) e na seguinte distribuição geográfica: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe); Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (FLORA DO BRASIL, 2018b).



Figura 1. Mapa de biomas do Brasil, onde ocorrem espécies de Euphorbiaceae.  
Fonte: Adaptado de IBGE, 2017.

Segundo Bennett (2007), Euphorbiaceae é considerada uma das 25 famílias de plantas economicamente mais importantes, compreende 317 gêneros, com aproximadamente 8.000 espécies, a maioria cosmopolita, ocorrendo especialmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a família é representada por 64 gêneros, destes 5 são considerados endêmicos e 947 espécies, sendo 634 endêmicas e destas 134 ocorrem no estado do Paraná (FLORA DO BRASIL, 2018b).

Dos diversos gêneros que constituem esta família, destacam-se os gêneros *Ricinus*, que inclui a Mamona (*Ricinus communis* L.), espécie rica em óleo de rícino; *Hevea*, gênero da espécie da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.)), a maior produtora de borracha, *Manihot esculenta* Crantz (mandioca); além de espécies medicinais encontradas em vários gêneros, especialmente em *Croton* (HIRUMA-LIMA et al., 2002).

### 2.1.2 *Croton* L.

Descrito por Carl Linnaeus em 1753, o gênero *Croton* é o mais importante da família Euphorbiaceae e significa na língua indígena “carrapato”, devido a semelhança das suas sementes com esse animal (TRINDADE; LAMEIRA, 2014; HIRUMA-LIMA et al., 2002). Na proposta de classificação realizada por Webster (1994), os gêneros da família Euphorbiaceae foram divididos em 49 tribos e agrupados em 5 subfamílias (Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae).

*Croton* pertence a classe Equisetopsida C. Agardh, ordem Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl., família Euphorbiaceae Juss., subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae; inclui espécies com forma de vida de arbustos, árvores, ervas, lianas e subarbustos; podendo ser rupícola ou terrícola e é considerado um gênero de origem nativa e não endêmica do Brasil. A distribuição geográfica de *Croton* abrange o Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe); Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina); pertencendo aos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORA DO BRASIL, 2018c). *Croton* é o mais diverso e o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com 750 espécies amplamente distribuídas nos trópicos (BENNETT, 2007). Segundo a Flora do Brasil (2018c) são aceitas 308 espécies no Brasil, destas 244 são endêmicas e 48 são encontradas no estado do Paraná.

### 2.1.3 Fitoquímica e Etnofarmacologia de espécies de *Croton* L.

*Croton* inclui diversas espécies de interesse econômico e utilização na medicina popular. A composição química de espécies deste gênero é muito diversa, incluindo substâncias da classe de diterpenos, alcaloides, taninos, flavonoides e óleos essenciais. Espécies de *Croton* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diabetes *Mellitus*, diarreia, malária, febre, problemas estomacais, inflamação do fígado, rins, vesícula, câncer e no controle de índices elevados de colesterol (TRINDADE; LAMEIRA, 2014). Devido ao vasto número de espécies com distribuição pantropical, neste tópico foi dado enfoque a fitoquímica e etnofarmacologia de algumas espécies nativas do Brasil.

*Croton cajucara* Benth., é uma das espécies mais conhecida no Norte do Brasil, denominada popularmente na região amazônica como “sacaca” (feitiço na língua indígena) e “cajuçara”; apresenta porte arbustivo, é terrícola, nativa, não endêmica do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2018d). Está presente na lista de plantas medicinais do SUS (RENISUS, 2009), sendo a casca caular e as folhas os farmacógenos desta espécie (ANVISA, 2015). Dados da medicina tradicional da região amazônica, relatam a utilização do chá das folhas de *C. cajucara* contra dores de estômago, febres, problemas hepáticos, icterícia e malária. Diversas atividades biológicas são citadas para diterpenos do tipo clerodanos, substâncias abundantes em *C. cajucara*, como exemplo, tem-se a atividade antibiótica, antiviral, antiulcerogênica, anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica e psicotrópica (MACIEL; CORTEZ; GOMES, 2006).

Como exemplo de diterpenos clerodanos, tem-se o cajucarinolídeo (Figura 2A) e o isocajucarinolídeo (Figura 2B), que apresentam atividade anti-inflamatória (ICHIHARA et al., 1992); 19-nor-clerodanos de sistema enona: *trans*-desidrocrotonina (Figura 2C), *trans*-crotonina (Figura 2D), cajucarinolida (Figura 2E), *cis*-cajucarina B (Figura 2F) e *trans*-cajucarina B (Figura 2G); os clerodanos isosacacarina (Figura 2H) e cajucarina A (Figura 2I), isolados da casca caular de *C. cajucara* (MACIEL et al., 1998; 2003; 2006). O diterpeno *trans*-desidrocrotonina (DCTN) é o metabólito majoritário correlacionado com grande parte das indicações terapêuticas desta espécie (MACIEL et al., 2000), como a atividade antitumoral, cujo mecanismo de ação não está totalmente elucidado, tendo sido evidenciado a indução de apoptose e uma possível atividade imunomoduladora. Apesar de estudos de toxicidade aguda e subcrônica da DCTN em animais mostrarem uma baixa toxicidade, o uso indevido das cascas de *C. cajucara* na medicina popular pode acarretar efeitos hepatotóxicos irreversíveis.

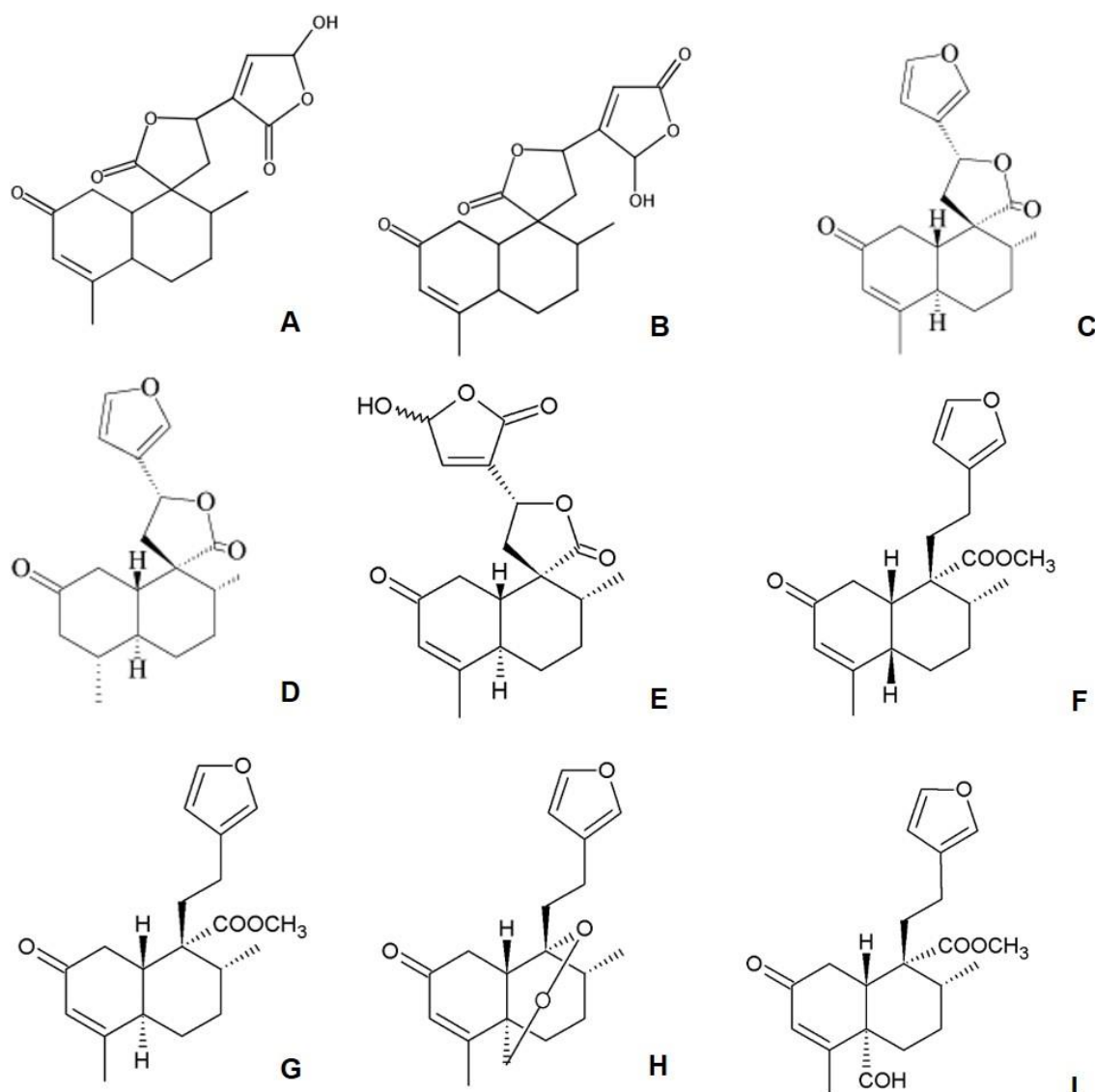


Figura 2. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Croton cajucara*. Cajucarinolídeo (A), isocajucarinolídeo (B), *trans*-desidrocrotonina (C), *trans*-crotonina (D), cajucarinolida (E), *cis*-cajucarina B (F); *trans*-cajucarina B (G), isosacacarina (H) e cajucarina A (I).

Outra espécie de *Croton* que faz parte da lista do Rénisus é *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm., conhecida no nordeste do Brasil como “canelinha”. A infusão das folhas de *C. zehntneri* é utilizada pela população do Ceará como bebida substituta do café, no tratamento de insônia e dores no estômago. As cascas desta espécie contêm em maior quantidade os compostos metileugenol (34%), metiliso Eugenol (26%), estragol (9%) e cariofileno (8%) (Figura 3) (CRAVEIRO et al., 1978). Segundo Costa et al. (2008), o estragol é o constituinte majoritário presente no óleo essencial extraído das folhas de *C. zehntneri* e apresenta atividade antibacteriana significativa frente *Shigella flexneri*, com CIM de 50 µg/mL.

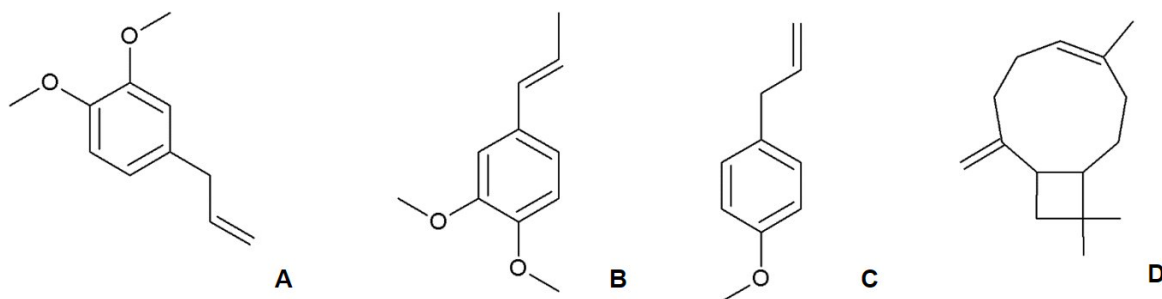


Figura 3. Estruturas químicas das substâncias isoladas do caule de *Croton zehntneri*. Metileugenol (A), metiliseugenol (B), estragol (C) e cariofileno (D).

*Croton sonderianus* Müll.Arg., arbusto nativo, endêmico do Brasil, ocorre na Caatinga (FLORA DO BRASIL, 2018e), é conhecido popularmente como “marmeleiro” e suas folhas são usadas contra hemorragias uterinas, vômito e diarreia (FRANCO; BARROS, 2006). Pinho-da-Silva et al. (2010) analisaram por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG/EM) as folhas de *C. sonderianus*, identificando quatro componentes majoritários, o 1,8-cineol, espatulenol,  $\alpha$ -pineno e óxido de cariofileno (Figura 4). Este mesmo óleo essencial demonstrou atividade miorelaxante em ratos, apresentando um possível potencial terapêutico no tratamento de broncoespasmos (PINHO-DA-SILVA et al., 2010).

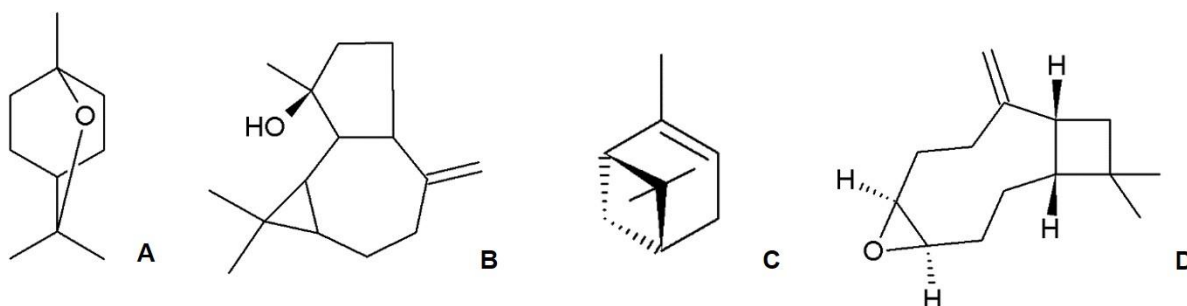


Figura 4. Estruturas químicas das substâncias isoladas das folhas de *Croton sonderianus*. 1,8-cineol (A); espatulenol (B);  $\alpha$ -pineno (C) e óxido de cariofileno (D).

*Croton lechleri* Müll. Arg. é uma árvore terrícola, nativa e não endêmica do Brasil, conhecida popularmente no Acre como “sangue de grado” (FLORA DO BRASIL, 2018f). O látex de *C. lechleri* é constituído quimicamente pelos alcaloides taspina, isoboldina, norisoboldina e magnoflorina; pelos flavonoides catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina (Figura 5). A casca desta espécie contém os diterpenos korberina A e B (Figura 5I e 5J) e ácido crolequínico (Figura 5K); os esteróis sitosterol (Figura 5L), sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Figura 5M) e  $\beta$ -sitosterol (Figura 5N).

Além de *C. lechleri*, outras duas espécies, *C. draconoides* Müll. Arg e *C. lanjouwensis* Jabl. são conhecidas popularmente por sangue de dragão, mesmo nome dado a resina vermelha que é extraída das cascas destas três espécies. Os constituintes majoritários desta resina são os polifenóis, representando cerca de 90% do peso seco do látex, 4% açúcares (lactose, galactose e ramnose), podendo os constituintes do látex variarem de acordo com o local da coleta (AMARAL; SIMÕES; FERREIRA, 2005).

O látex de *C. lechleri* é usado pelos índios peruanos para tratar reumatismo (PERDUE et al., 1979). Perdue et al. (1979) isolaram e identificaram do látex de *C. lechleri* o alcaloide taspina, sendo que o sal deste alcaloide, cloridrato de taspina, mostrou ter atividade anti-inflamatória nos modelos farmacológicos testados e em níveis de dosagem inferiores aos que produzem efeitos letais em ratos. Duas substâncias isoladas do extrato clorofórmico de *C. lechleri*, o 2-4-6-trimetoxifenol e o 1-3-5-trimetoxibenzeno, submetidas ao ensaio de bioautografia foram consideradas muito ativas contra *Bacillus subtilis*, sendo 30 vezes mais potente que os antibióticos cloranfenicol e penicilina. Outros constituintes do látex também apresentaram bons resultados, como os diterpenos korberina A e korberina B, ativos contra *B. subtilis* e o diterpeno, ácido crolequínico que demonstrou atividade contra *Escherichia coli* e *B. subtilis* (CHEN; CAI; PHILLIPSON, 1994).

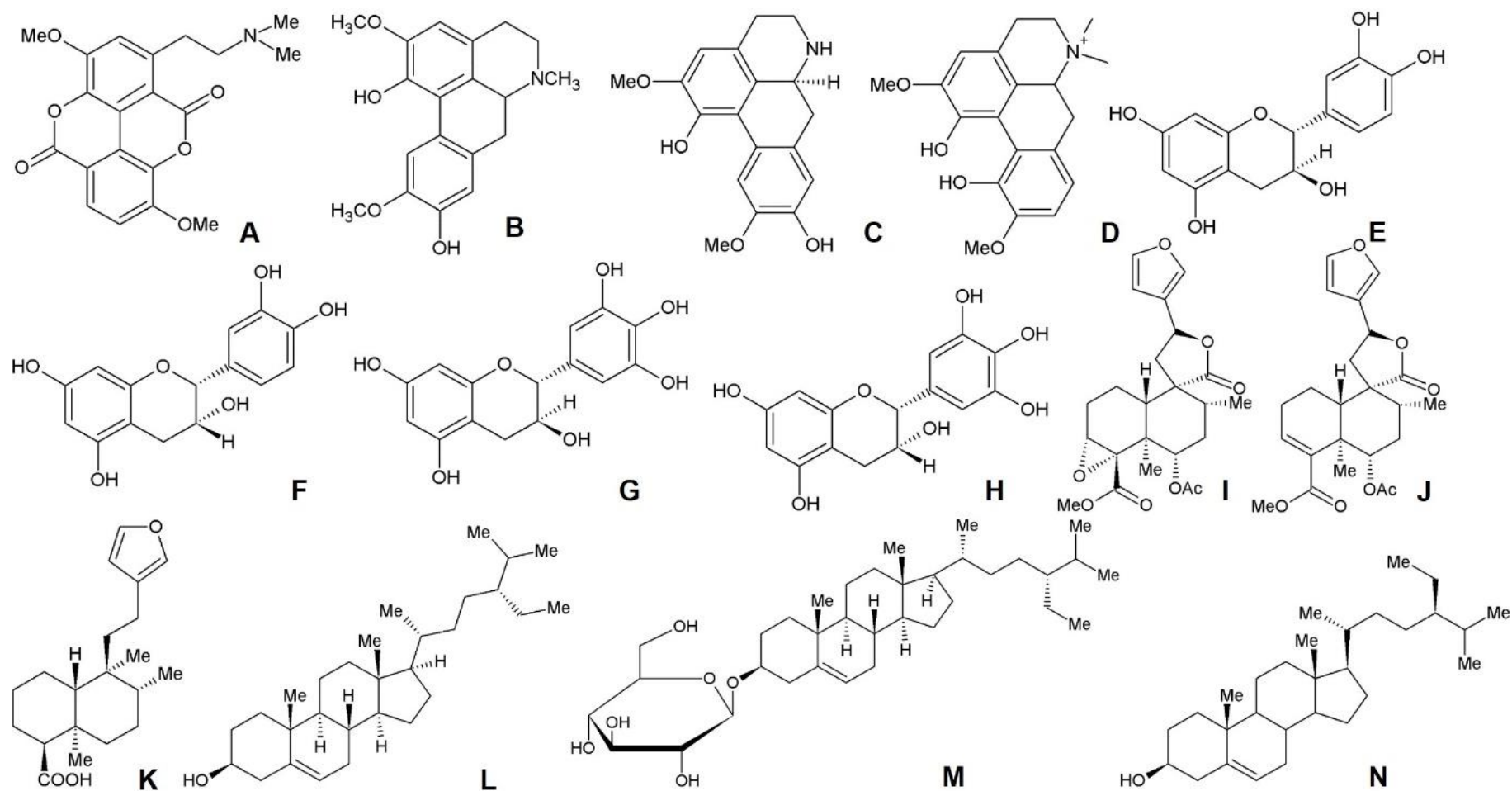


Figura 5. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Croton lechleri*. Taspina (A); isoboldina (B); norisoboldina (C); magnoflorina (D); catequina (E), epicatequina (F), galocatequina (G); epigalocatequina (H); korberina a (I) e b (J); ácido crolequínico (K); sitosterol (L); sitosterol-β-D-glicopiranosídeo (M) e β-sitosterol (N).

*Croton echioides* Müll. Arg., conhecida popularmente na região nordeste por “canela-de-velho” e “quebra-faca”, é um arbusto, terrícola, nativa e endêmica do Brasil, presente nos domínios fitogeográficos da Caatinga e Cerrado, com ocorrência no Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte) e no Sudeste (Minas Gerais) (FLORA DO BRASIL, 2018g). Novello (2011), isolou da fração hexano do extrato hidroalcoólico 70% das cascas de *C. echioides*, diterpenos do tipo clerodano e o triterpeno lupeol (Figura 6), os fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (em mistura) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (Figura 7). Já da fração acetato de etila foram isolados alcaloides indólicos, flavonoides e derivados do ácido benzoico (Figura 8). O alcaloide *n-trans*-4-metóxicinamoil-5-hidroxitriptamina apresentou melhor atividade frente a linhagem de células tumorais de câncer de cólon humanas (HCT-116), com  $CI_{50}$  de 29,3  $\mu\text{g/mL}$ .

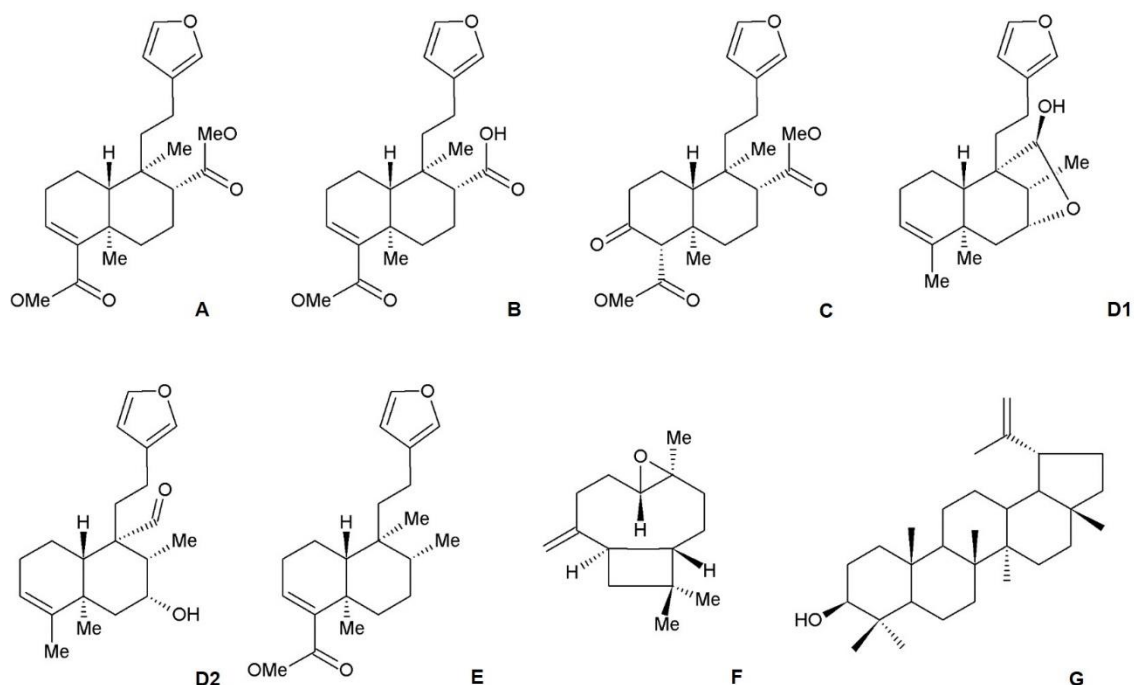


Figura 6. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca de *Croton echioides*. Diterpenos do tipo clerodano: 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17,18-dicarboxilato de metila (A); 15,16-epóxi-3,13(16),14-*neo*-clerodatrien-17-carbóxi-18-carboxilato de metila (B); 3-oxo-15,16-epóxi-13(16),14-*neo*-clerodadien-17,18-dicarboxilato de metila (C); ptychonal-hemiacetal (D1) e ptychonal (D2); éster metílico do ácido hardwichico (E); o sesquiterpeno *trans*-1-(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (F) e o triterpeno lupeol (G).

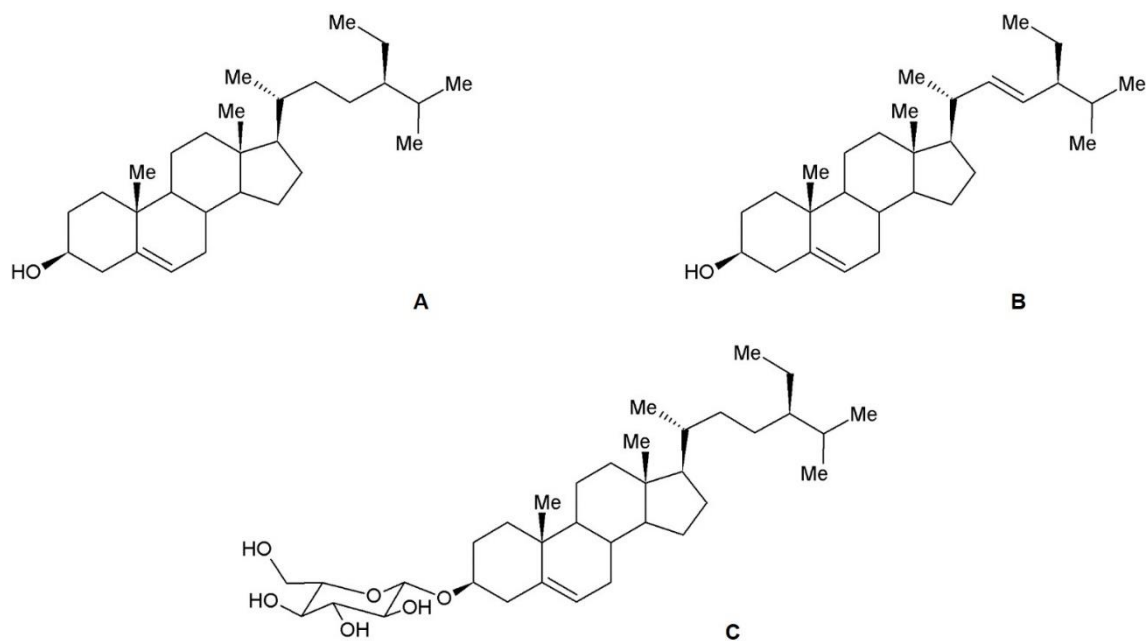


Figura 7. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca de *Croton echinoides*.  $\beta$ -sitosterol (A), estigmasterol (B) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (c).

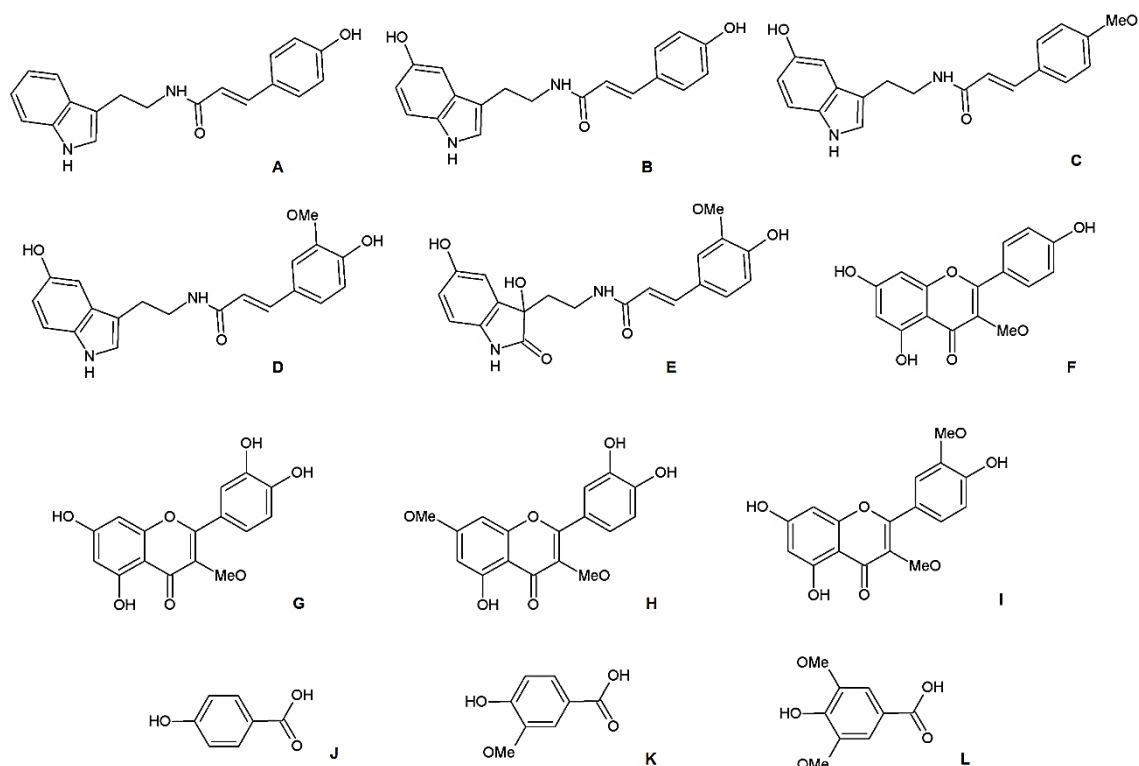


Figura 8. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca de *Croton echinoides*. Alcaloides indólicos: *n-trans-p*-coumaroil-tryptamina (a); *n-trans-p*-coumaroil-5-hidroxitriptamina (b); *n-trans*-4-metóxi-cinamoil-5-hidroxitriptamina (c); *n-trans*-feruloil-5-hidroxitriptamina (d) e *n-trans*-feruloil-3,5-dihidroxitriptamina-2-ona (e). Flavonoides: 3-*O*-metilcanferol (f); 3-*O*-metilquercetina (g); 3-7-di-*O*-metilquercetina (h) e 3-3'-di-*O*-metilquercetina (i). Derivados do ácido benzóico: 4-hidróxi ácido benzóico (j); 4-hidróxi-3-metóxi ácido benzóico (k) e 4-hidróxi-3,5-dimetóxi ácido benzóico (l).

### 2.1.4 *Croton floribundus* Spreng.

*Croton floribundus* Spreng., Euphorbiaceae, é uma árvore terrícola, nativa, não endêmica do Brasil, presente no domínio geográfico da Mata Atlântica e distribuída nas seguintes regiões e estados: Norte (Tocantins); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco); Centro-Oeste (Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná). Esta espécie é conhecida popularmente por “capixingui”, árvore pioneira que ocorre em vegetação do tipo campo rupestre, cerrado, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila e vegetação sobre afloramentos rochosos (FLORA DO BRASIL, 2018a). De acordo com Carvalho (2003), *C. floribundus* pode receber diferentes denominações populares dependendo da região brasileira em que se encontra, como “capexingui, tapixingui, capoeira-preta, sangra-d’água, lixeira, sangue-de-dragão, sangue-de-drago, velame e velame-de-cheiro”.

*C. floribundus* é uma árvore de pequeno porte, com altura de 6 a 10 m, comumente encontrada em capoeiras e clareiras. É uma invasora de pastagens e possui boa resistência às mudanças ambientais. Possui tronco com casca áspera, de coloração cinza-escura. Suas folhas são simples e discolors, ou seja, a face superior tem coloração verde escura e a face inferior tem coloração verde clara (Figura 9B e 9C). A folha, quando retirada do galho, libera um látex aquoso. As flores são bem pequenas, amareladas e melíferas (Figura 9A) (FLORA IPE, 2016).

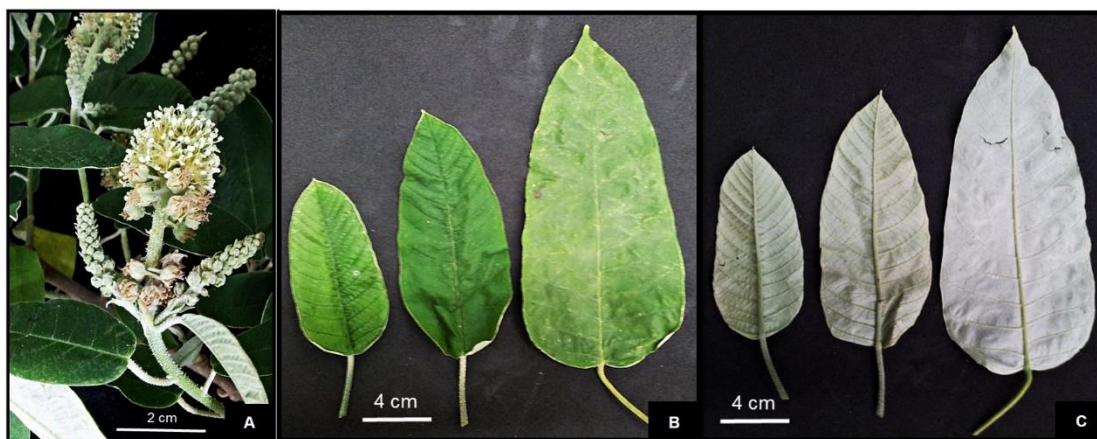


Figura 9. *Croton floribundus*. Detalhe da inflorescência (A) e da diversidade das folhas discolors, face adaxial (B) e abaxial (C).

Fonte: Naiara Cássia Gancedo, 2016.

Dentre as atividades biológicas descritas na literatura para *C. floribundus*, tem-se a atividade antimicrobiana frente o *B. subtilis*, com concentração bactericida do ácido caurenico de 6,26 µg/mL (PEIXOTO, 2007) e frente as espécies *Flavobacterium columnare* e *Aeromonas hydrophila*, ambas bactérias patogênicas de peixes, que causam lesões cutâneas e alta mortalidade e, infecções cutâneas, septicemia e gastroenterite em peixes e humanos, respectivamente (CASTRO et al., 2008). Segundo Medina et al. (2009),

investigações fitoquímicas das cascas caulinares de *C. floribundus*, conduziram ao isolamento do diterpeno ácido caurenoico. O extrato metanólico e o composto isolado apresentaram alta atividade contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, sendo que o ácido caurenoico também demonstrou alta atividade frente as cercárias de *S. mansoni*, com 100% de morte após 60 min de exposição na concentração de 10 µg/mL.

Diversas atividades são descritas na literatura para o ácido caurenoico, como antidiabética, efeito relaxante do músculo liso, analgésica, anti-inflamatória, diurética, antioxidante, antitumoral (leucemia, câncer de mama e de cólon), função em doenças neurológicas (anticonvulsivante, anti-Alzheimer), atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antiviral, inseticida, anti-helmíntica e moluscicida (VILLA-RUANO; LOZOYA-GLORIA; PACHECO-HERNANDEZ, 2016).

Barth et al. (2018), relataram a atividade antimicrobiana do extrato da casca caulinar de *C. floribundus* frente a *Staphylococcus aureus*, com CIM de 39,6 µg/mL e capacidade inibidora da enzima acetilcolinesterase no ensaio de bioautografia. Haraguchi et al. (2011), comprovaram a ação de derivados de benzaldeído-tiosemicarbazona do ácido caurenoico contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Barth (2011) foi o primeiro a relatar a capacidade antioxidante dos extratos das folhas e cascas de *C. floribundus*, além da realização de testes químicos, comprovando a presença de metabólitos secundários dos grupos dos flavonoides e taninos. Bratti et al. (2013), relataram o uso do chá das cascas de *C. floribundus* para o tratamento de câncer, tumores, verrugas, sífilis e leucemia.

Até o momento, foram isolados da casca caulinar de *C. floribundus* o constituinte majoritário ácido caur-16-en-19-oico, que corresponde a 2% da planta seca (p/p) (PEIXOTO, 2007; MEDINA et al., 2009). Outras substâncias isoladas de *C. floribundus* foram os diterpenos ácido 16 $\alpha$ ,17-diidróxi-19-cauranoico e 6-hidróxicaur-16-en-19-ol, 16-hidróxi-19-cauranoato de metila, candol B e o esteroide 3-O- $\beta$ -glicopiranosil sitosterol (Figura 10) (PEIXOTO, 2007).

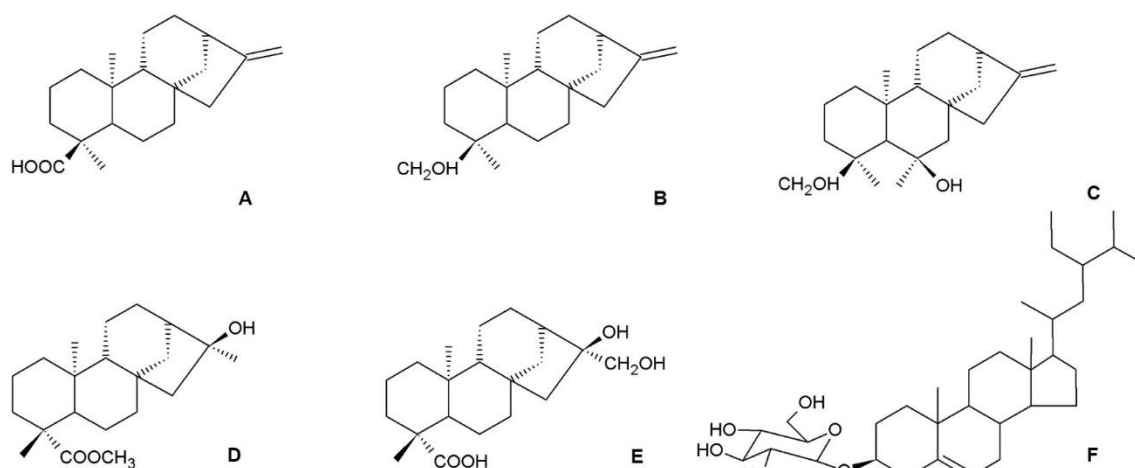


Figura 10. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca caulinar de *Croton floribundus*. Diterpenos: ácido caur-16-en-19-oico (A), candol B (B), 6-hidróxicaur-16-en-19-ol (C), 16-hidróxi-19-cauranoato de metila (D), ácido 16 $\alpha$ ,17-diidroxi-19-cauranoico (E) e o esteroide: 3-O- $\beta$ -glicopiranosil sitosterol (F).

Uchoa (2011), isolou das cascas da raiz de *C. floribundus*, o ácido *ent*-traquiloban-19-oico, ácido *ent*-15 $\alpha$ -hidroxitraquiloban-19-oico, *ent*-traquiloban-19-ol, *ent*-traquiloban-18,19-diol, ácido *ent*-caur-16-en-19-oico, *ent*-caur-16-en-6 $\alpha$ ,19-diol, ácido *ent*-16 $\alpha$ -hidroxicaur-11-en-19-oico (Figura 11).

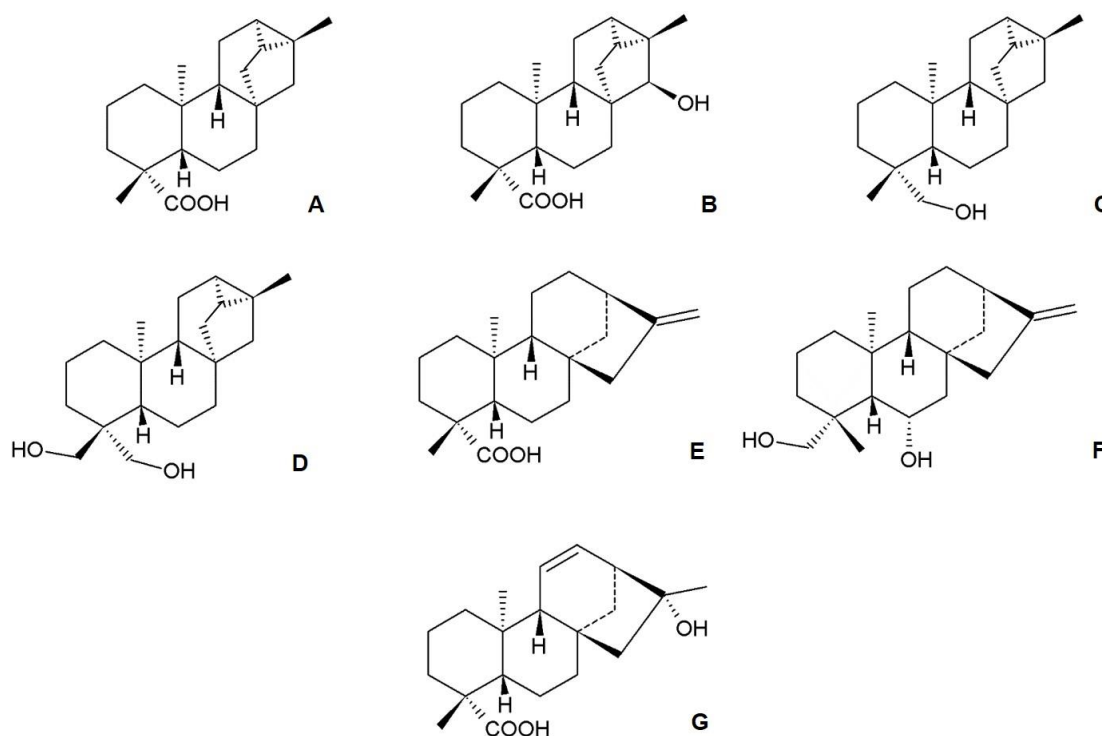


Figura 11. Estruturas químicas das substâncias isoladas da casca da raiz de *Croton floribundus*. Ácido *ent*-traquiloban-19-oico (a), ácido *ent*-15 $\alpha$ -hidroxitraquiloban-19-oico (b), *ent*-traquiloban-19-ol (c), *ent*-traquiloban-18,19-diol (d), ácido *ent*-caur-16-en-19-oico (e), *ent*-caur-16-en-6 $\alpha$ ,19-diol (f) e ácido *ent*-16 $\alpha$ -hidroxicaur-11-en-19-oico (g).

## 2.2 GLÂNDULA PROSTÁTICA

### 2.2.1 Anatomia, Histologia e Função

A próstata é uma glândula presente somente no sexo masculino e está localizada na parte baixa do abdômen. Trata-se de um órgão muito pequeno, retroperitoneal, com forma de maçã e está situado logo abaixo da bexiga e à frente do reto. A próstata envolve a porção inicial da uretra, tubo pelo qual a urina armazenada na bexiga é eliminada (Figura 12) (INCA, 2017a).

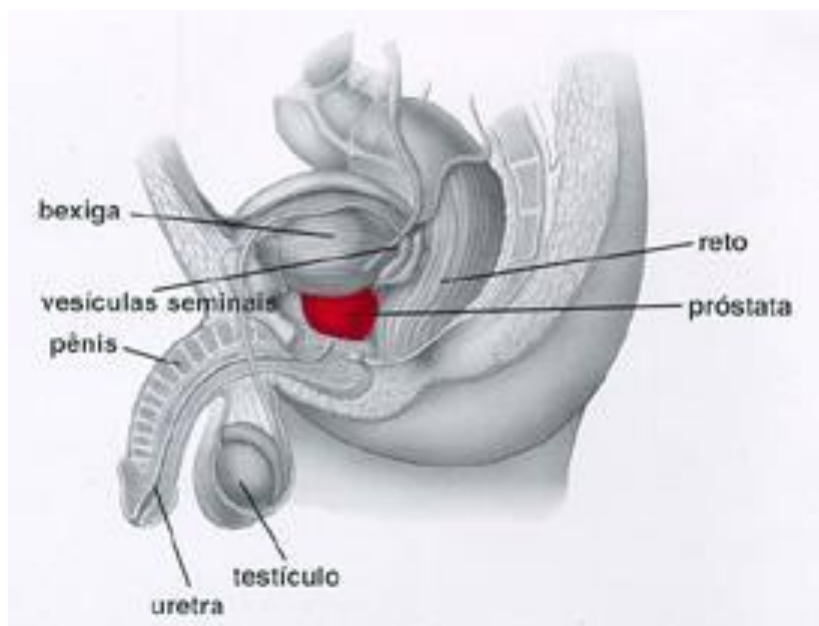


Figura 12. Localização da glândula prostática.  
Fonte: INCA, 2017a.

No adulto, a próstata pesa aproximadamente 20 g e seu parênquima pode ser dividido em quatro zonas distintas: as zonas periférica, central, de transição e a região do estroma fibromuscular anterior. A próstata é composta por glândulas revestidas por duas camadas de células, uma basal de epitélio cuboide baixo coberta por uma camada de células secretoras colunares. As glândulas são separadas por um estroma fibromuscular abundante (EPSTEIN, 2010).

A glândula prostática é responsável por secretar um líquido fino, leitoso, constituído de cálcio, íon citrato, íon fosfato, uma enzima de coagulação e uma pró-fibrinolína, que constitui aproximadamente 30% do sêmen. A leve alcalinidade do líquido prostático é importante para a fertilização bem-sucedida do óvulo, uma vez que tanto o líquido do canal deferente, quanto o pH das secreções vaginais femininas são ácidos. Dessa forma, a secreção alcalina da próstata favorece que os líquidos que envolvem os espermatozoides adquiram a faixa de pH ideal (6,0-6,5) necessária para a mobilidade destes (GUYTON; HALL, 2011).

A próstata permanece pequena na infância e começa a crescer na puberdade, estimulada pela testosterona, atingindo tamanho quase estacionário em torno dos 20 até 50 anos de idade aproximadamente. Nessa idade, em alguns homens, ela começa a regredir, juntamente com a redução da produção de testosterona pelos testículos.

Dos processos patológicos que mais afetam a glândula prostática, têm-se a inflamação, o aumento nodular benigno e tumores. Destes, o aumento nodular benigno e o carcinoma prostático são os mais comuns. Uma característica dos tipos de lesões proliferativas é o fato destas lesões se diferirem em cada região, por exemplo, a maioria das hiperplasias surge na zona de transição, enquanto que a maioria dos carcinomas é originada na zona periférica, localizada próxima ao reto (EPSTEIN, 2010).

## 2.3 CÂNCER DE PRÓSTATA

### 2.3.1 Incidência

A palavra câncer, do grego *karkínos*, significa caranguejo e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460-377 a.C.). A proliferação celular pode ser um processo controlado ou descontrolado. No crescimento controlado, tem-se um aumento localizado do número de células que constituem os tecidos normais que formam o organismo, causado por estímulos fisiológicos ou patológicos. Neste tipo de crescimento, as células são normais ou com pequenas alterações na sua forma e função, podendo ser iguais ou diferentes do tecido onde se instalam e o efeito é reversível após o término dos estímulos que o provocaram. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são exemplos de crescimento celular controlado (Figura 13). Já no crescimento descontrolado, tem-se uma massa anormal de tecido, com crescimento autônomo que persiste mesmo após o término dos estímulos que o provocaram. As neoplasias, câncer *in situ* e câncer invasivo, são exemplos dessa forma não controlada de crescimento celular e, normalmente, são denominados de tumores (INCA, 2011).

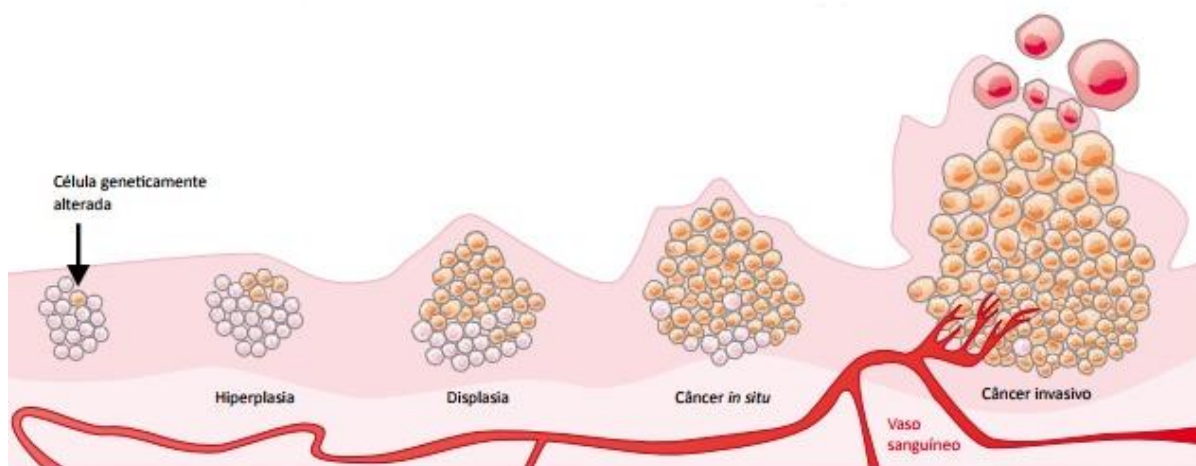


Figura 13. Tipos de crescimento celular.  
Fonte: INCA, 2011.

A etiologia do CaP está relacionada com fatores externos, como estilo de vida, incluindo o uso de tabaco e obesidade, assim como fatores internos, como mutações genéticas hereditárias, fatores hormonais e condição imunológica. Todos estes fatores podem agir de forma sequencial ou simultaneamente, iniciando e/ou promovendo o desenvolvimento do câncer. Devido a sua predominância, mais de 95% dos casos, o adenocarcinoma de próstata tem como sinônimo “câncer de próstata”.

O CaP é o segundo mais incidente entre os homens, com uma estimativa de 1 milhão de casos novos e 307.500 mortes no mundo em 2012 (Figura 14) (TORRE et al., 2015). Dos casos diagnosticados, cerca de 70% ocorrem em regiões mais desenvolvidas, entretanto, algumas regiões menos desenvolvidas, como o Caribe, países da América do Sul e países do Sul da África apresentam altas taxas de incidência (INCA, 2015).

Segundo Prostate Cancer Foundation (2017), 1 em 8 homens será diagnosticado com CaP em algum momento da sua vida, sendo considerado um câncer da terceira idade pelo fato de três quartos dos casos no mundo ocorrerem a partir dos 65 anos e menos de 1% ser detectado antes dos 50 anos (INCA, 2015). Entretanto, recomenda-se que homens que apresentam maior risco para esta neoplasia, realizem exames de triagem a partir dos 40 anos (EPSTEIN, 2010).

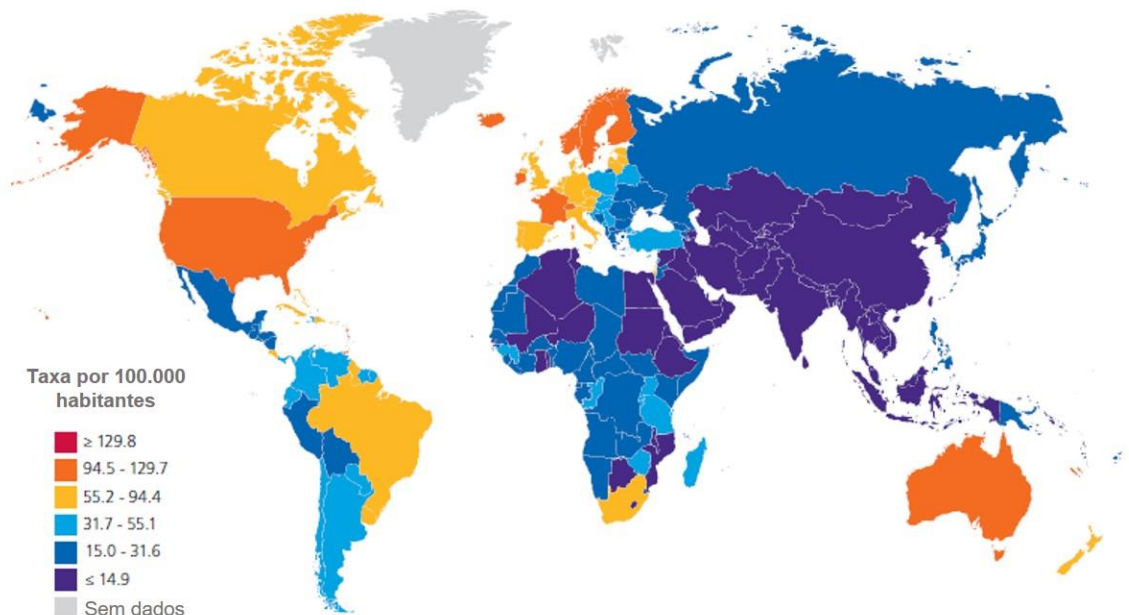


Figura 14. Variação internacional das taxas de incidência de câncer de próstata, 2012\*. Fonte: Adaptado de Globocan, 2012.

Com relação à história familiar, aproximadamente 25% dos casos apresentam o seguinte perfil: homens que tiveram pai ou irmão diagnosticados previamente com a doença apresentam um aumento de duas a três vezes no risco de desenvolver essa neoplasia. Esse risco aumenta para aproximadamente 11 vezes se o diagnóstico do pai ou do irmão tiver ocorrido antes dos 40 anos (INCA, 2015).

De acordo com Prostate Cancer Foundation (2017), as taxas de diagnóstico de CaP aumentam com a idade do paciente, onde nos Estados Unidos, 1 em 350 homens com menos de 50 anos será diagnosticado com CaP; 1 em 52 para a faixa de 50-59 anos; 1 em 19 para 60-69 anos e 1 em 11 para homens que já passaram dos 70 anos. Dessa forma, aproximadamente 60% de todos os CaP são diagnosticados em homens com mais de 65 anos.

O risco de CaP é 74% maior em negros do que em brancos, por razões ainda desconhecidas, mas que possivelmente incluem fatores hereditários. Estima-se que durante o ano de 2018, 164.690 casos novos de CaP serão diagnosticados nos Estados Unidos, com uma estimativa de 29.430 mortes, sendo a terceira causa de morte em homens no país (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

No Brasil, o CaP é o segundo mais comum entre os homens (15%), atrás somente do câncer de pele não melanoma. Estimou-se para 2016, cerca de 61.200 casos novos de CaP no Brasil e em 2013 foram registradas 13.772 mortes (INCA, 2015). O CaP é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, como pode ser observado na Figura 15. Estimam-se 68.220 casos novos de CaP para cada ano do biênio 2018-2019. O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida. Além disso, a melhoria da qualidade dos sistemas de informação do país e a ocorrência de sobrediagnóstico, em função da disseminação do rastreamento do câncer de próstata por meio da dosagem de PSA e toque retal, também influenciam na magnitude da doença no país (INCA, 2017b).

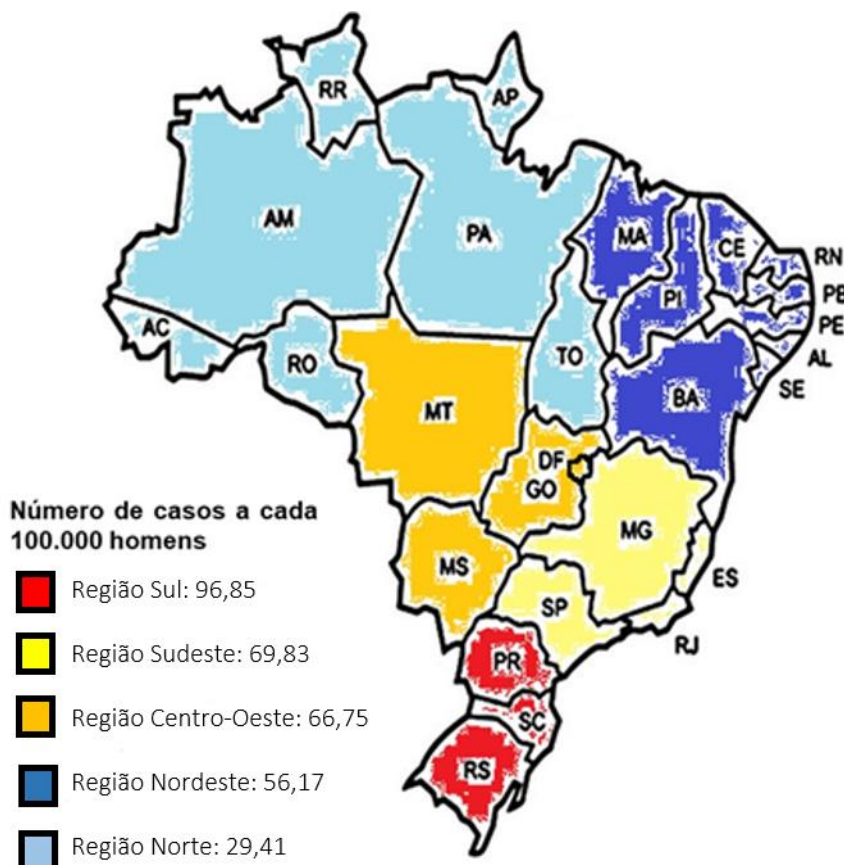


Figura 15. Incidência de câncer de próstata por região do Brasil, 2016\*.

\*Valores a cada 100.000 homens.

Fonte: Adaptado de INCA, 2017b.

### 2.3.2 Etiologia, Sintomas e Diagnóstico

A etiologia do CaP não está totalmente esclarecida. Suspeita-se que vários fatores como idade, raça, história familiar, níveis hormonais e influências ambientais desempenhem um papel importante no desenvolvimento desta patologia (INCA, 2015). O crescimento e a sobrevivência das células do CaP dependem de andrógenos (incluindo testosterona e di-hidrotestosterona), hormônios produzidos principalmente pelos testículos e uma pequena quantidade na glândula adrenal. Estes se ligam ao receptor de andrógenos (RA) e induzem a expressão de genes pró-crescimento e pró-sobrevivência. A importância dos andrógenos pode ser observada no efeito terapêutico da castração ou do tratamento com antiandrogênicos, que geralmente são responsáveis por induzir a regressão da doença. Entretanto, a maioria dos tumores, infelizmente, tornam-se resistentes ao bloqueio hormonal, através de mecanismos como uma hipersensibilidade de RA em níveis baixos de andrógeno, mutações em RA que permitem sua ativação por ligantes não androgênicos e outras mutações que ativam vias de sinalização alternativas (EPSTEIN, 2010).

Inicialmente, o CaP não apresenta sintomas. Com o avanço da doença, o paciente pode sentir diminuição ou interrupção do fluxo urinário; dificuldade de iniciar ou de parar o fluxo urinário; sentir a necessidade de urinar frequentemente, especialmente à noite;

hematúria; dor ou queimação ao urinar. Comumente ocorre no CaP metástase óssea, podendo causar dor no quadril, coluna vertebral, costelas, e em outros locais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Nos casos em que o CaP é composto de células muito anormais, estas são mais propensas a se dividirem e se espalharem mais rápido para outras regiões do corpo. Muitas vezes, o CaP se espalha primeiro aos tecidos que estão perto da próstata, incluindo as vesículas seminais e os linfonodos próximos. Se o câncer de próstata se espalhou para os gânglios linfáticos quando é diagnosticado, isso significa que há maior chance de se espalhar para outras áreas do corpo também, caracterizando uma metástase, ou seja, as células tumorais deixam a próstata e formam tumores em outros locais do corpo. Quando as células de CaP obtêm acesso à corrente sanguínea, estas podem ser depositadas em vários locais, mais comumente em ossos (85% a 90% dos casos metastáticos) e, mais raramente, para outros órgãos, como fígado, pulmão ou cérebro (PROSTATE CANCER FOUNDATION, 2017).

Atualmente, nenhuma organização apresenta uma triagem para detecção precoce de CaP de risco médio, devido a preocupação da alta taxa de sobrediagnóstico, ou seja, “excesso de diagnóstico”, detectando doenças que nunca causariam sintomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). No Brasil, o Ministério da Saúde, em suas diretrizes, não recomenda o rastreamento populacional, pois considera que não há evidências de que o tratamento de tumores em estádios iniciais tenha uma efetividade que supere os riscos dos efeitos adversos (CONITEC, 2016).

O CaP é diagnosticado por biópsia, sendo o elevado nível de antígeno prostático específico (PSA) o motivo mais comum de se realizar este exame invasivo (PROSTATE CANCER FOUNDATION, 2017) e a principal recomendação é de que a realização do PSA como mecanismo de rastreamento do CaP seja uma decisão individualizada e compartilhada com o paciente, considerando os benefícios e as consequências de um diagnóstico precoce e as opções de tratamento (CONITEC, 2016).

Apesar do PSA e do exame digital retal (toque retal) serem as principais formas de detectar o CaP, uma elevação nos níveis séricos de PSA não é específica de neoplasia, pois também está presente nos processos inflamatórios da próstata (prostatite), trauma local e hiperplasia prostática benigna (MAGNABOSCO, 2014). Já a realização do exame digital retal se justifica pelo fato de 80% dos tumores prostáticos estarem presentes na zona periférica da glândula, podendo serem palpados através do reto e aproximadamente 18% dos pacientes com CaP têm PSA normal, sendo o tumor detectado exclusivamente pelo toque retal. Dessa forma, quando se utiliza somente os níveis de PSA como forma de detecção do CaP, deve-se levar em consideração se o paciente faz uso de drogas que diminuem os níveis de PSA, como o medicamento Finasterida, utilizado no tratamento de calvície de padrão masculino (alopecia androgênica) (PROSTATE CANCER FOUNDATION, 2017).

Vários métodos para melhorar a sensibilidade e especificidade de diagnóstico do CaP e reduzir o número de biópsias desnecessárias foram propostos, principalmente na faixa de PSA entre 4 e 10 ng/mL, como os métodos de PSA ajustado para a idade (Tabela 1); densidade do PSA (valor PSA/ volume prostático); relação entre PSA livre/PSA total, sendo este último considerado o melhor parâmetro (MAGNABOSCO, 2014).

O PSA é um produto do epitélio prostático, secretado normalmente no sêmen. É uma serina protease cuja função é clivar e liquefazer o coágulo seminal formado após a ejaculação. Em homens normais, apenas quantidades mínimas de PSA circulam no sangue. Na maioria dos laboratórios, um nível sérico de 4 ng/mL é usado como ponto de corte entre normal e anormal, porém o PSA é específico para o órgão, mas não é específico para o câncer (EPSTEIN, 2010).

Tabela 1 - PSA ajustado à idade.

| <b>Idade (anos)</b> | <b>PSA sérico (ng/mL)</b> |
|---------------------|---------------------------|
| 40-49               | 2,5                       |
| 50-59               | 3,5                       |
| 60-69               | 4,5                       |
| 70-79               | 6,5                       |

Fonte: MAGNOBOSCO, 2014.

Como mencionado anteriormente, o diagnóstico definitivo de CaP é feito somente com a biopsia prostática, onde devem ser obtidos 12 fragmentos aleatórios que representem todas as regiões da próstata (MAGNABOSCO, 2014).

O estadiamento do câncer é baseado no tamanho ou extensão do tumor primário e se este se espalhou para os linfonodos próximos ou outras partes do corpo. Se o câncer está localizado e não se espalhou, este estágio é chamado de *in situ*, porém se as células do câncer penetraram além do seu tecido de origem, a neoplasia tornou-se invasiva, sendo classificada como local, regional ou distante, baseado na extensão de propagação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Segundo as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas de Adenocarcinoma de Próstata (CONITEC, 2016), o estadiamento do CaP, com o intuito de definição do estágio da doença, é determinado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), que utiliza os critérios T (tumor), N (linfonodo) e M (metástases) e a graduação histopatológica pelo escore de Gleason. O sistema TNM avalia o crescimento e a propagação do câncer de três maneiras: extensão do tumor primário (T); ausência ou presença do envolvimento de linfonodos locais (N) e ausência ou presença de metástase (M). Após a categoria T, N ou M ser determinada, um estágio de 0, 1, 2, 3 ou 4 é atribuído (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O escore patológico de Gleason é o mais utilizado no mundo e se baseia na diferenciação glandular e no padrão de crescimento em relação ao estroma, classificando o padrão histológico de 1 a 5 (quanto maior o número, mais agressivo é o tumor), considerando primeiro o padrão predominante, o mais frequente e, após, o padrão secundário, ou seja, o

segundo mais frequente ou o de maior grau encontrado, resultando em um escore final de 2 a 10 após ser realizada a soma dos dois padrões. Em sua 7ª edição de 2009 (Tabela 2) o grau histológico (Gleason) e o valor de PSA foram acrescentados na classificação do estágio clínico como grupos prognósticos (Tabela 3) (MAGNABOSCO, 2014).

Tabela 2 - Classificação TNM, 7ª edição.

| <b>Tumor primário</b>                                                        | <b>T0</b> | <b>Sem evidência tumoral</b>                                                |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|
|                                                                              | T1a       | TU incidental < 5% amostra (detectado pela RTU)                             |
|                                                                              | T1b       | TU incidental > 5% amostra (detectado pela RTU)                             |
|                                                                              | T1c       | TU descoberto em biópsia por agulha por elevação PSA (com toque normal)     |
|                                                                              | T2a       | TU acomete < ½ de 1 lobo prostático                                         |
|                                                                              | T2b       | TU acomete > ½ de 1 lobo prostático                                         |
|                                                                              | T2c       | TU acomete ambos os lobos prostáticos                                       |
|                                                                              | T3a       | Extensão extracapsular do tumor                                             |
|                                                                              | T3b       | Tumor invade as vesículas seminais                                          |
|                                                                              | T4        | TU fixo ou invadindo estruturas adjacentes (reto, bexiga, pelve, intestino) |
| <b>Linfonodos regionais (abaixo da bifurcação entre as artérias ilíacas)</b> | N0        | Linfonodos não acometidos                                                   |
|                                                                              | N1        | Metástase em linfonodos regionais                                           |
| <b>Metástases a distância (categoria mais avançada)</b>                      | M0        | Ausência de metástases a distância                                          |
|                                                                              | M1a       | Metástase para linfonodos não regionais                                     |
|                                                                              | M1b       | Metástase para ossos                                                        |
|                                                                              | M1c       | Metástase para outros órgãos                                                |

RTU: Ressecção Transuretral de Próstata; TU: Tumor.

Fonte: MAGNABOSCO, 2014.

Tabela 3 - Grupo prognósticos, 7ª edição TNM.

|            |            |            |    |              |                  |
|------------|------------|------------|----|--------------|------------------|
| <b>I</b>   | T1a-c/T2a  | N0         | M0 | PSA < 10     | Gleason ≤ 6      |
|            | T1a-c      | N0         | M0 | PSA 10-20    | Gleason < 6      |
| <b>IIA</b> | T1a-c      | N0         | M0 | PSA < 20     | Gleason = 7      |
|            | T2a-b      | N0         | M0 | PSA 10-20    | Gleason ≤ 7      |
|            | T2c        | N0         | M0 | PSA qualquer | Gleason qualquer |
| <b>IIB</b> | T1-2       | N0         | M0 | PSA ≥ 20     | Gleason qualquer |
|            | T1-2       | N0         | M0 | PSA qualquer | Gleason ≥ 8      |
| <b>III</b> | T3         | N0         | M0 | PSA qualquer | Gleason qualquer |
|            | T4         | N0         | M0 | PSA qualquer | Gleason qualquer |
| <b>IV</b>  | T qualquer | N1         | M0 | PSA qualquer | Gleason qualquer |
|            | T qualquer | N qualquer | M1 | PSA qualquer | Gleason qualquer |

Fonte: MAGNABOSCO, 2014.

Existem ainda vários critérios prognósticos para o CaP, sendo a divisão de grupos proposta por D'Amico a mais empregada para doença localizada (Tabela 4). Um estadiamento de CaP adequado é importante pois determina a(s) melhor(es) forma(s) terapêutica(s), assim como o prognóstico e o melhor esquema de seguimento do paciente (MAGNABOSCO, 2014).

Tabela 4 - Grupo de risco para recidiva de câncer de próstata (D'Amico).

| <b>Sobrevida livre de doença em 10 anos</b> |                                                 |     |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----|
| <b>Baixo risco</b>                          | PSA < 10 ng/mL<br>Gleason ≤ 6<br>Estádio ≤ T2a  | 83% |
| <b>Risco intermediário</b>                  | PSA 10-20 ng/mL<br>Gleason = 7<br>Estádio T2b-c | 46% |
| <b>Alto risco</b>                           | PSA > 20 ng/mL<br>Gleason 8-10<br>Estádio T3a-b | 29% |

Fonte: MAGNABOSCO, 2014.

### 2.3.3 Tratamento

Atualmente as opções terapêuticas disponíveis para o CaP localizado variam conforme a agressividade do tumor e as características do paciente, e incluem apenas a observação; vigilância ativa em casos de bom prognóstico ou em pacientes com comorbidades; condutas invasivas, como a prostatectomia radical (ressecção completa da próstata, considerado padrão-ouro) ou radioterapia nos pacientes com tumores de comportamento mais agressivo. Dependendo da categoria de risco, proposta por D'Amico, existe mais de uma alternativa terapêutica para o tratamento do CaP localizado (CONITEC, 2016).

Quando surgem metástases distantes, a terapia hormonal passa a constituir o principal tratamento do CaP metastático, sendo a terapia de privação androgênica o tratamento-padrão de primeira linha, realizado por meio da castração cirúrgica (orquiectomia bilateral) ou castração química (utilizando agonistas ou antagonistas do hormônio de liberação das gonadotropinas, GnRH, e como tratamento de segunda linha, tem-se antiandrogênios, estrógenos e inibidores da esteroidogênese).

A terapia de privação androgênica é considerada um tratamento paliativo, mas não leva a cura, podendo aliviar os sintomas relacionados ao câncer e melhorar a qualidade de vida do paciente (MOY; LEE; SMITH, 2012). A Tabela 5 contém os medicamentos utilizados no bloqueio hormonal para o tratamento do CaP metastático (ARAÚJO; ANTUNES, 2012).

Tabela 5 - Opções de hormônio terapia no câncer de próstata e suas propriedades.

| <b>Classe</b>                                    | <b>Fármaco</b>                                                                                                                                                                | <b>Local de ação</b>         | <b>Mecanismo de ação</b>                                                  |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agonistas GnRH</b>                            | Leuprorrelina (Lupron®);<br>Gosserrelina (Zoladex®)                                                                                                                           | Glândula pituitária anterior | Diminuição da liberação do hormônio luteinizante (LH)                     |
| <b>Antagonistas GnRH</b>                         | Abarelix (Plenaxis®);<br>Degarelix (Firmagon®)                                                                                                                                | Glândula pituitária anterior | Inibição direta dos receptores GnRH                                       |
| <b>Ablação adrenal</b>                           | Cetoconazol                                                                                                                                                                   | Glândula adrenal             | Inibição do citocromo P450                                                |
| <b>Antiandrogênio periférico</b>                 | Esteroides:<br>Ciproterona (Androcur® Schering);<br>Megestrol (Megestat®);<br>Não esteroides:<br>Flutamida (Eulexin®);<br>Bicalutamida (Casodex®);<br>Nilutamida (Nilandron®) | Glândula prostática          | Inibição do receptor androgênico por competitividade                      |
| <b>Antiandrogênio central</b>                    | Ciproterona                                                                                                                                                                   | Central e periférica         | Inibição da secreção e produção de gonadotrofinas e competição periférica |
| <b>Estrógeno</b>                                 | Dietilestilbestrol                                                                                                                                                            | Periférica                   | Competição com o receptor androgênico                                     |
| <b>Inibidor da 5<math>\alpha</math>-redutase</b> | Finasterida;<br>Dutasterida                                                                                                                                                   | Glândula prostática          | Inibição da conversão da testosterona em di-hidrotestosterona             |

Fonte: Adaptado de ARAÚJO e ANTUNES, 2012.

Existem dois principais bloqueadores da via androgênica que são utilizados para o tratamento de CaP resistente à castração, abiraterona (Zytiga®) e enzalutamida (Xtandi®). A abiraterona em combinação com prednisona ou prednisolona e a enzalutamida são indicados para o tratamento de pacientes com CaP metastático, resistente à castração, assintomáticos ou levemente sintomáticos, após falha à terapia de privação androgênica; para o tratamento de pacientes com CaP avançado metastático resistente à castração e que receberam quimioterapia prévia com docetaxel (ANVISA, 2017).

O uso da quimioterapia no CaP se restringia ao tratamento da doença metastática avançada, refratária à hormonioterapia. Estudos recentes sugerem o uso de quimioterapia paliativa concomitante à hormonioterapia como primeira linha terapêutica do câncer de próstata recém diagnosticado e com grande volume tumoral, devendo essa conduta ser analisada pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) em termos de eficácia, efetividade e custo-efetividade (CONITEC, 2016).

Atualmente, a quimioterapia com taxano, administrada com prednisona, é o padrão de cuidados para homens com CaP metastático. Os agentes de quimioterapia de taxano aprovados para tratamento de câncer de próstata avançado incluem docetaxel (Taxotere®) e

cabazitaxel (Jevtana®). Outro tipo de tratamento é a utilização da imunoterapia. O sistema imunológico tem a habilidade de combater células consideradas perigosas, como células infectadas ou células cancerígenas. Uma maneira de ativar as respostas imunes anticâncer é o uso de vacinas contra o câncer, que estimulam o sistema imunológico a reconhecer e combater células cancerosas.

Em 29 de abril de 2010, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o Sipuleucel-T (Provenge®), a primeira vacina baseada no conceito de células apresentadoras de antígenos. Tais células podem ser reconhecidas por células T que atuam na destruição de células anormais, incluindo células cancerosas. Este tratamento é destinado a homens com CaP resistente à terapia hormonal metastática e com dor mínima ou nenhuma, e é mais comumente administrado antes da quimioterapia, embora pareça ser eficaz em alguns homens mesmo após a quimioterapia (FDA, 2018).

Em 2017, foi aprovado pelo FDA, o pembrolizumabe (Keydruta®) para o tratamento de todos os tumores sólidos, incluindo o câncer de próstata (PROSTATE CANCER FOUNDATION, 2017). Em outubro de 2018, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aprovou o registro de um novo medicamento, o Erleada® (Apalutamida), que será comercializado na forma farmacêutica de comprimido revestido de 60 mg e será utilizado em combinação com a terapia de privação androgênica, por castração cirúrgica ou química, sendo indicado para o tratamento de pacientes com CaP não-metastático resistente à castração (ANVISA, 2018). A apalutamida age inibindo de forma seletiva o receptor de andrógenos (JANSSEN, 2018).

Infelizmente o CaP pode ressurgir após 10 anos do término do tratamento, dessa forma, os médicos não utilizam o termo cura para o CaP, preferindo usar termos como controle bioquímico (quando os níveis de PSA são mantidos normais com a medicação) ou livre de desenvolver doença metastática (o câncer não se espalhou para órgãos distantes), ajudando a avaliar o sucesso terapêutico no CaP (PROSTATE CANCER FOUNDATION, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise fitoquímica, controle de qualidade e avaliar *in vitro* a capacidade antiproliferativa, utilizando células de câncer de próstata metastático, dos extratos brutos preparados a partir da casca caulinar de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a descrição morfoanatômica, histoquímica e organoléptica da casca caulinar de *C. floribundus*;
- Determinar parâmetros para o controle de qualidade da casca caulinar de *C. floribundus*, incluindo as análises granulométrica, teor de umidade, cinzas totais, matéria estranha, teor de extrativos, resíduo seco e teor de polifenóis totais;
- Produzir os extratos brutos (EBs) a partir da casca caulinar de *C. floribundus* utilizando solventes de diferentes polaridades e selecionar o melhor líquido extrator pela análise da capacidade antioxidante e do teor de resíduo seco;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos EBs nas células tumorais de epitélio prostático humano (PC-3 e LNCaP) e células não tumorais de epitélio prostático humano (RWPE-1), realizando a técnica de Vermelho Neutro;
- Caracterizar o perfil químico do EB que apresentar maior índice de seletividade, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 MATERIAL VEGETAL**

A casca caulinar de *C. floribundus* foi coletada em abril de 2016, mediante autorização IBAMA-SISBIO nº 11995-6, no campus da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (23°24' W, 51°56' S), Maringá, Paraná, Brasil. Acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen registrado sob nº A22A035. Amostras dos ramos em estágio reprodutivo foram coletadas em outubro de 2016 e preparadas na forma de exsiccatas, servindo como material testemunho e resguardadas no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM), sob registro nº 30778. O material coletado foi comparado e identificado com exsicata da espécie depositada no HUEM.

### **4.2 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL**

#### **4.2.1 Secagem e Moagem**

Coletaram-se 6,261 kg de casca caulinar. Este material foi fragmentado e seco em estufa de circulação forçada de ar à 36 °C por 11 dias. A cominuição do material seco foi realizada em moinho de martelos (Tigre ASN6).

### **4.3 ENSAIOS DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL**

#### **4.3.1 Granulometria**

O tamanho médio das partículas foi determinado de acordo com a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira (2010). Para isso, uma sequência de tamises de ordem decrescente de abertura (1 a 0,149 mm e coletor), previamente pesados, foram montados em agitador mecânico. Em seguida, a casca caulinar pulverizada (50,0 g) foi colocada no tamis superior e após agitação mecânica, a quantidade de pó restante em cada tamis foi pesada. A partir dos resultados foi possível calcular a porcentagem de fração residual e a porcentagem de retenção acumulada. A granulação média do pó foi aquela que apresentou uma retenção acumulada de aproximadamente 50%. O restante do material foi acondicionado ao abrigo da luz e de umidade.

#### **4.3.2 Estudo Morfoanatômico**

Para a realização da descrição morfoanatômica foram utilizados ramos jovens (1º ao 3º nó, espessura inferior a 1 mm), ramos maduros (espessura acima de 1 mm) e a casca caulinar madura (espessura  $\geq 4$  mm) de *C. floribundus*. As amostras foram fixadas em FAA50 (5% formaldeído, 5% ácido acético e 90% de álcool etílico 50%, v/v) para as análises de Microscopia Óptica (MO) ou glutaraldeído 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,2

para as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e, após 48 h, foram conservadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940; KRAUS; ARDUIN, 1997).

#### **4.3.2.1 Caracterização Macroscópica**

Fragmentos frescos e secos da casca caulinar de *C. floribundus* foram analisados sob vista desarmada e com estereomicroscópio. Características da superfície caulinar externa e interna e do potencial de enrolamento foram determinadas de acordo com os apontamentos de Oliveira et al. (2014).

#### **4.3.2.2 Caracterização Microscópica**

Para a realização das análises ao MO e MEV as amostras foram seccionadas nos planos transversal, longitudinal radial e longitudinal tangencial. Para MO as secções foram recolhidas em vidro de relógio contendo água e, após a seleção das melhores, foram transferidas para solução de hipoclorito de sódio 30% durante 10 min, lavadas com água destilada e coradas com azul de Astra (1%) e safranina (1%). As lâminas semipermanentes foram montadas com gelatina glicerina, segundo indicações de Kraus e Arduin (1997). A lâmina foi etiquetada com as seguintes informações: nome da espécie, órgão analisado, tipo de secção e data.

Para as análises ao MEV, secções mais espessas dos tecidos vegetais, passaram pela desidratação em série etanólica, iniciando-se com álcool etílico 30% (v/v) por 30 min, seguida de álcool etílico 40%, 50%, 60% e 70% (v/v), respectivamente, mantendo-se 30 min de intervalo. Seguiu-se a desidratação com álcool etílico 80%, 90%, 95% por 15 min, finalizando em álcool etílico absoluto durante 10 min, por duas vezes, e em seguida, as amostras foram secas no ponto crítico do CO<sub>2</sub> (Bal-Tec CPD 030) (HORRIDGE; TAMM., 1969). Por fim, as amostras devidamente posicionadas nos planos anatômicos foram fixadas sobre suporte metálico com fita dupla face de carbono, submetidas à metalização com ouro (Bal-Tec 5CD050 sputter coater) e analisadas no MEV (FEIQUANTA 250) (15 kV). Realizou-se a análise morfológica e da composição química dos cristais presentes na casca caulinar de *C. floribundus*, utilizando espectroscopia de energia dispersiva de raio-x (OXFORD AZtec) acoplado ao MEV (FEIQUANTA 250) (15 kV).

#### **4.3.2.3 Testes Histoquímicos**

Os testes histoquímicos foram feitos em secções transversais da casca caulinar, nas quais os tecidos vegetais foram expostos ao Lugol, cloreto de zinco iodado, Sudan IV glicerinado, cloreto férrico, cloral hidratado 60% com ácido sulfúrico 25% e 2-4-dinitrofenilhidrazina, conforme descritos por Johansen (1940), Ganter e Jolles (1969-1970), Berlyn e Miksche (1976), Kraus e Arduin (1997) e Farmacopeia Brasileira (2010).

#### 4.3.2.4 Análise do pó

A casca caulinar pulverizada foi reidratada, clarificada e corada para preparo das lâminas e análise em MO. As imagens das lâminas semipermanentes e dos testes histoquímicos foram obtidas com auxílio de MO (Nikon® Eclipse 80i) com câmera (Nikon DS-FI1C cooled digital®) acoplada ao microscópio e ao computador (Intel Pentium Processor® E 5700 LGA775), com imagens transmitidas pelo programa D-DA simple analyzer.

#### 4.3.2.5 Análise Organoléptica

O aspecto visual, sabor, odor e percepção ao tato da casca caulinar foram observados segundo os apontamentos de Oliveira et al. (2014).

#### 4.3.3 Reações Químicas de Caracterização de Metabólitos Secundários

Para a análise fitoquímica foram realizados diferentes testes para identificar a presença de metabólitos secundários das seguintes classes: cumarinas (caracterização das cumarinas e identificação do sublimado); antraquinonas (reação de Bornträger, pesquisa de heterosídeos antraquinônicos livres e combinados, O-heterosídeos e C-heterosídeos); lactonas sesquiterpênicas; saponinas (teste qualitativo de espuma e determinação do índice afrosimétrico); substâncias iridoidais; taninos (testes de identificação com gelatina, cloreto férrico, acetato de chumbo, vanilina clorídrica e reação de Stiasny); glicosídeos cardiotônicos (reação de Libermann-Buchard, reação de Salkowski, reação de Kedde, reação de Baljet e reação de Keller-Kilani); alcaloides (reativo de Dragendorff, Mayer e Wagner), metil-xantinas (reação da murexida) e flavonoides (reação de Shinoda, Taubouk, reação com cloreto de alumínio e pesquisa de açúcares liberados após hidrólise ácida).

Para determinar o índice de afrogenicidade, 1,0 g da droga vegetal moída foi transferida para erlenmeyer contendo 50,0 mL de água fervente, mantendo-o sob fervura moderada durante 15 min. Em seguida, resfriou e filtrou em algodão para balão volumétrico de 100,0 mL, completando o volume. Após, com a solução extrativa foi preparada uma série de diluições de 0 a 10 vezes (Tabela 6), seguidas de agitação vigorosa. As soluções permaneceram em repouso por 15 min e, então, foi verificado qual diluição foi capaz de formar um anel de espuma de 1 cm de altura e que não desaparecesse com a adição de 1,0 mL de HCl 2N. O índice de espuma (IE) foi calculado segundo a equação (1):

$$IE = 1000/A \quad (1)$$

Onde: A é o volume em mililitro do decocto usado para preparar a diluição no tubo onde a espuma foi observada.

Tabela 6 - Padronização dos tubos de ensaio para determinação do índice afrosimétrico (IA).

| <b>Tubos</b>               | <b>I</b> | <b>II</b> | <b>III</b> | <b>IV</b> | <b>V</b> | <b>VI</b> | <b>VII</b> | <b>VIII</b> | <b>IX</b> | <b>X</b> |
|----------------------------|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|------------|-------------|-----------|----------|
| <b>ST* (mL)</b>            | 1        | 2         | 3          | 4         | 5        | 6         | 7          | 8           | 9         | 10       |
| <b>Água destilada (mL)</b> | 9        | 8         | 7          | 6         | 5        | 4         | 3          | 2           | 1         | 0        |

ST: Solução teste.

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2018.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e foram utilizados como padrão positivo drogas vegetais que contém os metabólitos secundários a serem identificados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SIMÕES et al., 2017; SIMÕES et al. 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2018).

#### 4.3.4 Doseamento do Teor de Polifenóis Totais (PT)

Para a determinação do teor de PT foi utilizada a técnica de taninos totais descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), com algumas modificações. Foram preparadas as soluções estoque, realizando a decocção de 0,750 g da droga pulverizada em erlenmeyer com 150 mL de água destilada durante 30 min, à temperatura de 60 °C. As soluções amostra foram preparadas diluindo 5 mL do filtrado da solução estoque em balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Desta solução foram transferidos 2 mL, adicionado 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdotúngstico) e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com solução de carbonato de sódio a 10,75% (p/v).

As soluções padrão foram preparadas dissolvendo 50 mg de pirogalol em balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Dessa solução foram transferidos 5 mL para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada. Transferiram-se 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdotúngstico) e 10 mL de água destilada, para balão volumétrico de 25 mL completando o volume com solução de carbonato de sódio a 10,75% (p/v).

As análises foram realizadas em triplicata e ao abrigo da luz. Após 30 min as absorvâncias foram determinadas à 760 nm em espectrofotômetro utilizando água destilada para ajuste do zero. Como padrão antioxidante foi utilizado o pirogalol e o resultado foi expresso em porcentagem de polifenóis totais, expressos em pirogalol. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz e em triplicata. Foi determinado o teor de umidade nas amostras no dia do teste.

## 4.4 VERIFICAÇÃO DA PUREZA DO MATERIAL VEGETAL

### 4.4.1 Pesquisa de Matéria Estranha

A determinação de matéria estranha presente na casca caulinar foi realizada segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010). Primeiro foi realizado a amostragem, ou seja, determinado a quantidade de droga que passaria pelo processo de quarteamento, de acordo com o grau de divisão da amostra. A amostra pulverizada foi recolhida da região superior e inferior do recipiente de armazenamento, totalizando 200 g.

Em seguida, realizou-se o quarteamento, distribuindo toda a amostra de modo homogêneo sobre área quadrada e dividindo em quatro partes iguais. As porções contidas em dois quadrados opostos foram rejeitadas, juntando as outras porções restantes. Este processo foi repetido mais duas vezes, obtendo-se no final uma amostra de 25 g, quantidade de amostra que foi submetida à pesquisa de matéria estranha. A amostra foi espalhada em superfície plana e analisada ao olho nu e com o auxílio de estereomicroscópio. O material separado foi pesado e a porcentagem de matéria estranha foi determinada com base no peso da amostra submetida ao ensaio.

### 4.4.2 Determinação do Teor de Extrativos (TE)

A determinação do TE foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Mello e Petrovick (2000). Pesaram-se 10,0 g da droga vegetal moída que foi submetida a decocção em 100,0 mL de água (1:10, m/v), durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi completado para 100,0 mL. A solução foi filtrada em papel filtro e os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Alíquotas de 20,0 g foram transferidas para pesa filtro, previamente tarado e evaporadas até a secura em banho de água. Os resíduos obtidos foram mantidos em estufa por 2 h à 105 °C. Em seguida, as cápsulas foram resfriadas em dessecador e pesadas. Foi determinado o teor de umidade nas amostras no dia do teste. O TE foi calculado em porcentagem pela média de três determinações segundo a equação (2):

$$TE = g.FD.100/m \quad (2)$$

Onde: TE é o teor de extrativos (%; m/m); g é a massa do resíduo seco em gramas; FD é o fator de diluição (5) e m é a massa da amostra em gramas.

### 4.4.3 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Para a determinação do teor de cinzas totais, que incluem cinzas fisiológicas e cinzas não fisiológicas, utilizou-se a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), com algumas modificações. Para isso, foram pesados 0,5 g da amostra pulverizada que foi transferida para cadinho previamente tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada

aumentando gradativamente a temperatura até, no máximo,  $600 \pm 25$  °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Em seguida, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. A análise foi realizada em triplicata.

#### **4.4.4 Determinação do Teor de Umidade: Balança por Infravermelho**

O procedimento foi realizado seguindo a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010). Primeiramente foi removida a umidade do equipamento e após, pesou-se cerca de 1 g da amostra distribuída uniformemente no coletor de alumínio contido dentro do aparelho. Utilizaram-se o tempo de 30 min e a temperatura de secagem de 105 °C. Por último, anotou-se o percentual de umidade. A análise foi realizada em triplicata.

#### **4.5 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS (EBs)**

Os EBs foram preparados na proporção droga vegetal: líquido extrator 1:10 (p/v), pelo método sólido/líquido à frio de turbólise (Ultra-Turrax® IKA T25), 12000 rpm, durante 15 min, com intervalos de 5 min e temperatura inferior a 40 °C. Foram utilizados 20,0 g da droga vegetal e os seguintes solventes em proporção volumétrica: água; etanol:água (1:1, 7:3 e 9,5:0,5); metanol; metanol:água (1:1); acetato de etila; diclorometano e acetona:água (7:3). Os extratos foram filtrados em funil de Büchner, sob pressão reduzida e o volume completado para 200 mL. Alíquotas dos EBs foram utilizadas para a determinação do resíduo seco (RS) (Farmacopeia Brasileira, 2010). Por fim, os EBs foram concentrados sob pressão reduzida em rotaevaporador (Büchi R-200), congelados em nitrogênio líquido e liofilizados (Figura 16). O rendimento dos extratos foi calculado pela equação (3):

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal}) \times 100 \quad (3)$$

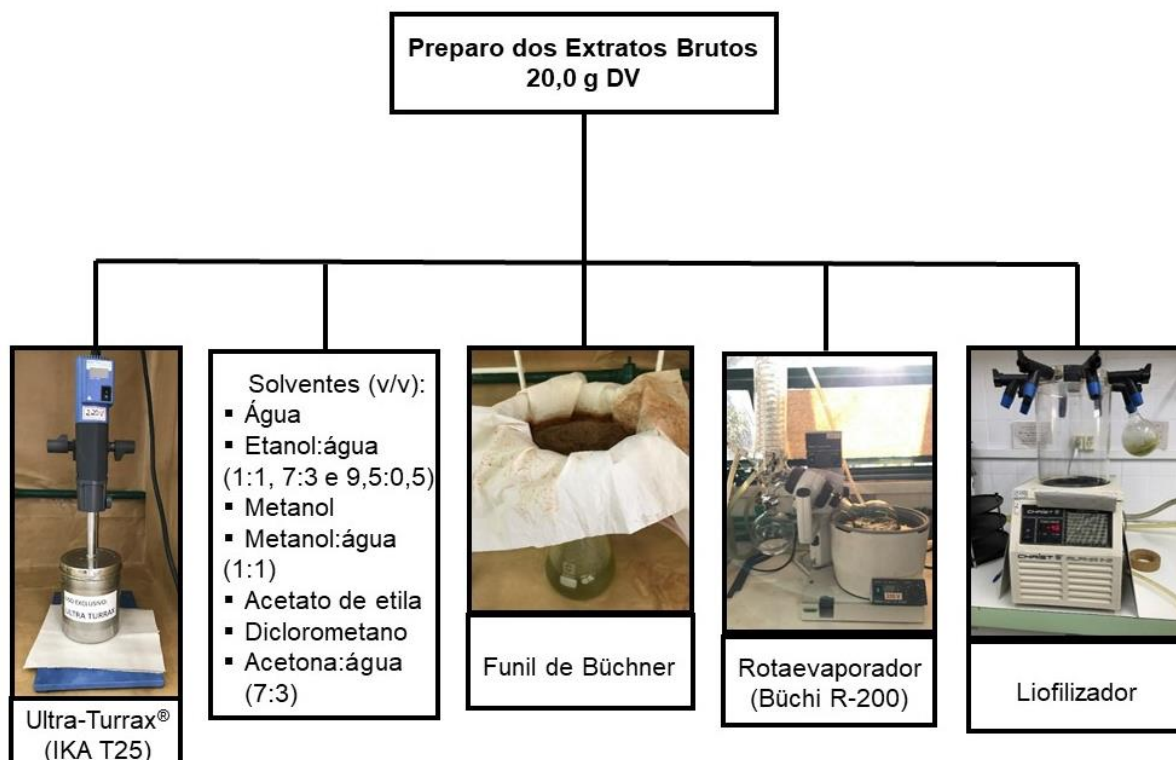


Figura 16. Etapas do preparo dos extratos brutos da casca caulinar de *Croton floribundus*.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES PARA DETERMINAR O MELHOR LÍQUIDO EXTRATOR

Com o objetivo de determinar o melhor líquido extrator foram realizadas as determinações do resíduo seco e da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) de cada EBs.

##### 4.6.1 Resíduo Seco (RS)

A avaliação do teor de RS foi realizada de acordo com a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), com modificações. Uma amostra de 10,0 g de cada EBs foi transferida para placa de Petri, medindo, aproximadamente, 50 mm em diâmetro e 30 mm de altura. As amostras foram evaporadas até secar em banho-maria e, em seguida, transferidas para balança de infravermelho 105 °C, por 15 min, para determinação do teor de RS. O teor de RS por grama de droga vegetal foi calculado. O teor de umidade nas amostras foi determinado no dia do teste. A análise foi realizada em triplicata.

##### 4.6.2 Determinação da Capacidade Antioxidante pelo Método de Sequestros de Radicais Livres (DPPH•)

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007) e Sousa et al. (2007). Para isso, 1,0 mg de cada EBs foi diluído em metanol grau HPLC. As soluções de cada EBs foram

preparadas nas seguintes concentrações: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 (µg/mL). Utilizaram-se os controles negativo (metanol e solução de DPPH 65 µM), positivo (ácido gálico, vitamina C e Trolox) e metanol como branco. Após 30 min da adição da solução de DPPH\*, procederam-se as leituras em leitor de microplacas (EPOCH 2) a 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata e ao abrigo da luz.

A partir dos valores das absorvâncias foi possível determinar a porcentagem de capacidade antioxidante (%CAT) pela equação (4):

$$\text{Capacidade antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}))}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde: Abs<sub>controle</sub> = absorvância do controle negativo; Abs<sub>amostra</sub> = absorvância da solução de extrato bruto; Abs<sub>branco</sub> = absorvância do metanol.

O valor da concentração efetiva de 50% (CE<sub>50</sub>) foi calculado por regressão linear e utilizado para determinar a capacidade antioxidante dos extratos.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados da capacidade antioxidante e do teor de resíduo seco foram analisados aplicando-se ANOVA (unifatorial) seguido pelo teste de Tukey, utilizando o software Statistica® 12 e considerado  $p < 0.05$  como diferença estatística significativa entre os grupos.

Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO

##### 4.8.1 Cultura de Células

Foram utilizadas linhagens de células epiteliais neoplásicas de próstata: PC-3 (ATCC CRL-1435, adenocarcinoma de próstata), LNCaP (ATCC CRL-1740, carcinoma de próstata) e a linhagem de epitélio normal de próstata RWPE-1 (ATCC CRL-11609), utilizada para a determinação do índice de seletividade (IS). As linhagens PC-3 e RWPE-1 foram cedidas pelo Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a LNCaP pela Profa. Dra. Catarina Segreti Porto da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (CELLSTAR®), em 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco®) para as linhagens PC-3 e LNCaP e Queratinócito (Gibco®) para a linhagem RWPE-1, contendo L-glutamina e vermelho fenol, suplementado com 2,0 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Synth®) e 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®), 1% (v/v) de solução antibiótico-antimicótico (Gibco®), contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de

anfoterecina B, sob condições de incubação de 37,0 °C em atmosfera úmida com 5,0% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.8.2 Ensaio de Viabilidade e Citotoxicidade celular: Vermelho Neutro

O ensaio do Vermelho Neutro foi realizado conforme Borefreund e Puerner (1984), com algumas modificações. Para os experimentos foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento e com viabilidade celular igual ou superior a 90%, determinada pela técnica de azul de Trypan, em câmara de Neubauer. Células em meio de cultura foram tripsinizadas (0,25%+EDTA 1 mM em tampão PBS, pH 7,4) durante 1 min, ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SBF sem antibiótico, transferidas para placa de cultura de 96 poços (100 µL, 2,5x10<sup>5</sup> células/mL para PC3; 4x10<sup>5</sup> células/mL para RWPE1 e 5x10<sup>5</sup> células/mL para LNCaP) e mantidas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO<sub>2</sub>.

Decorrido o tempo de estabilização, o meio de cultura foi substituído e a monocamada celular foi tratada com 200 µL de cada EBs nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 µg/mL, diluídos em meio sem SBF e antibiótico, sendo que a maior concentração testada continha 0,5% de DMSO. As placas foram incubadas por 48 h a 37,0 °C em 5,0% de CO<sub>2</sub>.

Decorrido o período de tratamento, o sobrenadante foi removido e os poços lavados com PBS (solução salina tamponada com fosfatos). Adicionaram-se 200 µL da solução do corante Vermelho Neutro, diluído em meio sem SBF e antibiótico (40 µg/mL). Após 3 h de incubação a 37,0 °C e 5,0% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido e os poços lavados rapidamente com 200 µL da solução fixadora (1% CaCl<sub>2</sub> e 2% de formaldeído, v/v). O Vermelho Neutro incorporado nos lisossomos das células viáveis foi solubilizado com 200 µL da solução ácido-alcóolica (1% de ácido acético glacial em etanol 50%, v/v). A placa foi agitada por 5 min e a absorvância mensurada em espectrofotômetro (EPOCH 2) a 540 nm.

Paralelamente, durante o período de tratamento foram mantidos poços contendo no lugar dos EBs meio de cultivo com 0,5% de DMSO como controle negativo (CN) e poços com apenas meio de cultivo, utilizados como grupo controle (CT). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação (5):

$$(\%) \text{ de viabilidade celular} = 1 - (\text{AbsT}_{\text{tratamento}} / \text{Abs}_{\text{CN}}) \times 100 \quad (5)$$

Onde: AbsTratamento é a absorvância do tratamento e AbsCN é a absorvância do controle negativo.

Os valores do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em três dias distintos em quadruplicata técnicas de cada condição.

#### 4.8.3 Índice de Seletividade (IS)

O IS foi determinado realizando a razão da concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular ( $CI_{50}$ ) de cada tratamento entre as linhagens de células normais (RWPE-1) e neoplásicas (PC-3 e LNCaP), calculados por análise de regressão linear. Foi considerado significativo um valor de IS  $\geq 2,0$  (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

#### **4.9 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

O extrato bruto com maior índice de seletividade foi analisado por CLAE.

##### **4.9.1 Preparo da amostra**

O extrato bruto de acetona 70% foi selecionado e preparado na concentração de 1 mg/mL em metanol 20% (v/v). A solução foi extraída em cartucho de extração de fase sólida (C18) (Chromabond®) e filtrada em membrana de 0,45  $\mu$ m (Millipore).

##### **4.9.2 Equipamento e condições cromatográficas para a análise por CLAE**

A amostra preparada (seção 4.9.1) foi analisada utilizando o equipamento de CLAE da marca Thermo®, equipado com bomba, *degasser* (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), software controlador (ChromQuest®) e amostrador automático (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) com um *loop* de injeção de 10  $\mu$ L. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 (Phenomenex® Gemini, 110Å, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) com vazão de 0,5 mL/min em sistema isocrático de água ultrapura:acetonitrila 90:10 (v/v) acidificado com 0,05% de ácido fórmico. Os cromatogramas foram observados a 210, 280 e 330 nm.

### **5 ANÁLISE ESTRUTURAL**

#### **5.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)**

O extrato bruto com melhor atividade biológica foi analisado por EM. A separação cromatográfica foi realizada em UHPLC (Dionex Ultimate 3000 RS) utilizando coluna C18 (Dionex Acclaim® RSLC, 120Å, 2,1  $\times$  100 mm, 2,2  $\mu$ m) em sistema gradiente (A: água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico; B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) com fluxo de 0,4 mL/min: 0 a 0,4 min: isocrático a 5% B; 0,4 a 9,9 min: linear de 5% a 100% B; 9,9 a 15,0 min: isocrático a 100% B; 15,0 a 15,1 min: linear de 100% B a 5% de B; 15,1 a 20,0 min: isocrático a 5% B. O volume de injeção foi de 5  $\mu$ L.

Os compostos eluídos foram detectados usando um Dionex Ultimate DAD-3000 RS na faixa de comprimento de onda de 200-400 nm e um espectrômetro de massas Bruker Daltonics micrOTOF-QII equipado com uma fonte de ionização do tipo eletrospray (ESI),

analisador Quadropolo-Tempo de voo, Apollo no modo negativo e positivo de ionização a 3 Hz (EM e EM/EM) e tune do equipamento na faixa de 50-1500  $m/z$ , com voltagem do capilar de 4.5 kV, temperatura da fonte de 220 °C e fluxo de gás de dessolvatação de 9 L/min. Para cada análise foi realizada uma calibração interna dos dados utilizando uma solução 10 mM de formiato de sódio em isopropanol a 50% que foi infundida durante o reequilíbrio da cromatografia líquida utilizando válvula de desvio equipada com um *loop* de amostra de 20  $\mu$ L.

Os espectros de massas obtidos foram analisados por meio do Software DataAnalysis 4.2 e comparados com a literatura.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os requisitos de qualidade de insumos farmacêuticos abrangem aspectos relacionados com a identidade e pureza, além da realização de análises qualitativas e quantitativas das classes de metabólitos secundários (SOARES; FARIAS, 2017). Segundo Farías et al. (2009), existem poucos estudos anatômicos da casca caulinar de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae). Neste contexto, pode-se determinar a identidade de *C. floribundus* após a análise dos caracteres morfoanatômicos da casca caulinar desta espécie (Figura 17A). Entende-se que a casca caulinar engloba todos os tecidos situados externamente ao câmbio vascular caulinar (OLIVEIRA et al., 2014).

Os ramos jovens (espessura inferior a 1 mm) de *C. floribundus* apresentam superfície externa rica em tricomas e, quando seccionados transversalmente, secretam látex transparente, levemente esbranquiçado, em abundância, com ausência de oxidação (Figura 17B). Os ramos maduros (espessura acima de 1 mm) apresentam superfície externa com estriações longitudinais anastomosadas e lenticelas lignificadas (Figura 17C), caracteres também presentes em *C. draco* Schltdl. & Cham. (Farías et al., 2009). Os ramos maduros com diâmetro superior a 0,5 cm, secretam látex alaranjado nas regiões da medula e casca, o qual oxida-se, adquirindo coloração marrom-alaranjada (Figura 17D). A casca caulinar madura (espessura  $\geq 4$  mm) apresenta superfície externa áspera, com fissuras na horizontal, estrias longitudinais e coloração acinzentada. A presença de líquens na superfície externa foi comum, o que contribui para o aspecto acinzentado dos caules maduros (Figuras 17E e 17F). A superfície interna da casca caulinar madura é finamente estriada no sentido perpendicular ao maior eixo do órgão e apresenta coloração rosada (Figuras 17E), destacando-se o aspecto marmoreado de coloração branca e rosada, quando fresca (Figura 17F). Observou-se que a casca do tronco de *C. floribundus* não libera látex após incisão, diferindo de outras espécies de *Croton* que liberam látex avermelhado após incisão, como *C. lechleri*, *C. draconoides* e *C. lanjouwensis* (AMARAL; SIMÕES; FERREIRA, 2005). Após secagem, as cascas adquirem formato encurvado e coloração relativamente homogênea, marrom-rosada. A fratura é do tipo fibrosa. A casca caulinar possui odor característico de mentol e cânfora, sabor amargo, adstringente e é levemente picante.

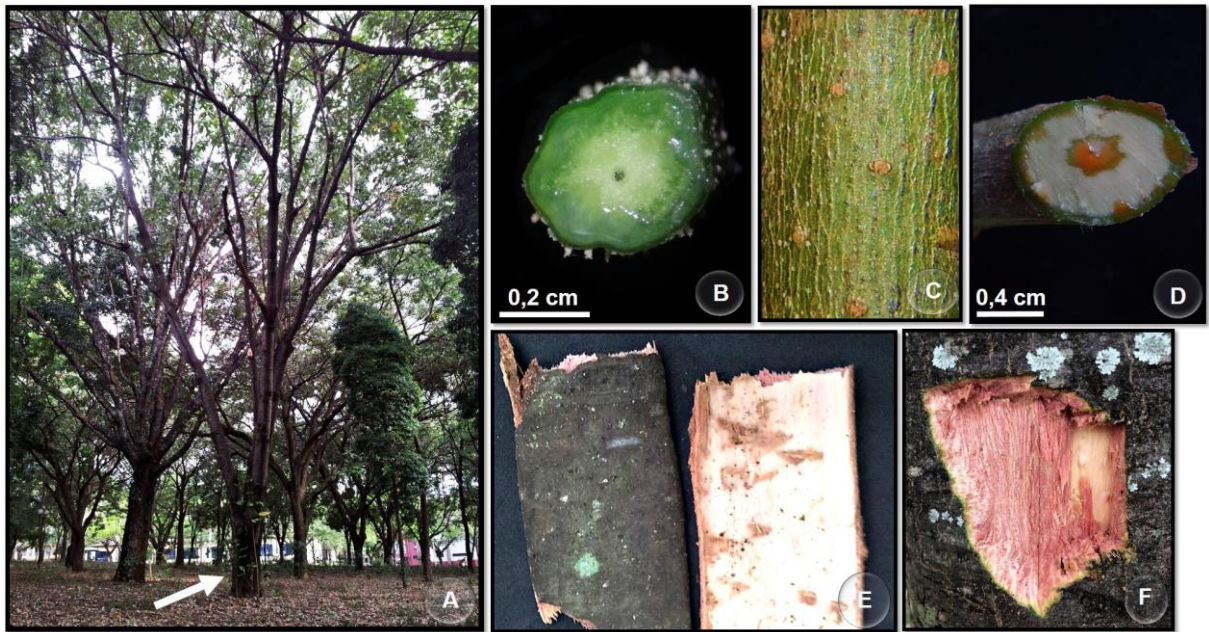


Figura 17. Análise macroscópica de *Croton floribundus*. Aspecto geral do espécime de sombra (seta) (A). Ramo jovem com exsudado de látex, secção transversal (B). Detalhe das estriações longitudinais anastomosadas de ramos maduros (C). Secção transversal de ramo maduro com mais de 0,5 cm de diâmetro, com exsudado de látex na região da casca e medula (D). Aspecto da face externa e interna da casca caulinar madura (E) e (F).

Na análise anatômica do primeiro ao terceiro nó (ramos jovens), a epiderme apresenta-se uniestratificada, com abundância de tricomas tectores estrelados (Figuras 18A, 18B e 18C), além de tricomas glandulares pluricelulares, com apenas uma célula na região de inserção (Figura 18D). Subepidermicamente estão 4 estratos de colênquima angular, seguido por 5-6 estratos de parênquima clorofiliano (Figuras 18A, 18B e 18C). Por todo o córtex e especialmente no floema são abundantes laticíferos articulados não ramificados, longos e de grande calibre (Figura 18E), bem como amiloplastos e idioblastos com drusas. Os feixes vasculares são colaterais (Figuras 18B e 18F). A medula caulinar é composta por células achatadas até isodiamétricas, em secção longitudinal tangencial, respectivamente, e idioblastos com drusas. Centralmente, encontra-se um amplo canal secretor do tipo lisígeno (Figura 18F).

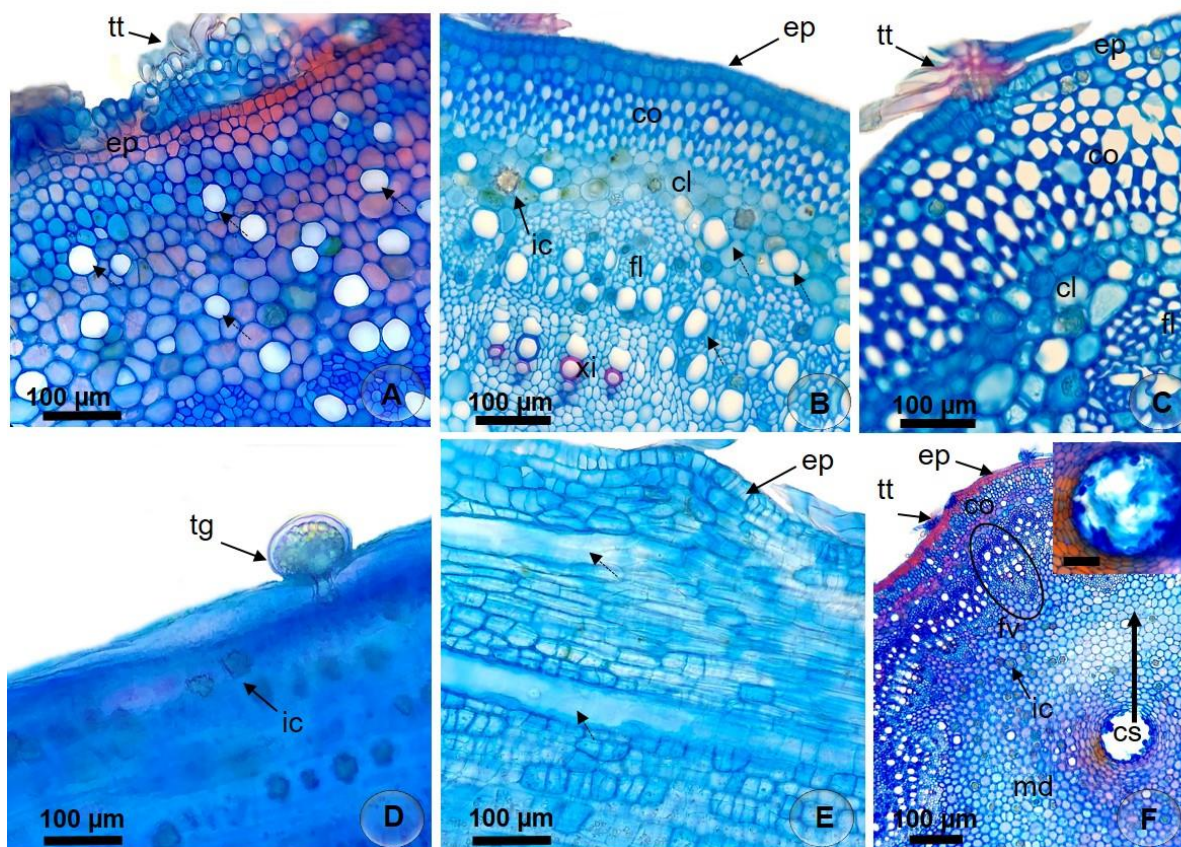


Figura 18. Seções anatômicas de ramos de *Croton floribundus* em MO. Epiderme (ep), colênquima (co) e células do parênquima presentes no primeiro (A), segundo (B) e terceiro nó (C), em secção transversal, contendo idioblastos com drusas (ic) e cloroplastos (cl) (B). Tricoma glandular (tg) pluricelular, em secção longitudinal tangencial (D). Laticíferos articulados não ramificados, em secção longitudinal tangencial (E) (setas pontilhadas). Aspecto geral do córtex, feixes vasculares (fv) do tipo colateral, medula (md) e detalhe do canal secretor (cs) interno (F). floema (fl), xilema (xi), tricoma tector (tt).

A casca caulinar dos ramos maduros apresenta periderme delgada, constituída por 2-3 estratos de células compactadas, semelhante ao observado por Farías et al. (2009) em *C. draco*, mantendo este padrão também na casca caulinar madura. Em *C. floribundus*, as células da periderme possuem conteúdo avermelhado e reagem positivamente com o cloreto férrico, evidenciando a presença de compostos fenólicos (Figura 22A). Na região cortical estão aproximadamente 20 estratos de clorênquima, responsáveis pela coloração esverdeada dos ramos jovens (Figura 17B) e maduros (Figura 17C) e que se mantem no tronco (Figura 17F).

Na casca caulinar madura, a região do parênquima cortical sofre um aumento quanto ao número de células parenquimáticas, sendo dividido em duas regiões. A primeira, subjacente à epiderme, possui cerca de 6-10 estratos de células de diâmetro reduzido e contorno circular, paredes celulósicas delgadas e espaços intercelulares reduzidos, mas com algumas células de aspecto colenquimatoso, quando em secção transversal (Figuras 19A, 19B e 19C). Incluso neste parênquima estão poucos esclereides, isolados ou em grupos cujas pontoações são do tipo simples ou ramificada (Figura 19D).

A segunda região do córtex caracteriza-se pela presença de células parenquimáticas com maior diâmetro, de tamanhos e formatos diversos, em geral quadradas ou retangulares em secção longitudinal radial, formadas por paredes celulósicas mais finas, quando comparadas com as demais células da região parenquimática externa e contando com pouquíssimos espaços intercelulares, quando em secção transversal (Figuras 19A, 19B e 19C), além de conter, em maior número, grupos (6-12 elementos) de fibras gelatinosas calibrosas (de 40 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro), com lamelações abundantes e pontoações simples ou ramificadas (Figuras 19A e 19B). Tais grupos de fibras também foram observadas nas amostras de *C. floribundus* analisadas por Dias-Leme e Angyalossy-Alfonso (1998), estando interrompidos por células parenquimáticas, formando um arco único próximo ao floema.

Na região do câmbio vascular, próxima ao floema, as fibras gelatinosas apresentam camadas internas retraídas (Figuras 20A e 20B), fato também observado em *C. urucurana* por Luchi (2004), pois as lamelas celulósicas (camada 'G') se desprendem das lamelas lignificadas. As fibras gelatinosas estão presentes em muitos gêneros de Euphorbiaceae, como relatado por Mennega (2005), sendo comuns em espécies de *Croton*, e abundantes no xilema secundário de caules jovens de *C. echiioides* (Novello et al., 2012). Nesta porção cortical, também são encontrados idioblastos com drusas (Figura 20C) que reagiram positivamente ao cloral hidratado 60% com ácido sulfúrico 25% (Figura 22C). Tais cristais apresentaram espectro da análise de espectroscopia de energia dispersiva de raio-X com picos de cálcio (20,3%), carbono (27,4%) e oxigênio (41,3%), que confirmam a composição de oxalato de cálcio (Figura 21).

As drusas observadas no parênquima cortical de *C. floribundus* não foram relatadas em *C. echiioides* (Novello et al., 2012). Outros idioblastos com conteúdo denso reagiram positivamente à presença de cloreto férrico (Figura 22A) e Sudan IV glicerinado, confirmando a presença de polifenóis (mais abundante) e substâncias lipídicas, respectivamente, sendo essas mais frequentes nas cascas caulinares mais espessas. Verificou-se que os grupos de esclereides e de fibras são responsáveis pela coloração branca do aspecto marmoreado da casca *in natura*.

Os raios floemáticos são formados por 1-3 (raramente 4) séries de células e em praticamente todas ocorre uma drusa. Nas amostras analisadas, laticíferos não puderam ser diferenciados nos mais diversos planos de corte, e de acordo com Rudall (1994), laticíferos em espécies de *Croton* são menos abundantes em caules mais velhos do que em caules jovens, como observado em *C. comosus* Müll. Arg.

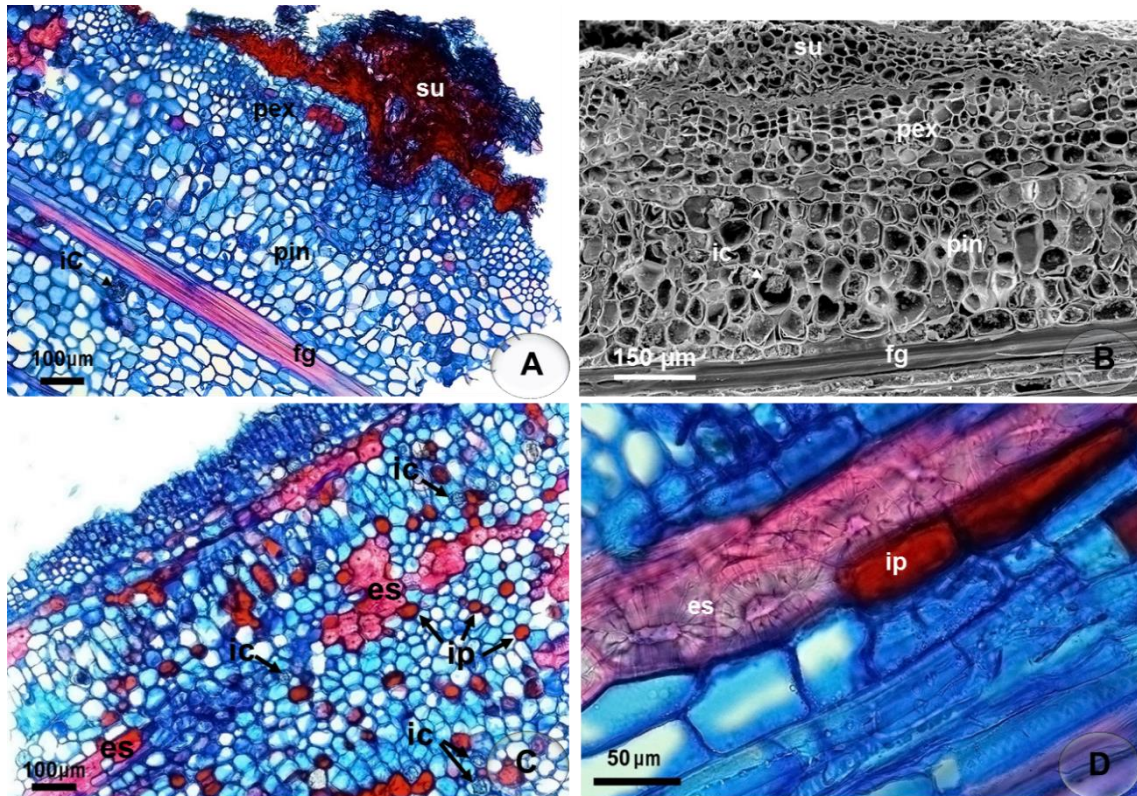


Figura 19. Casca caulinar de *Croton floribundus*. Súber (su), parênquima cortical externo (pex) e interno (pin), idioblasto cristalífero (setas) (ic) e fibra gelatinosa (fg) em secções longitudinais (A e B). Aspecto geral do córtex em secção transversal (C) e detalhe em secção longitudinal (D) de esclereides (es) e idioblastos com polifenóis (ip). A, C e D: em MO; B: em MEV.

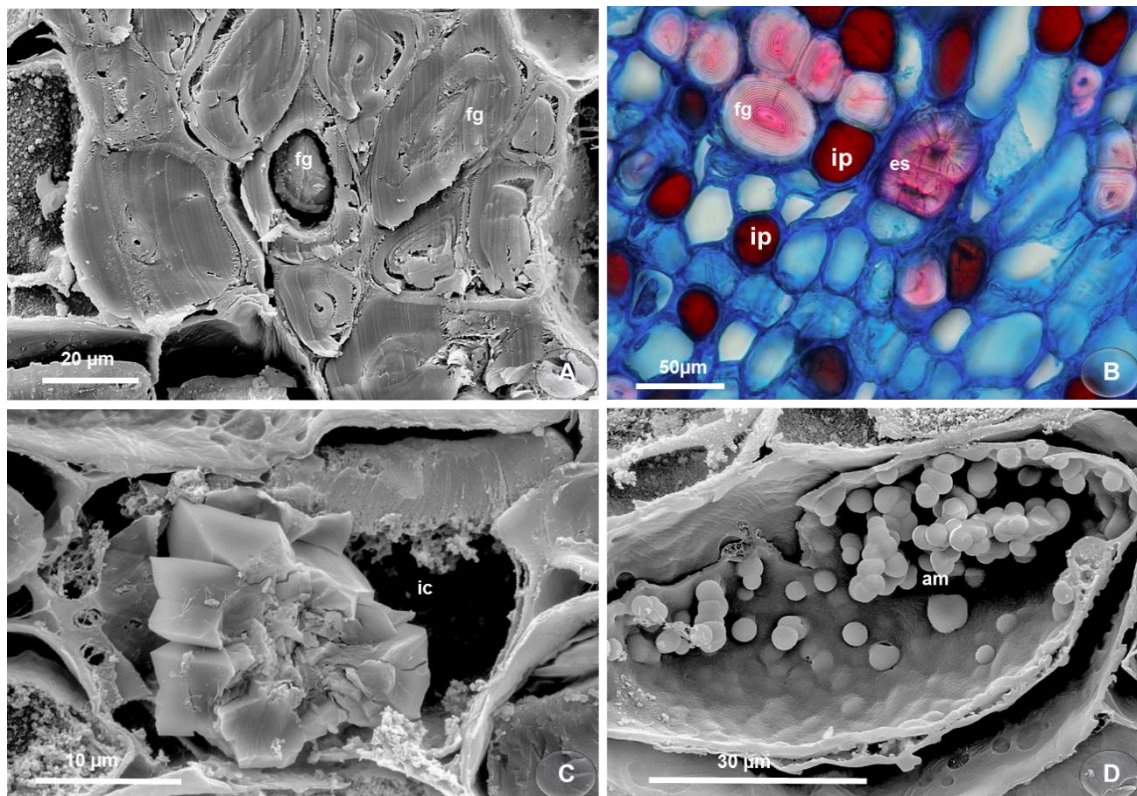


Figura 20. Casca caulinar de *Croton floribundus*. Grupos de fibras gelatinosas (fg) (A) e esclereides (es) (B), em secção transversal. Detalhe do idioblasto cristalífero (ic) (C) e amiloplasto (am) (D). ip: idioblastos com polifenóis. A, C e D: em MEV, B: em MO.

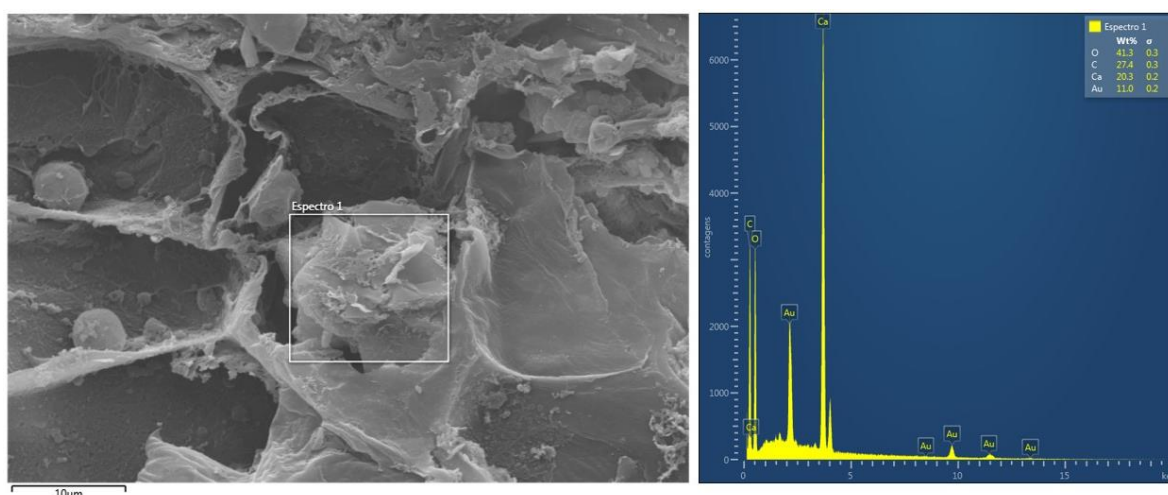


Figura 21. Drusa presente na casca caular de *Croton floribundus* e espectro da análise de espectroscopia de energia dispersiva de raio-x.

Os testes histoquímicos também confirmaram a presença de polifenóis em idioblastos no floema (Figura 22A), amido (Figura 22B) e drusas de oxalato de cálcio (Figura 22C).

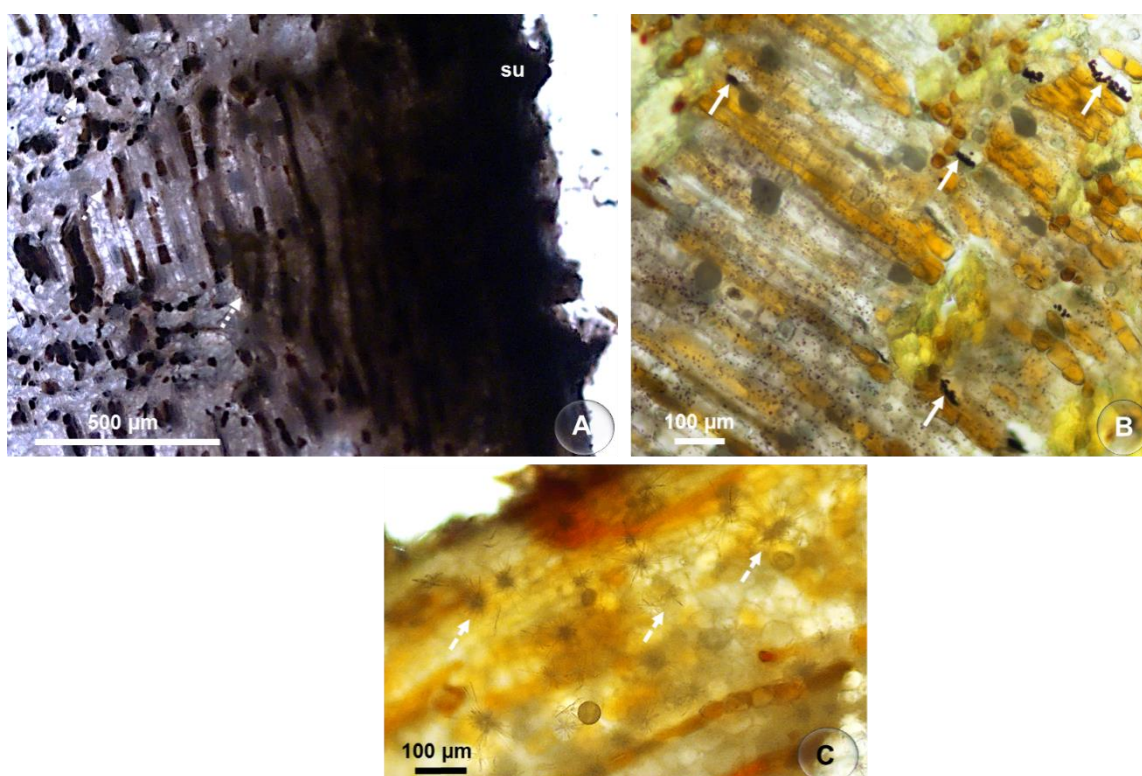


Figura 22. Secções da casca caular de *Croton floribundus* após testes histoquímicos. Reação do súber (su) e idioblastos (setas) ao cloreto férrico (A) (setas pontilhadas). Identificação de amido (setas compactas) ao lugol (B). Reorganização de cristais aciculares de sulfato de cálcio (setas tracejadas) após exposição das drusas de oxalato de cálcio à solução de cloral hidratado com ácido sulfúrico (C).

No parênquima cortical, também estão presentes idioblastos com inclusões finas e esféricas, que não reagiram ao Lugol ou à 2-4-dinitrofenilhidrazina.

A análise do pó de *C. floribundus* mostrou fragmentos contendo fibras calibrosas e com pontoações evidentes (Figura 23A), grupos de esclereides com pontoações simples e ramificadas (Figura 23B), fragmentos de tecido parenquimático com células quadradas e retangulares junto as quais estão grãos de amidos e/ou idioblastos com drusas (Figuras 23C, 23D e 23E).

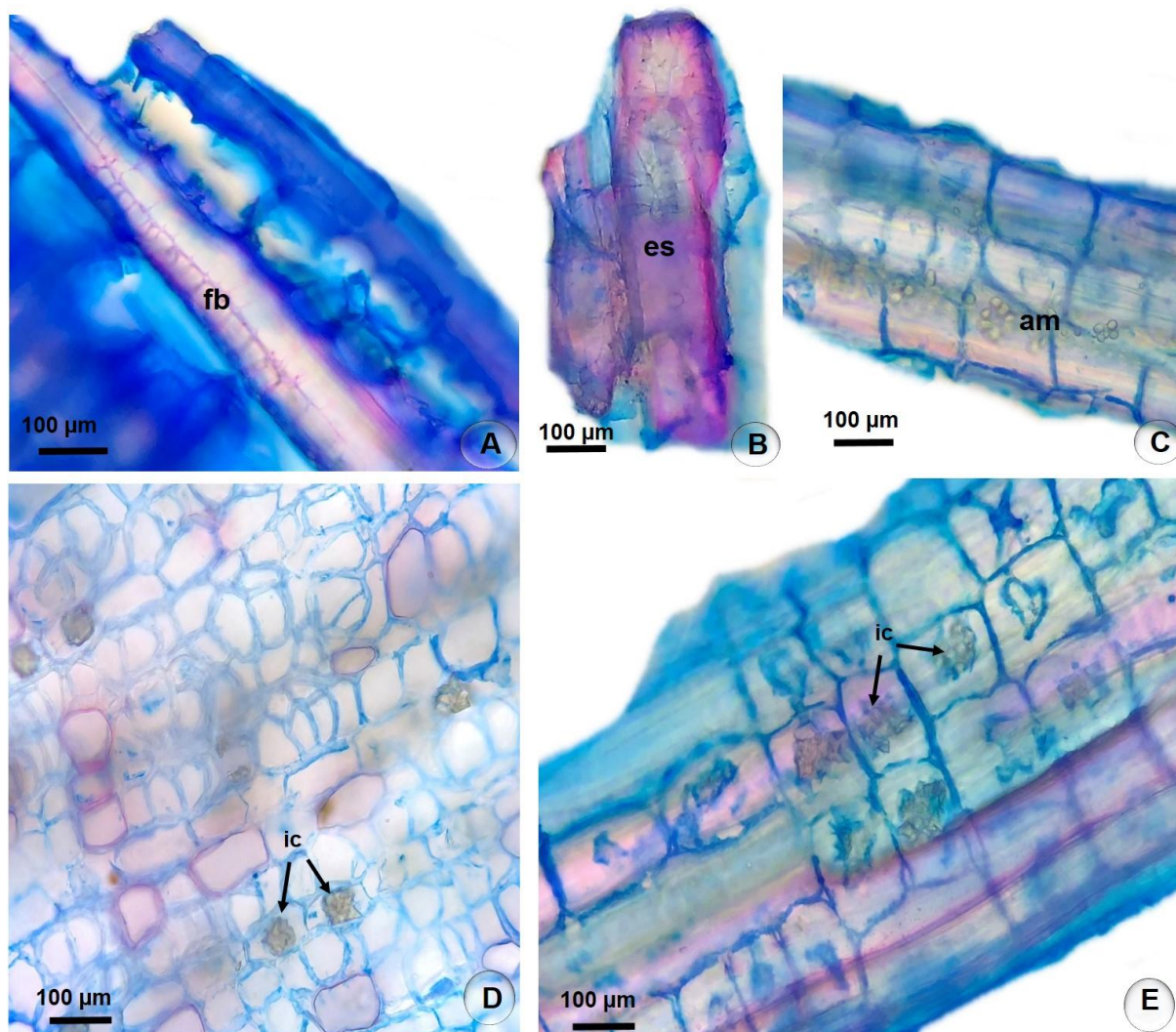


Figura 23. Fragmentos do pó reidratado da casca caulinar de *Croton floribundus* contendo fibra (fb) (A), esclereides (es) (B), grãos de amido (am) (C) ou idioblastos cristalíferos (ic) (D e E).

Com a realização da etapa de secagem, as cascas caulinares de *C. floribundus* passaram a pesar 2,684 kg, ou seja 42,86% do peso inicial de 6,261 kg. Segundo Oliveira et al. (2014), o teor de umidade de cascas frescas está entre 50 e 55% e a secagem tem como objetivo diminuir a quantidade de água, evitando a degradação dos princípios ativos presentes no órgão vegetal, seja pela ação de fungos, bactérias ou enzimas. Além da finalidade de conservação da amostra, o processo de secagem diminui o volume da droga vegetal, facilitando o armazenamento. Após a cominuição da droga vegetal, foram obtidos 2,649 kg de pó, com perda de 1,3% de amostra durante o processo de moagem.

A granulação média do pó das cascas caulinares representa a retenção acumulada de 50%, obtida com a análise granulométrica (Apêndice A). O diâmetro médio das partículas em função da porcentagem de passagem e de retenção acumulada foi de 0,3 mm (figura 24).

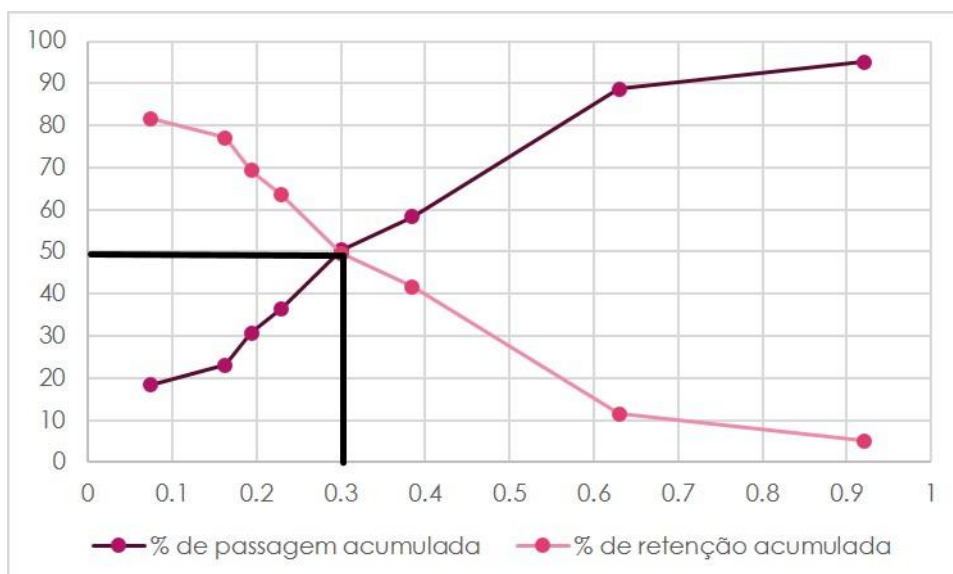


Figura 24. Curva da porcentagem de retenção e de passagem acumulada após análise granulométrica do pó da casca caulinar de *Croton floribundus*.

Foram calculados a massa (g) e os rendimentos (%) de cada EBs em relação a droga vegetal, descontando o teor de umidade residual da amostra (Tabela 7). O extrato com maior rendimento, ou seja, aquele em que o líquido extrator foi capaz de extrair a maior quantidade de sólidos solúveis foi o etanol 70%, com rendimento de 26,90%, seguido pela acetona 70%, com rendimento de 26,44%.

Tabela 7 - Massa e rendimento dos extratos brutos da casca caulinar de *Croton floribundus*.

| Extrato Bruto (EB) | Massa EB (g) | Rendimento do EB (%) |
|--------------------|--------------|----------------------|
| Aquoso             | 4,11         | 22,93                |
| Acetona 70%        | 4,75         | 26,44                |
| Acetato de etila   | 1,25         | 6,99                 |
| Diclorometano      | 0,87         | 4,80                 |
| Etanol 50%         | 4,08         | 22,35                |
| Etanol 70%         | 4,85         | 26,90                |
| Etanol 95%         | 3,16         | 17,41                |
| Metanol            | 4,36         | 24,29                |
| Metanol 50%        | 3,36         | 18,80                |

A casca caulinar de *C. floribundus* não apresentou material considerado estranho. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010) são considerados elementos estranhos partes do organismo que a droga vegetal deriva, exceto aqueles incluídos na descrição da

droga e quando estão acima do limite especificado em monografia. Caso este limite não esteja definido, a porcentagem de material estranho não deve ser maior que 2% (m/m). Também são considerados materiais estranhos, quaisquer organismos que não estejam especificados na descrição farmacopeica da droga vegetal e as impurezas de natureza mineral ou orgânica, não-inerentes da droga.

A Tabela 8 contém os teores de umidade, cinzas totais e de extrativos presentes na casca caulinar de *C. floribundus*. O teor de umidade está dentro do valor recomendado de 8 a 14% (m/m) (OLIVEIRA et al., 2014). O teor de umidade é a porcentagem de umidade residual que permanece na droga vegetal após a realização da etapa de secagem e deve estar dentro do valor recomendado, pois o excesso de água favorece o crescimento de micro-organismos, como fungos e bactérias, além de servir como meio reacional, deteriorando o material vegetal pela ocorrência de reações de hidrólise (OLIVEIRA et al., 2014).

A análise do teor de cinzas totais, permitiu quantificar a presença de impurezas inorgânicas não voláteis de origem fisiológica presentes na amostra, como carbonatos, cloretos e óxidos, quanto de origem não fisiológica, incluindo areia, terra e pedra. A quantificação do teor de cinzas totais é possível, pois, a amostra calcinada tem todo o material orgânico convertido em gás carbônico, restando somente o conteúdo inorgânico na forma de cinzas (FARIAS; SOARES, 2017). O alto teor de cinzas pode estar relacionado com a estrutura complexa do tecido caulinar de *C. floribundus*, como a presença de células ricas em inclusões e cristais, descartando-se a presença de impurezas inorgânicas de origem não fisiológica, devido a ausência de material estranho na amostra analisada. Já o teor de extrativos apresentou um rendimento bem abaixo do obtido pelo método de turbólise, o que pode ser explicado pela maior eficiência deste método de extração, quando comparado com o método de decocção.

Tabela 8 - Teor de cinzas totais, umidade e de extrativos da casca caulinar de *Croton floribundus*.

| Cinzas (%)      | Teor de umidade (%) | Teor de extrativos (%) |
|-----------------|---------------------|------------------------|
| ±DP(CV%)        | ±DP(CV%)            | ±DP(CV%)               |
| 3,97±0,19(4,78) | 10,32±0,27(2,69)    | 9,61±0,01(0,16)        |

CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão.

Os resultados das capacidades antioxidantes expressos em CE<sub>50</sub> (concentração efetiva de extrato bruto necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH em µg/mL) dos nove extratos brutos de *C. floribundus* são mostrados na Figura 25 e Apêndice B. No método de captura do radical livre DPPH, a porcentagem de atividade antioxidante corresponde a quantidade de DPPH• consumida. Quanto maior o consumo de DPPH• pela amostra, maior a capacidade antioxidante, dessa forma, mais DPPH-H será formado e menor será o valor da absorvância (NASCIMENTO et al., 2011).

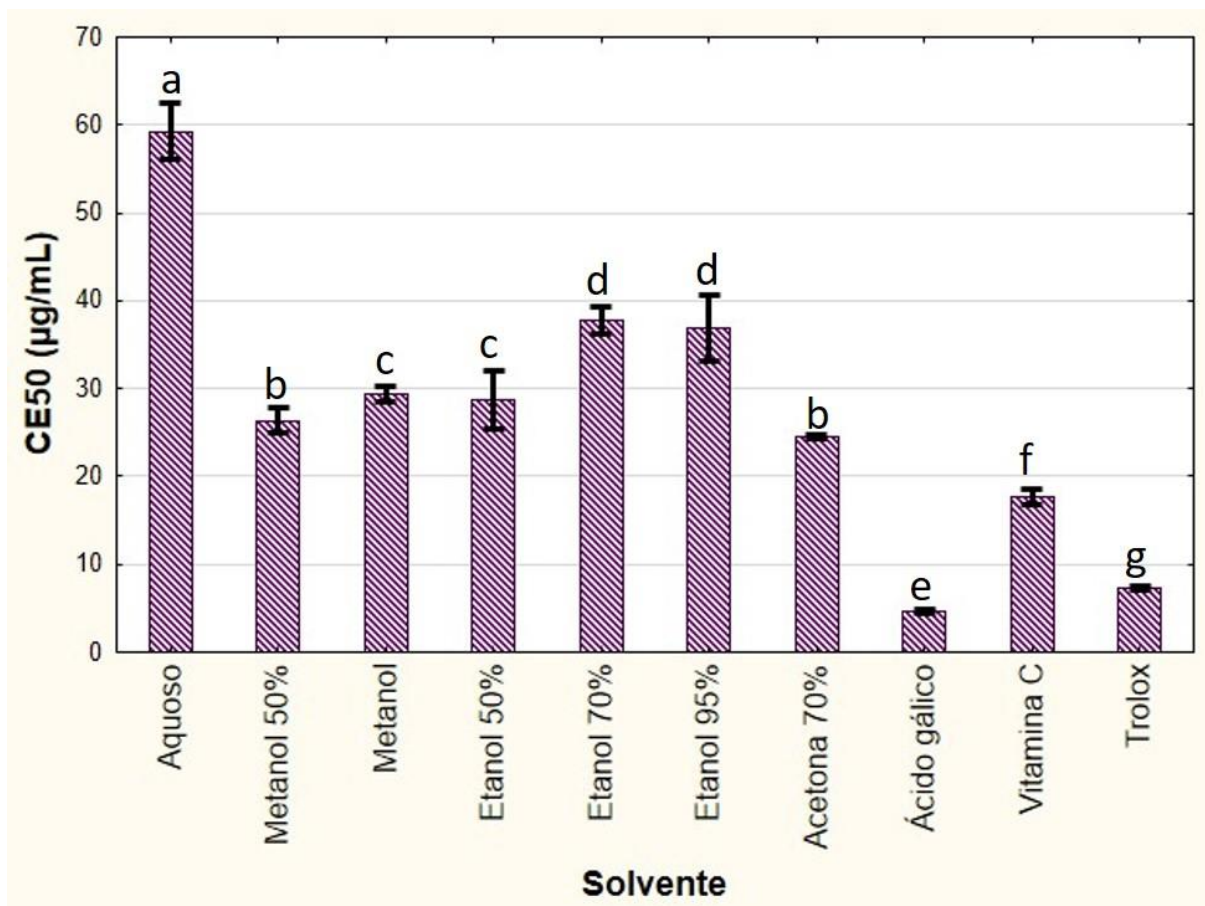


Figura 25. Capacidade antioxidante dos extratos da casca caulinar de *Croton floribundus*. <sup>a-g</sup>Letras diferentes representam diferenças significativas entre os valores da capacidade antioxidante de cada extrato e dos padrões (Anova unifatorial e teste Tukey,  $p < 0.05$ ). Não foi possível determinar o CE<sub>50</sub> do EB de acetato de etila e diclometano nas concentrações testadas.

Os radicais livres são substâncias altamente reativas, resultantes de reações de oxidação e redução, apresentando um elétron desemparelhado em sua configuração eletrônica. A maioria dos agentes reativos patogênicos são derivados do metabolismo do oxigênio e são denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), além disso, são considerados produtos do metabolismo celular, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). O excesso de EROs pode danificar lipídios celulares, proteínas ou DNA, prejudicando suas funções normais e favorecendo a perda da homeostasia. O estresse oxidativo está envolvido no desencadeamento de várias doenças humanas, incluindo câncer, diabetes *Mellitus*, doenças inflamatórias, distúrbios neurodegenerativos, assim como no processo de envelhecimento. Os mecanismos de defesa que atuam contra o estresse oxidativo envolve a prevenção e reparação, defesas físicas e ação de antioxidantes. As defesas antioxidantes de origem endógena incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), enquanto que, tem-se como exemplo de antioxidantes não enzimáticos o ácido ascórbico (Vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E),

glutathiona, carotenoides, flavonoides, pigmentos naturais, entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PEREIRA; CARDOSO, 2012; VALKO et al., 2007).

Dentro deste contexto estão os compostos fenólicos, substâncias que apresentam grande diversidade estrutural, possuindo ao menos um anel aromático com, no mínimo, um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila, considerados antioxidantes de ocorrência natural e originados pelas vias biossintéticas do ácido chiquímico e acetil-coenzima A. Fazem parte desta classe de metabólitos secundários os fenóis simples, ácidos fenólicos, como os derivados dos ácidos benzoico e cinâmico, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). A atividade antioxidante de compostos fenólicos está relacionada com as suas propriedades de oxirredução, desempenhando um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Segundo Alves et al. (2007) quanto maior o número de hidroxilas presentes em um composto, maior a sua atividade antioxidante. Os taninos, por exemplo, são substâncias que possuem alta concentração de grupos hidroxilas orto-orientados, característica que provavelmente está relacionada com as suas propriedades biológicas, como a de conseguirem estabilizar radicais livres, interceptando o oxigênio ativo e originando radicais estáveis (HASLAM, 1974; SANTOS; MELLO, 2004). Além disso, a capacidade antioxidante dos polifenóis está relacionada com a propriedade redox destes compostos, agindo como agentes redutores ou doadores de átomos de hidrogênio. Tal propriedade pode ser demonstrada pelo efeito destes compostos frente ao radical DPPH, que serve como substância modelo de radicais lipídicos ou radicais peróxido lipídicos (RESENDE et al., 2011).

A concentração dos EBs testados necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH,  $CE_{50}$  (Figura 25 e Apêndice B), variou de  $24,51 \pm 0,11$   $\mu\text{g/mL}$  a  $59,24 \pm 1,31$   $\mu\text{g/mL}$ , mostrando que dos nove extratos avaliados, sete apresentaram uma certa capacidade antioxidante, apesar dos valores de  $CE_{50}$  dos EBs serem maiores que os obtidos para os padrões Trolox, ácido gálico e vitamina C. Os valores da capacidade antioxidante dos extratos de acetona 70% e metanol 50%; etanol 50% e metanol; etanol 70% e etanol 95%, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Dentre os extratos analisados, acetona 70% e metanol 50% foram os que apresentaram melhor capacidade antioxidante, com menores valores de  $CE_{50}$ ,  $24,51 \pm 0,11$   $\mu\text{g/mL}$  e  $26,32 \pm 0,59$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Enquanto que os extratos de acetato de etila e diclorometano foram os menos ativos, com  $CE_{50}$  não detectado nas concentrações testadas.

As cascas caulinares de *C. floribundus* apresentaram um teor de polifenóis totais de  $6,33\% \pm 0,02$  (CV%0,39). Face a capacidade antioxidante de extratos vegetais estar relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos, determinou-se o teor de polifenóis totais da casca caulinar de *C. floribundus*. Neste método, utilizou-se o reagente de Folin-Ciocalteu,

que consiste na mistura de sais de molibdato de sódio e tungstato de sódio, também denominado de reagente fosfomolibdotúngstico. Em pH alcalino, o grupo fenólico está na forma de fenolato, dessa forma, os íons molibdato e tungstato serão reduzidos, produzindo coloração azulada. Quanto maior a quantidade de hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis, mais intensa será a cor azul, e consequentemente, maior será o teor de polifenóis totais (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013). Pelo fato do método de Folin-Ciocalteu medir todas as hidroxilas fenólicas livres é considerado um dos métodos mais utilizados na quantificação de fenóis solúveis (MELLO; SANTOS, 2017).

Para avaliar o melhor solvente extrator, além da determinação da capacidade antioxidante, também foi realizado a análise do teor de resíduo seco de cada extrato bruto. Os valores do teor de resíduo seco dos nove EBs são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Teor de resíduo seco dos extratos brutos da casca caulinar de *Croton floribundus*.

| Extrato bruto (EB) | Resíduo seco (g RS/ g DV)±DP |
|--------------------|------------------------------|
| Acetato de Etila   | 0,07±0.01 <sup>a</sup>       |
| Acetona 70% (v/v)  | 0,30±0.01 <sup>b</sup>       |
| Aquoso             | 0,10±0.01 <sup>c</sup>       |
| Diclorometano      | 0,08±0.01 <sup>a,c</sup>     |
| Etanol 50% (v/v)   | 0,17±0.01 <sup>d</sup>       |
| Etanol 70% (v/v)   | 0,18±0.01 <sup>d</sup>       |
| Etanol 95% (v/v)   | 0,09±0.01 <sup>a,c</sup>     |
| Metanol 50% (v/v)  | 0,17±0.01 <sup>d</sup>       |
| Metanol            | 0,18±0.00 <sup>d</sup>       |

DV: droga vegetal; DP: desvio padrão; RS: resíduo seco; <sup>a-d</sup>Letras diferentes representam diferenças significativas entre os valores de resíduo seco de cada extrato bruto (Anova unifatorial e teste Tukey,  $p < 0.05$ ).

Os teores de resíduo seco dos EBs de *C. floribundus* variaram de 0,07±0,01 a 0,30±0,01 g RS/g DV. Os valores de RS dos extratos de acetato de etila, diclorometano e etanol 95%; aquoso, diclorometano e etanol 95%; etanol 50%, etanol 70%, metanol e metanol 50%, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. O extrato que apresentou o maior teor de resíduo seco por grama de droga vegetal foi acetona 70% (0,30±0,01), apresentando teor de resíduo seco com diferença estatística significativa em relação aos demais solventes ( $p < 0,05$ ). Ao levar em consideração os dados obtidos das análises de capacidade antioxidante e do teor de resíduo seco, pode-se determinar que acetona 70% foi o melhor solvente utilizado no preparo do extrato bruto da casca caulinar de *C. floribundus*. Para o preparo dos extratos, optou-se pelo processo de extração por turbulização, pelo fato deste ser um método simples, rápido e versátil, permitindo extrair as substâncias de interesse com simultânea diminuição do tamanho das partículas (REGINATTO, 2017).

As análises qualitativas dos compostos químicos presentes na casca caulinar de *C. floribundus* indicaram a presença de metabólitos secundários da classe dos taninos

condensados, glicosídeos saponínicos e lactonas sesquiterpênicas, sendo negativa para os metabólitos do grupo dos alcaloides, flavonoides, antracênicos, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas e fenólicos simples (Tabela 10). Os taninos condensados são substâncias comumente encontradas em plantas lenhosas e extraídos com a mistura de acetona/água, de 50 a 80% (MELLO; SANTOS, 2017), o que possivelmente explica os bons resultados obtidos na determinação do teor de polifenóis totais e na capacidade antioxidante do extrato bruto de acetona 70% da casca caulinar de *C. floribundus*.

Devido a presença de glicosídeos saponínicos, a afrogenicidade foi determinada, tendo as cascas caulinares de *C. floribundus* apresentado índice de espuma igual a 200. Outros trabalhos realizados com *C. floribundus*, relataram a presença de compostos fenólicos, terpenos, alcaloides (SILVA, 2006) e diterpenos (UCHOA, 2011). Estas diferenças podem ocorrer pelo fato dos metabólitos secundários serem formados durante fases específicas do desenvolvimento das plantas (KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2017), além de terem a síntese influenciada por condições ambientais, como sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A triagem fitoquímica das cascas caulinares de outras espécies do gênero *Croton*, apresentaram metabólitos do grupo dos alcaloides, triterpenos e flavonoides como em *C. rhamnifolioides* Pax & K.Hoffm. e esteroides em *C. rhamnifolius* Willd. (RANDAU et al., 2004).

Tabela 10 - Reações químicas de caracterização dos metabólitos secundários presentes na casca caular de *Croton floribundus*.

| Metabólitos secundários          | Planta padrão                                                     | Reações químicas                                     | Resultado                     |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Antraquinonas</b>             | Cáscara sagrada<br>( <i>Rhamnus purshiana</i> DC.)                | Antraquinonas livres:                                |                               |
|                                  |                                                                   | O-heterosídeos                                       | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | C-heterosídeos                                       | Negativo                      |
| <b>Alcaloides</b>                | Catuaba<br>( <i>Trichilia catigua</i> Adr. Juss.)                 | Reação de Bornträger                                 | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação de Mayer                                      | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação de Dragendorff                                | Negativo                      |
| <b>Cumarinas</b>                 | Folhas de Guaco<br>( <i>Mikania glomerata</i> Spreng.)            | Reação de Wagner                                     | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Caracterização das cumarinas                         | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Identificação do sublimado:                          |                               |
| <b>Flavonoides</b>               | Carqueja<br>( <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.)               | Nitrato de prata                                     | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Cloreto férrico                                      | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação de Taubouk                                    | Negativo                      |
| <b>Glicosídeos cardiotônicos</b> | Espirradeira<br>( <i>Nerium oleander</i> L.)                      | Reação de Shinoda                                    | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação com cloreto de alumínio                       | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Pesquisa de açúcares liberados após hidrólise ácida  | Negativo                      |
| <b>Glicosídeos saponínicos</b>   | Carqueja<br>( <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.)               | Reação de Kedde                                      | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação de Baljet                                     | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação de Salkowsky                                  | Negativo                      |
| <b>Lactonas sesquiterpênicas</b> | Carqueja<br>( <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.)               | Reação de Liebermann-Burchard                        | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação de Keller-Kilani                              | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Teste qualitativo de espuma                          | <b>Positivo</b>               |
| <b>Metil-xantinas</b>            | Erva mate<br>( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill.)              | Reação de identificação de lactonas sesquiterpênicas | <b>Positivo</b>               |
|                                  |                                                                   | Reação da murexida                                   | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Precipitação com gelatina                            | <b>Positivo</b>               |
| <b>Taninos</b>                   | Espinheira santa<br>( <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.) | Reação com cloreto férrico                           | <b>Positivo</b><br>(azul)     |
|                                  |                                                                   | Reação com vanilina clorídrica                       | <b>Positivo</b><br>(vermelha) |
|                                  |                                                                   | Reação com acetato de chumbo                         | <b>Positivo</b>               |
| <b>Substâncias Iridoidais</b>    | Guarra do diabo<br>( <i>Harpagophytum procumbens</i> DC.)         | Reação de Stiasny:                                   |                               |
|                                  |                                                                   | Taninos condensados                                  | <b>Positivo</b>               |
|                                  |                                                                   | Taninos hidrolisáveis                                | Negativo                      |
| <b>Substâncias Iridoidais</b>    | Guarra do diabo<br>( <i>Harpagophytum procumbens</i> DC.)         | Reação com cristais de floroglucinol                 | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação com ácido sulfúrico                           | Negativo                      |
|                                  |                                                                   | Reação com cristais de vanilina                      | Negativo                      |

Segundo Mello e Santos (2017), os taninos são definidos como compostos fenólicos que apresentam solubilidade em água, com massa molecular entre 500 e 3.000 *u* e que possuem a capacidade de formar complexos insolúveis em água na presença de alcaloides, metais pesados, gelatina e outras proteínas, sendo responsáveis pela adstringência de frutos. Os taninos podem ser classificados, segundo sua estrutura química em taninos hidrolisáveis e taninos condensados, também denominado de proantocianidinas. Os taninos condensados são formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.

Diversas são as atividades farmacológicas descritas na literatura para a classe dos taninos, como as propriedades antimicrobianas e antivirais, antitumoral, diabetes *Mellitus*, doenças cardiovasculares, reumatismo, problemas estomacais, como gastrite e úlcera gástrica, problemas renais e anti-inflamatório (MELLO; SANTOS, 2017; SERRANO et al., 2009). Acredita-se que as propriedades biológicas dos taninos estão relacionadas com as características que este grupo de substâncias possuem em se complexarem com íons metálicos, como ferro, cobre, cálcio, alumínio, entre outros; atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de se complexar com outras moléculas, como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 2007).

As saponinas, outra classe de metabólitos secundários presentes na casca caulinar de *C. floribundus*, são consideradas glicosídeos de esteroides ou terpenos policíclicos, comuns no reino vegetal e que apresentam a capacidade de formar espuma persistente em solução aquosa. Isso ocorre, pelo fato das saponinas possuírem caráter anfifílico, devido a presença em sua estrutura de uma parte lipofílica, também denominada de aglicona (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares), diminuindo a tensão superficial da água, apresentando ação detergente e emulsificante. Algumas das propriedades biológicas das saponinas incluem a ação hipocolesterolemiantes, anti-inflamatória, antiedematogênica, antiviral e antitumoral, como a saponina triterpênica platycodina D, extraída das raízes de *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A.D.C., substância que apresentou a capacidade de indução apoptótica, autofagia e inibição da angiogênese em diferentes tipos de tumores (ATHAYDE et al., 2017; KHAN et al., 2016).

Os diferentes EBs de *C. floribundus* foram avaliados quanto a citotoxicidade e os valores de  $CI_{50}$  foram determinados (Tabela 11). Para a linhagem RWPE1 foi possível determinar o  $CI_{50}$  dos EBs aquoso, MeOH 50% e acetona 70%, aumentando a maior concentração testada para 200  $\mu\text{g/mL}$ . Utilizando os valores de  $CI_{50}$  expressos na Tabela 11, foi determinado o IS de cada extrato bruto (Tabela 12), indicando a seletividade dos EBs entre a linhagem neoplásica e a normal.

Tabela 11 – Citotoxicidade dos extratos brutos da casca caulinar de *Croton floribundus*.

| Extrato Bruto    | CI <sub>50</sub> RWPE-1<br>(µg/mL)±DP | CI <sub>50</sub> PC-3<br>(µg/mL)±DP | CI <sub>50</sub> LNCaP<br>(µg/mL)±DP |
|------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Aquoso           | 111,55±16,33                          | 97,17±4,00                          | 25,70±3,79                           |
| MeOH 50%         | 109,00±15,59                          | 49,02±0,76                          | 25,50±2,46                           |
| MeOH             | 50,07±8,59                            | 28,94±4,31                          | 18,60±1,72                           |
| EtOH 50%         | 61,57±7,02                            | 49,36±6,51                          | 26,20±3,23                           |
| EtOH 70%         | 48,71±10,90                           | 23,57±1,48                          | 37,60±2,29                           |
| EtOH 95%         | 56,82±2,62                            | 28,09±3,44                          | 44,80±4,24                           |
| Acetona 70%      | 132,43±3,43                           | 42,11±6,32                          | 21,50±2,99                           |
| Acetato de etila | 6,99±0,69                             | 6,59±0,88                           | 17,90±0,48                           |
| Diclorometano    | 6,34±0,71                             | 6,22±0,42                           | 4,50±0,57                            |

CI<sub>50</sub>: concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular; DP: desvio padrão.

Tabela 12 – Índice de seletividade dos extratos brutos da casca caulinar de *Croton floribundus*.

| Extrato Bruto    | IS PC-3 | IS LNCaP |
|------------------|---------|----------|
| Aquoso           | 1,15    | 4,34     |
| MeOH 50%         | 2,22    | 4,27     |
| MeOH             | 1,73    | 2,69     |
| EtOH 50%         | 1,25    | 2,35     |
| EtOH 70%         | 2,07    | 1,30     |
| EtOH 95%         | 2,02    | 1,27     |
| Acetona 70%      | 3,20    | 6,27     |
| Acetato de etila | 1,06    | 0,39     |
| Diclorometano    | 1,02    | 1,42     |

IS: índice de seletividade.

O extrato bruto acetona 70% foi três vezes mais ativo para a linhagem neoplásica PC-3 (IS 3,20) e seis vezes mais ativo para a linhagem neoplásica LNCaP (IS 6,27) do que para a linhagem normal RWPE-1, sendo considerado o mais ativo em relação aos demais tratamentos. Este aumento de seletividade pode estar relacionado com o fato da linhagem LNCaP ter crescimento modulado ao hormônio di-hidrotestosterona e a possibilidade de algum componente presente no extrato bruto acetona 70% apresentar estrutura química semelhante a este hormônio, como o fitoesterol, 3-O-β-glicopiranosil sitosterol, isolado da casca caulinar de *C. floribundus* por Peixoto (2007). Além disso, o extrato bruto acetona 70% pode ser considerado promissor para a linhagem neoplásica LNCaP, pois possui CI<sub>50</sub> <30 µg/mL (CI<sub>50</sub> = 21,50 µg/mL) e IS >2 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). O DMSO na concentração máxima utilizada (0,5%), não interferiu no crescimento celular.

Estudos demonstram que existe correlação da lipofilicidade de um composto com a atividade citotóxica (BAGULEY; HICKS, WILSON, 2002), o que explica os baixos valores de  $CI_{50}$  dos extratos preparados com os solventes menos polares: diclorometano e acetato de etila. Isso ocorre, pois, as substâncias lipofílicas possuem a capacidade de atravessarem a membrana plasmática por difusão passiva e se ligarem rapidamente ao seu sítio ativo (BAGULEY; HICKS, WILSON., 2002). Apesar dos valores de  $CI_{50}$  dos extratos brutos diclorometano e acetato de etila serem interessantes, ambos não apresentaram bons IS.

Na literatura é relatada a atividade antitumoral de muitas espécies de *Croton* (XU; LIU; LIANG, 2018), como para o extrato bruto das folhas e do composto isolado, julocrotina, de *Croton membranaceus* Müll. Arg., que inibiu a atividade da enzima  $5\alpha$ -redutase (ABOAGYE et al., 2000); do diterpeno furano-clerodano, crotomembranafurano, isolado da raiz desta mesma espécie e, apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer de próstata humano (PC-3), com  $CI_{50}$  de 4,1  $\mu\text{g/mL}$  (BAYOR et al., 2008); do composto escopoletina, isolado de *C. membranaceus*, que inibiu a proliferação celular da linhagem PC-3 por induzir apoptose, justificando o uso popular desta espécie para o tratamento do câncer de próstata e do extrato metanólico obtido das folhas de *Croton erythroxyloides* Croizat, que demonstrou atividade antiproliferativa e alta seletividade para a linhagem PC-3 (SAVIETTO et al., 2013). Em adição, Vivas et al. (2013), avaliaram os efeitos citotóxicos de duas substâncias isoladas de *Croton micans* Sw. e a interação destas moléculas com medicamentos anticancerígenos. Os resultados destes pesquisadores colaboram com a hipótese de que produtos naturais utilizados em combinação com agentes quimioterápicos reduzem a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelas células tumorais, minimizando o efeito citotóxico e aumentando a eficácia (VIVAS et al., 2013).

Na tentativa de realizar a caracterização química do extrato com melhor capacidade antiproliferativa, EB acetona 70%, recorreu-se a análise de perfil cromatográfico e espectroscópico. Para ter uma ideia sobre o comportamento da amostra e desenvolver o método analítico por CLAE, foram utilizados diferentes sistemas isocráticos de água ultrapura:acetonitrila, acidificado com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). Iniciou-se com a proporção de 95:5 (v/v) de água ultrapura:acetonitrila acidificada, utilizando coluna C18, tempo de corrida de 30 min, EB na concentração de 0,5 e 1 mg/mL, vazão de 0,5 mL/min e detecção em 210, 280 e 330 nm. Em seguida, para cada condição testada, variou-se a concentração de acetonitrila de 5 em 5%, até atingir a proporção de 50:50 (v/v) de água ultrapura:acetonitrila.

Dos dez métodos analisados, a condição que apresentou melhor resolução, foi o sistema isocrático de água ultrapura:acetonitrila acidificado com 0,05% de TFA (90:10, v/v) (Figura 26). O modo isocrático como condição de eluição é útil na avaliação de matrizes

contendo substâncias com pequenos tempos de retenção, permitindo uma rápida análise dos marcadores químicos (PEREIRA; BELTRAME, 2015).

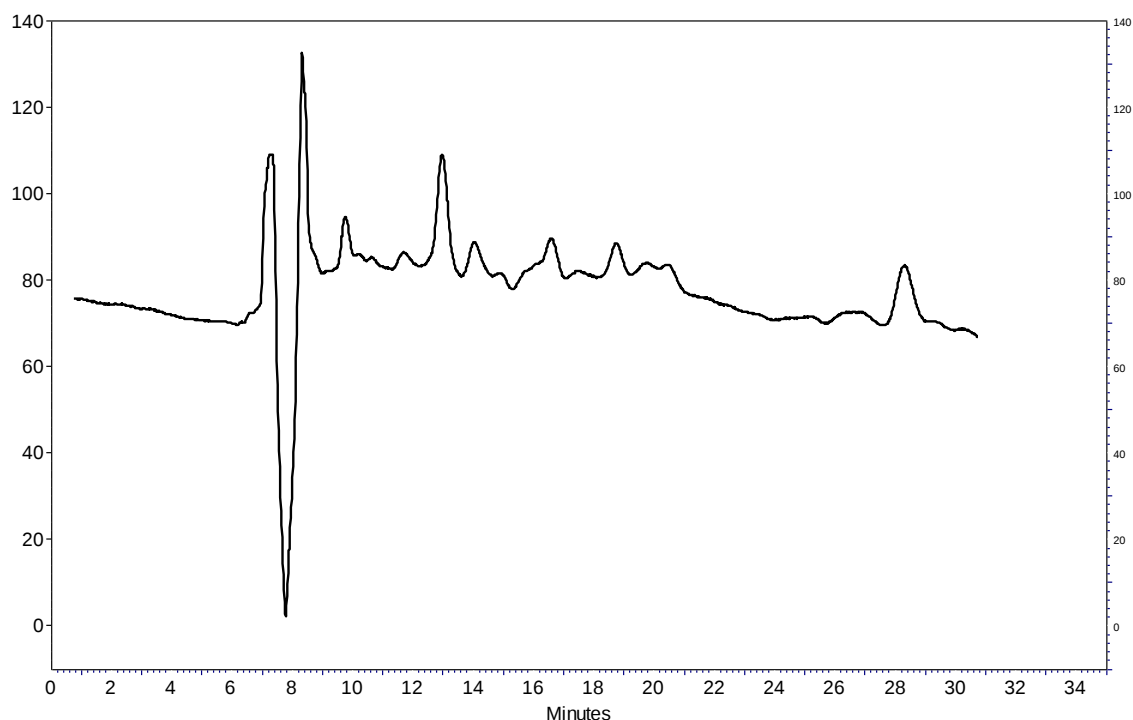


Figura 26. Perfil cromatográfico do extrato bruto acetona 70% de *Croton floribundus*, 1 mg/ml, 210 nm.

Para a realização da análise de cromatografia líquida de ultraperformance acoplada com espectroscopia de massas (UPLC/EM) foi necessário substituir o TFA por ácido fórmico 0,05%, favorecendo a protonação do analito (Figura 27).

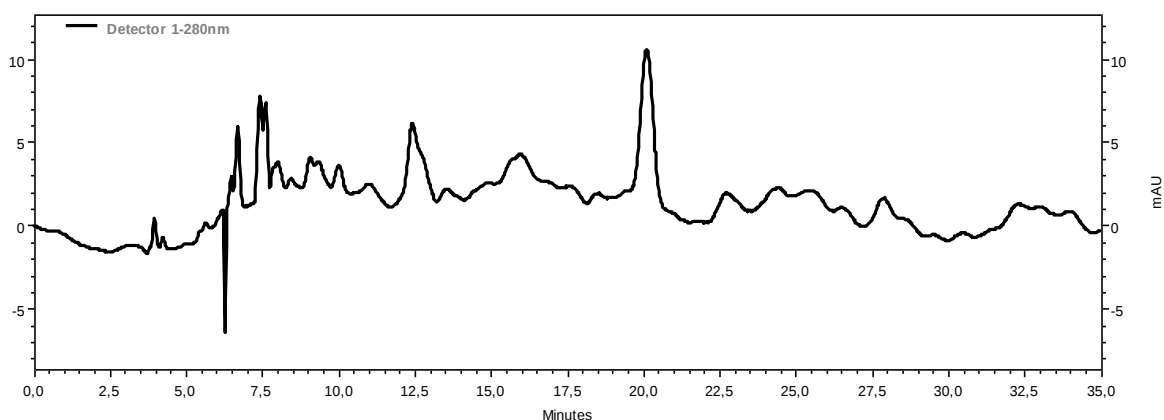


Figura 27. Perfil cromatográfico do extrato bruto acetona 70% de *Croton floribundus*, 1 mg/mL, 280 nm.

A caracterização e identificação dos compostos presentes no extrato bruto acetona 70% foi realizada por meio da interpretação dos dados de massa molecular, fórmula molecular, perfil de fragmentação e comparação com dados da literatura de moléculas isoladas de espécies de *Croton*.

A análise do extrato bruto acetona 70% por UPLC/EM no modo positivo originou o cromatograma apresentado na figura 28. A tabela 13 apresenta o tempo de retenção dos picos, valores de  $m/z$  do íon no modo positivo e os fragmentos dos compostos sugeridos.

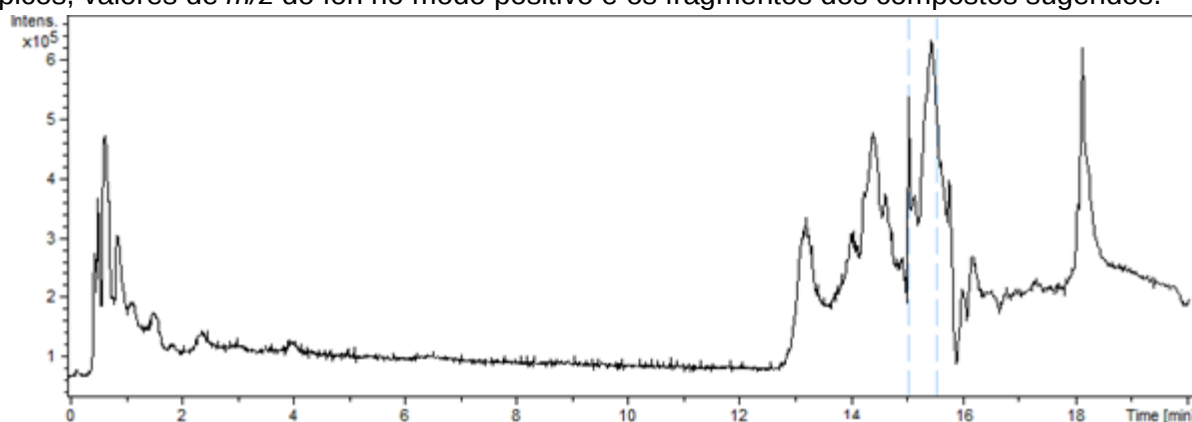


Figura 28. Cromatograma do extrato bruto acetona 70% de *Croton floribundus*, obtido por análise UPLC/EM, modo positivo.

Tabela 13 - Compostos identificados no extrato bruto acetona 70% de *Croton floribundus*, sugeridos por espectrometria de massas.

| Pico | TR     | Composto                                                                  | FM                                              | Modo Positivo                   |                        |
|------|--------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
|      |        |                                                                           |                                                 | [M+H] <sup>+</sup><br>( $m/z$ ) | EM/EM                  |
| 1    | 0,622  | 4-β-D-glicopiranosilo-9-hidroxi-7H-Furo [3,2-g][1]benzopiran-7-ona        | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub> | 381,0833                        | --                     |
| 2    | 0,633  | 3-etil-3'metil-4,4',5,5',6,6'hexahidroxi-[1,1'-bifenil]-3,3'dicarboxilato | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub> | 381,0818                        | --                     |
| 3    | 14,242 | Nootkatone                                                                | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O               | 219,1740                        | 177, 161, 147, 135, 81 |
| 4    | 14,304 | NI                                                                        | C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO              | 280,2625                        | --                     |
| 5    | 14,326 | Diterpeno                                                                 | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>  | 301,2172                        | --                     |
| 6    | 14,349 | Diterpeno                                                                 | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>  | 317,2127                        | --                     |
| 7    | 14,479 | Diterpeno                                                                 | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O               | 285,2217                        | --                     |
| 8    | 14,603 | δ-Cadineno                                                                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                 | 205,1942                        | --                     |
| 9    | 14,814 | Diterpeno                                                                 | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O               | 287,2375                        | --                     |

NI: não identificado.

O óleo essencial de espécies de *Croton* é rico em fenilpropanoides, monoterpênos e sesquiterpênos. A substância nootkatone, sugerida pela análise de UPLC/EM no extrato acetona 70% de *C. floribundus*, é um sesquiterpeno e já foi descrito no óleo essencial das espécies *Croton malambo* H. Karst. e *Croton cuneatus* Clotzsch (SUÁREZ et al., 2005). Outra

substância sugerida é o  $\delta$ -Cadineno, composto químico encontrado no óleo essencial das partes aéreas de *Croton bonplandianus* Baill. (JOSHI, 2014).

Investigações fitoquímicas de espécies de *Croton*, revelaram a predominância de metabólitos secundários da classe dos terpenos, incluindo diterpenos do tipo caurano (XU; LIU; LIANG, 2018). Segundo Souza (2014), o ácido caurenoico possui ocorrência natural em duas formas isoméricas, ácido *ent*-caur-16-en-19-oico e ácido *ent*-caur-16-en-18-oico, este último, isolado de *Croton argyrophylloides* Müll. Arg. (MONTE; DANTAS; BRAZ-FILHO, 1988) e *Croton antisiphiliticus* Mart. (PEREIRA et al., 2012). Segundo Peixoto (2007), o ácido caur-16-en-19-oico é considerado o constituinte majoritário da casca caular de *C. floribundus*.

Os dados dos espectros correspondentes as substâncias dos picos 5, 6, 7 e 9, são sugestivos de diterpenos, porém não foi possível determinar a estrutura pela falta de dados na literatura, como perfil de fragmentação, além da baixa intensidade dos íons fragmentos formados.

## 7 CONCLUSÕES

A análise dos caracteres morfológicos e anatômicos da casca caular de *Croton floribundus* revelou uma estrutura complexa, formada por diversos tipos celulares, alguns dos quais são bem característicos e servem como base para a realização do controle de qualidade da espécie.

Os índices de controle de qualidade da casca caular de *C. floribundus* foram estabelecidos.

Na avaliação fitoquímica determinou-se a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários, detectando nos testes quantitativos um teor considerável de compostos fenólicos, compatível com os resultados obtidos na avaliação da capacidade antioxidante dos extratos brutos de *C. floribundus*, em especial para o extrato bruto acetona 70%, considerado o melhor líquido extrator.

Foi possível obter o perfil químico (*fingerprint*) por cromatografia líquida e sugerir alguns dos compostos presentes no extrato acetona 70% por espectrometria de massas.

O extrato acetona 70% apresentou atividade antiproliferativa promissora e melhor índice de seletividade frente as linhagens neoplásicas avaliadas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABOAGYE, F. A.; SAM, G. H.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Julocrotine C, A glutarimide alkaloid from *Croton membranaceus*. **Fitoterapia**, v. 71, p.461-462, 2000.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Câncer de Próstata: aprovado um novo tratamento. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/cancer-de-prostata-aprovado-novo-tratamento/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageld=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/cancer-de-prostata-aprovado-novo-tratamento/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageld=pt_BR)>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Monografia para a espécie *Croton cajucara* Benth (Sacaca). Ministério da Saúde e Anvisa. Brasília, DF. Brasil. 2015.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Zytiga (acetato de abiraterona). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5304212015&pIdAnexo=2684832](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5304212015&pIdAnexo=2684832)>. Acesso em 26 nov. 2017.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de Flavonoides. **Diálogos & Ciência**, n. 12, p. 1-8, 2007.
- AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V.; FERREIRA, J. L. P. Coletânea científica de plantas de uso medicinal. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 58-76, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta: **American Cancer Society**, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2018. Atlanta: **American Cancer Society**, 2018.
- ARAÚJO, L. H.; ANTUNES, A. A. Tratamento medicamentoso para câncer de próstata. **Farmacêutico em Foco**, n. 16, 2012.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determination of phenolic compounds in wine: a review. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.
- ASADI-SAMANI, M.; KOOTI, W.; ASLANI, E.; SHIRZAD, H. A Systematic Review of Iran's Medicinal Plants With Anticancer Effects. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v.21, n. 2, p. 143-153, 2016.
- ASLAM, E. Vegetable tannins: lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2713-2721, 2007.
- ATHAYDE, M. L.; TAKETA, A. T. C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Saponinas. In: In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 285-302, 2017.
- BAGULEY, B. C.; JHICKS, K. O.; WILSON, W. R. Tumor cell cultures in drug development. In: BAGULEY, B. C.; KERR, D. J. (Eds.). Anticancer drug development. San Diego: Academic Press, p. 269-284, 2002.
- BARTH, E. F. Estudo fitoquímico e avaliação de potenciais atividades biológicas de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). Dissertação. Universidade Paranaense - UNIPAR: Umuarama, 75 p., 2011.

BARTH, E. F.; PINTO, L. S.; DILELI, P.; BIAVATTI, D. C.; SILVA, Y. L.; BORTOLUCCI, W.; GAZIM, C. Z.; TAKEMURA, O. S.; ROMAGNOLO, M. B.; LAVERDE-JUNIOR, A. Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 601-608, 2018.

BAYOR, M. T, AYIM, J. S. K., MARSTON, G., PHILLIPS, R. M., SHNYDER, S. D., WHEELHOUSE, R. T.; WRIGHT, C. W. A cytotoxic diterpenoid from *Croton membranaceus*, the major constituent of anticancer herbal formulations in Ghana. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 1875-1878, 2008.

BENNETT, B.C. Twenty-five Economically Important Plant Families. **ECONOMIC BOTANY**. 2007.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University, 1976.

BOREFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, 1984.

BRANDÃO, M. G. L. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 29-37, 2017.

BRANDI-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRATTI, C.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; OLIVEIRA, A. P. A.; MARAFIGA, B. G.; FERNANDES, S. S. L. Levantamento de plantas medicinais nativas da Fazenda Azulão em Dourados-MS. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 675-683, 2013.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, p. 519-533, 2004.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília DF: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo: **Embrapa Floresta**, v. 2, 2003.

CASTRO, S. B. R.; LEAL, C. A. G.; FREIRE, F. R.; CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, D. F.; FIGUEIREDO, H. C. P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 756-760, 2008.

CHEN, Z.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J. D. Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood. **Planta Medica**, v. 60, p. 541-545, 1994.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS (CONITEC). Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. Ministério da Saúde, 66 p., 2016.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Anise-like flavor of *Croton* aff. *Zehntneri* Pax et Hoffm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 772-773, 1978.

*Croton cajucara*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB35777>>. Acesso em: 04 set. 2018d.

*Croton echiioides*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17510>>. Acesso em: 16 nov. 2018g.

*Croton floribundus*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17512>>. Acesso em: 04 set. 2018a.

*Croton lechleri*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22688>>. Acesso em: 07 nov. 2018f.

*Croton sonderianus* Müll. Arg. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17540>>. Acesso em: 07 set. 2018e.

*Croton*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 04 set. 2018c.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DIAS-LEME, C. L.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Intrusive cavities in Euphorbiaceae fibre walls. **IAWA Journal**, v. 19, n. 3, p. 279-283, 1998.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, p. 108-118, 2004.

EPSTEIN, J. I. O Trato Urinário Inferior e Sistema Genital Masculino. In: KUMAR, V. et al. Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1001-1010, 2010.

*Euphorbiaceae*. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>>. Acesso em: 04 set. 2018b.

FARÍAS, F. R.; WILLIAMSSON, J. S.; RODRÍGUEZ, S. V.; ANGELES, G.; PORTUGAL, V. O. Bark anatomy in *Croton draco* var. *draco* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 12, p. 2155-2167, 2009.

FARLEY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. E359-E386, 2015.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Brasil. 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p.61-68, 1997.

FLORA IPE. *Croton floribundus* Spreng. Disponível em: <[flora.ipe.org.br/sp/142?pdf=1](http://flora.ipe.org.br/sp/142?pdf=1)>. Acesso em: 26 nov. 2017.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 627-650, 1927.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Provenge. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM210031.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

GANTER, P.; JOLLES, G. Histochemie normale et pathologique. Gauthier-Villars, Paris. 1969-1970.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HARAGUCHI, S. K.; SILVA, A. A.; VIDOTTI, G. J.; DOS SANTOS, P. V.; GARCIA, F. P.; PEDROSO, R. B. NAKAMURA, C. V.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; DA SILVA, C. C. Antitrypanosomal Activity of Novel Benzaldehyde-Thiosemicarbazone Derivatives from Kaurenoic Acid. **Molecules**, v. 16, p. 1166-1180, 2011.

HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. **Biochemical Journal**, v.139, p.285-288, 1974.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M.; DI STASI, L. C. Euphorbiales medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Editora Unesp, p. 236- 258, 2002.

HORRIDGE, G. A.; TAMM, S. L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, v. 163, p. 817-818, 1969.

ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTIDOME, M.; ITOKAWA, A. Cajucarinolide and Isocajucarinolide: Anti-Inflammatory Diterpenes from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 58, p. 549-551, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em <<https://www2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/ Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 128 p., 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 122 p., 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 128 p., 2017b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 26 nov. 2017a.

JAIN, S.; DWIVEDI, J.; KUMAR, P.; JAIN, P. K.; SATPATHY, S.; PATRA, A. Medicinal Plants for Treatment of Cancer: A Brief Review. **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 2, p. 87-102, 2016.

JANSSEN. Apalutamida. Disponível em: <[https://www.janssen.com/brasil/sites/www\\_janssen\\_com\\_brazil/files/prod\\_files/live/erleada\\_pub\\_vp.pdf](https://www.janssen.com/brasil/sites/www_janssen_com_brazil/files/prod_files/live/erleada_pub_vp.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2018.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. McGraw-Hill., New York, 1940.

JOSHI, R. K. Chemical composition of the essential oil of *Croton bonplandianus* from India. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 2, p. 269-270, 2014.

KHAN, M.; MARYAM, A.; ZHANG, H.; MEHMOOD, T.; MA, T. Killing cancer with platycodin D through multiple mechanisms. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 3, p. 389-402, 2016.

KOOTI, W.; SERVATYARI, K.; BEHZADIFAR, M.; ASADI-SAMANI, M.; SADEGHI, F.; NOURI, B.; MARZOUNI, H. Z. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. **Journal of Evidence Based Complementary & Alternative Medicine**, p. 1-14, 2017.

KRAUS, J., ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica: EDUR, 1997.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 147-165, 2017.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, p. 36-42, 2005.

LUCHI, A. E. Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 271-280, 2004. MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., BRABO, S. N., SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823-828, 1998.

MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n.3, p. 54-73, 2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; ARRUDA, A.C.; PAMPLONA, S.G.S.R.; VANDERLINE, F.A.; LAPA, A.J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; CÔLUS, I.M.S.; FARIAS, R.A.F.; LUNA COSTA, A.M.; RAO, V.S.N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.1, p. 41-55, 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; KAISER, C.R. NMR and structure review of some natural fluroclerodanes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.41, n.4, p. 278-282, 2003.

MAGNABOSCO, W. J. Câncer de próstata – diagnóstico e estadiamento. **Revista Onco&**, p. 22-25, 2014.

MEDINA, J. M.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, A. A.; HARAGUCHI, S.; FALAVIGNA, D. L. M.; ZAMUNER, M. L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n.1B, p. 207-211, 2009.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 236-246, 2017.

MENNEGA, A.M.W. Wood anatomy of the subfamily Euphrbioideae: a comparison with subfamilies Crotonoideae and Acalyphoideae and the implications for circumscription of the Euphorbiaceae. **IAWA Journal**, v. 26, n.1, p. 68, 2005.

MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G; FILHO-BRAZ, R. F. New diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3209-3212, 1988.

MOSMANN, J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

MOY, B.; LEE, R. J.; SMITH, M. Produtos naturais na quimioterapia do câncer: hormônios e agentes relacionados. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed., Porto Alegre: AMGH, p. 1763-1767, 2012.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUZA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n.4, p. 327-332, 2011.

NOVELLO, C. R. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica, antioxidante e adaptógena do lenho de *Croton echinoides* Baill. – Euphorbiaceae. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 205 f., 2011.

NOVELLO, C. R.; MARQUES, L. C.; MIYAZAKI, C. R.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; CARNEIRO-TORRES, D. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; MELLO, J. C. P. Morphoanatomy and pharmacognostic study of the wood of *Croton echinoides*, the Northeastern Marapuama. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 946-956, 2012.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. Farmacognosia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

PEIXOTO, J. L. B. Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 77 f., 2007.

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N.; BLAKE, D. A.; FARNSWORTH, N. R. South American Plants II: Taspine isolation and anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 1, p. 124-126, 1979.

PEREIRA, A. V.; BELTRAME, F. L. A importância da cromatografia líquida na qualificação e quantificação de drogas vegetais e seus metabólitos. In: CASS, Q. B.; CASSIANO, N. Cromatografia líquida, novas tendências e aplicações. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 275-297, 2015.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. An *ent*-kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 8851-8858, 2012.

PINHO-DA-SILVA, L.; MENDES-MAIA, P. V.; DO NASCIMENTO GARCIA, T. M.; CRUZ, J. S.; DE MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, 17, p. 721–725, 2010.

PROSTATE CANCER FOUNDATION. Prostate Cancer: A comprehensive resource on diagnosis, treatment, side effects, and risk factors for patients and families with a history of prostate cancer. **Prostate cancer foundation**, 70p, 2017.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

REGINATTO, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 69-80, 2017.

RELAÇÃO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS (RENISUS). Espécies vegetais. Brasil. Ministério da Saúde. 2009. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

RESENDE, F. O.; RODRIGUES-FILHO, E.; LUFTMANN, H.; PETEREIT, F.; MELLO, J. C. P. Phenylpropanoid Substituted Flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their *In Vitro* Antioxidative Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2087-2093, 2011.

RUDALL, P. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 270-282, 1994.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Online**, v.127, p.1-4, 2007.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, p.615-645, 2004.

SAVIETTO, J. P.; FURLAN, C. M.; MOTTA, L. B.; SALATINO, L. F.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SALATINO, A.; SANTOS, D. Y. A. C. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 4, p. 662-667, 2013.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; SAURA-CALISTO, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. S310-S329, 2009.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA a cancer journal of clinical**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA a cancer journal of clinical**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SILVA, B. O. Análise Estrutural e Histoquímica de *Croton macrobothrys* Baillon. e *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Parasitologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 150 f., 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOARES, L. A. L.; FARIAS, M. R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 83-103, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. Disponível em: <<http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/index.html>>. Acesso em: 02 ago. 2017.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. S.; ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, A. H. Estudo químico de *Croton limae* A. P. S. Gomes, M. F. Sales & P. E. Berry (Euphorbiaceae). Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 278 f., 2014.

STAL, E. Thin Layer Chromatography. New York: Springer Verlag, 1962.

SUÁREZ, A. I.; VÁSQUEZ, L. J.; MANZANO, M. A.; COMPAGNONE, R. S. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 611-614, 2005.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In: HOSTETTMANN, K. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press. 1991.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics. **CA a cancer journal of clinical**, v. 65, n. 2, p. 65-87, 2015.

TRINDADE, M. J. S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.19, n.1, p. 292-309, 2014.

UCHOA, P. K. S. Estudo químico de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 162 f., 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAUCHER, R. A.; TEIXEIRA, M. L.; BRANDELLI, A. Investigation of the Cytotoxicity of Antimicrobial Peptide P40 on Eukaryotic Cells. **Current Microbiology**, v.60, p. 1-5, 2010.

VILLA-RUANO, N.; LOZOYA-GLORIA, E.; PACHECO-HERNANDEZ, Y. Kaurenoic Acid: A Diterpene With a Wide Range of Biological Activities. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 51, 552 p., 2016.

VIVAS, J.; SOJO, F.; CHÁVEZ, K.; SUÁREZ, A. I.; ARVELO, F. Cytotoxic effects of the monomer and dimer of 3, 4-seco-ent-kaurene from *Croton Micans* and their interaction with antitumoral drugs on cellular line of human prostate cancer. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, p. 683-688, 2013.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 04 set. 2018a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: 04 set. 2018b.

XU, W. H.; LIU, W. Y.; LIANG, Q. Chemical constituents from *Croton* species and their biological activities. **Molecules**, v. 23, p. 1-38, 2018.

YATES, J. S.; MUSTIAN, K. M.; MORROW, G.R.; GILLIES, L. J.; PADMANABAN, D.; ATKINS, J. N.; ISSEL, B.; KIRSHNER, J. J.; COLMAN, L. K. Prevalence of complementary and alternative medicine use in cancer patients during treatment. **Support Care Cancer**, v. 13, p. 806-811, 2005.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DO PÓ DA CASCA CAULINAR DE *Croton floribundus*.

| Nº do Tamis  | Faixa Granulométrica (mm) | Abertura Média (mm) | Peso Inicial do Tamis (g) | Peso Inicial do Tamis + Amostra (g) | Peso Retido (g) | Fração Residual (%) | Retenção acumulada (%) | Passagem acumulada (%) | Fração Residual (%) x Abertura Média (mm) |
|--------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------------|
| 18 - 20      | 1,00 - 0,840              | 0,920               | 377,39                    | 379,89                              | 2,5             | 5                   | 5                      | 95                     | 4,6                                       |
| 20 - 40      | 0,840 - 0,420             | 0,630               | 522,79                    | 526                                 | 3,21            | 6,42                | 11,42                  | 88,58                  | 4,04                                      |
| 40 - 45      | 0,420 - 0,350             | 0,770               | 442,33                    | 457,47                              | 15,14           | 30,3                | 41,72                  | 58,28                  | 11,66                                     |
| 45 - 60      | 0,350 - 0,250             | 0,300               | 450,93                    | 454,9                               | 3,97            | 7,95                | 49,67                  | 50,33                  | 2,38                                      |
| 60 - 70      | 0,250 - 0,210             | 0,230               | 432,4                     | 439,33                              | 6,93            | 13,87               | 63,54                  | 36,46                  | 3,19                                      |
| 70 - 80      | 0,210 - 0,177             | 0,194               | 418,01                    | 420,85                              | 2,84            | 5,7                 | 69,24                  | 30,76                  | 1,1                                       |
| 80 - 100     | 0,177 - 0,149             | 0,163               | 435,56                    | 439,44                              | 3,88            | 7,77                | 77,01                  | 22,99                  | 1,27                                      |
| 100 - 0      | 0,149 – 0,000             | 0,074               | 425,38                    | 427,7                               | 2,32            | 4,64                | 81,65                  | 18,35                  | 0,34                                      |
| Coletor      | 0,000                     | 0,000               | 367,46                    | 376,63                              | 9,17            | 18,35               | 100,00                 | 0,00                   | 0,00                                      |
| <b>Total</b> |                           |                     |                           |                                     | 49,96           |                     |                        |                        |                                           |

**APÊNDICE B - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DA CASCA CAULINAR DE *Croton floribundus* COMPARADOS COM OS PADRÕES.**

| <b>Extrato Bruto<br/>(EB)</b> | <b>CE<sub>50</sub> µg/mL<br/>± DP(CV%)</b> |
|-------------------------------|--------------------------------------------|
| Acetato de Etila              | ND*                                        |
| Acetona 70% (v/v)             | 24,51 ± 0,11 (0,45) <sup>a</sup>           |
| Aquoso                        | 59,24 ± 1,31 (2,21) <sup>b</sup>           |
| Diclorometano                 | ND*                                        |
| Etanol 50% (v/v)              | 28,75 ± 1,33 (4,63) <sup>c</sup>           |
| Etanol 70% (v/v)              | 37,76 ± 0,60 (1,59) <sup>d</sup>           |
| Etanol 95% (v/v)              | 36,97 ± 1,51 (4,07) <sup>d</sup>           |
| Metanol 50% (v/v)             | 26,32 ± 0,59 (2,24) <sup>a</sup>           |
| Metanol                       | 29,44 ± 0,37 (1,26) <sup>c</sup>           |
| <b>Padrões</b>                | <b>CE<sub>50</sub> µg/mL<br/>± DP(CV%)</b> |
| Ácido gálico                  | 4,63 ± 0,08 (1,74) <sup>e</sup>            |
| Trolox                        | 7,25 ± 0,08 (1,10) <sup>f</sup>            |
| Vitamina C                    | 17,68 ± 0,36 (2,02) <sup>g</sup>           |

CV: coeficiente de variação; EB: extrato bruto; DP: desvio padrão; Os valores da capacidade antioxidante pelo método do DPPH• foram expressos em CE<sub>50</sub>, que é a concentração efetiva de extrato bruto necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH; \*ND: não detectado; <sup>a-</sup><sup>g</sup>Letras diferentes representam diferenças significativas entre os valores da capacidade antioxidante de cada extrato e padrões (Anova unifatorial e teste Tukey,  $p < 0.05$ ).