

Perfil Fitoquímico y Farmacológico de *Croton micans* Sw. Una Visión General

Phytochemical and Pharmacological Profile of *Croton micans* Sw. An Overview

ALÍRICA I SUÁREZ^{a*}, ELSA MATEU^a, KATIUSKA CHÁVEZ^a, REINALDO S COMPAGNONE^b,
GIOVANNINA ORSINI^a, STEPHEN TILLET^a, RICARDA RIINA^c, WILMER ALCAZAR^a,
MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN^a, FRANCISCO ARVELO^d Y ANITA ISRAEL^a

Resumen

Se presentan los resultados del estudio fitoquímico y farmacológico de la planta *Croton micans* Sw (Euforbiaceae). La investigación química de los extractos orgánicos obtenidos de flores, hojas y tallos de *Croton micans*, condujo al aislamiento e identificación de 18 compuestos, siete de los cuales han sido reportados por primera vez en la literatura de productos naturales: dos diterpenos de tipo 3,4-seco-*ent*-kaureno, cinco dímeros con estructuras de 3,4-seco-*ent*-kaurenos, tres kauranos, tres esteroides triterpénicos, dos sesquiterpenos, un monoterpeneo, un flavonoide y un ácido graso. Se identificó igualmente la composición del aceite esencial obtenido de flores y hojas, encontrándose como compuesto mayoritario el acetato de fenchilo. La evaluación farmacológica permitió determinar los efectos tóxicos del extracto acuoso sobre animales de experimentación y con ellos se obtuvo la dosis tóxica cincuenta (DT₅₀). Igualmente, se determinó su acción sobre la musculatura lisa del íleon de cobayo, en la respuesta cardiovascular, su actividad analgésica y antihistamínica así como la acción citotóxica de metabolitos aislados sobre células tumorales humanas.

Palabras clave: *Croton micans*, fitoquímica, farmacología, metabolitos secundarios, citotoxicidad.

Abstract

This review presents the results of a phytochemical and pharmacological study of the plant *Croton micans* Sw. Chemical investigation of organic extracts obtained from *Croton micans* flowers, leaves and stems, led to isolation and identification of 18 compounds, seven of them reported for the first time in natural products literature: two 3,4-seco-*ent*-kaurene diterpenes, five 3,4-seco-*ent*-kaurene dimers, three *ent*-kaurenes, three steroids with triterpene skeletons, two sesquiterpenes, a monoterpene, a long chain acid and a flavonoid. Composition of essential oil obtained from flowers and leaves was also identified, fenchil acetate being the major compound. Pharmacological evaluation allowed determining toxic effects of *Croton micans* aqueous extract on experimental animals and the TD₅₀ were determined. In addition, the effects on guinea pig ileal smooth muscle, cardiovascular response, and analgesic and antihistamine activity were also determined. Cytotoxic activity of organic extracts and isolated metabolites on human tumor cells are also shown.

Key words: *Croton micans*, phytochemistry, pharmacology, secondary metabolites, cytotoxicity.

Introducción

El género *Croton* pertenece a la familia Euforbiaceae, una de las más grandes del reino vegetal; está formado por hierbas, arbustos, árboles y, aunque menos comunes, algunos se presentan como lianas.

Croton es el género más grande de la subfamilia *Crotonoideae* (Caruzo y col., 2011). Se han reportado aproximadamente unas 1.300 especies diseminadas en las regiones cálidas del planeta, especialmente en América del Sur y en África; en Venezuela se han iden-

^a Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

^b Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

^c University of Michigan Herbarium and Department of Ecology and Evolutionary Biology, Ann Arbor, Michigan, USA.

^d Instituto de Biología Experimental (IBE), Universidad Central de Venezuela.

tificado 80 especies (Berry, 1999). Las plantas están recubiertas por pelos estrellados o escamosos, y tienen hojas enteras, dentadas o lobuladas. Las plantas son monoicas o dioicas y sus flores están reunidas en espigas terminales o axilares.

Los estudios fitoquímicos realizados sobre un grupo considerable de especies, han conducido al aislamiento de esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas, y una gran variedad estructural de diterpenos con esqueleto carbonado tipo labdano, kaurano, cleistanano, crotofalano así como clerodano, siendo éste último el más abundante. Muchas especies son ricas en mono y sesquiterpenos (Junior y col., 2006), y en recientes reportes se señala la presencia de péptidos cíclicos (Quintyne-Walcott y col., 2007; Mehmood y Malik, 2010).

Varias especies de *Croton*, contienen un látex rojo viscoso el cual es utilizado ampliamente en la medicina tradicional de Sur América para el tratamiento de heridas, inflamación, infecciones, diarreas y cáncer (Cai y col., 1993). La savia de la especie *C. palanostigma* contiene un alcaloide llamado taspina, el cual es el principio activo responsable de las propiedades antiinflamatorias, así como de sanar heridas y de su actividad biológica como agente antitumoral (Sandoval y col., 2002). Muchas especies de *Croton* son utilizadas con propósitos medicinales específicos, por ejemplo *C. zehntneri* (Craveiro y col., 1978; Oliveira y col., 2002) y *C. cajucara* (do Socorro y col., 2003) son comúnmente utilizadas en Brasil para tratar problemas gastrointestinales y como anti-parasitario, *C. lechleri* es empleado en toda Sur América para el tratamiento de la inflamación, de úlceras gástricas, del cáncer y para cicatrizar heridas (Cai y col., 1993). *C. nepetaefolius* se usa en la medicina folclórica de Brasil como antiespasmódico (Abdon y col., 2002). Los usos, la química y la farmacología de una gran cantidad de especies han sido y continúan siendo reportadas (Salatino y col., 2007).

En Venezuela, la corteza de *C. malambo* se recomienda para el tratamiento de enfermedades tales como: diabetes, diarreas, reumatismo, úlcera gástrica, así como antiinflamatorio y analgésico. Un extracto acuoso de *C. malambo* mostró actividad antinociceptiva en ratas (Suárez y col., 2003). *C. cuneatus* es una planta medicinal utilizada por los nativos del Amazonas para tratar problemas gastrointestinales, y la inflamación (Webster y col., 1999); un extracto acuoso de las partes aéreas de dicha planta mostró propiedades antiinflamatorias en animales de experimentación (Suárez y col., 2006); tres alcaloides con estructura glutarimídica, aislados de hojas y tallos de esa planta, han demostrado ser los responsables de la acción antiinflamatoria y antioxidante (Mijares y col., 2012).

Dentro de las actividades farmacológicas experimentalmente comprobadas para el género *Croton* se encuentra su potencial como agente antidiabético (Torrico y col., 2007; Okokon y col., 2006).

Croton micans Sw., es un arbusto que crece en la zona norte-costera de Venezuela, y hasta el presente no ha sido documentado nombre común ni usos terapéuticos para esta especie en nuestro país (Berry y col., 2005). Sin embargo, en Brasil, a la especie *Croton micans* Müll. Arg., conocida como *alecrim-de-vaqueiro* se le atribuyen propiedades medicinales tales como: tratamiento para problemas cardíacos, influenza y como sedante (Agra y col., 2008). Por ello, y debido a la variada actividad y riqueza estructural de los compuestos de especies del género *Croton* y el escaso conocimiento de la actividad biológica y composición química de la especie *C. micans* Sw., en la presente revisión se presentan resultados tanto desde el punto de vista químico como farmacológico que nos permiten señalar que la especie *C. micans* Sw., puede ser considerada como otra de las especies del género con propiedades medicinales y que presenta nuevos compuestos con actividad terapéutica en analgesia, efectos cardiovasculares, antihistamínicos, anticolinérgicos y citotóxicos.

Química

El aislamiento y purificación de los compuestos aislados de los diferentes extractos de las flores, hojas y ramas de *C. micans* fue realizada por diferentes técnicas cromatográficas y su caracterización e identificación por medio de técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono (RMN ¹H y RMN ¹³C), DEPT 135, HMBC, HMQC, NOESY, IR y por espectrometría de masas (EM).

En el estudio fitoquímico de las flores, los diterpenos de tipo 3,4-seco-*ent*-kaurenos caracasina (**1**) y el ácido de caracasina (**2**), fueron los compuestos mayoritarios; los mismos se reportaron como estructuras nuevas en la literatura de productos naturales (Suárez y col., 2009). Adicionalmente, se aisló e identificó los sesquiterpenos: óxido de cariofileno (**3**) y espatulenol (**4**), el monoterpeno 3,7-dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol (**5**), los esteroides estigmasterol (**6**) y β -sitosterol (**7**), el flavonoide tilirosido (**8**) y el ácido palmítico (Chávez, 2007).

De los extractos orgánicos obtenidos por extracción de las hojas se aislaron los seco-*ent*-kaurenos **1** y **2** conjuntamente con los ya conocidos diterpenos 16 α , 17- β -diol-*ent*-kaureno (**9**), kaurenal (**10**) y kaurenol (**11**). En los extractos de las hojas igualmente se caracterizó los esteroides β -sitosterol (**6**) y el estigmasterol-4-ene-2-ona (**12**) (Mateu, 2011). El estudio de los

extractos orgánicos obtenidos de las ramas permitió el aislamiento e identificación de cinco nuevas estructuras diterpénicas diméricas: ácido micansinoico (**13**), ácido isomicansinoico (**14**) y los dimetil (**15**), monoetil (**16**) y monometil (**18**) ésteres del ácido micansinoico (Mateu y col., 2012) (Figura 1). Los extractos acuosos polares de hojas y tallos mostraron ser ricos en taninos.

ACEITES ESENCIALES Y SUS CONSTITUYENTES

La evaluación fitoquímica de la especie *C. micans*, incluyó el aislamiento por hidro-destilación y la caracterización por análisis de Cromatografía CG-FID y cromatografía gases-masas CG-EM, de los aceites esenciales obtenidos de flores y hojas. Los análisis revelaron 67 compuestos en la composición del aceite de las flores, cuyos principales componentes fueron: ace-

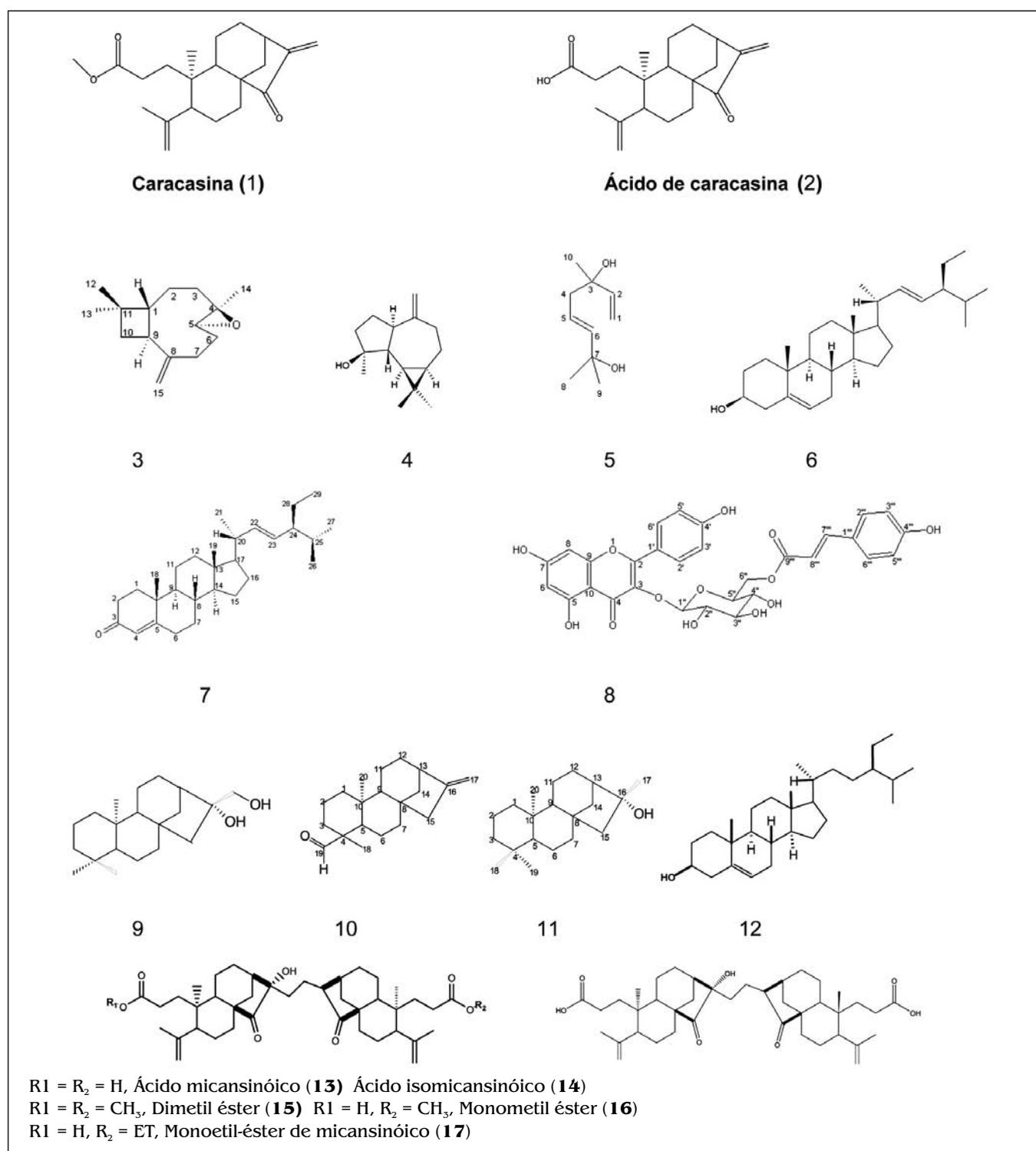


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados de *C. micans*

tato de fenchilo (41,6%), α -cariofileno (12,6%), β -cubebeno (5,0%), β -cariofileno (5,5%), α -cubebeno (5,3%), β -elemeno (4,7%) y valenceno (4,6%). En el aceite de las hojas se identificó al acetato de fenchilo (25,3%), α -cariofileno (20,7%), α -selineno (12,8%) y al β -bourbano (9,3%) como los componentes mayoritarios (Tabla I) (Compagnone y col., 2010).

Tabla I
Composición de los aceites esenciales de *Croton micans*

Compuesto	RI	Área de pico (% <i>C. micans</i>)		Identificación
		Hojas	Flores	
α -thujeno	925	0.1	0.2	RI, MS
α -pineno	936	0.3	0.1	RI, MS
α -fencheno	945	0.6	1.5	RI
Sabineno	962	0.1	0.3	RI, MS
Verbeneno	965	0.3	0.1	RI, MS
β -myrceno	972	0.2	1.3	RI, MS
β -pineno	986	0.9	0.2	RI, MS
δ -3-careno	1010	0.2	0.1	RI, MS
Limoneno	1018	2.9	1.3	RI
p-Cimeno	1030	0.7	1.1	RI, MS
δ -terpineno	1063	nd	0.1	RI, MS
Fenchona	1068	0.3	0.4	RI, MS
Linalool	1091	2.2	1.5	RI, MS
α -fenchol	1104	2.0	0.1	RI, MS
β -fenchol	1110	0.6	0.2	RI, MS
Terpinen-4-ol	1158	1.1	1.2	RI, MS
Norborneol	1167	nd	tr	RI, MS
α -Terpineol	1190	0.5	tr	RI, MS
Myrtenal	1198	0.3	0.1	RI, MS
Trans-carveol	1212	nd	0.2	RI, MS
α -Acetato de fenchilo	1223	25.3	41.6	RI, MS
Geraniol	1242	nd	0.1	RI, MS
Pulegona	1234	0.2	0.2	RI
Thymol	1291	nd	tr	RI, MS
Carvacrol	1293	0.1	nd	RI
Eugenol	1347	1.1	tr	RI, MS
α -cubebeno	1380	1.8	5.3	RI, MS
β -bourbano	1382	9.3	nd	MS
β -cubebeno	1386	2.7	5.0	RI, MS
β -elemeno	1392	0.5	4.7	RI, MS
Metileugenol	1400	nd	0.1	RI, MS
β -caryophylleno	1422	0.7	5.5	RI, MS
α -humuleno	1442	nd	1.1	RI, MS
α -caryophylleno	1448	20.7	12.6	RI, MS
Desconocido	1459	nd	nd	--
Germacreno-D	1467	nd	1.1	RI, MS
Alloaromadendreno	1474	0.1	nd	RI, MS
Veratral	1480	0.4	0.2	RI, MS

Tabla I (continuación)

Compuesto	RI	Área de pico (% <i>C. micans</i>)		Identificación
		Hojas	Flores	
Ar-curcumeno	1482	nd	nd	MS
Valenceno	1485	2.9	4.6	RI, MS
α -Selineno	1501	12.8	nd	RI, MS
Metiliso Eugenol	1509	tr	tr	RI, MS
β -bisaboleno	1509	0.2	tr	RI, MS
Bisaboleno	1520	nd	0.3	RI, MS
δ -Cadineno	1526	0.2	tr	RI, MS
Calameneno	1532	tr	tr	RI, MS
Elemol	1540	0.2	0.2	RI, MS
Ledol	1545	0.2	tr	RI, MS
Desconocido	1548	1.0	0.1	---
Elemicina	1550	1.6	1.1	RI, MS
λ -Eudesmol	1560	tr	0.2	RI, MS
Espathulenol	1565	0.9	0.1	RI, MS
Globulol	1580	0.5	tr	RI, MS
Óxido de caryophyllene	1587	0.2	1.1	RI, MS
Humulene epóxido	1593	nd	tr	RI, MS
3,4,5-Trimetoxiben-zaldehído	1623	0.1	nd	RI, MS
Desconocido	1595	0.1	0.1	RI, MS
Cedrol	1638	0.1	tr	MS
Carotol	1649	0.1	nd	RI, MS
β -bisabolol	1653	0.1	0.3	RI, MS
Isoelmicine	1656	0.2	tr	RI, MS
Agarospírol	1664	tr	tr	RI, MS
α -bisabolol	1667	nd	0.1	RI, MS
Cubenol	1669	0.1	nd	RI, MS
α -Cadinol	1672	tr	2.1	RI, MS
τ -Cadinol	1673	nd	0.1	RI, MS
δ -Cadinol	1684	0.1	tr	RI, MS
α -11-Eudesmeno	1688	nd	0.2	---
Desconocido	1690	0.2	0.3	RI, MS
Selina-4-11-diene	1692	nd	0.2	RI, MS
Ledenol	1761	0.2	tr	RI, MS
α -Cyperona	1783	0.1	0.3	
Total		97.3	98.9	

nd=no detectado; tr= área de pico < 0,05

ACTIVIDAD TOXICOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA

TOXICIDAD AGUDA

La administración del extracto acuoso de las hojas de *C. micans* causó varios efectos tóxicos en ratones tratados intraperitonealmente con dosis crecientes (4, 8, 16, 32 y 64 mg/Kg, i.p.) de dicho extracto. En efecto, destaca la presencia de diarrea e irritación visceral

evidenciada por la contorsión del abdomen, efecto conocido como «síndrome de contorsión», asociado con toxicidad intraperitoneal. Este efecto apareció en los primeros 60 minutos post-inyección y mostró un perfil dependiente de la dosis. La dosis tóxica 50 (DT_{50}) para este efecto (Litchfield y Wilcoxon, 1949), fue de 16 mg/kg, con límites de confianza al 95% entre 7,19 mg/kg y 35,60 mg/kg. Asimismo, las curvas tiempo-efecto para las distintas dosis evaluadas del extracto, mostraron un tiempo de efecto pico (TEP) de 30 minutos (Figura 2).

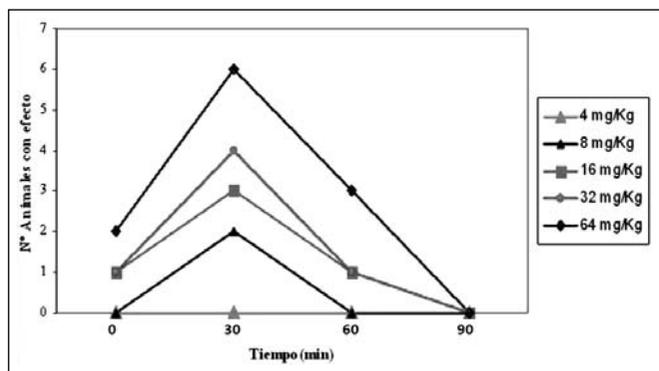


Figura 2. Curva tiempo-efecto del efecto tóxico (síndrome de contorsión) del extracto acuoso de hojas de *Croton micans* administrado en dosis crecientes.

Aún más, se observaron tres aspectos interesantes en el estudio de la toxicidad aguda del extracto acuoso de esta planta: la intermitencia del fenómeno evaluado, la desaparición del mismo a los 90 minutos y la inexistencia de efectos letales a las dosis evaluadas, lo cual no permitió obtener la dosis letal 50 (DL_{50}). Estas características señalan una baja toxicidad aguda del extracto. Estos hallazgos son similares a los reportados previamente en los estudios de la toxicidad aguda del extracto acuoso de hojas de *C. cuneatus* (Suárez y col., 2006), en el cual se reporta la aparición del síndrome de contorsión como el efecto tóxico más resaltante, con una $DT_{50} = 103$ mg/kg, el cual resultó ser mucho mayor que la obtenida para *C. micans*, mientras que es coincidente con el TEP de 30 minutos. Adicionalmente, se ha descrito la toxicidad aguda de un extracto de corteza de *C. malambo* reportándose conducta estereotipada como el efecto tóxico más notorio, con una DT_{50} de 12,3 mg/kg y un TEP de 10 minutos (Suárez y col., 2003).

ACTIVIDAD SOBRE LA MUSCULATURA LISA DEL ÍLEON DE COBAYO

La presencia de diarrea como efecto tóxico, después de la administración en el animal entero del extracto acuoso de las hojas de *C. micans*, sugirió una posible actividad estimulante del extracto sobre la mus-

culatura lisa intestinal. Por ello, se evaluó la actividad sobre la musculatura lisa del íleon aislado de cobayo, una preparación que carece de vías aferentes (Perry, 1968). Nuestros hallazgos muestran que el extracto acuoso de hojas de *C. micans* en el íleon aislado de cobayo, no fue capaz de activar la musculatura lisa intestinal (Figura 3). Esto sugiere que los efectos tóxicos intestinales observados *in vivo* (diarrea) y el síndrome de contorsión no se relacionan con la activación directa de los receptores de la musculatura lisa, sino con la actividad refleja mediada por el sistema nervioso parasimpático en respuesta a la irritación peritoneo-visceral que produce el extracto. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos, donde se evaluó la actividad de los extractos de *C. malambo* y *C. cuneatus* sobre el íleon aislado de cobayo (Suárez y col., 2003, 2006), o del aceite de *Croton* administrado intraperitonealmente que produjeron síndrome de contorsión en ratones debido a una intensa irritación del mesenterio abdominal (Pol y col., 1994).

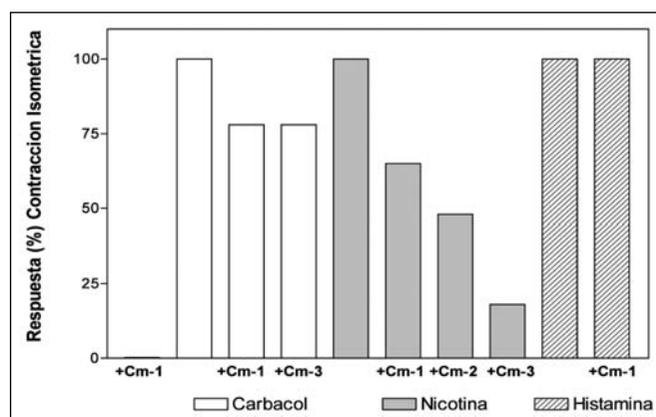


Figura 3. Efecto del extracto acuoso de *Croton micans* sobre la contracción isométrica inducida por agonistas en el íleon aislado de cobayo. Cm: *Croton micans* a dosis crecientes (100 μ g/ml, 1 y 100 mg/ml). Carbacol: 0,01 μ g/ml; Nicotina: 2,0 μ g/ml e histamina: 0,2 μ g/ml.

Además del efecto directo del extracto sobre la musculatura lisa del íleon aislado de cobayo, se estudió el posible efecto del extracto acuoso de *C. micans* sobre la acción estimulante (contracción isométrica) de agonistas como el carbacol, la nicotina y la histamina. Así, el extracto causó una disminución significativa, dependiente de la dosis, de la contracción isométrica inducida por nicotina sobre el íleon aislado de cobayo (Figura 3), lo que sugiere un posible efecto bloqueante ganglionar del extracto. Por otra parte, se observó un efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por carbacol en el íleon aislado de cobayo. En este caso la inhibición fue menos marcada y no se observó dependencia de la dosis administrada. El carbacol es un agonista colinérgico, resistente a la hidrólisis por la colinesterasa, con predominio de acciones muscaríni-

cas, aunque posee considerable actividad nicotínica, particularmente sobre los ganglios del sistema nervioso autónomo (Brown y Taylor, 2001). Es probable que el efecto inhibitorio observado, se deba al bloqueo del componente nicotínico ganglionar de la contracción muscular inducida por carbacol, y no al bloqueo de los receptores muscarínicos presentes en la musculatura lisa del íleon de cobayo. El extracto no alteró la respuesta del íleon a la histamina.

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ ESPONTÁNEA Y LA CONDUCTA ESTEREOTIPADA EN RATAS

Con el fin de evaluar un posible efecto del extracto acuoso de *C. micans* sobre el sistema nervioso central, se estudió su acción sobre la actividad locomotriz espontánea y la conducta estereotipada, en una caja de actividad (Letica, Modelo LE 8811) utilizando la escala de Fuenmayor y Díaz (1984). Nuestros hallazgos mostraron que el extracto acuoso de hojas de *C. micans* fue incapaz de afectar la actividad locomotriz espontánea y la conducta estereotipada en ratas a las dosis evaluadas (2; 4 y 5,3 mg/Kg, i.p.), lo que indica que el extracto no ejerce efectos centrales *in vivo*.

EFFECTO SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO

Con el fin de establecer un posible efecto sobre el metabolismo hepático del extracto acuoso de hojas de *C. micans* sobre el metabolismo hepático, se evaluó su efecto en animales de experimentación tratados con una dosis correspondiente a la mitad de su DT_{50} (16 mg/Kg), dos veces al día (BID, 9:00 am y 4:00 pm) durante cuatro días consecutivos, por vía intraperitoneal (i.p.). Al final del tratamiento, se procedió a la extracción y determinación del peso de los hígados, y a la preparación del homogeneizado de hígado según el procedimiento descrito por Marshall y McLean (1969). Posteriormente, 1 ml del homogeneizado fue diluido en 9 ml de buffer fosfato pH 7,4, teniendo ahora una dilución al 1%, la cual se utilizó para la determinación de las proteínas totales por el Método de Lowry (1951).

Los resultados mostraron que el extracto acuoso de *C. micans* no presenta actividad sobre el metabolismo hepático microsomal en ratas tratadas durante 4 días con dosis de 8 mg/Kg, BID i.p., ya que el peso del hígado y la concentración de proteínas totales fueron similares a los del control (Figura 4). Estos resultados contrastan con los obtenidos con el fenobarbital, agente inductor del metabolismo hepático el cual incrementó significativamente tanto el peso del hígado como la concentración de proteínas hepáticas y los obtenidos con la cimetidina, un inhibidor del metabolismo, el cual redujo el peso hepático (Figura 4).

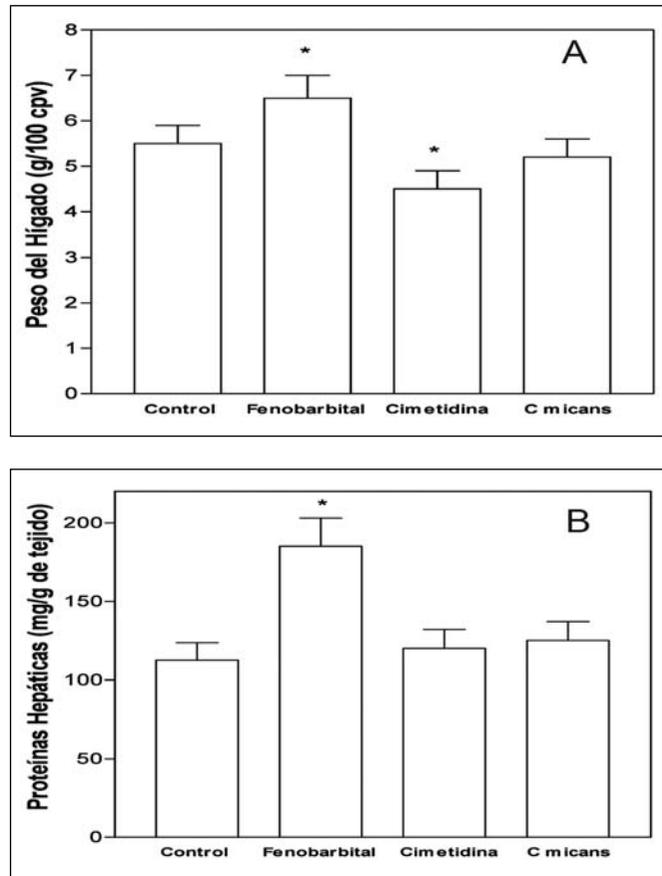


Figura 4. Efecto de diferentes tratamientos sobre el peso del hígado de la rata (Panel A) y sobre el contenido de proteínas hepáticas totales (Panel B). (N=24, 6 por grupo). Tratamientos: Control: solución fisiológica (NaCl 0,9%); Fenobarbital sódico (40 mg/Kg); Cimetidina (100 mg/Kg); Extracto acuoso de hojas de *Croton micans* (16 mg/Kg). * $p < 0,05$.

ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CROTON MICANS*

Para determinar el posible efecto analgésico del extracto acuoso de *C. micans* se empleó la prueba de la retirada de la cola en ratones (Davies y col., 1946). Los animales de experimentación fueron seleccionados de acuerdo al tiempo de respuesta (retirada de la cola) al estímulo de calor radiante, descartándose aquellos animales que tenían un tiempo de respuesta mayor que seis (6) segundos. El estímulo nociceptivo de tipo térmico fue aplicado en la cola de los ratones utilizando un analgesímetro (LETICA, Scientific Instruments, LE 7106, España), para determinar el tiempo que tarda el animal en retirarla (período de latencia). El ácido acetilsalicílico (ASA), un analgésico y antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y la morfina (MOR), un opioide, se utilizaron como analgésicos de referencia. El período de latencia fue medido a los 15, 30, 60, y 90 minutos después de la administración de los tratamientos. El tiempo máximo de exposición al estímulo térmico fue de 15 segundos.

Los resultados muestran que el extracto acuoso de *C. micans* es efectivo como analgésico, ya que el tiempo de latencia de retirada de la cola, en los animales tratados con el extracto de *C. micans*, fue significativamente mayor en todos los tiempos evaluados, con respecto al control y comparables con los obtenidos en los grupos tratados con el ácido acetilsalicílico (ASA) y menor que aquellos obtenidos con la morfina (Figura 5).

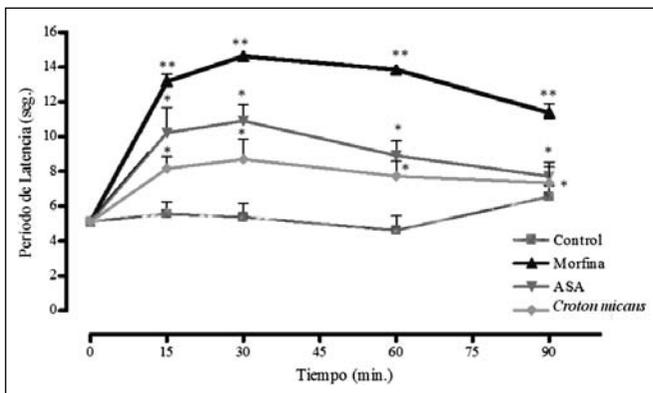


Figura 5. Efecto del extracto acuoso de hojas de *C. micans* sobre el tiempo de latencia de retirada de la cola en ratones (Método térmico). La nocicepción térmica fue determinada por el ensayo de retirada de la cola. Los animales seleccionados se dividieron en cuatro grupos (N=7 c/u) y recibieron los siguientes tratamientos: Control (NaCl 0,9%, i.p.); Extracto acuoso de *C. micans* [1/2DT₅₀ (16 mg/kg, i.p.)]; Ácido acetilsalicílico (ASA) (200 mg/kg, p.o.) y Morfina (MOR) (3 mg/kg, i.p.). *p<0,05; **p<0,01 comparado con el grupo control.

Estos hallazgos son similares a los reportados para la especie *C. malambo*, la cual mostró un efecto analgésico superior al de la aspirina y menor que el de la morfina en ratones tratados por vía intraperitoneal con el extracto acuoso de la corteza, a la dosis de 6 mg/Kg, ya que prolongó el tiempo de retirada de la cola ante el estímulo térmico (TEP: 90 min.) (Suárez, 2000). Esto indica que ambas especies, *C. malambo* y *C. micans*, comparten propiedades analgésicas junto con otras especies como *C. celtidifolius*, planta que abunda en el sur de Brasil, la cual mostró un efecto analgésico dependiente de la dosis (10-300 mg/Kg, p.o.) en el ensayo de dolor inducido por la formalina en ratones, reduciendo significativamente la respuesta nociceptiva de lamido en la pata posterior derecha (Nardi y col., 2006). De la misma manera, los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas de *C. cajucara*, de la amazonia brasilera, ejercieron un efecto antinociceptivo en ratones tratados por vía oral, a las dosis de 100 y 200 mg/Kg (Campos y col., 2002). De igual forma, el aceite esencial de *C. nepetaefolius*, especie oriunda del noreste de Brasil, administrado oralmente en ratones, produjo un incremento significativo en el período de latencia, obser-

vado en la prueba de la plancha caliente, a las dosis de 30 y 300 mg/Kg (Abdon y col., 2002). Aún más, se encontró una notable acción antinociceptiva del aceite esencial de *C. zehntneri* (300 mg/Kg, p.o.) en ratones, mediante la prueba de dolor inducido por la formalina y la prueba de la plancha caliente (Oliveira y col., 2002). Toda esta evidencia indica, sin lugar a dudas, que las diferentes especies de *Croton* evaluadas presentan uno o varios compuestos de alto valor farmacológico, desde el punto de vista analgésico. Se hace necesario entonces estudios adicionales a fin de obtener y caracterizar los compuestos responsables de esta actividad.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

El efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las hojas de *C. micans* se evaluó utilizando el método del edema inducido por carragenina en la pata de la rata, descrito por Bhatt y col. (1977), a la dosis de 16 mg/Kg i.p. La inyección intraplantar de la carragenina provocó un edema significativo en la pata de la rata del grupo control. Sin embargo, no se observó actividad antiinflamatoria significativa inducida por el extracto acuoso de *C. micans*, obteniéndose solamente un 14% de inhibición del edema inducido por la carragenina en la pata trasera de rata, a los tiempos evaluados: 1, 3 y 5 horas post administración de la λ -carragenina (Figura 6).

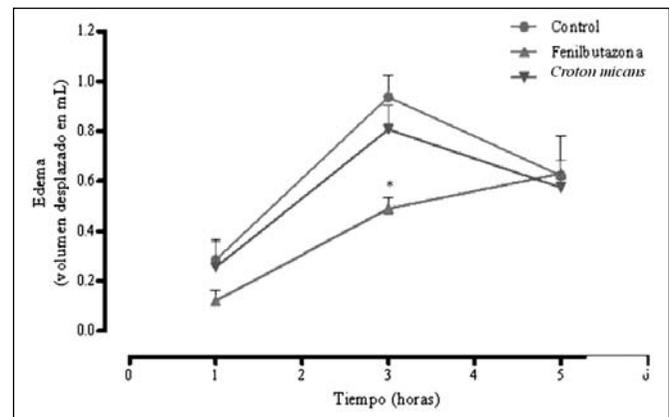


Figura 6. Efecto del tratamiento y del extracto acuoso de hojas, sobre el edema inducido por la λ -carragenina en la pata trasera de rata. Grupos de tratamiento: control (vehículo), fenilbutazona (FBZ) y *C. micans*, a la 1, 3 y 5 horas post-carragenina. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. *p<0,01, comparado con el grupo control.

ACTIVIDAD SOBRE LA RESPUESTA CARDIOVASCULAR FRENTE AL ESTÍMULO ELÉCTRICO PLANTAR EN LA RATA

Para evaluar la actividad del extracto de *C. micans* sobre el sistema cardiovascular, se utilizó el modelo de estrés agudo inducido por el estímulo eléctrico plantar (EEP) en la rata, un método que consiste en so-

meter a los animales en experimentación a estrés mediante descargas eléctricas en la zona plantar. El estímulo (EEP) provoca un incremento significativo de los niveles plasmáticos de norepinefrina y epinefrina (Kvetnansky y Mikulaj, 1970), es decir, es un modelo experimental de estrés agudo que estimula la actividad del sistema simpático-adrenal y que se refleja en incrementos de la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial media (PAM) (Cierco e Israel, 1994).

Tal y como se muestra en la figura 7, el estímulo eléctrico plantar (1Hz) incrementó significativamente la presión arterial media y la frecuencia cardíaca. El incremento sobre el valor basal de la presión arterial media inducido por el estímulo eléctrico plantar fue de 35 ± 3 mmHg. La administración intragástrica del extracto acuoso de las hojas de *C. micans* no alteró significativamente la presión ni la frecuencia cardíaca basales. Sin embargo, el extracto acuoso de las hojas de *C. micans* redujo significativamente la respuesta presora al estrés eléctrico plantar ($p < 0,01$) sin alterar la respuesta de la frecuencia cardíaca. Es interesante que los efectos observados fueron similares a los observados por el antagonista del receptor AT_1 de la angiotensina, el valsartán, un agente antihipertensivo de referencia (Figura 7). Estos hallazgos abren la posibilidad del empleo de compuestos derivados de *Croton micans* como potenciales agentes antihipertensivos y anti-estrés.

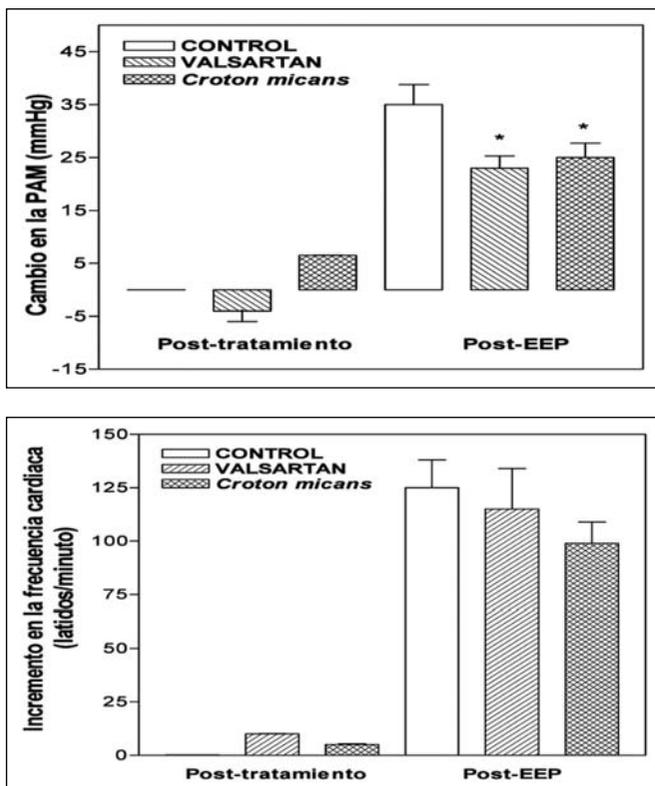


Figura 7. Efecto del extracto acuoso de *Croton micans* sobre el cambio en la presión arterial media (arriba) y sobre la frecuencia cardíaca (abajo); basal (post-tratamiento) y en respuesta al estímulo eléctrico plantar (1 Hz) (post-EEP) en ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control.

ACTIVIDAD ANESTÉSICA LOCAL

Se evaluó la actividad anestésica local del extracto acuoso de *C. micans* en cobayos, mediante el método descrito por Bulbring y Wajda (1945) y modificado por Luduena y Hoppe (1958), encontrándose que el extracto acuoso de *C. micans* no mostró efecto anestésico local a las concentraciones usadas (0,25; 0,50; 0,75 y 1 % p/v).

ACTIVIDAD ANTIHISTAMÍNICA

La actividad antihistamínica, del extracto acuoso de hojas de *C. micans*, fue evaluada mediante el método de inducción de broncoespasmo en cobayos mediante un aerosol de histamina (Armitage y col., 1961; Stone y col., 1961). Los resultados mostraron que a la dosis de 8 mg/Kg, el extracto acuoso de hojas de *C. micans* aumentó significativamente el «tiempo de respuesta» al comparar este efecto con el grupo control ($p < 0,001$). Por otra parte, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto del extracto vegetal en estudio y la difenhidramina, antihistamínico de referencia ($p = 0,102$). En términos de porcentaje de protección ($(1 - T1/T2) \times 100$) y la potencia antihistamínica, el extracto acuoso de las hojas de la planta exhibió una potencia de 68,5% respecto a la difenhidramina que protegió a los cobayos del broncoespasmo inducido por la histamina en un 100% (Figura 8).

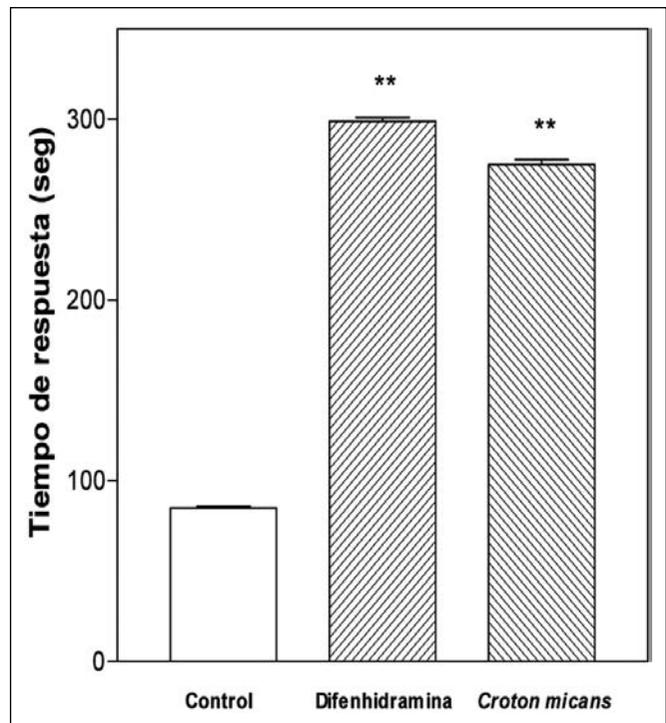


Figura 8. Efecto del tratamiento sobre el tiempo requerido para inducir el broncoespasmo en cobayos sometidos a una atmósfera de histamina 0,5% p/v. ** $p < 0,01$ comparado con el control.

Es importante destacar que por primera vez se reporta la existencia de actividad antihistamínica en un extracto de una planta del género *Croton*. De manera interesante, se observó que cuando se evaluó el efecto del extracto sobre la musculatura lisa del íleon aislado de cobayo, no se evidenció antagonismo frente a la histamina, lo cual pudo deberse a que la concentración ensayada en el baño para órgano aislado (100 µg/mL) no fue suficiente para bloquear el efecto contráctil de la histamina. Por otra parte, se sabe que el músculo liso bronquial de los cobayos es exquisitamente sensible a la histamina; por ende, en el modelo de estimulación directa de las vías respiratorias utilizado, se espera que se pueda observar más claramente el posible efecto antihistamínico de un determinado agente. Experimentos *in vitro* han demostrado que existen diferencias entre los tipos de interacción de los antagonistas H₁ con los receptores de histamina localizados tanto en el íleon como en la tráquea del cobayo (Skidgel y Erdős, 2007). Así, en términos del antagonismo competitivo ejercido por la difenhidramina, en el íleon aislado de cobayo, se reportó un pA₂ = 7,8, mientras que en tiras de tráquea de cobayo, se observó un valor diferente, pA₂ = 7,0, indicando una ligera variación en la afinidad del antagonista por su sitio de unión quizás dependiendo de la localización anatómica de los receptores, pero se ha demostrado que en ambos tejidos los receptores de histamina son del tipo H₁, y que quizás estén interviniendo diferentes mecanismos para este antagonismo (Labrid y col., 1977).

Durante la caracterización fitoquímica de la *C. micans*, en la composición de los extractos orgánicos se encontró la presencia de sustancias terpenoides en abundancia (Mateu, 2012; Chávez, 2007). Se ha reportado previamente que la combinación de un antihistamínico con un terpenoide, administrada por vía oral en humanos, favorece sinérgicamente la prevención y el tratamiento de la rinitis alérgica, asma y urticaria (Ogunlesi y col., 2009). Por otra parte, dos terpenos: 19-nor-clerodano trans-dehidrocrotónina y ácido acetil aleurítico, aislados de la corteza de *C. cajucara* en Brasil, presentaron actividad antihistamínica en el modelo del edema de la pata de la rata inducido por histamina, donde ambos compuestos inhibieron la formación de edema en más de 40%, efecto comparable al de la ciproheptadina utilizada como antihistamínico de referencia en el citado estudio (Perazzo y col., 2007). Estos antecedentes conducen a proponer la posibilidad de que el efecto antihistamínico observado en el extracto acuoso de hojas de *C. micans*, podría atribuirse, al menos en parte, a la presencia de los compuestos de tipo terpénico aislados y caracterizados durante su estudio fitoquímico.

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE ALGUNOS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *C. MICANS*

Para evaluar la citotoxicidad inducida por algunos compuestos aislados de *C. micans* en líneas celulares humanas de diferente origen, se realizó el ensayo de supervivencia celular *in vitro* desarrollado por Mosman (1983), el cual consiste en la formación de púrpura de formazán a partir de una sal de tetrazolio, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), en donde esta sal es reducida por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial (complejo II). Nuestros resultados realizados en nueve líneas celulares de cáncer humano de diferentes orígenes y uno en cultivo primario mostraron que los compuestos caracasina, ácido de caracasina y ácido micansinoico tienen una marcada actividad citotóxica sobre las líneas celulares evaluadas. Los valores de CI₅₀ se muestran en la Tabla II. Resulta interesante que en fibroblastos normales y en las líneas celulares HeLa, MCF-7, PC-3, LoVo, Jurkat E6.1 y Jurkat JCaM1.6, los valores de CI₅₀ del ácido de caracasina fueron significativamente más bajos que los obtenidos con la caracasina. No se observaron diferencias de las CI₅₀ entre ambos compuestos en las líneas celulares leucémicas U937 y K562 (Suárez y col., 2009) (Tabla II). Esto indica que la porción ácida presente en la estructura incrementa el efecto citotóxico de la caracasina por algún mecanismo que no parece activo en las células leucémicas evaluadas. En relación al ácido micansinoico, el mismo exhibió la mayor potencia, siendo de 2 a 10 veces más activo que la caracasina y el ácido de caracasina en las líneas evaluadas, excepto para MCF-7. Estas observaciones sugieren que la presencia en la molécula de dos unidades monoméricas activas, duplica el poder citotóxico del dímero en cuestión. Los valores de CI₅₀ se muestran en la Tabla II.

Los hallazgos ratifican los efectos citotóxicos y pro-apoptóticos del género *Croton*. En efecto, en el estudio realizado con el compuesto *ent*-16β-17α-dihidroxicaurano **9**, aislado de la *Croton malambo*, en el que se evaluó su efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer mamario humano MCF-7 y sobre un cultivo primario de fibroblastos dérmicos, se determinó que el compuesto evaluado posee un efecto citotóxico 2,6 veces mayor para las células MCF-7 que para los fibroblastos, encontrándose una potencia citotóxica excelente a las 48 horas de tratamiento con una IC₅₀ = 12,5 µg/ml (Morales y col., 2005). Aún más, al estudiar el efecto del diterpeno **9** sobre la regulación de la apoptosis, o muerte celular programada, se demostró que el mismo es capaz de activar la apoptosis en las células tumorales MCF-7 (Morales y col., 2011). El mecanismo de acción molecular del diterpeno **9**

Tabla II

Actividad antiproliferativa de los compuestos caracasina, ácido de caracasina y ácido micansinoico sobre líneas tumorales humanas.

Línea celular	Caracasina	Ácido de Caracasina	Ácido micansinoico
MCF-7	15.7±1.02	6.00±1.00*	12.00±1.84
PC3	12.1±1.05	3.30±2.57*	1.33±1.10 ^{&***}
HeLa	24.3±1.08	3.70±1.11*	0.32±1.08 ^{&***}
X-17	18.3±1.00	3.30±1.59*	0.30±1.08 ^{&***}
LoVo	17.8±1.04	3.40±1.20*	1.99±1.09 ^{&***}
U937	2.70±0.68	4.00±1.95	–
K562	9.60±3.01	10.90±1.34	–
Jurkat E6.1	10.8±5.91	1.70±0.82*	–
JurkatCAM1.6	10.10±5.29	1.80±1.38*	–
Fibroblastos	13.60±1.00	3.40±4.11*	12.14±0.34

Los valores representan el IC₅₀ (µM) ± intervalo de confianza 95%

*p<0,01 comparado con caracasina.

implica que el mismo participa en la regulación de la transcripción del gen anti-apoptótico Bcl-2, mediante la disociación de la activación del complejo Ap2 α -Rb, afectando así su capacidad de unión al promotor del gen del Bcl. Este efecto es de suma importancia ya que se sabe que las células tumorales comúnmente se desvían del proceso de apoptosis hacia la proliferación celular incontrolada convirtiéndose eventualmente en células cancerosas, por lo que este efecto pro-apoptótico es de potencial aplicación terapéutica (Morales y col., 2011).

Conclusiones

Se presenta una visión general del estudio fitoquímico y farmacológico realizado con la planta *Croton micans* Sw. Los resultados de la evaluación farmacológica sugieren que la planta, así como muchas otras pertenecientes a este género, tiene propiedades medicinales, mostrándose la presencia de efectos analgésicos, antihistamínicos, bloqueante ganglionar, antihipertensivos y citotóxicos; sin embargo, se requieren estudios más amplios que validen su eficacia y su inocuidad. Los resultados obtenidos, en el estudio fitoquímico y la evaluación biológica de los constituyentes mayoritarios, señalan que los compuestos reportados por primera vez en esta especie muestran un verdadero potencial para ser considerados en el desarrollo de moléculas líderes potencialmente útiles como analgésico y en el tratamiento de la hipertensión y del cáncer.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo financiero al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela a través del Proyecto PG-06-7342-2008.

Referencias bibliográficas

- Abdon APV, Leal-Cardoso JH, Coelho-de-Sousa AN, Moraes SM, Santos CF. 2002. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice Braz J Med Biol Res 35:1215-1219.
- Agra MF, Silva KN, Diniz-Bazalo IJ, de Freitas PF, Barbosa-Filho KN. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Braz J Pharmacog 18: 472-508.
- Armitage AK, Boswood J, Large BJ. 1961. Thioxanthines with potent bronchodilator and coronary dilator properties. Brit J Pharmacol 16:59-76.
- Bhatt KR, Mehta RK, Shrivastava PN. 1977. A simple method for recording antiinflammatory effects on rat paw edema. Indian J Physiol Pharmacol 21:399-400.
- Berry EP. 1999. *Croton*. En: Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Editado por: Berry, P, Yatskievich, K y Holst, B. Missouri Botanical Garden Press. USA. pp. 111-133.
- Berry P, Hipp AL, Kenneth J, Wurdack KJ, van Ee B, Riina R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS AND TRNL-TRNF DNA sequence data. Am J Bot 92: 1520-1534.
- Brown JH, Taylor P. Agonistas y Antagonistas de los Receptores Muscarínicos. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Vol. I. Editado por: Hardman J. y Limbird L.

- Décima Edición en Español. McGraw-Hill, México, 2001. Cap. 7 pp. 163-181.
- Bulbring E, Wajda I. 1945 Biological comparison of local anaesthetics. *J Pharmacol Exp. Ther* 85: 78-84.
- Cai Y, Chen ZP, Phillipson JD. 1993. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 34: 265-268.
- Campos AR, Albuquerque FAA, Rao VSN, Maciel MAM, Pinto AC. 2002. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia* 73:116-120.
- Caruzo MBR, van Ee B, Cordeiro I, Berry PE, Riina R. 2011. Molecular phylogenetics and character evolution of the «sacaca» clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). *Mol Phylogenet Evol* 60: 193-196.
- Chávez K. 2007. Aislamiento y Caracterización de Metabolitos Presentes en las Flores de *Croton caracasana* con Posible Actividad Citotóxica. Tesis Licenciatura en Química, UCV. pp 86-105.
- Cierco M, Israel A. 1994. Role of angiotensin AT₁ receptor in the cardiovascular response to footshock. *Eur J Pharmacol* 251: 103-106.
- Craveiro AA, Andrade CHS, Matos FJA, De Alencar JW. 1978. Anise-like Flavor of *Croton zethneri* Pax. et Hoff. *J Agric Food Chem* 26: 772-773.
- Compagnone RS, Chávez K, Mateu E, Orsini G, Arvelo F, Suárez AI. 2010. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. *Rec Nat Prod* 4:101-108.
- Davies OL, Raventós J, Walpole AL. 1946. A method for the evaluation of analgesic activity using rats. *Brit J Pharmacol* 1: 255-264.
- do Socorro MSR, Mendonca-Filho RR, Bizzo HR, Almeida Rodrigues I, Soares RMA, Souto-Padrón T, Alviano CS, Hampshire-Lopes CS. 2003. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47: 1895-1901.
- Fuenmayor LD, Díaz S. 1984. The effect of fasting on the stereotyped behavior induced by amphetamine and by apomorphine in the albino rat. *Eur J Pharmacol* 99: 153-158.
- Junior S, Alves V, Moura F, Vieira M, Conserva L, Lemos R. 2006. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Braz J Pharmacognosia* 16: 397-402.
- Kvetnansky R, Mikulaj L. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization. *Endocrinology* 87:738-743.
- Labrid C, Dureng G, Duchene-Marullaz P, Moleyre J. 1977. Dualist or pseudo-dualist interactions of mepyramine, diphenhydramine and eprozinol with histamine at H₁-receptors. *Japan J Pharmacol* 27: 491-500.
- Litchfield JT, Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96(2): 99-113.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Luduena FP, Hoppe JO, Borland JK. 1958. A statistical evaluation of the relationships among local anesthetic activity, irritancy and systemic toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 123: 269-277.
- Marshall WJ, McLean AEM. 1969. The effect of oral phenobarbitone on hepatic microsomal cytochrome P-450 and demethylation activity in rats fed normal and low protein diets. *Biochem Pharmacol* 18:153-157.
- Mateu E. 2011. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad farmacológica y citotóxica-antitumoral de los metabolitos secundarios presentes en *Croton micans* Sw. Tesis Doctoral. Postgrado en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia. UCV. pp. 179-283.
- Mateu E, Chávez K, Riina R, Compagnone RS, Delle Monache F, Suárez AI. 2012. New 3,4-Seco-ent-kaurene dimers from *Croton micans*. *Nat Prod Comm* 7: 5-8.
- Mehmood R, Malik A. 2010. Isolation and characterization of crotosparsamide, a new cyclic nonapeptide from *Croton sparsiflorus*. *Nat Prod Commun* 5: 1885-1888.
- Mijares MR, Martínez GP, Chirinos P, Suárez AI, Compagnone RS, Blanco Z, De Sanctis JB. 2012. Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato de forbol miristato. *Rev Fac Farmacia, UCV* 75(1), 2012.
- Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone RS, Suárez AI, Arvelo F, Ramírez JL, Galindo-Castro I. 2005. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16b-17a-dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett* 218: 109-116.
- Morales A, Álvarez A, Arvelo F, Suárez AI, Compagnone RS, Galindo-Castro I. 2011. The natural diterpene ent-16b-17a-dihydroxykaurane down-regulates Bcl-2 by disruption of the Ap-2a/Rb transcription activating complex and induces E2F1 up-regulation in MCF-7 cells. *Apoptosis* 16 12:1245-1252.
- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Nardi GM, DalBó S, Monache FD, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. 2006. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 107: 73-78.
- Perry WLM. Experiments with Intestinal Smooth Muscle. En: *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations*. Editado por E & S LIVINGSTONE LTD, Edinburgh and London, 1968. Cap IV: pp. 58-87.
- Pol O, Ferrer I, Puig MM. 1994. Diarrhea associated with intestinal inflammation increases the potency of Mu and Delta opioids on the inhibition of gastrointestinal transit in mice. *J Pharm Exper Ther* 270: 386-391.
- Okokon JE, Basse AL, Obot J. 2006. Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus* Muell. (Thunder plant) in alloxan diabetic rats. *Afr J Trad CAM* 3: 21-26.
- Oliveira AC, Leal-Cardoso JH, Santos CF, Morais SM, Coelho-de-Sousa AN. 2002. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz J Med Biol Res* 34:1471-1474.
- Ogunlesi M, Okiei W, Ofor E, Osibote E. 2009. Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae), a potential medication for asthma. *African J Biotechnol* 8:7042-7050.

- Perazzo FF, Carvalho JC, Rodrigues M, Morais EKL, Aparecida M, Maciel M. 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Braz J Pharmacognosy* 17(4): 521-528.
- Quintyne-Walcott S, Maxwell AR, Reynolds WF. 2007. Croto-gossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. *J Nat Prod* 70: 1374-1376.
- Salatino A, Faria-Salatino ML, Negri G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Brazil Chem Soc.* 18: 11-33.
- Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Ángeles FM, Lao J, Bustamante S, Millar M. 2002. «Sangre de grado» *Croton palanostigma* induce apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 80: 121-129.
- Skidgel RA, Erdös EG. Histamine, bradykinin and their antagonists. In Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. eds Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill 2007 Cap 24: pp 629-651.
- Suárez AI. 2000. Estudio químico y farmacológico de la corteza de *Croton malambo*. Trabajo de Ascenso a la Categoría de Profesor Agregado. Facultad de Farmacia, UCV. pp 38-62.
- Suárez AI, Salazar-Bookaman MM, Compagnone RS, Tillett S, Delle Monache F, Digiulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 88:11-14.
- Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 105: 99-101.
- Suárez AI, Chavez K, Delle Monache F, Vasquez L, Orsini G, Compagnone RS. 2008. New 3,4-seco-entkaurenes from *Croton caracasana* flowers. *Nat Prod Commun* 3: 319-322.
- Suárez AI, Chavez K, Mateu E, Compagnone RS., Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis JB. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Comm* 4: 1547-1550.
- Stone CA, Wenger HC, Ludden CT, Stavorski JM, Ross CA. 1961. Antiserotonin-antihistaminic properties of cyproheptadine. *J Pharmacol Exp Ther* 131:73-84.
- Torrice F, Cepeda M, Guerrero G, Melendez F, Blanco Z, Canelon DJ, Diaz B, Compagnone RS, Suarez AI. 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Pharmacognosy* 17: 166-169.
- Webster G, Berry P, Armbruster W, Esser H, Gillespie L, Hayden J, Levin G, Secco R, Heald S. Euphorbiaceae. En: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Editado por: Berry, P, Yatskevich, K y Holst, B. Missouri Botanical Garden Press. USA, 1999. pp. 72-228.