

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
LUCAS DE ANDRADE HUBER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO DE SANGRA
D'ÁGUA FRENTE À LINHAGEM HUMANA DE CÂNCER DE PULMÃO DE
CÉLULAS NÃO PEQUENAS A549 (ADENOCARCINOMA)**

**PORTO ALEGRE
2010**

LUCAS DE ANDRADE HUBER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO DE SANGRA
D'ÁGUA FRENTE À LINHAGEM HUMANA DE CÂNCER DE PULMÃO DE
CÉLULAS NÃO PEQUENAS A549 (ADENOCARCINOMA)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
Porto Alegre/RS, como requisito para a
obtenção de grau em Farmácia, sob orientação
da Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques e
co-orientação da Profa. Rafaela Marin

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques

Co-orientadora: Rafaela Marin

BANCA EXAMINADORA

Msc. Carolina dos Santos Passos

Dr. Mário Luiz Conte da Frota Júnior

Porto Alegre: _____ de _____ de 2010

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu vida e inteligência, e que me dá força para continuar a caminhada em busca dos meus objetivos.

Ao meu pai Leo que me ensinou a perseverança essencial não só para o trabalho, mas também para a vida.

À minha mãe Elza, cuja bondade e humildade me ensinaram a viver.

Ao meu irmão Mateus por me mostrar a coragem para enfrentar as dificuldades.

À Professora Rafaela Marin pela dedicação na realização deste trabalho, que sem sua importante ajuda não teria sido concretizado.

À Professora Amélia Teresinha Henriques pelo incentivo e sugestões dadas para a realização da monografia.

Ao Mestrando Matheus Becker Freitas pelo conhecimento e tempo doados, fundamentais para o trabalho.

Ao Professor Fábio Klamt pela parceria essencial para que o trabalho pudesse ser realizado.

E aos demais, que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho

*O saber a gente aprende com os mestres e
com os livros. A sabedoria, se aprende é
com a vida e com os humildes.*

Cora Coralina

RESUMO

O câncer de pulmão é um dos tipos de câncer de maior incidência e mortalidade no Brasil e no Mundo, apesar da constante e ampla pesquisa por novos fármacos e tratamentos. Nesta perspectiva, o presente trabalho explorou o potencial antitumoral sugerido pelo uso popular de *Croton sp.*, uma espécie de Sangra D'água nativa do Brasil. Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, foi realizada a identificação e doseamento da Taspina, um alcalóide previamente estudado quanto ao seu potencial antitumoral, presente em outras espécies de Sangra D'água, como a *Croton lechleri*. Além disso, foi feito o teste de citotoxicidade de *Croton sp.* e do padrão autêntico de Taspina frente a linhagem humana de câncer de pulmão de células não pequenas A549 (adenocarcinoma), através do plaqueamento das células em placas de 96 poços e exposição direta a diferentes concentrações do extrato e da Taspina por 72 horas. A citotoxicidade foi analisada pelo método da Sulforrodamina B e o valor CI_{50} do extrato da planta foi determinado. Os resultados de doseamento indicaram a presença de Taspina no extrato na concentração de 1,46%. Os testes de citotoxicidade demonstraram que o extrato apresenta alto potencial citotóxico na linhagem celular testada, sendo ainda mais eficaz do que a Taspina pura e também do que o medicamento padrão para o tratamento de câncer de pulmão, a Cisplatina. Esta constatação levou a elaboração de dois possíveis cenários explicando o mecanismo citotóxico do extrato. No primeiro, a Taspina é colocada como a principal responsável pela citotoxicidade, embora no extrato, seu potencial esteja aumentado devido a presença de outras moléculas não identificadas no trabalho. No segundo cenário, sugere-se a presença de outros compostos desconhecidos com atividade citotóxica majoritária no extrato. Conclui-se que estudos complementares são necessários para se comprovar a eficácia do extrato de *Croton sp.* no tratamento de câncer, como sugerido pelo seu uso popular. Entretanto fica clara a exploração do potencial citotóxico do extrato no tratamento de células neoplásicas, em estudos próximos.

Palavras-chave: Sangra D'Água; Taspina; Câncer de pulmão

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	p. 7
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	p.14
2.1 Material de análise.....	p.14
2.2 Preparo das amostras para análise por CLAE.....	p.15
2.3 Parâmetros cromatográficos.....	p.15
2.4 Preparo da curva padrão.....	p.15
2.5 Cultura de células.....	p.16
2.6 Citotoxicidade do extrato de <i>Croton sp.</i>	p.16
2.7 Preparo das concentrações de extrato para teste <i>in vitro</i>	p.17
2.8 Preparo das concentrações do padrão de Taspina para teste <i>in vitro</i>	p.17
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	p.18
3.1 Análise Cromatográfica.....	p.18
3.2 Análise da atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato de <i>Croton sp.</i>	p.20
4. CONCLUSÃO.....	p.23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	p.25

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO DE SANGRA D'ÁGUA FRENTE À LINHAGEM HUMANA DE CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS A549 (ADENOCARCINOMA)

Lucas de Andrade Huber

Rafaela Marin

Matheus Becker Freitas

Fabio Klamt

Amélia Teresinha Henriques

1. INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer está entre as patologias de maior gravidade. Estimativas da agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS apontaram que em 2008 ocorreu a incidência de 12,4 milhões de novos casos e 7,6 milhões de óbitos no mundo todo. Ainda, segundo a mesma estimativa, as maiores incidências estão associadas ao câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), de mama (1,29 milhões) e de cólon e reto (1,15 milhões), sendo que os de maior mortalidade são os de pulmão, estômago e fígado com 1,31 milhões, 780 mil e 699 mil óbitos, respectivamente¹. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer para 2010, com prevalência do câncer de pele tipo não melanoma (114 mil casos), próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (28 mil) e cólon e reto (28 mil)².

Nos últimos anos, o investimento na pesquisa de novos fármacos para o tratamento de câncer de pulmão trouxe algumas inovações como, por exemplo, os anticorpos monoclonais (Cetuximab®, Bevacizumab®), inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico relacionado a receptores tirosina quinase (EGF-R RTK)(Gefitinib®), inibidores mTOR (“mammalian target of *rapamycin*”) (Rapamicina), entre outros³. Entretanto, devido à recente descoberta destas drogas, os estudos clínicos sobre elas ainda são poucos e não conclusivos. Desta forma, o tratamento de primeira linha para o câncer de pulmão ainda consiste na associação de alguns fármacos, como os de origem natural: etoposídeo e alcalóides da vinca (vimblastina, vinorelbina ou vindesina) com a cisplatina.⁴

A cisplatina, fármaco descoberto em meados do século XIX, utilizada em vários tratamentos quimioterápicos, inclusive como tratamento de primeira linha no câncer de pulmão, pode apresentar alguns efeitos adversos graves como ototoxicidade⁵ e nefrotoxicidade⁶. Além disso, estudos recentes demonstraram que o uso da mesma, mesmo em associação com outras drogas, apresenta efetividade moderada do tratamento quimioterápico do câncer.

O estudo IALT (*Internacional Adjuvant Lung Cancer Trial*) incluiu 1867 pacientes com NSCLC (*Non-small cell lung carcinoma*) em vários estágios da doença (I a IIIA) sendo tratados com cisplatina e etoposídeo ou cisplatina e vinorelbina. Com o tratamento quimioterápico, o intervalo livre da doença foi 17% maior e a redução do risco de morte foi de 14% em relação às pessoas que não passaram pelo procedimento⁷. Ainda, os resultados a longo prazo (7,5 anos) deste estudo, demonstraram que houve a piora no índice de redução do risco relativo de morte para apenas 9%, ocorrendo perda do benefício de sobrevida após 5 anos. Além disso, o trabalho apontou um aumento no número de mortes não relacionadas ao câncer no grupo que recebeu quimioterapia, especialmente após 5 anos do início do tratamento. Os resultados sugerem que efeitos secundários ao tratamento farmacológico podem levar a um aumento do risco de morte de pacientes tratados⁸.

Neste contexto é notória a necessidade da descoberta de protótipos e/ou novos fármacos alternativos mais eficazes e com menos efeitos adversos para o tratamento do câncer. Dentre as alternativas para a prospecção de novas moléculas bioativas, podemos destacar a importância das fontes naturais. Muitos dos fármacos atualmente empregados na quimioterapia foram obtidos dessa forma, a exemplificar: podofilotoxina⁹, paclitaxel¹⁰, camptotecina¹¹ e a própria vincristina¹², utilizada no tratamento de câncer de pulmão.

Uma análise recente do mercado de medicamentos anticâncer da América do Norte, Japão e Europa, entre 1981 e 2006, revelou que dos 155 medicamentos clinicamente aprovados no combate ao câncer, 47,1% são produtos de origem natural sem modificações ou derivados semi-sintéticos ou moléculas sintetizadas a partir de protótipos de origem natural¹³. Os metabólitos secundários de plantas, normalmente têm como característica, a presença de estruturas mais próximas do sistema biológico de outros seres vivos, do que produtos sintéticos produzidos aleatoriamente, consistindo desta forma, de importantes fontes de novas estruturas para a síntese de novas moléculas na pesquisa de fármacos ou modelos de fármacos que possam vir a ser utilizados na quimioterapia¹⁴.

Sangra d'água, é o nome popular usado para se referir a algumas espécies do gênero *Croton* (Tabela 1), caracterizadas pela produção de extrato avermelhado (conhecido como

‘sangue de dragão’) que escorre do tronco quando este sofre incisões superficiais. O gênero *Croton* é o segundo mais numeroso da família Euphorbiaceae¹⁵, englobando um total de 700 a 800 espécies de distribuição neotropical e algumas paleotropicais¹⁶, com cerca de 300 representantes catalogados no Brasil¹⁷.

Tabela 1 – Principais espécies pertencentes ao gênero *Croton* denominadas como Sangra d’água¹⁸

<i>Croton draco</i>
<i>Croton draconoides</i>
<i>Croton equinocarpus</i>
<i>Croton erythrochilus</i>
<i>Croton ferrugineus</i>
<i>Croton gossypifolius</i> var. <i>hibiscifolius</i>
<i>Croton lechleri</i>
<i>Croton magdalenensis</i>
<i>Croton methodorus</i>
<i>Croton palanostigma</i>
<i>Croton panamensis</i>
<i>Croton riviniaefolius</i>
<i>Croton salutaris</i>
<i>Croton sordidus</i>
<i>Croton urucurana</i>
<i>Croton xalapensis</i>

Espécies do gênero *Croton* apresentam grande potencial para o estudo na área medicinal. Uma busca rápida na base de dados Scopus, usando como palavra-chave “*Croton*”, no dia 7 de março de 2010, encontrou 2802 resultados. Sendo que destes, 995 resultados se enquadram no subtema “Medicine” e 972 em “Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics”. Essa grande quantidade de pesquisas, quando restritas apenas às 16 espécies de Sangra D’água, se traduz em estudos especialmente relacionados às atividades antiinflamatória¹⁹, antiviral²⁰, antioxidante^{21, 23} e cicatrizante²² e em poucos estudos

exploratórios de atividade antitumoral. Dos estudos existentes, vale ressaltar os relacionados à *Croton lechleri* (presente em países como Peru, Equador, Colômbia e Bolívia)²³, por ser a espécie mais amplamente estudada quanto à atividade antineoplásica.

Do extrato da *Croton lechleri* foi identificado o alcalóide Taspina^{24, 25} (Figura 1), que segundo alguns trabalhos^{22, 26, 27, 28, 36, 39}, demonstra atividade antitumoral promissora. Itokawa et al. determinou que o CI_{50} (concentração para inibir 50% do crescimento celular) da Taspina em células KB (carcinoma de epiderme oral humana) foi de 0,39mg/mL²⁶. Rossi et al. precisou uma CI_{50} de 2,5 μ g/mL do extrato de *Croton lechleri* para inibir a proliferação de células K562 humanas (eritroleucemia)²⁷. Em outro trabalho, Walid Fayad et al, avaliou este alcalóide na mesma escala de efetividade da cisplatina no tratamento de células HCT116 de carcinoma de cólon. Além disso, estimou que sua atividade antitumoral baseia-se na indução da apoptose celular através da abertura de poros de transição de permeabilidade da mitocôndria, causando a diminuição do potencial de membrana da mesma, levando a saída de parte do Citocromo *c* mitocondrial para o citosol da célula (via mitocondrial) e através da inibição da Topoisomerase I e II. Ainda, por ser pouco afetada por proteínas transportadoras de efluxo celular (PGP e MRP), responsáveis pela resistência de células neoplásicas a algumas drogas, a Taspina mantém atividade em células que expressam ambos os tipos de proteínas²⁸

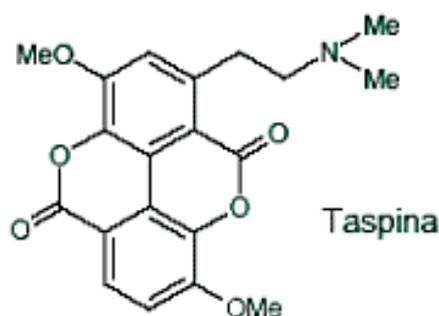


Figura 1: Taspina²⁹

Além do efeito citotóxico da Taspina presente no extrato da *Croton lechleri*, estudos *in vitro* e *in vivo* desta espécie demonstraram várias atividades de outros compostos presentes no extrato. (Tabela 2). Alguns destes compostos e extratos merecem destaque: a molécula 3',4-O-dimetilcedrusina (Figura 2), também encontrado em *Croton draconoides* e *Croton*

erythrochilus, relacionada com a capacidade de inibir a incorporação de timidina em células endoteliais, inibindo a proliferação celular³⁰ e o extrato SP-303, relacionado com a atividade antiviral (normalmente relacionada a mecanismos sobre o DNA/RNA)²⁰. Além desses compostos, também podemos destacar as protoantocianidinas oligoméricas (epigalocatequinas, catequinas, epicatequinas, galocatequinas), devido a sua atividade antioxidante, útil no combate aos radicais livres e assim ao estresse oxidativo, relacionado a mecanismos carcinogênicos³¹.

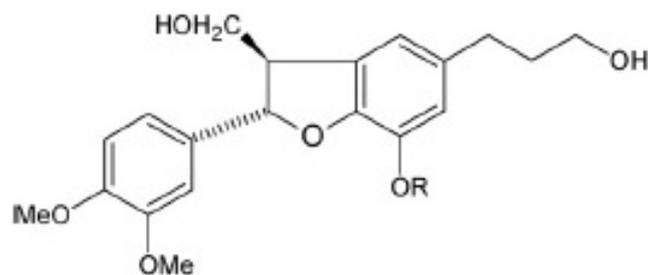


Figura 2 - 3',4-O-dimetilcedrusina²⁹

Em outra perspectiva se apresenta a *Croton urucurana*., uma espécie de Sangra D'água presente na flora Brasileira, com poucos estudos exploratórios acerca de seu potencial medicinal (tabela 2). Uma pesquisa na base de dados Scopus realizada em 30 de maio de 2010, com a palavra “*Croton urucurana*” retornou 26 resultados, e quando relacionadas as palavras “*Croton urucurana*” e “câncer”, a pesquisa não encontrou nenhum resultado. Apesar disso, como o uso popular da Sangra D'água no tratamento de câncer não diferencia as espécies, a investigação de tal atividade em espécies brasileiras é relevante.

Tabela 2 – Principais moléculas e extratos provenientes das espécies *Croton urucurana.*, *C. lechleri* e *C. draco.*, e suas respectivas atividades biológicas

Espécie	Composto	Atividade
<i>Croton urucurana.</i>	Sonderianina ^{32, 33, 34}	Antibacteriana
	Ácido Acetil Aleuritólico ^{32,33}	Antibacteriana Analgésica
	β-Sitosterol; β-Sitosterol-O- glucoside Campesterol Catequina Stigmasterol Galocatequina ³³	Analgésica
	12-Epi-metill-barabascoato 15,16-epoxi-3,13-clerodatrieno-2-ona ³⁵	
	Fucoarabinogalactano (CU-1) ³⁶	
<i>Croton lechleri</i>	Taspina ^{22, 24, 25, 26, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 41}	Antiinflamatória Cicatrizante Citotóxica
	3,4- <i>O</i> -Dimetilcedrusina ^{30, 38, 42}	Cicatrização
	Procianidina B-1 e B-4 ⁴³	Inibição da proliferação celular
	Catequina; Epigalocatequina Epicatequina Galocatequina ^{22,43}	
	Catequina (4-α-8)-galocatequina (4-α-6) gallocatechin; catequina (4-α-8)-galocatequina (4-α-8)-galocatequina; galocatequina (4-α-6)- epigalocatequina; galocatequina (4-α-8)-epi-catequina; galocatequina (4-α-8)-galocatequina (4-α-8)- epi-galocatequina ⁴³	

<p>Ácido Benzofurano-5-il,2-3-dihidro:2-(4-hidroxi-3-metoxifenil) 7-metoxi-3-metoxi-carbonilpropeno-1-oico metil éster; Ácido benzofurano-5-il,2-3-dihidro:2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metoxicarbonil-propen-1-oico methyl ester⁴²</p>	
<p>β-Sitosterol; Bincatriol; Crolechinol (10); Ácido Crolechinico (11); Daucosterol; Ácido Hardwickiic^{22, 44}</p>	
<p>1,3,5-Trimetoxibenzeno 2,4,6-Trimetoxifenol 3,4-Dimetoxibenzil alcohol; 3,4-dimetoxi fenol; 4-hidroxifenetil alcohol; 4-hidroxifenetil acetato; Sitostenona; Sitosterol-β-d-glucopiranosideo⁴⁴</p>	<p>Citotóxico Antibacteriana</p>
<p>Korberina A (5) Korberina B (6)^{22, 44} 4-O-Methicedrusina³⁰</p>	
<p>SP-303 (PM= 2200 Da)^{20, 45}</p>	Antiviral
<p>Etil acetato; Etil propionato; 2-metil butanol; 2-metilbutil acetato; Propil acetato; 3-metilbutil acetato; Eucaliptol; 1-butil acetato; 3-metil-2-pentanol⁴⁶</p>	
<p>Isoboldina Norisoboldina ; Magnoflorina⁴⁷</p>	
<p>SB-300 (PM= 3000 Da)⁴⁸</p>	Antidiarreica
<i>Croton draco</i>	
<p>1-Hidroxijunenol 2,3-dihidroxi-dromifoliol 3,4,5-trimetoxicinamil alcohol Ácido 9-dehidrokaurenico 9-dehidromifoliol Ácido Hardwikiic</p>	---

***p*-hidroxibenzaldeído
Ácido *p*-metoxibenzoico
Escopoleina
Taspina⁴⁹**

Neste contexto, o presente trabalho avaliou a atividade antitumoral de *Croton sp.* na inibição da proliferação celular de linhagem humana de câncer de pulmão de células não-pequenas A549 (adenocarcinoma), tendo como perspectivas de resultados positivos a continuidade através do fracionamento e identificação da (s) molécula (s) bioativas. Além disto, dentre os objetivos encontra-se a investigação da presença de Taspina e a análise de sua capacidade na inibição da proliferação celular da linhagem celular supracitada. Para uma melhor avaliação, os resultados foram comparados com os valores de citotoxicidade da cisplatina, o fármaco de referência para o tratamento de câncer.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material de análise

O extrato da *Croton sp.* foi coletado em Fevereiro de 2010, no município de Jales – SP, Brasil (elevação 20°16'5.59"S e 50°32'55.87"O), na região de São José do Rio Preto. A identificação botânica da planta foi feita pela Dra. Inês Cordeiro, pesquisadora na Seção de Curadoria do Herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

O material foi coletado seguindo a orientação da população local, às 07 horas, com cortes superficiais no caule em diagonal, de cima para baixo, posicionando um pequeno coletor côncavo de alumínio, imediatamente em baixo do final do corte. Após alguns minutos de coleta, o extrato foi transferido para frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração em geladeira (-4°C) até Março, quando foi submetido a centrifugação. O processo sedimentou impurezas sólidas como restos da casca, pó e terra no fundo dos tubos de centrifuga. Após o sobrenadante foi coletado e liofilizado, sendo armazenado em freezer (-20°C).

2.2. Preparo das amostras para análise por CLAE

Para o preparo das amostras de extrato para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram pesados 184,5 mg da amostra liofilizada em balança analítica, e depois feita a diluição em Acetonitrila (grau CLAE, Merck, Darmstadt, Germany), Água ultra pura (MiliQ) e Ácido Trifluoracético (Nuclear, Diadema, São Paulo), em um balão volumétrico de 10 mL (Concentração: 18,45mg/mL). Em seguida foram transferidos 100 μ L desta amostra para outro balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com Acetonitrila, Água, Ácido Trifluoracético, obtendo-se, desta forma, a concentração final de 0,1845mg/mL. A amostra foi, então, levada para banho de ultra-som, por 15 minutos. Posteriormente foi filtrada através de uma membrana 0,45 μ m de tamanho de poro e analisada por CLAE.

2.3. Parâmetros cromatográficos

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo Waters Alliance modelo 2695, equipado com injetor automático, detector espectrofotométrico de conjuntos de fotodiodos Waters modelo 996 e programa de gerenciamento e avaliação de dados Empower Software. A análise foi realizada em sistema isocrático, utilizando uma coluna de aço inoxidável Nova-Pak[®] recheada com sílica C₁₈ (150 x 3,9 mm, DI) com 4,5 μ m de tamanho de partícula acoplada a uma pré-coluna Lichrosorb (10 x 4 mm, DI), empacotada com Bondapack C₁₈, com partículas de 10 μ m (Merck). Foi realizada varredura de absorção com intervalos de 1s, na faixa de 200 a 400 nm, com resolução de 4.8 nm.

2.4. Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada em triplicata utilizando o padrão de Taspina nas concentrações: 1, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M. Foi calculada a média das áreas integradas que foram

plotadas em gráfico Concentração *versus* Área Integrada. A linearidade e a equação da reta foram calculadas através do software Microsoft Excel 2003.

2.5. Cultura de células

Para o ensaio de citotoxicidade *in vitro* do extrato de *Croton sp.*, utilizou-se a linhagem humana de câncer de pulmão de células não pequenas A549 (adenocarcinoma) obtida do NCI-Frederick Cancer DCTD tumor. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 2 mM L-glutamina suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cripion), antibiótico Gentamicina[®](Schering-Plough) e antifúngico Anfotericina B[®] (SIGMA); e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C. Foram utilizadas neste estudo apenas células na fase exponencial de crescimento.

2.6. Citotoxicidade do extrato de *Croton sp.*

A citotoxicidade do extrato de *Croton sp.* foi mensurada pelo método da sulforodamina B (SRB). Para isto, 5×10^3 células/poço foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços durante 24h para permitir aderência. Após, as células foram tratadas com diferentes concentrações de extrato de *Croton sp.* por 72 horas. O meio contendo o extrato foi então removido e as células fixadas com solução de Ácido Tricloroacético 10% (4°C) por 1h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com água destilada por 5 vezes, e secadas à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada a sulforodamina B 0.4% (Sigma) (p/v) em ácido acético 1% (v/v) a temperatura ambiente por 20 min. A SRB foi então removida e a placa lavada com ácido acético 1% para remoção de corante excedente. As células coradas foram então solubilizadas com Tris-base 10mM (pH=10.5) e a solução homogeneizada por 10 minutos em agitador. Posteriormente, através de análise colorimétrica, foi lida a absorbância do solubilizado em espectrofotômetro a 515 nm.

A concentração de extrato *Croton sp.* que inibe a metade do crescimento celular (CI₅₀) foi determinada de acordo com a curva de dose-resposta do extrato, através do software GraphPad Prism.

2.7. Preparo das concentrações de extrato para teste *in vitro*

Na determinação da citotoxicidade do extrato de *Croton sp.*, foi feita uma curva de concentração do extrato *versus* resposta celular. Para isso, foi pesada 184,5 mg de extrato e este transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado com água (MiliQ). Em seguida, a solução foi levada para banho de ultra-som por 15 minutos. Após, foi retirado o sobrenadante e feita sua filtração através de uma membrana esterilizante (0,45µm).

Em uma primeira fase do projeto foram testadas várias concentrações, com ampla faixa de valores, em placa de 96 poços (Tabela 3) a fim de verificar a presença de atividade. Posteriormente, com base nos valores obtidos, foi elaborada a segunda etapa do projeto, onde foram preparadas mais duas curvas, em quadriplucata cada, de concentração do extrato *versus* resposta celular, com faixa mais estreita de valores de concentração (Tabela 4), para obter-se o valor mais preciso do CI₅₀.

Tabela 3 – Concentrações de extrato testadas (1ª Etapa)

Concentração (mg de Extrato/mL)
0,01845
0,05535
0,1107
0,2214
0,46125
0,9225
1,845

Tabela 4 – Concentrações de extrato testadas (2ª Etapa)

Concentração (mg de Extrato/mL)
0,01845
0,0369
0,0738
0,09225
0,1476
0,1845
0,369

2.8. Preparo das concentrações do padrão de Taspina para teste *in vitro*

Para comparação com os resultados da citotoxicidade encontrados no extrato de *Croton sp.* com o alcalóide Taspina, presente na espécie, foi feito em triplicata o mesmo teste (sulforrodamina B) com a substância isolada. Para isto, foi preparada uma solução-mãe na

concentração de 500 μ M de Taspina. Posteriormente a solução mãe foi diluída, em triplicata, diretamente na placa de 96 poços, nas concentrações de 1, 2, 4, 8 e 16 μ M.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Cromatográfica

Trabalhos anteriores realizados no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul determinaram e validaram o método analítico de doseamento da Taspina no extrato de *Croton lechleri*. Na análise do extrato de *Croton Sp.* as condições cromatográficas foram mantidas, havendo apenas alteração do fluxo de 0,8 para 0,6 mL/min.

Num primeiro momento, buscou-se na análise por CLAE a presença de Taspina no extrato de *Croton sp.* Foi identificada a presença deste composto pelo tempo de retenção de 6,6 minutos e perfil espectrofotométrico (Figura 3), idênticos aos do Padrão de Taspina.

Posteriormente, o doseamento de Taspina no extrato foi realizado através de curva padrão do padrão autêntico preparada em triplicata nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 μ g/mL. A integração automática das áreas (tabela 5) foi realizada utilizando o sistema de integração automático do software de análise de dados “Empower Software”, com comprimento de onda igual a 246nm. O tempo de retenção da Taspina na coluna foi de 6,6 minutos e o perfil espectrofotométrico (Figura 3) apresentou comprimento de ondas máximo de absorção, em 247,1nm.

Tabela 5 – Áreas integradas de cada N amostral e suas respectivas concentrações, média entre áreas, desvio padrão relativo

Conc. Taspina (µg/mL)	N = 1	N = 2	N = 3	Média	Desvio Padrão Relativo
	Integração da Área	Integração da Área	Integração da Área		
1	88472,66667	92117,165	89495,33333	90028,38833	2,07
2	187733,3333	183069,165	187721,3333	186174,6106	1,45
4	364710,6667	384762,5	365669,6667	371714,2778	3,04
8	716691	704804,33	689300,6667	703598,6656	1,95
16	1407212	1504793	1533238,5	1481747,833	4,46
32	-----	2946409,667	2842030,334	2894220	2,55

A curva padrão obtida está representada no gráfico 1. A equação da reta resultante foi $y = 90636x + 2902,3$ e a linearidade (R^2) = 0,9997.

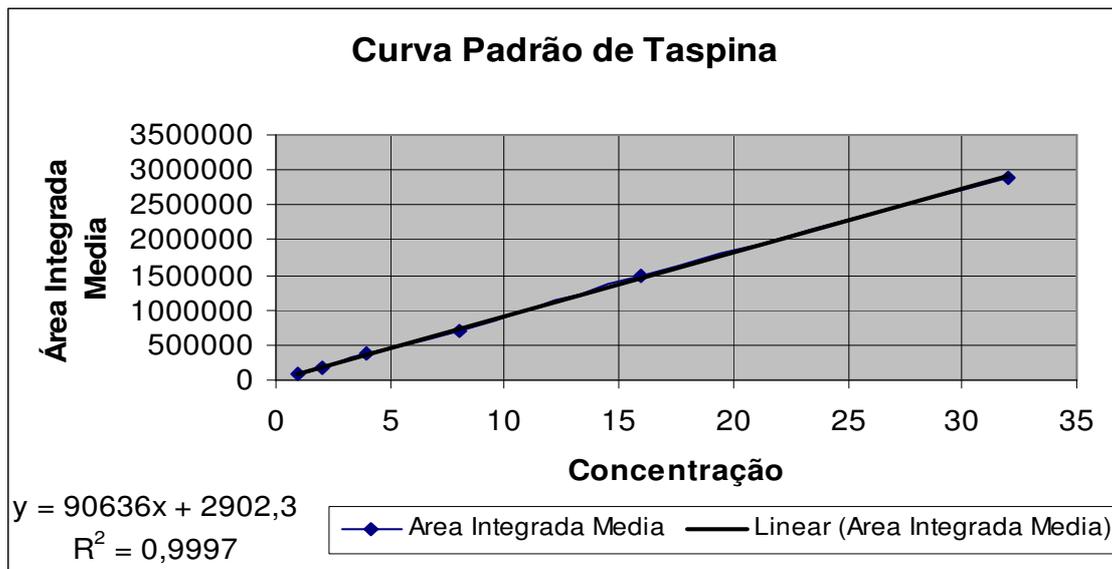


Gráfico 1 - Curva Padrão de Taspina

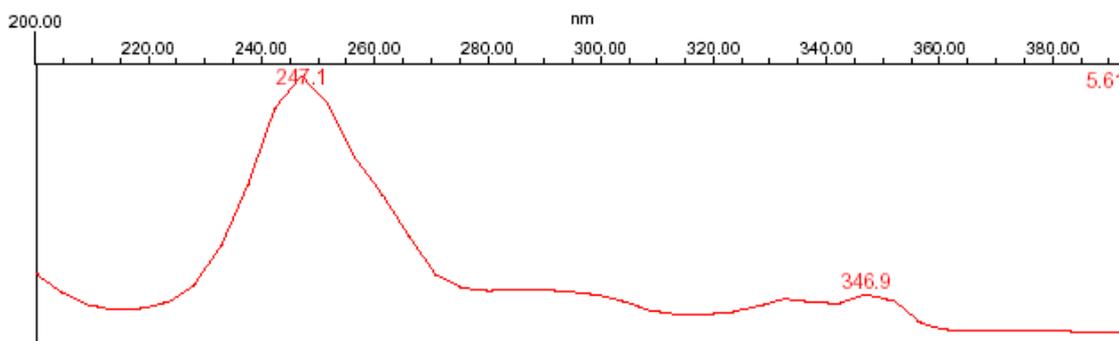


Figura 3 – Perfil espectrofotométrico do Padrão de Taspina.

A concentração de Taspina no extrato da amostra, foi determinada em triplicata através da preparação de uma solução com concentração de 0,1845mg/mL de extrato e análise por CLAE, nas mesmas condições cromatográficas da curva padrão.

Para o doseamento, foram analisadas por CLAE três amostras do extrato na concentração de 0,1845mg/mL (triplicata). Foi então calculada a média entre as áreas integradas, o desvio padrão e o desvio padrão relativo. (tabela 6). A média foi usada na equação da curva padrão para o cálculo da concentração de Taspina no extrato. O resultado indicou que a Taspina se apresenta na proporção de 1,46% (p/p) no extrato de *Croton sp.* analisado.

Tabela 6 – Áreas integradas de cada N amostral, média entre áreas, desvio padrão relativo e concentração e proporção de Taspina no extrato de *Croton sp.*

Conc. Extrato (mg/mL)	Área N=1	Área N=2	Área N=3	Media	DPR	Conc. Taspina (µg/mL)	Proporção (%)
0,1845	260127,7	244220,3	237139,7	247162,6	4,763279	2,695	1,46%

3.2. Análise da atividade citotóxica *in vitro* do extrato de *Croton sp.*

Para o estudo *in vitro* da atividade citotóxica do extrato de *Croton sp.* foi utilizada linhagem de câncer de pulmão de células não pequenas A549 (adenocarcinoma) em

condições ideais de crescimento e proliferação celular. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços e expostas a diferentes concentrações de extrato por 72 horas. Posteriormente o crescimento celular foi interrompido e a proliferação celular foi avaliada segundo o protocolo do NCI (National Cancer Institutes) pelo método da CI_{50} Sulforrodamina B.

O estudo foi dividido em 2 etapas. Na primeira, utilizou-se concentrações de extrato entre 0,01845 e 1,845mg/mL (Tabela 3 – Materiais e métodos), com o objetivo de verificar se o extrato era realmente capaz de inibir a proliferação de células neoplásicas, como o proposto pelo seu uso popular. Os resultados indicaram que o extrato foi capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI_{50}) numa faixa de concentração entre 0,05535mg/mL e 0,1107mg/mL. Este resultado levou à segunda etapa do trabalho que consistiu em fazer a determinação mais próxima do CI_{50} do extrato, já que os resultados preliminares determinaram uma faixa muito ampla de concentrações. Para isto, o teste foi repetido com um $n=2$, restringindo a faixa de concentrações de extrato em pontos entre 0,01845mg/mL e 0,368mg/mL (tabela 4 – Materiais e métodos), ou considerando a concentração de 1,46% de Taspina no extrato, uma faixa de 0,74 a 14,79 μ M de Taspina (gráficos 3 e 4).

Com base na concentração média inibitória (CI_{50}) de Taspina presente no extrato ($CI_{50}= 2,905\mu$ M de Taspina em 72,4 μ g/mL de extrato), preparou-se um segundo teste de citotoxicidade em relação ao padrão de Taspina. Para isto utilizou-se concentrações de 1, 2, 4, 8 e 16 μ M de Taspina.

Os resultados (Gráfico 5) indicaram que a taspina isolada apresenta menor potencial citotóxico quando comparada com a mesma concentração de taspina determinada para o extrato de *Croton sp.*. A diferença foi tão significativa que não foi possível precisar o CI_{50} nas concentrações utilizadas no teste do padrão de Taspina isolada. Entretanto, é possível inferir, através dos resultados, que esse valor se encontra acima de 16 μ M, estando bem acima dos 2,905 μ M de Taspina presentes na concentração de extrato, quando este foi capaz de inibir 50% da proliferação celular.

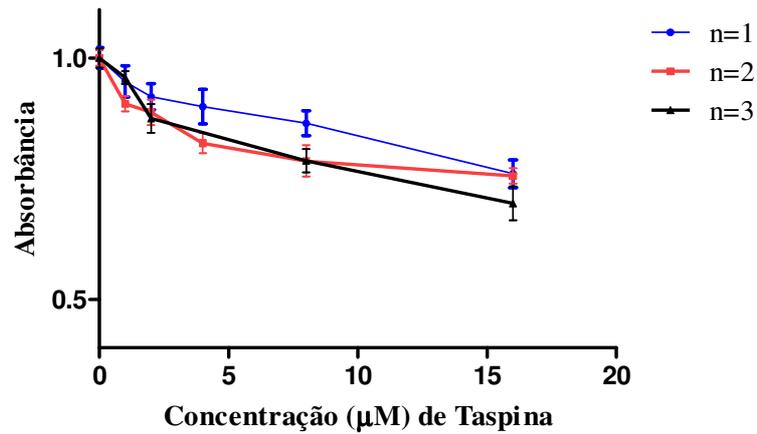


Gráfico 5. CI_{50} não determinado do padrão de Taspina em câncer de pulmão de células não pequenas A549 (adenocarcinoma)

Além disso, vale salientar que a concentração de Taspina no extrato de *Croton sp.*, capaz de inibir 50% do crescimento celular em câncer de pulmão de células não pequenas A549 ($CI_{50} = 2,905\mu M$), chega a ser menor que o valor estipulado pelo NCI (National Cancer Institutes) para a Cisplatina ($CI_{50} = 3,92\mu M$) (Gráfico 6).

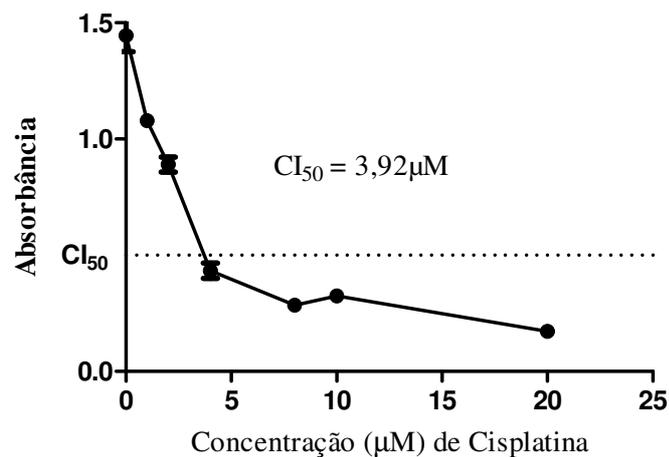


Gráfico 6. CI_{50} do padrão de Cisplatina em câncer de pulmão de células não pequenas A549 (adenocarcinoma)

Desta forma, pode-se levantar a possibilidade de que no extrato o efeito da Taspina estaria potencializado de alguma forma. Algumas sugestões sobre como isto seria possível são:

- A. Caso ocorresse a existência de 1 ou mais compostos no extrato com a capacidade de potencializar atividade citotóxica da Taspina. Por exemplo, aumentando a quantidade de Taspina que consegue entrar na célula, sensibilizando receptores nos quais a mesma teria ação ou ainda inibindo mecanismos de efluxo celular ou degradação da taspina.
- B. Caso ocorresse a existência de 1 ou mais compostos no extrato que apresentam atividade citotóxica sinérgica ao mecanismo da Taspina. Desta forma, o somatório dos efeitos entre os compostos levaria a uma diminuição da concentração necessária para a Taspina atuar.
- C. Caso ocorresse a existência de 1 ou mais compostos no extrato capazes de sensibilizar a célula à Taspina e, ainda, apresentar atividade citotóxica sinérgica.

Outra possibilidade é de que a Taspina interfira pouco na citotoxicidade final do extrato na concentração inibitória observada. Isto poderia ocorrer caso exista no extrato outro composto com atividade citotóxica suficiente para exercer o seu efeito sem interferência relevante da Taspina.

Em relação ao CI_{50} do padrão de Taspina, não foi possível precisar o valor até a data de finalização do projeto. Mas isto não afetou criticamente o trabalho, pois os resultados obtidos permitiram a comparação entre a amostra de extrato e a Taspina pura. De qualquer forma, a determinação deste valor, e a elucidação dos mecanismos pelos quais a Taspina pode ter seu efeito potencializado no extrato, ou ainda, a presença de compostos citotóxicos diferentes, ficam como perspectiva para trabalhos futuros.

4. CONCLUSÃO

O extrato da espécie *Croton sp.* apresentou atividade citotóxica em câncer de pulmão de células não pequenas A549 (adenocarcinoma). Este efeito, apesar de possivelmente influenciado pela presença de Taspina no extrato, parece ser afetado por outros compostos não determinados.

Desta forma, pode-se concluir que o uso do extrato de *Croton sp.* na medicina popular para o tratamento de diversos tipos de cânceres não se mostra infundado. Entretanto, não se pode afirmar, através deste trabalho, que ele é correto já que os resultados obtidos são preliminares. Para tanto, são necessários novos testes que confirmem o potencial antitumoral do extrato *in vivo* e determinem seu potencial toxicológico em seres humanos.

Ainda assim, não se pode negar o potencial de estudo do extrato de *Croton sp.* e seus compostos para o desenvolvimento de novos fitofármacos ou como base para a síntese de novas moléculas para o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report**, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2009.
- 2) MINISTÉRIO DA SAÚDE/SAS/INCA/COMPREV. **Estimativas 2010. Incidência de Câncer no Brasil**. INCA: Rio de Janeiro, 2009
- 3) WOLFRAM C.M. DEMPKE, TAMAS SUTO, MARTIN RECK. **Targeted therapies for non-small cell lung cancer**. *Lung Cancer* 2010, 67, 257–274
- 4) ANTONIO CARLOS BUZUID, PAULO MARCELO HOFF, FERNANDO COTAIT MALUF. **Manual Prático de Oncologia Clínica do Hospital Sírio-Libanês**. Ed. Dendrix, 7^o Ed., 2009
- 5) ADRIANA P. GARCIA; MARIA CECÍLIA M. IÓRIO; ANTÔNIO S. PETRILLI. **Monitoramento de pacientes expostos a cisplatina**; *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* Mar/Abrl 2003, vol.69 no. 2; São Paulo
- 6) LUSÂNIA MARIA GREGGI ANTUNES; MARIA DE LOURDES PIRES BIANCHI. **Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina**. *Rev. Nutr.* vol.17 no.1 Campinas Jan./Mar. 2004
- 7) ARRIAGADA R, BERGMAN B, DUNANT A, LE CHEVALIER T, PIGNON JP, VANSTEENKISTE J; INTERNATIONAL ADJUVANT LUNG CANCER TRIAL COLLABORATIVE GROUP. **Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer**. *N Engl J Med.* Jan. 2004, 22;350(4):351-60.
- 8) T. LE CHEVALIER, A. DUNANT, R. ARRIAGADA, B. BERGMAN, M. CHABOWSKI, C. LEPECHOUX, M. KOZLOWSKI, M. TARAYRE, J. P. PIGNON, IALT COLLABORATIVE GROUP. **Long-term results of the International Adjuvant Lung Cancer Trial (IALT) evaluating adjuvant cisplatin-based chemotherapy in resected non-small cell lung cancer (NSCLC)**. *J Clin Oncol*, 2008, 26:398s, (suppl; abstr 7507)
- 9) HARTWELL, J.L., SCHRECKER, A.W., **Components of podophyllin. V. The constitution of podophyllotoxin**. *J. Am. Chem. Soc.* 1951; 73, 2909–2916.
- 10) WANI, M.C., TAYLOR, H.L., WALL, M.E., COGGON, P., MCPHAIL, A.T. **Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia***. *J. Am. Chem. Soc.* 1971. 93, 2325–2327.
- 11) WALL, M.E., WANI, M.C., COOK, C.E., PALMER, K.H., MCPHAIL, A.I., SIM, G.A., **Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata***. *J. Am. Chem. Soc.* 1966. 88, 3888–3890.
- 12) SVOBODA, G.H., **Alkaloids of *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*). IX. Extraction and characterization of leurosidine and leurocristine**. *Lloydia.* 1961, 24, 173–178.

- 13) NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** *J. Nat. Prod.* 2007. 70, 461–477.
- 14) BINDSEIL, K.U., JAKUPOVIC, J., WOLF, D., LAVAYRE, J., LÉBOUL, J., VAN DER PYL, D., **Pure compound libraries: a new perspective for natural product based drug discovery.** *Drug Discov. Today*, 2001, 6, 840–847.
- 15) FARNSWORTH NR, BLOMSTER RN, MESSMER WM, KING JC, PERSINOS GJ, WILKES JD. **A phytochemical and biological review of the genus *Croton*.** *Lloydia*. 1969. 32: 1-28.
- 16) RANDAU KP, FLORÊNCIO DC, FERREIRA CP, XAVIER HS. **Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm.** *Rev Bras Farmacogn.* 2004, 14: 89-96.
- 17) SCHULTZ ARH. **Introdução à botânica sistemática.** Porto Alegre: Editora da Universidade. Sharaf M, Mansour RMA, Saleh NAN 1992. Exudate flavonoids from aerial parts of four *Cleome* species. *Biochem Syst Ecol.* 1984. 20: 443-448.
- 18) RISCO E, VILA E, HENRIQUES AT, CAÑIGUERAL S. **Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago.** *Revista de Fitoterapia* 2005, 5 (2): 101-114.
- 19) FALCÃO HS, LIMA IO, SANTOS VL, DANTAS HF, DINIZ MFFM, BARBOSA-FILHO JM, BATISTA LM. **Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil.** *Rev Bras Farmacogn* 2005, 15: 381-391.
- 20) UBILLAS R. **SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago).** *Phytomedicine* 1994, 1:77–106.
- 21) C. DESMARCHÉLIER, F. WITTING SCHAUS, J. COUSSIO, G. CICCÀ. **Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals.** *Journal of Ethnopharmacology* 1997, 58, 103-108.
- 22) CHEN, Z.P., CAI, Y., PHILLIPSON, J.D. **Studies on the antitumor, anti-bacterial and wound-healing properties of Dragon's blood.** *Planta Medica* 1994, 60, 541–545.
- 23) SIMONA DE MARINO, FULVIO GALA, FRANCO ZOLLO, SARA VITALINI, GELSOMINA FICO, FRANCESCO VISIOLI, MARIA IORIZZI. **Identification of Minor Secondary Metabolites from the Latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and Evaluation of Their Antioxidant Activity.** *Molecules* 2008, 13, 1219-1229, DOI: 10.3390/molecules13061219.
- 24) GEORGIA PERSINOS PERDUE, RALPH N. BLOMSTER, DAVID A. BLAKE, NORMAN R. **South American plants II: Taspine isolation and anti-inflammatory activity.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1979, 68 (1), pp. 124-126.
- 25) VAISBERG, A.J., MILLA, M., AS, M.C., C'ORDOVA, J.L., ROSAS DE AGUSTI, E., FERREYRA, R., MUSTIGA, M.C., CARLIN, L., HAMMON, G.B. **Taspine is the**

cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Medica* 1989, 55, 140–143.

26) ITOKAWA, H., ICHIHARA, Y., MOCHIZUKI, M., ENOMORI, T., MORITA, H., SHIROTA, O., INAMATSU, M., TAKEYA, K. **A cytotoxic substance from Sangre de Grado.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1991, 39 (4), pp. 1041-1042.

27) D. ROSSI, R. BRUNI, N. BIANCHI, C. CHIARABELLI, R. GAMBARI, A. MEDICI, A. LISTA, G. PAGANETTO. **Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex.** *Phytomedicine*, 2003, 10: 139–144.

28) WALID FAYAD, MARTEN FRYKNA, SLAVICA BRNJIC, MARIA HÄGG OLOFSSON, ROLF LARSSON, STIG LINDER. **Identification of a Novel Topoisomerase Inhibitor Effective in Cells Overexpressing Drug Efflux Transporters.** *PLoS ONE* (www.plosone.org), Outubro/2009, Volume 4, Issue 10, e7238.

29) DEEPIKA GUPTA, BRUCE BLEAKLEY, RAJINDER K. GUPTA. **Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 115 (2008) 361–380

30) PIETERS L, DE BRUYNE T, CLAEYS M, VLIETINCK A, CALOMME M, VAN DEN BERGHE D. **Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American Dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation.** *J Nat Prod.*, 1993. 56: 899-906.

31) KORKINA, L.G., DE LUCA, C., KOSTYUK, V.A., PASTORE, S. **Plant polyphenols and tumors: From mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments.** *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16 (30), pp. 3943-3965

32) PERES, M.T.L.P., DELLE MONACHE, F., CRUZ, A.B., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. **Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton* sp. Baillon (Euphorbiaceae).** *Journal of Ethnopharmacology*, 1997, 56, 223–226.

33) PERES, M.T.L.P., DELLE MONACHE, F., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., BEIRITH, A., CALIXTO, J.B., YUNES, R.A. **Analgesic compounds of *Croton* sp. Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation.** *Phytotherapy Research*, 1998a. 12, 209–211.

34) CRAVEIRO, A., SILVEIRA, E.R. **2 Cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*.** *Phytochemistry*, 1982. 21, 2571–2574.

35) PERES, M.T.L.P., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A., DELLE MONACHE, F. **Clerodane diterpenes of *Croton* sp.** *Phytochemistry*, 1998b. 49, 171–174.

36) MILO, B., RISCO, E., VILA, R., IGLESIAS, J., C~ANIGUERAL, S. **Characterization of a Fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton* sp.** *Journal of Natural Products*, 2002, 65, 1143–1146.

- 37) ITOKAWA, H., ICHIHARA, Y., MOCHIZUKA, M., ENOMORI, T., MORITA, H., SHIROTA, O., INAMATSU, M., TAKEYA, K. **A cytotoxic substance from Sangre de Grado.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 1991. 39, 1041–1042.
- 38) PIETERS L, DE BRUYNE T, VAN POEL B, VINGERHOETS R, TOTTE J, VAN DEN BERGHE D, VLIETINCK A. **In vivo wound healing activity of Dragon's blood (*Croton spp.*), a traditional South American drug.** *Phytomedicine*, 1995, 2 (1), pp. 17-22.
- 39) SETHI, M.L. **Inhibition of RNA-directed DNAPolymerase activity of RNA tumor viruses by taspine.** Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences. 1977. 12, 7–9.
- 40) ZHANG YM, HE LC, WANG HY. **Inhibitory effect of taspine on mouse S180 sarcoma and its mechanism.** *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2007. 32: 953–956.
- 41) PORRAS-REYES, B.H., LEWIS, W.H., ROMAN, J., SIMCHOWITZ, L., MUSTOE, T.A. **Enhancement of wound healing by the alkaloid taspine defining mechanism of action.** In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 203. Society for Experimental Biology and Medicine, New York, NY. 1993. pp. 18–25.
- 42) PIETERS L, DE BRUYNE T, MEI G, LEMIERE G, VAN DEN BERGHE D, VLIETINCK AJ. **In vitro and in vivo biological activity of South American Dragon's blood and its constituents.** *Planta Med*. 1992. 58: 582-583.
- 43) CAI, Y., EVANS, J., ROBERTS, M.F., PHILLIPSON, J.D., ZENK, M.H., GLEBA, Y.Y. **Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*.** *Phytochemistry*, 1991. 30, 2033–2040.
- 44) CAI Y, CHEN ZP, PHILLIPSON J. **Diterpenes from *Croton lechleri*.** *Phytochemistry*. 1993. 32: 755-760.
- 45) SIDWELL, R.W., HUFFMAN, J.H., MOSCON, B.J., WARREN, R.P. **Influenza virus inhibitory effects of intraperitoneally and aerosol-administered SP-303, a plant flavanoid.** *Chemotherapy*, 1994. 40, 42–50.
- 46) BELLESIA, F.F., PINETTI, A.A., TIRILLINI, B.B. **Headspace analysis of *Croton lechleri* L. sap.** *Journal of Essential Oil Research*, 1996. 8, 435–437.
- 47). MILANOWSKY, D.J.; WINTER, R.E.; ELVIN-LEWIS, M.P.; LEWIS, W.H. **Geographic distribution of the alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*.** *J. Nat. Prod.*, 2002, 65, 814–819.
- 48) FISCHER, H., MACHEN, T.E., WIDDICOMBE, J.H., CARLSON, T.J.S., KING, S.R., CHOW, J.W.S., ILLEK, B. **A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. 93, 351–357.
- 49) MURILLO, R.M., JAKUPOVIC, J., RIVERA, J., CASTRO, V.H. **Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae).** *Revista de Biología Tropical*, 2001. 49, 259–264.