



Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sacaquinha* croizat (euphorbiaceae)

*Ricardo H. Costa-e-Sousa*¹

*João W.S. Silveira*²

*Wellington S. Cortes*³

*Silvana Monteath*⁴

*Aurea Echevarria*⁵

*Maria A.M. Maciel*⁶

*Elson A. Costa*⁷

*Pablinny M. Galdino*⁸

*Fábio F. Rocha*⁹

*Frederico A. Vanderlinde*¹⁰

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS E GALHOS DE *Croton sacaquinha* CROIZAT (EUPHORBIACEAE)

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antinociceptiva e o efeito sobre a migração leucocitária do extrato hidroalcoólico obtido das folhas e galhos de *Croton sacaquinha* (EHA). Para esse propósito foram utilizados camundongos *swiss* machos submetidos aos testes farmacológicos das contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, placa quente e peritonite induzida por carragenina. O EHA mostrou atividade antinociceptiva no teste das contorções abdominais e na 2ª fase do teste da formalina, assim como, reduziu a migração leucocitária. O extrato não foi efetivo nos outros modelos utilizados. Esses resultados indicam uma atividade antinociceptiva desse extrato, que pode estar relacionada a mecanismos anti-inflamatórios, justificando o uso de *C. sacaquinha* na medicina popular por suas propriedades analgésicas.

Palavras-chave: Plantas medicinais; anti-inflamatório; analgésico.

¹Doutorando em Fisiologia, UFRJ

²Doutorando em Farmacologia, FMRP-USP

³Professor Adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFRRJ

⁴Mestre em Química Orgânica

⁵Professora Associada do Departamento de Química, UFRRJ

⁶Professora Pesquisadora do Departamento de Química, UFRN

⁷Professor Adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFG

⁸Mestranda em Biologia, UFG

⁹Professor Adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFRRJ

¹⁰Professor Associado do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFRRJ



ABSTRACT

EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF BRANCHES AND BARKS HIDROALCOOLIC EXTRACT OF CROTON SACAQUINHA CROIZAT (EUPHORBIACEAE)

The objective of this study was to evaluate the antinociceptive activity and the effect on leukocytes migration of hidroalcoholic extract (EHA) obtained from *Croton sacaquinha* branches and barks. For this purpose were utilized male Swiss mice submitted to the acetic acid-induced writhes test, formalin test, hot-plate test and the carrageenan induced peritonitis test. The EHA showed an antinociceptive activity in the acetic acid-induced writhes and in the 2nd phase of formalin test also reducing the leukocytes migration. The extract was ineffective in the other tests. These results suggest an antinociceptive activity of the plant which could be related to anti-inflammatory mechanisms. This work may confirm the use of *C. sacaquinha* in the popular medicine for its analgesic properties.

Key words: Medicinal plants; anti-inflammatory; analgesic.



Introdução

O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) constitui um grupo com cerca de 1200 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, muitas delas conhecidas na medicina popular por suas diversas propriedades medicinais (WEBSTER, 1994). Em função de seu uso tradicional, algumas espécies têm sido exaustivamente estudadas, com o intuito de validar essas indicações, ou buscar novos medicamentos com espectro de ação inovador. Nesse sentido, estudos recentes têm demonstrado que diferentes espécies do gênero *Croton* apresentam substâncias com atividade biológica, como, por exemplo, a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *trans*-desidrocrotonina, um diterpeno obtido do *Croton cajucara* (CARVALHO et al., 1996; MACIEL et al., 2000); o efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Croton stellulifer* (MARTINS et al., 2000); o efeito cardiovascular do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* (LAHLOU et al., 1999); a capacidade de glicosídeos, obtidos das partes aéreas do *Croton ruzianus*, em aumentar o efeito da trombina sobre a agregação plaquetária (PIACENTE et al., 1998); a atividade antibacteriana do *Croton urucurana* (PERES et al., 1997); o efeito vascular do extrato aquoso do *Croton schiedeannus* (GUERRERO et al., 2001); a atividade sobre o sistema nervoso central apresentada pelo óleo essencial do *Croton zebntneri* (LAZARINI et al., 2000); a citotoxicidade de diterpenóides isolados do *Croton oblongifolius* (ROENGSUMRAN et al., 2001) e a ação antinociceptiva do *Croton celtidifolius* (DALBÓ et al., 2006). No entanto, grande parte das espécies de *Croton* ainda não foram estudadas e as suas propriedades farmacológicas e efeitos colaterais continuam desconhecidos.

O *Croton sacaquinha* Croizat apresenta distribuição amazônica, sendo conhecida popularmente como sacaquinha em função de sua semelhança com a sacaca (*Croton cajucara*). Para a espécie, são descritas as mesmas propriedades medicinais da sacaca, sendo popularmente indicada para febre, inflamações em geral, taxa alta de colesterol, diarreia, diabetes, emagrecimento, problemas digestivos, dentre outras (DI STASI et al., 1989); no entanto, não se encontram relatos na literatura científica, que comprovem essas propriedades para o *C. sacaquinha*.

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sacaquinha* Croizat, tipo de extração semelhante à forma de utilização popular.

Material e métodos

Material Botânico e Extrato Vegetal

Amostras de galhos e cascas de plantas de *Croton sacaquinha*, cultivadas na unidade EMBRAPA–Amazônia, foram coletadas, e sua identificação foi realizada no Museu Paraense Emílio Goeldi, onde se encontra depositada a exsicata de número IAN37562.





Para o preparo do extrato vegetal, foram utilizadas quantidades equivalentes, em gramas, das folhas e dos galhos de *Croton sakaquinha*, que após secos e moídos, a estes se adicionou a solução hidroalcoólica (40% v/v), constituindo uma mistura na concentração de 10% p/v, que foi colocada em frasco âmbar, lacrado e armazenado em ambiente com completa ausência de luz durante sete dias.

Após esse período, filtrou-se o material, e o líquido resultante foi submetido à pressão reduzida que forneceu o extrato hidroalcoólico bruto. Devido à grande quantidade de água (60%), esse extrato foi posto em estufa à temperatura controlada de 50 °C até a evaporação da água restante, obtendo-se assim o extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sakaquinha* (EHA).

Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*mus musculus*) adultos, fornecidos pelo biotério central da FIOCRUZ, pesando entre 25 e 35g, mantidos com irrestrita disponibilidade de água e ração. Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; 1986; porter, 1992).

Drogas e reagentes

Formalina, ácido acético, acetona (Merck AG, Darmstadt, Germany), indometacina, carragenina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), fentanil (Janssen Pharmaceutical), dexametasona (Prodome, Brasil). O extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sakaquinha* (EHA), as drogas e os reagentes foram diluídos em água quando administrados por via oral ou em solução salina (NaCl - 0,9%) quando destinados a vias de administrações parenterais.

Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Grupos de oito camundongos foram tratados oralmente (p.o.) com o veículo, com o extrato hidroalcoólico (EHA 0,03 – 2,0 g/kg) ou com indometacina (10 mg/Kg), 60 min antes da administração intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (1,2%, 0,1 mL/10g), sendo então contados o número de contorções abdominais durante um período de 30 minutos (KOSTER et al., 1959).

Teste da formalina

Foram utilizados grupos experimentais de até 12 camundongos, tratados pela via oral com o veículo, com o EHA (1,0 g/kg) ou com a indometacina (10 mg/Kg). Após 60 minutos dos tratamentos, injetou-se na região intraplantar da pata posterior direita dos animais, 20 µL de



COSTA-E-SOUSA, R. H.; SILVEIRA, J. W. S.; CORTES, W. S. ...

formalina a 3% (formaldeído 1,2%). Em seguida, foi medida a reatividade do animal, considerada como o tempo, em segundos, que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou sacudindo a pata injetada. O efeito antinociceptivo foi avaliado nas duas fases de dor: durante os primeiros 5 minutos (dor neurogênica) e no período de 15 a 30 minutos, correspondente a dor inflamatória (HUNSKAAR et al., 1986).

Teste da placa quente

A latência em segundos para reação ao estímulo térmico (55±0,5 °C) na placa quente foi medida a cada 30 min., começando 60 min antes e terminando 120 min após o tratamento de grupos de oito camundongos com o EHA (1 g/kg, p.o.), com o veículo ou da administração subcutânea (s.c) de fentanil (200 µg/kg). Para evitar lesão tecidual, os animais eram mantidos na placa quente por no máximo 25 segundos. (D'AMOUR & SMITH, 1941).

Teste da peritonite induzida por carragenina

Grupos de 7 a 10 camundongos foram tratados com o veículo (p.o), com o EHA (1 g/kg, p.o) ou com a dexametasona (2 mg/kg, s.c.) e após 30 minutos (s.c.) ou 60 minutos (p.o.), injetou-se carragenina (1%, 10 µL/g) pela via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados após 4 horas e, antecedendo a coleta do fluido peritoneal, aplicou-se na cavidade peritoneal 2 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL). A contagem celular em câmara de Neubauer foi realizada após diluição do fluido em solução de Türk na proporção de 1 para 20. Os resultados foram expressos como médias de leucócitos totais ($\times 10^6/\text{mL}$), ou como percentagem de inibição da migração leucocitária (FERRÁNDIZ & ALCARAZ, 1991).

Análise Estatística

Com os resultados obtidos, foi realizada a análise de variância (ANOVA), expressando os resultados como a média mais ou menos o erro padrão. Para comparação entre as médias dos grupos experimentais foi utilizado o teste "t" de *Sudent* não pareado, admitindo diferença significativa se $p < 0,05$ (SOKAL E ROHLF, 1981).

Resultados e discussão

No teste farmacológico das contorções abdominais, o pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico dos galhos e cascas do *Croton sakaquinba* (EHA) inibiu, de forma dose-dependente, o número de contorções em 85%, 49% e 30%, nas doses de 2, 0,3 e 0,03 g/Kg respectivamente, quando comparado ao grupo experimental controle (43,8±3,7 contorções). O tratamento com a indometacina (controle positivo; 10 mg/Kg, p.o.) resultou em uma inibição de 68% no número de contorções abdominais como pode ser observado na figura 1.

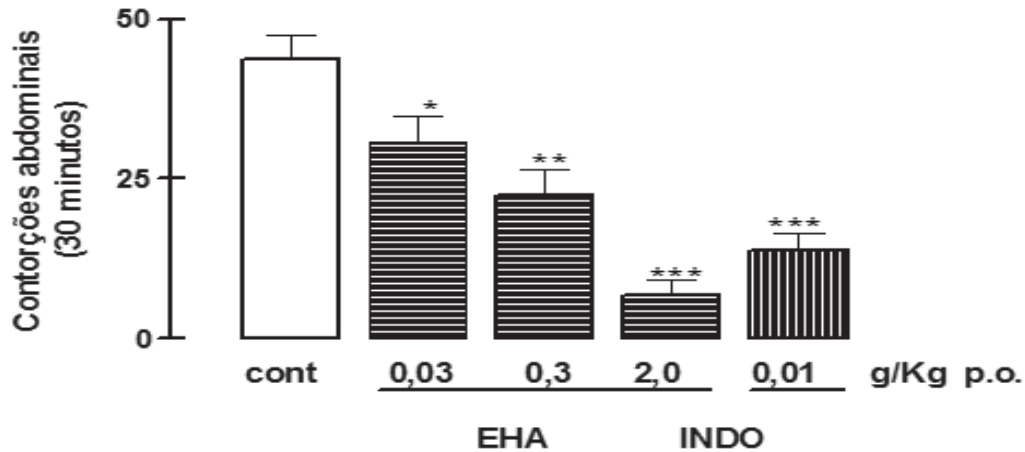


Figura 01: Contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina; 100 μ L/10g, i.p.) em camundongos previamente tratados (60 min.) pela via oral com o veículo (controle; água), com o extrato hidroalcoólico dos galhos e cascas do *Croton sakaquinha* ou com o controle positivo indometacina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão médio dos grupos experimentais (n = 8 animais). *, **, *** Diferem estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Sensível aos diferentes tipos de fármacos com atividade antinociceptiva, o teste das contorções abdominais é utilizado na investigação de novas substâncias com potencial terapêutico. Porém, devido a sua inespecificidade (sensível a drogas de ação central e a drogas de ação periférica), é insuficiente para a determinação do mecanismo responsável pela antinociceção (KOSTER et al., 1959; HENDERSHOT & FORSAITH, 1959). Através desse teste, foi possível verificar a atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico dos galhos e cascas do *C. sakaquinha* (EHA), e a utilização de diversas doses, resultando em uma inibição dose-dependente, nos permitiu a construção da curva dose-efeito, através da qual foi calculada a dose inibitória 50% (DI50) para esse extrato (246 mg/Kg). A partir desses resultados, foi utilizada a dose de 1,0 g/kg (4 x DI50) para avaliar o efeito do EHA nos modelos farmacológicos *in vivo* de atividade antinociceptiva, considerando que, nessa dose, o EHA estaria em seu efeito máximo.

Visando direcionar o estudo do mecanismo da ação antinociceptiva, foram realizados os testes da placa quente e da formalina. No teste da placa quente, não foi observada diferença significativa entre o grupo tratado com o extrato (EHA, 1 g/Kg) e o grupo experimental controle. Já o grupo controle positivo tratado com o fentanil (200 μ g/kg, s.c.) apresentou elevação significativa no tempo de reação ao estímulo térmico nociceptivo, nos instantes zero, 30 e 60 minutos, indicando com essa atividade antinociceptiva a validade do teste (Figura 02).

| Grupo | Dose | Tempo de reação (s) | |
|--------------|-----------------|---------------------|--------------------------|
| | | 1ª fase | 2ª fase |
| Controle | 10 mL/kg (p.o.) | 120,6 ± 5,0 | 134,5 ± 28,2 |
| EHA | 1 g/kg (p.o.) | 105,2 ± 6,0 | 42,0 ± 20,4 ^b |
| Indometacina | 10 mg/kg (p.o.) | 104,4 ± 5,1 | 51,5 ± 16,5 ^b |

Figura 02: Reatividade ao estímulo térmico nociceptivo avaliada no teste da placa quente (55 °C) com camundongos tratados com o veículo, com o extrato hidroalcoólico dos galhos e cascas do *Croton sakaquinha* (EHA) ou com o controle positivo fentaniil. Na ordenada, estão representados os tempos de reação dos camundongos ao estímulo térmico nociceptivo em segundos. Os símbolos e barras verticais representam as médias ± erro padrão médio dos grupos experimentais (n = 8). ** Difere estatisticamente do grupo controle (p < 0,01).

No teste da formalina (tabela 1), o pré-tratamento com o EHA (1 g/kg) reduziu a reatividade dos animais em 68% durante a segunda fase de nocicepção, quando comparado ao grupo experimental controle (134,54 ± 28,2 s). De forma semelhante, o controle positivo da 2ª fase (indometacina; 10mg/Kg) reduziu a reatividade dos animais em 62% na fase de nocicepção. Durante a primeira fase do teste (5 minutos iniciais), nenhum dos dois tratamentos influenciou a reatividade dos animais, que não diferiram estatisticamente do grupo controle (120,6 ± 5,0 segundos).

Tabela 1: Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas e galhos de *Croton sakaquinha* no teste da formalina em camundongos^a

| Grupo | Dose | Tempo de reação (s) | |
|--------------|-----------------|---------------------|--------------------------|
| | | 1ª fase | 2ª fase |
| Controle | 10 mL/kg (p.o.) | 120,6 ± 5,0 | 134,5 ± 28,2 |
| EHA | 1 g/kg (p.o.) | 105,2 ± 6,0 | 42,0 ± 20,4 ^b |
| Indometacina | 10 mg/kg (p.o.) | 104,4 ± 5,1 | 51,5 ± 16,5 ^b |

No teste da placa quente, o pré-tratamento com o EHA não produziu antinocicepção. Considerando que esse teste permite avaliar a participação de mecanismos centrais na atividade antinociceptiva (BEIRITH et al., 1998), esse resultado indica o não envolvimento de mecanismos centrais na atividade antinociceptiva do EHA, previamente observada no teste das contorções abdominais. Esse indicativo se reforça com a ausência de efeito do extrato na primeira fase de nocicepção do teste da formalina, que permite diferenciar a dor neurogênica da dor de origem inflamatória. A primeira fase da nocicepção (primeiros 5 minutos) decorre do estímulo direto do formaldeído aos nociceptores, enquanto a segunda fase (15° ao 30° minuto) é produzida pelos mediadores inflamatórios (HUNSKAAR et al., 1985, 1986 e 1987), podendo-se assim determinar a participação de mecanismos centrais ou anti-inflamatórios na antinocicepção. A diminuição da reatividade apenas na segunda fase do teste da formalina sugere o envolvimento de mecanismos anti-inflamatórios na atividade antinociceptiva do extrato.

Visando estudar o efeito do extrato em um dos componentes do processo inflamatório, a migração leucocitária, o EHA foi avaliado no teste da peritonite induzida por carragenina. Os resultados representados na tabela 2 mostram que o tratamento com o EHA (1,0 g/kg) produziu uma redução na migração leucocitária para a cavidade peritoneal de 50%, resultado semelhante ao obtido após o tratamento com o controle positivo dexametasona (2 mg/kg) que inibiu em 43,8% a migração.

Tabela 2: Efeito do extrato hidroalcolólico (EHA) das folhas e galhos de *Croton sakaquinha* no teste da peritonite induzida por carragenina em camundongos^a

| Grupo | Dose | Número total de leucócitos (x 10 ⁶) | Inibição (%) |
|--------------|------------------|--|--------------|
| Vehicle | 10 mL/kg (p.o.) | 10,6 ± 1,3 | - |
| EHA | 1,0 g/kg (p.o.) | 5,3 ± 0,7 ^b | 50,0 |
| Dexametasono | 2,0 mg/kg (s.c.) | 4,8 ± 0,8 ^b | 45,3 |

Considerando os diversos mediadores envolvidos no processo inflamatório e os mecanismos de ação dos fármacos anti-inflamatórios, esses resultados farmacológicos obtidos através da administração oral do EHA, permitem sugerir que substâncias ativas presentes nesse extrato possam bloquear a síntese ou ação de mediadores responsáveis pela quimiotaxia. Diversos fármacos anti-inflamatórios diminuem a migração leucocitária, dentre eles, os anti-inflamatórios esteroidais como a dexametasona e alguns anti-inflamatórios não-esteroidais como a indometacina (SCHIMMER & PARKER, 2001), não sendo assim possível, através desse resultado do EHA no teste da migração, estabelecer o(s) mecanismo(s) envolvido(s), reforçando, entretanto, a hipótese inicial de que a atividade antinociceptiva, evidenciada nos testes das contorções abdominais e da formalina, envolve mecanismos anti-inflamatórios (MORROW

& ROBERTS II, 2001), podendo explicar o uso popular do *Croton sakaquinha* em doenças que envolvem a dor e a inflamação. A purificação do EHA e a caracterização de seus princípios ativos permitirão uma melhor investigação dos mecanismos envolvidos nessas ações.

Referências

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur J Pharmacol**, v. 345, p. 233-245, 1998.

CARVALHO, J.C.; SILVA, M.F.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; NUNES, D.C.; LIMA, R.M.; BASTOS, J.K.; SARTI, S.J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from **Croton cajucara**. Part 1. **Planta Medica**, v.62, n.5, p.402-404, 1996.

DALBÓ, S; JÜRGENSEN, S; HORST, H ; SOETHE, D. N.; SANTOS, A.R.S.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from **Croton celtidifolius** barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacol, Biochem and Behav**, v. 85, p.317–323, 2006.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther**, v.72, p. 74–79, 1941.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M.; HIRUMA, C.A. **Plantas Medicinais da Amazônia**, São Paulo, SP: Editora UNESP, 1989. pp. 127–128.

FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents actions**, v. 32, p. 283-288, 1991.

GUERRERO, M.F.; CARRON, R.; MARTÍN, M.L.; SAN ROMAN, L.; REGUERO, M.T. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from **Croton schiedeianus** Schlecht in rats. **J Ethnopharmacol**, v.75, n.1, p.33-36, 2001.

HENDERSHOT, L.C.; FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenyquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesic and nonanalgesics. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 125, p. 237-240, 1959.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14: p.69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; BERGER, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.



HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

KALIL FILHO, A. N.; KALIL, G.P.C.; LUZ, A.I.R. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da amazônia brasileira para uso humano. Comunicado técnico-EMBRAPA, nº 50, p.1-4, 2000.

KOSTER, R.; ANDERSON, M; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v.18, p. 412, 1959.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MAGALHÃES, P.J.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; DUARTE, G.P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, v.65, n.6, p.553-557, 1999.

LAZARINI, C.A.; UEMA, A.H.; BRANDÃO, G.M.; GUIMARÃES, A.P., BERNARDI, M.M. *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral model related to depression and anxiety. **Phytomedicine**, v.7, n.6, 477-481, 2000.

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

MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.R.; GONÇALVES, M.J.; VILA, R.; TOMI, F.; ADZET, T.; DA CUNHA, A.P.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of **Croton stellulifer**, an endemic species from S. Tomé e Príncipe. **Planta Medica**, v.66, n.7, p.647-650, 2000.

MORROW, J.D.; ROBERTS II, L.J. Lipid-driven autacoids: Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. In Harman, J.G., Limbird, L.E. (eds) **Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th edn. New York: McGraw Hill, p. 669-683, 2001.

PERES, M.T.; DELLE MONACHE, F.; CRUZ, A.B.; PIZZOLATI, M.G.; YUNES, R.A. Chemical composition and antimicrobial activity of **Croton urucurana** Baillon (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, v.56, n.3, p.223-226, 1997.

PIACENTE, S.; BELISARIO, M.A.; DEL CASTILLO, H.; PIZZA, C.; DE FEO, V. **Croton ruizianus**: platelet proaggregating activity of two new pregnane glycosides. **J Nat Prod**, v.61, n.3, p.318-322, 1998.

PORTER, D. G. Ethical scores for animal experiments. **Nature**, v. 356: n. 101-102, 1992.

COSTA-E-SOUSA, R. H.; SILVEIRA, J. W. S.; CORTES, W. S. ...

ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; KUPTIYANUWAT, N.; VILAIVAN, T.; NGAMROJNAVANICH, N.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PHUTHONG, S. Cytotoxic labdane diterpenoids from **Croton oblongifolius**. *Phytochemistry*, v.56, n.1, p.103-107, 2001.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In Harman, J.G., Limbird, L.E. (eds) **Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th edn. New York: McGraw Hill, p. 1649-1677, 2001.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The principles and Practice of Statistics**, 2nd. Edn., W. H. Freeman, New York, pp. 859, 1981.

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

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16: n.109-110, 1983.

ZIMMERMANN, M. - Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. **Acta Physiol. Scand. Suppl.** v. 554: n. 221-233, 1986.