

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA E PRODUÇÃO DO
EPÍMERO DO ÁCIDO CAURENÓICO EM CALOS DE *Croton antisiphiliticus* MART.**

TAÍCE GONÇALVES DE OLIVEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia
(HORTICULTURA)

BOTUCATU – SP
Junho - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA E PRODUÇÃO DO
EPÍMERO DO ÁCIDO CAURENÓICO EM CALOS DE *Croton antisiphiliticus* MART.**

TAÍCE GONÇALVES DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia
(HORTICULTURA)

BOTUCATU – SP
Junho - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Oliveira, Taíce Gonçalves de, 1986-
O48e Estudo da diversidade genética e química e produção do
epímero do ácido caurenóico em calos de *Croton antisiphiliticus* Mart. / Taíce Gonçalves de Oliveira. - Botucatu :
[s.n.], 2015
viii, 83 f. : ils. color., fots. color.; grafs. color.,
tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015
Orientador: Ana Maria Soares Pereira
Coorientador: Bianca Waléria Bertoni
Inclui bibliografia

1. Croton (Botânica) - Genética. Euforbiaceae. 2. Plantas medicinais. 3. Plantas dos Cerrados. 4. Marcadores genéticos. I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Bertoni, Bianca Waléria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA E PRODUÇÃO DO EPÍMERO DO
ÁCIDO CAURENÓICO EM CALOS DE *Croton antisiphiliticus* (Mart.) MULL. ARG.

AUTORA: TAÍCE GONÇALVES DE OLIVEIRA

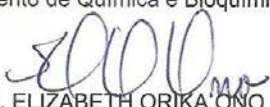
ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA MARIA SOARES PEREIRA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. BIANCA WALERIA BERTONI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA
(HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ANA MARIA SOARES PEREIRA
Depto de Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto


Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA
Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu


Profa. Dra. ELIZABETH ORIKA ONO
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu


Profa. Dra. ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES
EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília/DF


Profa. Dra. SILVIA HELENA TALEB CONTINI
Depto de Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto

Data da realização: 26 de junho de 2015.

Ao Lorenzo que trouxe mais cor e alegria para a minha existência...

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as oportunidades que me concede.

Ao meu companheiro de todas as horas, Márlen, por ser o meu esteio e fazer do seu coração o meu abrigo.

A minha família pelo apoio e por entender a minha ausência, em especial agradeço a minha mãe por cuidar do Lorenzo para que eu concluísse este trabalho.

A Juliana por todo o esforço e carinho sem os quais esse trabalho não teria se finalizado.

A professora Dra. Ana Maria Soares Pereira e Dra. Bianca Waléria Bertoni minha eterna gratidão por todo o apoio e incentivo durante esse percurso, obrigada por me auxiliar a dar os primeiros passos no mundo acadêmico.

A todos os professores e funcionários da Horticultura e do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP.

A UNAERP, representada na pessoa da Dr.^a Suzelei de Castro França, pela oportunidade e todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 O Gênero <i>Croton</i>	5
2.2. <i>Croton antisiphiliticus</i>	6
2.2.1. Taxonomia.....	6
2.2.2. Descrição Botânica e <i>habitat</i>	6
2.2.3. Distribuição geográfica da espécie.....	7
2.2.4. Etnobotânica e etnofarmacologia	7
2.2.5 Atividade farmacológica	8
2.2.7. Fitoquímica.....	17
2.3. Cultura de células.....	18
2.4 Variabilidade Genética.....	20
2.4.1 Marcadores Moleculares	21
2.4.1.1 AFLP	22
3. Hipóteses.....	25
4. Justificativa	26
Capítulo I. INDUÇÃO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CALOS DE <i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.....	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. Geral.....	28
2.2. Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Condições gerais dos experimentos	28
3.2. Obtenção de calos <i>in vitro</i>	29
3.3. Determinação da curva de crescimento.....	29
3.4. Extração dos constituintes químicos de calos de <i>C. antisiphiliticus</i> e quantificação do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31

4.1. Obtenção de calos <i>in vitro</i>	31
4.2. Determinação da curva de crescimento, extração dos constituintes químicos de calos de <i>C. antisiphiliticus</i> e quantificação do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC.....	33
Capítulo II. ANÁLISE DA DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE <i>Croton antisiphiliticus</i> POR MARCADOR MOLECULAR AFLP	36
1. INTRODUÇÃO	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. Geral.....	38
2.2. Específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Condições gerais dos experimentos	38
3.2. Extração de DNA	39
3.3. Marcador molecular AFLP	42
3.3.1. Digestão.....	43
3.3.2. Ligação dos adaptadores	43
3.3.3. Pré-amplificação.....	43
3.3.4. Amplificação seletiva.....	43
3.3.5. Desnaturação das amostras.....	44
3.3.6. Montagem da placa, eletroforese e leitura da placa	44
3.4. Extração e isolamento do ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC de folhas de <i>C. antisiphiliticus</i>	45
3.5. Análises estatísticas.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Extração de DNA	47
4.2 Marcador AFLP	48
4.3. Extração e isolamento do ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC de folhas de <i>C. antisiphiliticus</i>	55
5. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Levantamento das espécies do gênero <i>Croton</i> com atividade antimicrobiana.....	9
Tabela 2: Plantas do gênero <i>Croton</i> com atividade citotóxica.....	14
Tabela 3: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina na indução de calos obtidos a partir de caule e folha de <i>C. antisiphiliticus</i> cultivados por 60 dias.....	33
Tabela 4: Municípios, códigos e coordenadas geográficas dos acessos de <i>C. antisiphiliticus</i> para estudo da diversidade genética.....	39
Tabela 5: Combinação nucleotídica e número de fragmentos amplificados.....	49
Tabela 6: Estatística descritiva básica de seis populações de <i>C. antisiphiliticus</i> por marcadores AFLP.....	50
Tabela 7: Análise Molecular de Variância (AMOVA) entre e dentro de uma amostragem das populações de <i>C. antisiphiliticus</i> baseada em marcadores AFLP.....	52
Tabela 8: Teor de diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico dentro das populações <i>C. antisiphiliticus</i>	57
Tabela 9: Teor de diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico entre as populações <i>C. antisiphiliticus</i>	58
Tabela 10: Concentração do ácido ent-kaur-16-en-18-oico em calos, folha e raiz de <i>C. antisiphiliticus</i>	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta de <i>C. antisiphiliticus</i> no habitat natural.....	7
Figura 2: Estrutura do ácido caurenóico.....	18
Figura 3 Explantes caulinares e foliares em placas de petri com meio de cultura MS basal suplementado com 4mg de 2,4-D, avaliados aos 30 dias (A); aos 60 dias, explantes escuros (B); explante visto em lupa, detalhe em vermelho das células indiferenciadas (C) e calo friável utilizado na curva de crescimento (D).....	32
Figura 4: Acúmulo de massa fresca e seca em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de calos de <i>C. antisiphiliticus</i> . (I) fase lag, (II) fase exponencial, (III) fase estacionária e (IV) fase de desaceleração.....	34
Figura 5: Acúmulo de massa seca e concentração do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico em função do tempo de cultivo <i>in vitro</i> de calos de <i>C. antisiphiliticus</i> , inoculados em meio semi-sólido.....	35
Figura 6: Locais de coleta das populações de <i>C. antisiphiliticus</i> nos três estados.....	40
Figura 7: Preparo dos extratos de <i>C. antisiphiliticus</i> : as folhas foram cortadas (A); maceradas em nitrogênio líquido (B); e peneiradas em peneira de 48 mesh (C); o procedimento foi realizado em triplicata (D); detalhe do processo de filtração dos extratos (E).....	46
Figura 8: Dendograma das populações de <i>C. antisiphiliticus</i>	53
Figura 9: Análise em coordenadas principais (PCoA) das populações de <i>C. antisiphiliticus</i>	53
Figura 10: Composição dos grupos genéticos das populações de <i>C. antisiphiliticus</i> identificados através do programa STRUCTURE.....	54

Estudo da diversidade genética e química e produção do epímero do ácido caurenóico em calos de *Croton antisiphiliticus* Mart.

Autora: Bióloga Taíce Gonçalves de Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Soares Pereira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Bianca Waléria Bertoni

RESUMO

Croton antisiphiliticus Mart. ex M. Arg. é uma planta medicinal nativa do Cerrado, utilizada na medicina popular para infecções do aparelho urogenital. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer a cultura de calos, avaliar a variabilidade genética e química em populações naturais de *C. antisiphiliticus*, usando marcadores moleculares AFLP e quantificar por HPLC o ácido ent-kaur-16-en-18-oico em folha, raiz e calos. Para indução de calogênese foi utilizado segmento de caule e folhas, inoculados em meio MURASHIGE e SKOOG suplementada com auxinas AIB, ANA e 2,4-D. A avaliação da diversidade genética e química foi realizada a partir de acessos coletados nos estados de Minas Gerais, São Paulo, e Goiás. A genotipagem dos indivíduos foi realizada no equipamento 4300 DNA Analyser LICOR®. O maior rendimento no teor do ácido ent-kaur-16-en-18-oico (38,54%) foi obtido no meio de cultivo suplementado com 4mg/L de 2,4-D no trigésimo sexto dia. O marcador molecular AFLP foi eficiente para caracterizar a variabilidade genética em populações de *C. antisiphiliticus*, a variabilidade dentro delas foi maior do que entre as mesmas e o valor do *Fst* foi 0,3830 evidenciando que as populações estão altamente estruturadas. A maior porcentagem de locus polimórficos (92,16%) e a maior diversidade genética foi encontrada nos acessos da população de Pratinha. O fluxo gênico foi considerado restrito ($Nm = 1,18$) e não houve correlação entre distâncias genéticas e geográficas. A diversidade química encontrada entre e dentro das populações foi relacionada tanto a fatores genéticos, quanto ambientais sendo a produção do ácido ent-kaur-16-en-18-oico mais viável por cultura de tecido do que a partir de plantas coletadas *in situ*.

Palavras-chaves: Euphorbiaceae, Planta medicinal, Cerrado, conservação, AFLP, Li-Cor.

Study of genetic diversity and chemical and production of the epimer of kaurenoic acid in *Croton antisiphiliticus* callus Mart. Botucatu, 2015. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Taíce Gonçalves de Oliveira

Adviser: Ana Maria Soares Pereira

Co-advisor: Bianca Waléria Bertoni

SUMMARY

Croton antisiphiliticus Mart. ex M. Arg. is a medicinal plant native of the Cerrado, used in folk medicine for the urogenital tract infections. The aim of this study were to establish callus culture, evaluate the genetic and chemistry variability in natural populations of *C. antisiphiliticus* using AFLP molecular markers and quantify by HPLC the ent-kaur-16-en-18-oic acid in leaf, root and callus. For callus induction was used stem segments and leaves, inoculated in Murashige and Skoog supplementend with auxin IBA, NAA and 2,4-D. The genetic diversity and chemistry was performed from accesses collected in the states of Minas Gerais, São Paulo and Goiás. The genotyping of individuals was held in 4300 DNA Analyzer equipment LI-Cor®. The highest yield the acid content Kaur-ent-16-en-18-oic acid (38,54) was obtained in the culture medium supplemented with 4 mg/l 2,4-D in the thirty-sixth day. The AFLP molecular marker was efficient to characterize the genetic variability in populations of *C. antisiphiliticus*. The variability within populations was greater than between them and the value of F_{st} was 0.3830 showing that the populations are highly structured. The highest percentage of polymorphic loci (92.16%) and the greatest genetic diversity was found in the access of the population of Pratinha. Gene flow was considered restricted ($Nm = 1.18$) and there was no correlation between genetic and geographic distances. The chemical diversity found among and within populations was related both the genetic factors and environmental, and production of ent-kaur-16-en-18-oic acid by tissue culture was most viable than from plants collected in situ.

Keywords: Euphorbiaceae, medicinal plant, Cerrado, conservation, AFLP, Li-Cor.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Croton antisiphiliticus* que pertence a família Euphorbiaceae é utilizada popularmente para tratamento de diversas doenças do trato urogenital e as atividades farmacológicas atribuídas as substâncias isoladas são um forte indício de comprovação das atividades preconizadas por dados etnofarmacológicos.

Um dos principais problemas encontrados em plantas da família Euphorbiaceae é a propagação por semente, muitas das quais apresentam dificuldade no processo inicial de germinação, ou seja, dormência, causada por impedimentos mecânico, químico, térmico e/ou fisiológico. Entre as alternativas que podem ser utilizadas para superar as dificuldades encontradas, com espécies desta família, quanto a propagação é a cultura de células e tecidos quando se visa a multiplicação em larga escala e a produção de compostos bioativos de interesse.

As raízes da espécie são a parte do vegetal utilizada para a produção do fitoterápico o que compromete a conservação da espécie, visto que a planta inteira precisa ser coletada para retirar a parte de interesse. Além da utilização extrativista, a fragmentação do Cerrado também contribui para a perda da diversidade genética da espécie.

Na atualidade as estratégias de conservação de espécies ameaçadas ou vulneráveis utilizam técnicas de biologia molecular, como o marcador AFLP, que mostram como as populações estão estruturadas, contribuindo para o estabelecimento de critérios de

seleção de acessos que representem a diversidade da espécie.

Diante do exposto fica evidente a necessidade de se estabelecer estudos multidisciplinares com a espécie *Croton antisiphiliticus*, afim de trazer informações seguras que possibilite o uso de forma sustentável e a ampliação do conhecimento da diversidade genética e química da espécie, estabelecendo estratégias de manejo e conservação da mesma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae é composta de cerca de 8000 espécies, distribuídas em 317 gêneros representada nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta (SÁTIRO e ROQUE, 2008). Os gêneros estão agrupados em 29 tribos, 19 subtribos e 6 subfamílias (MOBOT, 2009).

Levantamentos florísticos, realizados no Brasil, mostram que a família Euphorbiaceae é uma das mais ricas em número de espécies, com cerca de 940, distribuídas em aproximadamente 63 gêneros. No Estado de São Paulo a família está representada por 37 gêneros e cerca de 160 espécies (CORDEIRO, 2015), além disso, é considerada uma das famílias de maior importância econômica (FRANÇA, 1997; CARNEIRO et al., 2002).

O gênero *Croton* L. é o segundo maior e mais diverso da família Euphorbiaceae, somando mais da metade das espécies da subfamília, cerca de 1.200, distribuídas predominantemente no continente americano (LIMA e PIRANI, 2008). O Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, com cerca de 300 espécies, que está representado nos mais variados ambientes e tipos vegetacionais (BERRY et al., 2005; SILVA et al., 2010).

O reduzido número de estudos com o gênero *Croton* deve-se a sua

complexidade taxonômica, o que tem levado alguns autores a considerá-lo como “gênero problema” (LIMA e PIRANI, 2008). Apesar disso, recentemente, alguns trabalhos têm sido publicados enfatizando os aspectos da distribuição geográfica e chaves de identificação (CARUZO e CORDEIRO, 2007; BINGTAO et al., 2008; LIMA e PIRANI, 2008; MEDEIROS et al., 2008; SÁTIRO e ROQUE, 2008; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

2.2. *Croton antisiphiliticus*

2.2.1. Taxonomia

Domínio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal

Classe: Magnoliopsida Brongn.

Ordem: Malpighiales

Família Euphorbiaceae

Subfamília: Crotonoidae Johannes Müller Argoviensis [Müll.Arg.]

Tribo Crotoneae (Blume) Müll.Arg.

Gênero *Croton* (L.) Müll.Arg.

Seção Eucroton Müll.Arg.

Espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. (FLORA BRASILIENSIS, 2010)

2.2.2. Descrição Botânica e *habitat*

A espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. (Figura 1), conhecida popularmente como pé-de-perdiz, minuano, canela-de-perdiz, alcanforeira, erva-mular, alcânfora e cocaleira (MOREIRA, 1862; OLIVEIRA, 1854; CASTRO, 1878 *apud* FENNER, 2006; FORZZA et al., 2010) é um subarbusto ou erva de 0,3 – 0,6 metros, pilosa, caule verde fosco a alaranjado (CHAVES, 2006; MUNHOZ e FELFILI, 2007; PAULA, et al., 2009), de ramos lenhosos, folhas lanceoladas, alternas, separadas por entrenós, eretas apoiadas por pecíolos; as flores são unissexuais, dispostas no ápice dos ramos em inflorescências

espícuiformes, floresce de outubro a novembro; os frutos são do tipo cápsula e frutifica de novembro a dezembro (CHAVES, 2006; FELFILI et al., 2007; SAINT-HILAIRE, 2009).

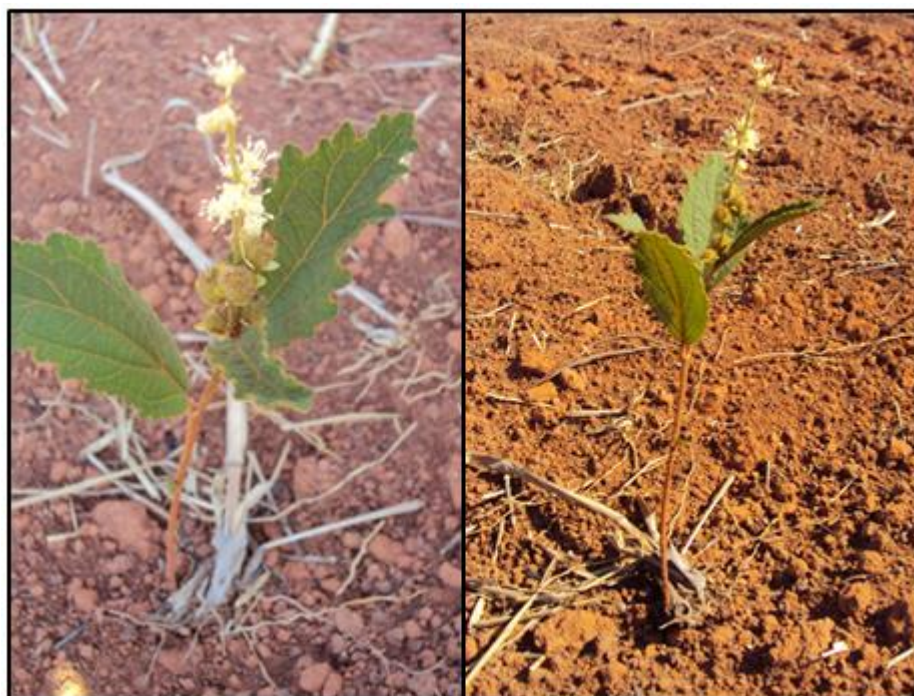


Figura 1: Planta de *Croton antisiphiliticus* no *habitat* natural.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.3. Distribuição geográfica da espécie

C. antisiphiliticus ocorre nos estados de Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e no Distrito Federal. É uma espécie nativa do bioma Cerrado, encontrada nas regiões de campo limpo, campo sujo, campos rupestres e bordas de matas. Ocorre na forma de reboleira ou formando moitas, mas também isolada (CHAVES, 2006; FELFILI et al, 2007; MEDEIROS et al., 2008; FARMACOPEIA POPULAR DO CERRADO, 2009; FORZZA et al., 2010).

2.2.4. Etnobotânica e etnofarmacologia

A espécie *C. antisiphiliticus* é citada em levantamentos etnobotânicos como uma das plantas mais utilizadas por comunidades regionais (SILVEIRA et al., 2008). As raízes e folhas são usadas na forma de decoctos e garrafadas, no tratamento de cólicas, reumatismos, contra sífilis, contra fungos, úlceras e inflamações, em especial das vias urogenitais (VILA VERDE et al., 2003; (MOREIRA, 1862; OLIVEIRA, 1854; CASTRO, 1878 *apud* FENNER, 2006); TRESVENZOL et al., 2006; CAVÉCHIA e PROENÇA, 2007; SILVA et al., 2009).

2.2.5 Atividade farmacológica

Estudos abordando a farmacologia de *C. antisiphiliticus* são escassos e limitados as atividades antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória. Carvalho (2013) avaliou a ação dos extratos de folhas e caule da espécie frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* e obteve inibição de todos esses micro-organismos. Outro estudo com atividade antimicrobiana foi realizado por Nader et al. (2010) que evidenciaram a ação inibitória e bactericida *in vitro* dos extratos clorofórmico e hexânico de *C. antisiphiliticus* sobre *Staphylococcus aureus*, causadora da mastite bovina.

A ação dos extratos de *C. antisiphiliticus* também foi avaliada em células tumorais, mostrando-se citostático para MCF-7 (mama) e citotóxico para TK-10 (renal) (CARVALHO, 2013). Além do extrato, o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oic, isolado das folhas da espécie, foi avaliado quanto à citotoxicidade em células de melanoma murino (B-16), cólon do útero (HeLa) e fibroblasto (3T3). No entanto, o epímero não foi seletivo entre as linhagens de células tumorais e normais (FERNANDES et al., 2013).

Estudo realizado por Reis (2013) mostrou, em camundongos, que o extrato de *C. antisiphiliticus* reduziu a inflamação e a concentração dos mediadores pró-inflamatórios Óxido nítrico (NOx), Teor de Necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-17 (IL-17).

Apesar do reduzido número de trabalhos para a espécie *C. antisiphiliticus*, há uma vasta bibliografia para o gênero *Croton* quanto a atividade farmacológica e fitoquímica (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Espécies do gênero *Croton* com atividade antimicrobiana.

Autor	Espécie	Uso	Micro-organismos	Resultados
Abo et al., 1999	<i>C. zambisicus</i>	Extrato metanólico da casca do caule	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Microsporum</i> ssp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 6571) <i>Salmonella typhosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 6750) <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> (NCTC 9750) <i>Proteus mirabilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus megaterium</i>	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados.
			<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12624) <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442) <i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 133155)	
Almeida et al., 2013	<i>C. campestris</i>	Óleo das folhas e caule	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 4646) <i>Streptococcus sobrianus</i> (ATCC 27609) <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 43146) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 49456) <i>Candida albicans</i> (ATCC 51501)	Óleo do caule Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados; Óleo de folhas inibiu apenas <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .
Alviano et al., 2005	<i>C. cajucara</i>	óleo essencial das folhas		Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados

Continuação Tabela 1...

Autor	Espécie	Uso	Micro-organismos	Resultados
Azevedo et al., 2012	<i>C. cajucara</i>	Óleo essencial das folhas	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA BMB 9393) <i>Candida albicans</i> (ATCC 36802) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus cereus</i>	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados
Carvalho, 2013	<i>C. antisiphiliticus</i>	Extratos brutos e frações	<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022) <i>Salmonella typhimurium</i> (BM/PANAMA-T12) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 10390) <i>Streptococcus β-haemolyticus</i> (ATCC 6314)	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados
Costa et al., 2008	<i>C. zehntneri</i> variedade estragol	Óleo essencial das folhas	dez estirpes de <i>Mycrosporium canis</i> cinco estirpes de <i>Candida albicans</i> três estirpes de <i>Candida tropicalis</i>	Com exceção de <i>S. typhimurium</i> , todos os micro-organismos testados foram inibidos.
Fontenelle et al., 2008	<i>C. nepetaefolius</i> <i>C. argyrophylloides</i> <i>C. zehntneri</i>	Óleo essencial das folhas	<i>T. mentagrophytes</i> (CECT 2795) <i>Mycrosporium gyspseum</i> (CECT 2908) <i>Tricophyton mentagrophytes</i> <i>Tricophyton tonsurans</i> <i>Tricophyton rubrum</i> <i>Mycrosporium canis</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>	O óleo essencial de <i>C. nepetaefolius</i> e <i>C. argyrophylloides</i> inibiu <i>M. canis</i> ; O óleo de <i>C. zehntneri</i> inibiu <i>Candida</i> ssp. e <i>M. canis</i> . Extrato diclorometano inibiu todos os micro-organismos testados.
Freixa et al., 1998	<i>C. zehntneri</i>	Extrato metanólico e diclorometano das folhas		
Gurgel et al., 2005	<i>C. urucurana</i>	Látex		

Continuação Tabela 1...

Autor	Espécie	Uso	Micro-organismos	Resultados
León e Santiago, 2007	<i>C. lechleri</i>	Extrato hidroalcoólico e alcoólico do látex	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Extrato alcoólico inibiu <i>S. aureus</i> .
Oliveira et al., 2008	<i>C. urucurana</i>	Látex, extrato das folhas e da entrecasca	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Com exceção <i>E. coli</i> todos os micro-organismos testados foram inibidos; Látex mais eficiente que os extratos.
Peres et al., 1997	<i>C. urucurana</i>	Extrato metanólico da casca	<i>Staphylococcus aureus</i> (ITAL 001) <i>Salmonella typhimurim</i> (FTPTAT 1035)	Inibiu o crescimento de <i>S. aureus</i> .
Portillo et al., 2001	<i>C. urucurana</i> <i>C. gracilipes</i>	Extrato aquoso, metano e diclorometano das folhas	<i>Tricophyton mentagrophytes</i> (CECT 2795) <i>Mycrosporium gypseum</i> (CECT 2908)	Extrato diclorometano inibiu <i>T. mentagrophytes</i> ; Extrato aquoso inibiu <i>M. gypseum</i> .
Saraswaty et al., 2012	<i>C. argyratus</i>	Extrato acetônico e metanol da casca do caule	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inibiu <i>S. aureus</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>P. aeruginosa</i>
Silva et al., 2011	<i>C. sonderianus</i>	Extrato etanólico das folhas	<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC9811) <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC25175) <i>Streptococcus sanguis</i> (ATCC10557) <i>Streptococcus sobrianus</i> (ATCC27609) <i>Streptococcus salivaris</i> (ATCC9811) <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados

Continuação Tabela 1...

Autor	Espécie	Uso	Micro-organismos	Resultados
Silva Jr. et al., 2009	<i>C. urucurana</i>	Látex	<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados
			<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	
			<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	
			<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	
			<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC32264)	
			<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	
			<i>Aspergillus flavus</i> (IAL 552)	
			<i>Aspergillus fumigatus</i> (IAL 640)	
			<i>Microsporum canis</i> (IAL 578)	
			<i>Microsporum gypseum</i> (IAL 579)	
			<i>Tricophyton mentagrophytes</i> (IAL 581)	
			<i>Tricophyton tonsurans</i> (IAL 592)	
			<i>Tricophyton rubrum</i> (IAL 612)	
			<i>Epidermophyton floccosum</i> (IAL 577)	
			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	
			<i>Staphylococcus epidermides</i> (ATCC 1228)	
			<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	
			<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	
Souza et al., 2006	<i>C. cajucara</i>	Óleo fixo da casca do caule	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotium rolfisii</i>	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados.
Thongtan et al., 2003	<i>C. kongensis</i>	Extrato das folhas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37 Ra)	Inibiu <i>M. tuberculosis</i>

Continuação Tabela 1...

Autor	Espécie	Uso	Micro-organismos	Resultados
Van Vuuren; Naidoo, 2010	<i>C. gratissimus</i>	Óleo essencial das folhas	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) <i>Trichomonas vaginalis clinica</i> <i>Oligella ureolytica</i> (ATCC 43534) <i>Ureaplasma urealyticum clinica</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC19424) <i>Gardnerella vaginalis</i> (ATCC 14018)	Inibiu <i>N. gonorrhoeae</i> e <i>G. vaginalis</i>
Vinayaka et al., 2013	<i>C. gibsonianus</i>	Extrato metanólico das folhas	<i>Staphylococcus aureus</i> (MTCCC902) <i>Escherichia coli</i> (MTCC 405) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MTCC 1934) <i>Tricophytum rubrum</i> (MTCC 3272) <i>Candida albicans</i> (MTCC 4748) <i>Aspergillus niger</i> (MTCC 1884) <i>Chrysosporum indicum</i> (MTCC 4965)	Inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados.

Tabela 2: Plantas do gênero *Croton* com atividade citotóxica

CITOTÓXICO

Autor	Espécie	Uso	Linhagens	Resultados
Almeida et al., 2003a	<i>C. cajucara</i>	Casca	Fibroblasto de pulmão (V79) e hepatócitos	Apresentou efeitos citotóxico.
Alfonso-Castro et al., 2012	<i>C. lechleri</i>	Extrato metanólico das folhas	Cólon do útero (HeLa), colo retal (SW-480), mama (MDA-MB-231), e do fígado (HepG2), carcinomas de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), ovário (SKOV-3) e da próstata (DU-145),	Apresentou efeito citotóxico em células HeLa
Bezerra et al., 2009	<i>C. regelianus</i>	Óleo das folhas e ascaridole	HL-60(leucemia), MDA-MB-435(melanoma), SF295(cérebro), HCT-8(cólon)	O óleo apresentou citotoxicidade para HL-60 e SF-295. Ascaridole para HCT-8 e HL-60.
Carvalho, 2013	<i>C. antisyphiliticus</i>	Planta inteira	MCF-7 (mama) e TK-10 (renal)	Apresentou efeitos citotóxico para TK-10 e citostático para MCF7
Fernandes et al., 2013	<i>C. antisyphiliticus</i>	Epímero do ácido caurenóico	melanoma murino (B-16) e cólon do útero (HeLa)	O epímero não foi seletivo entre as linhas de células tumorais e normais.
Júnior et al., 2013	<i>C. campestris</i>	Extrato das folhas	Camundongo Swiss	Não apresentou toxicidade aguda.
Maciel et al., 2007	<i>C. cajucara</i>	Clerodanos isolados	Leucemia humana (K562) e do carcinoma de Ehrlich	Apresentou atividade citotóxica moderada.
Maistro et al., 2013	<i>C. palanostigma</i>	Látex	Leucócitos e células hepáticas	Não apresentou citotóxicidade
Montopoli, 2012	<i>C. lechleri</i>	Látex e taspine	Melanoma (SK23) e cólon retal (HT29 e LoVo)	Ambos inibiram a proliferação celular

Continuação da Tabela 2...

Autor	Espécie	Uso	Linhagens	Resultados
-------	---------	-----	-----------	------------

Montopoli, 2012	<i>C. lechleri</i>	Látex e taspine	Melanoma (SK23) e cólon retal (HT29 e LoVo)	Ambos inibiram a proliferação celular
Pieters et al., 1993	<i>C. lechleri</i> <i>C. palanostigma</i> <i>C. erythrochilus</i>	Látex	Célula endotelial de cordão umbilical humano	Não estimulou a proliferação celular.
Rossi et al., 2003	<i>C. lechleri</i>	Látex	Leucemia humana (K562)	Não estimulou a proliferação celular
Sandoval et al., 2002	<i>C. palanostigma</i>	Látex	Estômago (AGS), colo (HT29 e T84)	Reduziu a proliferação das células

TÓXICO *in vivo*

Autor	Espécie	Uso	Linhagens	Resultados
Alfonso-Castro et al., 2012	<i>C. lechleri</i>	Extrato metanólico das folhas	Camundongo	Toxicidade moderada
Júnior et al., 2013	<i>C. campestris</i>	Extrato hidroalcoolico das folhas	Camundongo Swiss	Baixa toxicidade aguda.

ANTITUMORAL

Autor	Espécie	Uso	Linhagens	Resultados
Alfonso-Castro et al., 2012	<i>C. lechleri</i>	Extrato metanólico das folhas	HeLa (cólon do útero) em Camundongo fêmea	Efeito anti-tumoral
Bezerra et al., 2009	<i>C. regelianus</i>	Óleo das folhas e ascaridole	Sarcoma 180 em Camundongo fêmea	Efeito anti-tumoral

MUTAGENICIDADE

Autor	Espécie	Uso	Linhagens	Resultados
-------	---------	-----	-----------	------------

Rossi et al., 2003	<i>C. lechleri</i>	Látex	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> TA98 e TA100	Não apresentou ação mutagênica
Lopes et al., 2004	<i>C. lechleri</i>	Látex	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> XV185-14c (MATa ade-2-1, arg4-17, his1-7, lys1-1, trp548, hom3-10) <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535)	Apresentou atividade mutagênica para a linhagem TA1535 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> XV185-14c for the lys1-1, his1-7 e hom3-10

2.2.7. Fitoquímica

Entre as inúmeras classes de substâncias químicas encontradas no gênero *Croton* os terpenóides são os que mais se destacam em função de suas atividades farmacológicas e, entre estes, os diterpenos demonstram grande relevância por apresentar ampla distribuição dentro do gênero, a exemplo das espécies *C. cajucara* (MACIEL et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2004; SILVA, 2005; COSTA et al., 2007), *C. pullei* var. *glabrior* (ABREU et al., 2001), *C. nepetifolius* (SANTOS et al., 2008), *C. stipuliformis* (RAMOS et al., 2008); *C. floribundus* (MEDINA et al., 2009), *C. asiatica tiglium* e *C. flavens* (MULHOLLAND et al., 2010), *C. zambesicus* (ADEROGBA et al., 2011), *C. gossypifolius* (SUAREZ et al., 2013) e *C. urucurana* (PIZZOLATTI et al., 2013).

As propriedades farmacológicas dos diterpenos são amplas incluindo antitumoral (ADOLF et al., 1985; HAGIWARA et al., 1995; ROENGSUMRAN et al., 2002), anti-inflamatória (BRAQUET, 1988; ICHIHARA et al., 1992; CARVALHO et al., 1996; PERAZZO et al., 1997; MACIEL et al., 2000; DEMETZOS et al., 2001), antireumática (GU et al., 1995), antiulcerogênica (SHIRAKABE et al., 1995; BRITO et al., 1998; HIRUMALIMA et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2004), antibiótica (NAKANISHI, 1974) e hipoglicemiante (MACIEL et al., 2000).

Estudos sugerem que a ação antimicrobiana (GHISALBERTI, 1997; PINHO e TOYAMA, 2011; JEONG et al., 2013) e anti-inflamatória de algumas plantas está relacionado às altas concentrações do diterpeno ácido caurenóico, provenientes do metabolismo secundário da planta (ROCHA, 2008). Além disso, outras atividades dessa substância foram relatadas a exemplo da ação moluscicida, cercaricida (GHISALBERTI, 1997; MEDINA et al., 2009), antiplasmódica (LANGAT et al., 2012), citotóxica (COSTA-LOTUFO et al., 2002), sendo também ativo contra formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (VIEIRA et al., 2002).

Além do ácido caurenóico, outras substâncias são encontradas na espécie *C. antisiphiliticus* como os flavonoides *O*-glicosilados rutina, isoquercitina e quercitina, *C*-glicosilado vitexina, ácido quínico e o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico (Figura 2) (PEREIRA et al., 2012, CARVALHO, 2013, REIS et al., 2013). Este diterpeno, ácido ent-kaur-16-en-18-oico, foi isolado por Pereira et al. (2012) e apresenta atividade

antimicrobiana por isso foi escolhido como alvo do presente trabalho.

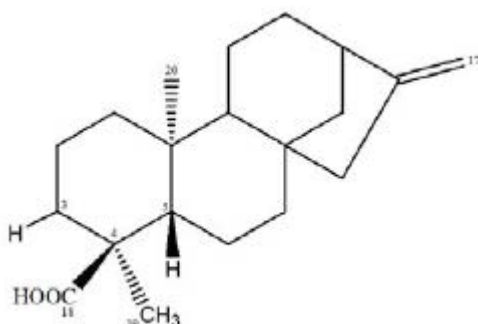


Figura 2: Estrutura do ácido caurenóico.

2.3. Cultura de células

Para as espécies do Cerrado com alto potencial farmacológico, exploradas predatoriamente e que apresentam dificuldade de propagação, a organogênese indireta pode ser uma alternativa viável para a produção de compostos bioativos, de modo sustentável, pois permite a propagação rápida e a obtenção de metabólitos secundários via cultivo de células (ALMEIDA et al., 1999; FRÁGUAS et al., 2009; SANTOS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2012).

A indução de calo pode ocorrer a partir de qualquer tecido vegetal, no entanto, há preferência por explantes com maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; MORAIS et al., 2012). O balanço hormonal endógeno, entre citocininas e auxinas, pode estimular a proliferação celular (VIETEZ e SAN-JOSÉ, 1996; MORAIS et al., 2012). No entanto, em alguns casos, a suplementação com reguladores exógenos é necessária, visto que muitos tecidos necessitam da adição de auxinas para se desenvolverem *in vitro* (OZIAS-AKINS e VASIL, 1985; MORAIS et al., 2012).

No período de multiplicação dos calos, pode ocorrer a variação somaclonal, uma variação fenotípica de origem genética ou epigenética, que pode ser uma vantagem quando aumenta a variabilidade ou desvantagem, quando provoca perda de estabilidade das linhagens celulares. Independente de ocorrer ou não variação, o cultivo de

células permite a realização de estudos de fisiologia, principalmente, quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular (PIERIK, 1990; MARASCHIN et al., 2002; MORAIS et al., 2012).

Além de calos, a cultura de células em suspensão é também um sistema *in vitro* muito utilizado, por apresentar maior facilidade no cultivo em escala e controle dos parâmetros físicos e químicos em biorreatores (KIERAN et al., 1997). Os processos industriais de maior sucesso para a produção de metabólitos secundários são a produção de chiconina a partir de *Lithospermum erythrorhizon* (FUJITA, 1988), berberina de *Coptis japonica* (FUJITA, 1988) e taxol de *Taxus* spp (BLECHERT e GUENARD, 1990; WU et al., 2003; ARIAS et al., 2009).

Um fato importante a ser considerado é que independente do sistema de cultivo existem culturas de células de plantas que produzem maior quantidade de metabólitos secundários do que plantas intactas. Apesar disso, ainda há problemas que dificultam o desenvolvimento do cultivo em larga escala de células vegetais, a exemplo da baixa produtividade de compostos, instabilidade das linhagens celulares e baixa taxa de multiplicação (RAVISHANKAR e VENKATARAMAN, 1993 *apud* RAMACHANDRA e RAVISHANKAR, 2002; ZHONG, 2001).

Entre as diversas classes de compostos secundários produzidos *in vitro* destacam-se os terpenoides, com especial atenção ao grupo dos diterpenos (PETERSEN, 2006; GARCÍA et al., 2007; SOARES, 2010; FERNANDES, 2013). Entretanto, não há registro na literatura de trabalhos com cultura de células indiferenciada de *C. antisiphiliticus* e mesmo para outras espécies da família Euphorbiaceae são escassos os estudos com cultura celular.

Lima et al. (2006) em estudo com a espécie *Croton urucurana* Baill. avaliaram o efeito de cinco reguladores vegetais e as combinações entre eles na indução de calos e formação de brotos adventícios e observaram maior acúmulo de biomassa fresca com o uso isolado de 2,4-D. Em trabalho realizado com *Jatropha curcas* L., outra espécie da família Euphorbiaceae, foram avaliados várias concentrações de BAP (Benzilamino-purina) e AIB (ácido indolbutírico), e constatou-se que ambos formaram calos e promoveram a regeneração de brotos adventícios (FEITOSA et al., 2013).

2.4 Variabilidade Genética

O Brasil é o país mais extenso da América do Sul, detentor da maior diversidade de espécies do mundo, abrigando aproximadamente 18% da diversidade global de plantas. No entanto, essa biodiversidade encontra-se ameaçada principalmente pela perda e degradação de seu *habitat*, consequência da expansão agrícola, do desmatamento, entre outras. Há dois *hotspots* de biodiversidade atualmente reconhecidos no país – a Mata Atlântica e o Cerrado (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011).

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e ocupa cerca de 22% do território nacional. Apesar de possuir abundância de espécies endêmicas, muitas já não ocorrem mais em áreas protegidas e outras encontram-se ameaçadas de extinção. Mesmo diante deste cenário, o Cerrado é o bioma que possui a menor porcentagem de áreas protegidas por Unidades de Conservação (UC) (8,21%), esse dado é ainda mais alarmante quando se trata de áreas de proteção integral (2,85% da área de UC) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

Além da falta de políticas públicas mais rigorosas, no sentido de proteger o bioma, ocorre a utilização de forma extrativista da flora para fabricação de medicamentos caseiros e produção de carvão pela população local (GUARIM NETO e MORAIS, 2003; SANTOS et al., 2010; CARNEIRO e SANTOS, 2013). O uso dessas plantas de interesse medicinal torna-se mais grave quando partes essenciais para a reprodução são retiradas (flores e sementes), ou até mesmo a planta inteira, de forma não sustentável (SILVA et al., 2001). Nesse sentido, estudos que possibilitem aferir como essas plantas estão estruturadas no tempo e no espaço são necessários.

A estrutura de populações é formada pela estrutura genética e demográfica, que apesar de serem interrelacionadas, são distintas. Os processos associados com nascimento, morte, dispersão, sistema de acasalamento e história de vida definem a estrutura demográfica. Enquanto que, a estrutura genética é designada pela estrutura de população, bem como, por processos genéticos tais como seleção, recombinação (migração ou fluxo gênico) e mutação (HAMRICK, 1992; SLATKIN, 1994).

Os fatores ecológicos que influenciam na reprodução e dispersão dos genes determinam a estrutura genética de uma população (LOVELESS e HAMRICK, 1984).

Um outro fator a ser considerado é o tamanho da população, pois influencia o nível e distribuição genética em espécies de plantas (SUN, 1995). Além disso, o fluxo gênico é igualmente importante na estrutura genética das espécies, por determinar a divergência genética existente entre as populações (NEIGEL, 1997).

Quando o fluxo gênico é alto há tendência de homogeneização da variação genética entre as populações, quando é baixo, fatores como endogamia, deriva genética e seleção causam divergência genética entre populações (SLATKIN, 1994; HEDRICK, 1999; HARTL e CLARCK, 2010).

Em populações subdivididas, fragmentadas, o fluxo gênico é restrito, podendo levar a endogamia e deriva genética, reduzindo a diversidade genética e comprometendo o potencial adaptativo, fertilidade, vigor e produtividade das populações, dentre outros (ALLARD, 1971; RITLAND, 1996; YOUNG et al., 1996; KELLER e WALLER, 2002; McLAUGHLIN et al., 2002). O conhecimento do nível do fluxo gênico e da variabilidade dentro e entre as populações são essenciais quando se objetiva estudos de conservação, em especial, para aquelas ameaçadas, pois auxilia na compreensão de processos populacionais e evolutivos a que estas estão submetidas. Nesse sentido, os parâmetros das análises de genética de populações são importantes por auxiliarem no estabelecimento de estratégias adequadas à conservação da biodiversidade (AVISE, 2010).

Os marcadores moleculares são ferramentas de grande potencial, pois permitem a identificação das diferenças genéticas entre indivíduos ou populações, possibilitando estimar os padrões de variabilidade, norteando assim, a tomada de decisões na conservação de recursos genéticos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998; FREITAS et al., 2005).

2.4.1 Marcadores Moleculares

A definição da estrutura química da molécula de DNA pelos pesquisadores Watson e Crick, na década de 50, foi o marco para o surgimento da Biologia Molecular, propiciando um entendimento das principais características dos seres vivos a partir dessa molécula (PINHO, 2006). O desenvolvimento das técnicas de manipulação do DNA

possibilitou o surgimento dos marcadores moleculares na década de 80 contribuindo para o avanço da Biologia Molecular (GUIMARÃES et al., 2009).

Os marcadores moleculares são ferramentas que permitem identificar e diferenciar genótipos através de sequências de DNA, para estudos da variabilidade genética das espécies, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos em programas de melhoramento genético e na manutenção de bancos de germoplasma (LANZA et al., 2000; LOPES et al., 2002; JÁGARELLI, 2007; GUIMARÃES et al., 2009).

Os marcadores moleculares avaliam os genótipos sendo as bandas comuns a todos os indivíduos interpretadas como semelhanças genéticas e as bandas não-comuns como diferenças. Os resultados são codificados, a fim de gerar uma matriz de similaridade ou dissimilaridade, interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada. (LANZA et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2009).

Nas décadas de 80 e 90 os marcadores do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foram os mais utilizados, sendo responsáveis pelo desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de espécies cultivadas (GUIMARÃES et al., 2009).

Diversas técnicas de marcadores moleculares têm sido empregadas em estudos de diversidade genética de plantas medicinais, auxiliando programas de conservação no Brasil, a exemplo das espécies *Maytenus ilicifolia* (RIBEIRO et al., 2010), *Lychnophora pinaster* (HABER et al., 2008), *Myracrodruon urundeuva* (FREITAS et al., 2005) e espécies da família Lamiaceae (MENDES, 2007). Além disso, estudos comparando a diversidade química e genética em plantas medicinais também têm sido realizados com as espécies *Ocimum gratissimum* (VIEIRA et al., 2001), *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* (CLEMENTE, 2010), *Ocimum selloi* (FACANALI, 2008), *Stryphnodendron adstringens* (MENDONÇA et al., 2012) e *Palicourea rigida* (SILVA et al., 2013).

2.4.1.1 AFLP

O marcador molecular AFLP é uma técnica segura e robusta, e tem-se

mostrado eficiente para análise de diferenças entre indivíduos geneticamente distintos (CLEMENTE, 2010; LONDE et al., 2010). Essa técnica une características de duas outras, RFLP e RAPD.

O AFLP baseia-se no polimorfismo resultante de inversões, deleções, mutações de ponto e inserções, que levam à perda ou ao ganho de sítios de restrição, reconhecidos pelas enzimas utilizadas ou na alteração da sequência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nas extremidades 3' dos *primers* seletivos, complementares aos adaptadores (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Esse tipo de marcador é baseado na geração de fragmentos de DNA através de enzimas de restrição, geralmente *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte frequente), que digerem o material genético, originando fragmentos maiores (*EcoRI/EcoRI*), intermediários (*EcoRI/MseI*) e curtos (*MseI/MseI*). Em seguida é realizada a ligação de adaptadores que são sequências de nucleotídeos específicas e complementares aos sítios de restrição; finalizando com a ligação de *primers* contendo bases arbitrárias por amplificação em reação de cadeia da polimerase (PCR). Assim, inúmeros fragmentos, polimórficos e monomórficos, são amplificados e podem ser visualizados em gel de poliacrilamida em diversos tamanhos (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998).

Modificações no protocolo desta técnica tem sido proposto com o objetivo de aumentar a eficiência e o rendimento do processo, um exemplo é a utilização de *primers* marcados com fluorescência em dois canais IRDye 700 (Infrared Fluorescent Dyes) e IRDye 800 (HARTL e SEEFELDER, 1998; HUANG e SUN, 1999; MYBURG. et al., 2001; HASBÚN et al., 2012). Esta metodologia é realizada no aparelho DNA Analyser LI-COR (Lincoln, Nebraska, USA, 1997) e tem produzido resultados satisfatórios para espécies de plantas com genomas de complexidade variada (MYBURG et al., 2001; KOMULAINEN et al., 2003; UKRAINETZ et al., 2008; HASBÚN et al., 2012). Além das vantagens em relação ao método convencional, como por exemplo, a segurança no uso do marcador IRDye® em detrimento dos radioativos, há também a obtenção dos dados de imagens em tempo real (LI-COR BIOSCIENCES, 2010).

Nos últimos anos o AFLP tem sido utilizado em vários trabalhos, a exemplo de *Avicennia germinans* L. (DODD et al., 2002), *Hypericum perforatum* L. (PERCIFIELD et al., 2007), *Tribulus terrestris* L. (SARWAT et al., 2008), *Croton draco*

Schltl. & Cham. (FARÍAS et al., 2009), *Echinaceae* (RUSSI et al., 2009), *Anacardium humile* St. Hill. (LONDE et al., 2010), *Eugenia uniflora* (FRANZON et al., 2010), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reis (RIBEIRO et al., 2010), *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (MENDONÇA et al., 2012), *Palicourea rigida* (SILVA et al., 2013) e *Lippia* sp L. (ALMEIDA, 2014).

3. Hipóteses

A cultura de calos é tão eficiente para a produção do epímero do ácido caurenóico *in vitro* quanto as folhas de *C. antisiphiliticus* obtidas *in situ* e apesar da vulnerabilidade da espécie, em função da ação antrópica, há ainda ampla diversidade genética e química a ser acessada e conservada.

4. Justificativa

A espécie *Croton antisiphiliticus* apresenta relevância farmacológica e etnofarmacológica, sendo amplamente utilizada no tratamento de infecção e inflamação das vias urogenitais e estudos realizados *in vitro* mostraram efeito citotóxico para células tumorais. Apesar da importância terapêutica dessa espécie, não há estudos agronômicos e de diversidade genética que possam viabilizar estratégias de conservação e de produção que assegure o uso sustentável da mesma.

Capítulo I. INDUÇÃO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CALOS DE *Croton antisiphiliticus* Mart.

1. INTRODUÇÃO

Para espécies medicinais do Cerrado, a exemplo de *C. antisiphiliticus* usadas abundantemente tanto pela população local, como acadêmica e que apresentam dificuldade de propagação *in vitro* e *ex vitro* (OLIVEIRA et al., 2011), a calogênese pode ser uma alternativa viável para a prospecção dos metabólitos secundários da planta.

Os calos são massas compactas formadas por células desdiferenciadas que podem ser induzidos a partir de lesões nos tecidos, ou ação de substâncias químicas sob determinadas condições hormonais (TORRES et. al., 2000). A vantagem desse tipo de cultura é a possibilidade de propagar diversas espécies vegetais em larga escala e em reduzido tempo (TORRES, 2013).

Nesse sentido, é importante estabelecer a curva de crescimento da espécie de interesse, afim de se obter a época de repicagem dos calos ou suspensão celular e determinar onde há a maior produção de metabólitos secundários (SOARES, 2003; TORRES, 2013). A curva de crescimento celular é caracterizada por seis fases: Lag (sem divisão celular, ocorre acúmulo de biomassa), exponencial (intensa divisão celular), linear (crescimento celular ativo), desaceleração (redução da divisão celular), estacionária (não ocorre divisão

celular, síntese de biomassa e aumento do número de células) e declínio (células começam a morrer) (FEITOSA et al., 2013).

Conhecendo o período de maior produção do composto de interesse através dos resultados da curva de crescimento, pode-se iniciar as avaliações fitoquímicas visando obter os compostos e/ou isolados de interesse, a exemplo dos estudos para o gênero *Croton* (Tabelas 1 e 2).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Quantificar por HPLC o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico nos extratos de calos induzidos *in vitro*.

2.2. Específicos

- Estimular a indução e a produção de calos a partir de explantes foliares e caulinares *C. antisiphiliticus*;
- Determinar a curva de crescimento celular em meio semi-sólido;
- Quantificar por HPLC o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico nos extratos de calos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 2,5 g/L do agente gelificante Phytigel[®], o pH ajustado para 6 e foi autoclavado por 20 minutos. Todas as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo

de 16 horas e intensidade luminosa de $25 \mu\text{Mol m}^2/\text{s}$, fornecida por lâmpada fluorescente branca, exceto para o experimento de obtenção dos calos *in vitro*. O delineamento foi inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância seguido de teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

3.2. Obtenção de calos *in vitro*

Plântulas obtidas de germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos foliares e caulinares de aproximadamente 0,5cm foram seccionados com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Os explantes foram inoculados em placa de petri 140x15 mm, contendo 50 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo 30 g/L de sacarose, 2,5 g/L de Phytigel® e suplementados com:

- a) Sem regulador vegetal
- b) 1 mg/L de ANA
- c) 4 mg/L de ANA
- d) 1 mg/L de AIB
- e) 4 mg/L de AIB
- f) 1 mg/L de 2,4-D
- g) 4 mg/L de 2,4-D

Após a autoclavagem, os meios foram vertidos em placas de petri dentro do fluxo laminar. O material foi incubado nas condições gerais supracitadas, mas sem a incidência de luz por 60 dias. O tratamento que apresentou maior número de explantes convertido em calos foi utilizado como meio base para o cultivo nos demais experimentos.

3.3. Determinação da curva de crescimento

Após a indução dos calos, estes foram repicados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 30 g/L de sacarose, 4 mg/L de 2,4-D, 2,5 g/L de

Phytigel® e mantidos por 6 meses, com repicagem mensal até a obtenção de massa suficiente para o estabelecimento da curva de crescimento. Após este período $1 \pm 0,05$ g de calos foi pesado e inoculado em frascos tipo pote (8 cm de altura e Ø5 cm com capacidade para 160 mL) contendo 40 mL do mesmo meio de cultura mencionado anteriormente.

A curva de crescimento foi estabelecida até 96° dia de cultivo, sendo as coletas de massas realizadas em intervalos de 4 dias. Em cada intervalo foram retirados 9 frascos, escolhidos ao acaso, os quais foram agrupados em três repetições. Foi avaliada a massa fresca e seca dos calos sendo a secagem realizada em estufa por 48 horas. Em seguida, os calos foram congelados em freezer para posterior análise do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

O percentual de crescimento das células foi determinado subtraindo a massa da matéria seca final (PF) da massa da matéria seca inicial (PI), dividindo este valor pela massa da matéria seca final e multiplicando por 100, através da fórmula $[(PF - PI) / PF] \times 100$ (DUNG et al., 1981).

3.4. Extração dos constituintes químicos de calos de *C. antisiphiliticus* e quantificação do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC

Para a obtenção dos extratos, 1 g de calo seco de *C. antisiphiliticus*, previamente pulverizado em moinhos de facas (MARCONI), foi submetido a extração com 100 mL de clorofórmio em ultrassom (ULTRASONIC) por 20 minutos, esse procedimento foi repetido três vezes, totalizando 300 mL de solvente. Foi realizado o *clean-up* nos extratos obtidos, solubilizando as amostras em MeOH : H₂O (85 : 15) as quais foram aplicadas em cartucho de C18 (Supelco® - LC18 reorder 57054), previamente ativado com 1 mL de MeOH, seguido de 1 mL de MeOH : H₂O nas mesmas condições de preparo das amostras (85 : 15). Para a quantificação 0,003 g do extrato foi ressuspendido em 1 mL de MeOH : H₂O (85 : 15), esta solução foi adicionada ao cartucho e após adsorção, foram adicionados 3 mL da solução MeOH : H₂O (85 : 15) para a eluição dos compostos de interesse. Os analitos em solução (1 mg.mL⁻¹) foram filtrados em membrana 0,22 µm (Millipore®) e uma alíquota de 20 µL foi injetada em equipamento HPLC Shimadzu (LC-10 AD vp), acoplado a detector de arranjo di-iodo (SPD-M10A), coluna supelcosil LC-18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5µ), usando

como fase móvel metanol : água + ácido acético 0,1 % (85 : 15) por 45 minutos com fluxo de 1 mL/min. e detecção no comprimento de onda de 210nm, modo isocrático (PEREIRA et al., 2012). Para a quantificação do ácido ent-kaur-16-en-18-oico foi preparada uma curva analítica do ácido, segundo Ribani et al., (2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de calos *in vitro*

O uso de regulador vegetal foi eficiente para a indução de calos em explantes foliares e caulinares de *C. antisiphiliticus*. Para ambos os tipos de explantes houve oxidação dos tecidos após 30 dias de permanência no meio de cultura. No entanto, aos 60 dias de cultivo surgiram células indiferenciadas do tecido, que estava aparentemente necrosado, formando uma massa celular de coloração clara da qual originou os calos friáveis utilizados nos experimentos (Figura 3).

Todas as auxinas avaliadas induziram calos nos explantes caulinar e foliar. Entretanto, a porcentagem variou em função da concentração dos reguladores, sendo que 2,4-D na concentração de 4,0 mg promoveu calos em mais de 90% de ambos os explantes (Tabela 3).

Esses resultados corroboram com o trabalho realizado para a espécie *Croton urucurana* (LIMA et al., 2006), que também demonstrou a viabilidade de produção de calos a partir do cultivo com o regulador vegetal 2,4-D.

Os resultados do presente estudo indicam que fornecimento exógeno de auxina foi suficiente para promover um equilíbrio hormonal capaz de induzir a formação de calos nos tecidos foliares e caulinares de *C. antisiphiliticus*.

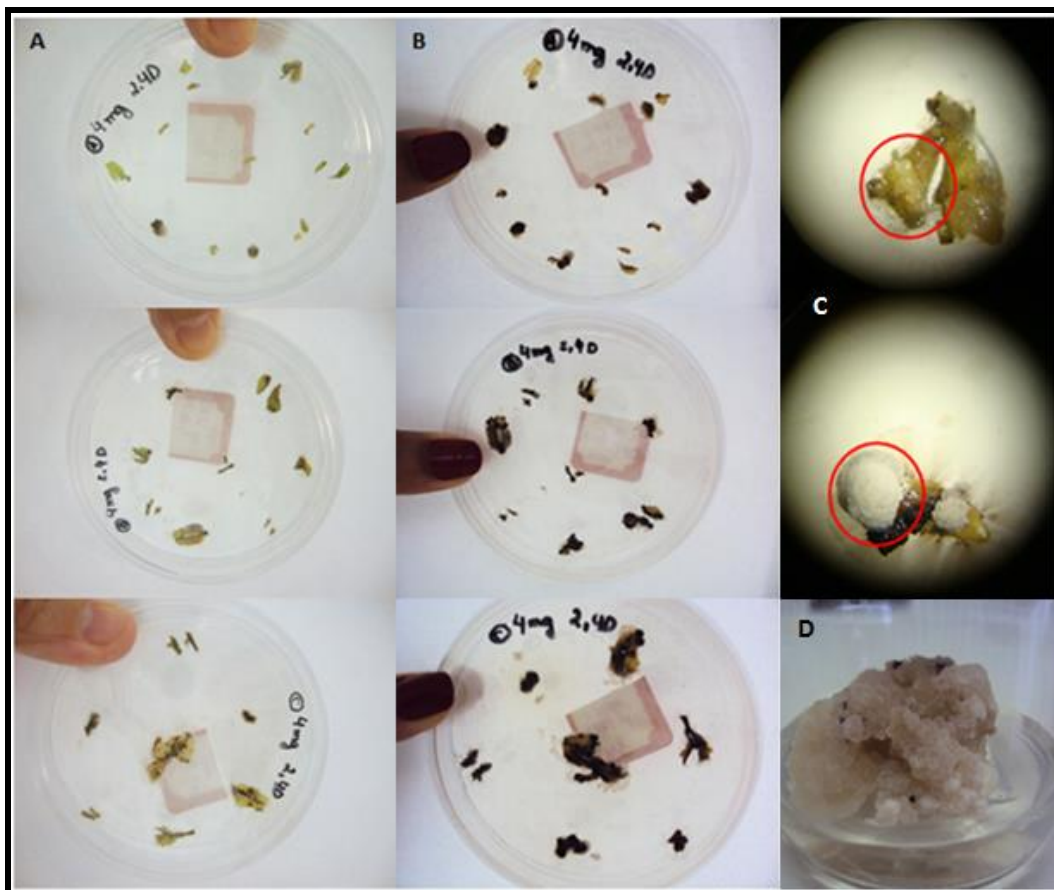


Figura 3: Explantes caulinares e foliares em placas de petri com meio de cultura MS basal suplementado com 4mg de 2,4-D, avaliados aos 30 dias (A); aos 60 dias, explantes escuros (B); explante visto em lupa, detalhe em vermelho das células indiferenciadas (C) e calo friável utilizado na curva de crescimento (D). Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina na indução de calos obtidos a partir de caule e folha de *C. antisiphiliticus* cultivados por 60 dias.

Auxinas	Porcentagem de calos					
	Caule			Folha		
	Concentração mg/L			Concentração mg/L		
	1,0	4,0	C.V.	1,0	4,0	C.V.
Controle	0,0dA	0,0cA	0	0,0bA	0,0cA	0
ANA	100aA	89,33bA	7,52	57,67aA	31,00bA	35,28
2,4-D	50bB	100aA	9,43	53,0aB	93,33aA	13,33
AIB	21,33cB	100aA	7,12	5,33bB	39,33bA	41,12
C.V.	13,68	6,96		36,40	24,52	

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

4.2. Determinação da curva de crescimento, extração dos constituintes químicos de calos de *C. antisiphiliticus* e quantificação do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC.

Foi possível identificar quatro fases na curva de crescimento (massa fresca) de *C. antisiphiliticus* (Figura 4). A fase lag (I) ocorreu do 0 ao 4º dia, período no qual as células se preparam para a divisão; fase exponencial (II) do 4º ao 40º dia, período caracterizado por intensa divisão celular; fase estacionária (III) do 40º ao 76º dia, momento que ocorre redução na divisão celular e fase de desaceleração (IV) que iniciou no 76º dia e foi até o 96º dia. É nesta última fase que os calos devem ser transferidos para novo meio de cultura devido o acúmulo de substâncias tóxicas e redução dos nutrientes do meio (AZEVEDO, 2003).

De acordo com a Figura 4, a fase lag apresentou duração mais curta, esse fato pode ser resultado da metodologia utilizada na determinação da curva de crescimento, visto que as culturas já se encontravam em crescimento quando da sua utilização, resultado similar foi observado em outros trabalhos (CELEDÓN et al, 2000; TORRES 2013).

Em relação à massa seca observou-se que do tempo 0 ao 36ª dia houve aumento no acúmulo de biomassa devido a elevada divisão celular, caracterizada pela fase exponencial, que foi coincidente com a fase I da biomassa fresca. No 36ª dia foi obtido o maior acúmulo de massa seca e a apartir deste período ocorreu o decréscimo da biomassa.

Houve variação na concentração do ácido ent-kaur-16-en-18-oico nos dias avaliados. A maior produção desta substância ocorreu no 24º dia (109,84 ug/g PS) e este ponto não foi coincidente com o maior acúmulo de biomassa seca (Figura 5). Esses dados corroboram com os estudos realizados com raízes *in vitro* da espécie *Peritassa campestris* (PAZ et al., 2013) e calos de *Maytenus ilicifolia* (COPPEDE et al., 2014) nos quais os autores também não obtiveram valores coincidentes da maior biomassa seca e a concentração máxima do composto de interesse.

Em termos de produtividade, o melhor resultado foi obtido no 36º com 1,07 ug/dia do ácido ent-kaur-16-en-18-oico.

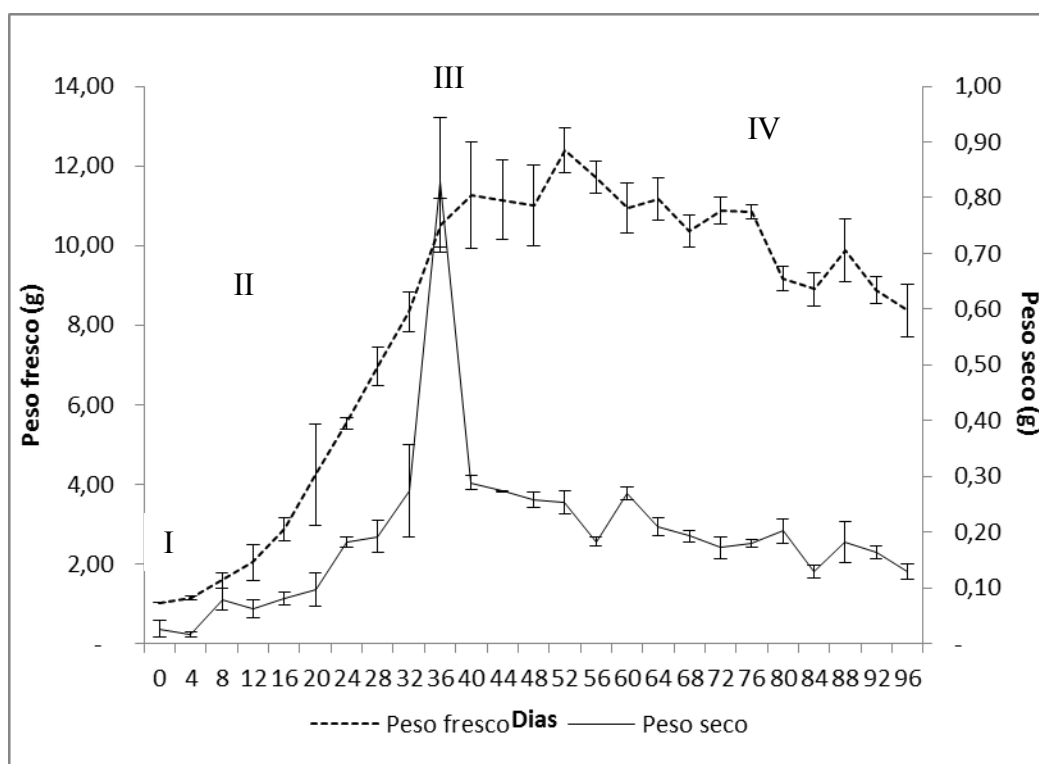


Figura 4: Acúmulo de massa fresca e seca em função do tempo de cultivo *in vitro* de calos de *C. antisiphiliticus*. (I) fase lag, (II) fase exponencial, (III) fase estacionária e (IV) fase de desaceleração com 2,4-D.

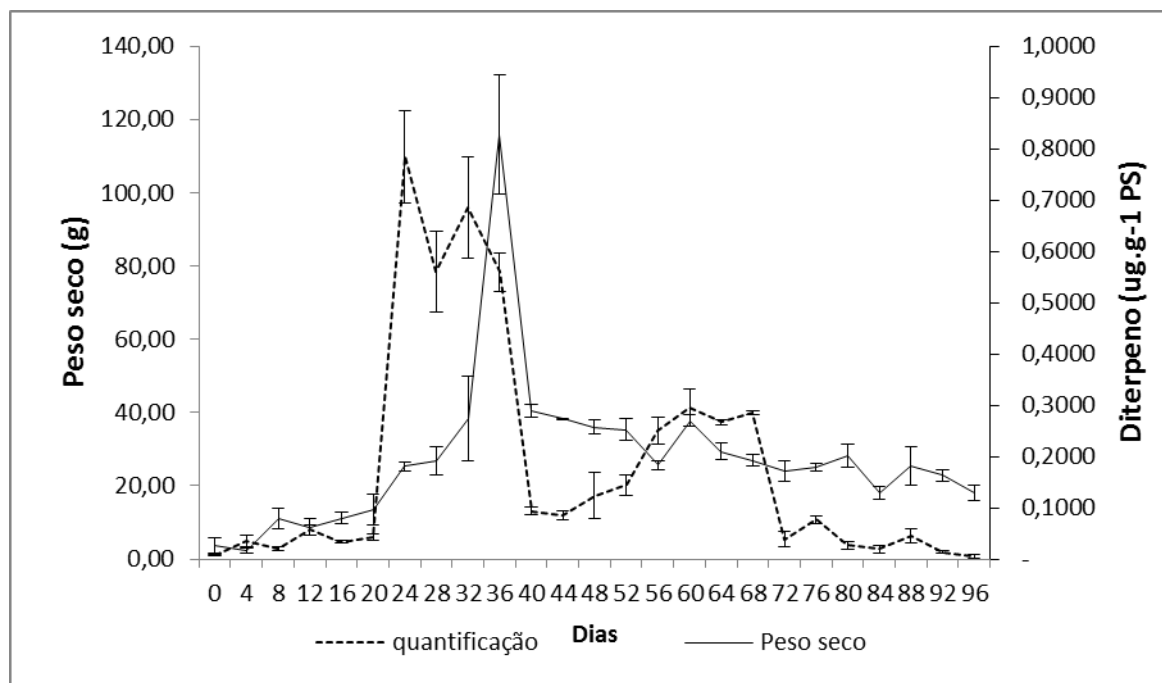


Figura 5: Acúmulo de massa seca e concentração do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico em função do tempo de cultivo *in vitro* de calos de *C. antisiphiliticus*, inoculados em meio semi-sólido.

Capítulo II. ANÁLISE DA DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE *Croton antisiphiliticus* POR MARCADOR MOLECULAR AFLP

1. INTRODUÇÃO

As características morfológicas são muito utilizadas para a caracterização de uma espécie, mas os marcadores moleculares fornecem uma abordagem mais específica de cada indivíduo e são muito mais eficientes para a determinação da variabilidade genética, por analisarem diretamente o material genético (YANAKA, 2005). No que se refere a estudos genéticos de populações naturais, os marcadores moleculares representam uma ferramenta eficiente na identificação da diversidade genética.

Nos últimos anos, os marcadores moleculares baseados no DNA são considerados a melhor técnica para determinar relações genéticas e diversidade, colaborando, também, para estudos evolutivos e ecológicos (FRACARO et al., 2005; SEMAGN et al., 2006).

Os marcadores moleculares fornecem informações importantes em diferentes níveis (estrutura da população, relações filogenéticas, padrões de biogeografia histórica e análises de ascendência e parentesco), devido à capacidade de detectarem,

variações genéticas (FÉRAL, 2002). O conhecimento da maneira que essa variação está estruturada no espaço é importante no direcionamento de estratégias de conservação genética, manejo sustentável e melhoramento genético (ESTOPA, 2003; KAGEYAMA et al., 2003; SAHYUN, 2007; ROSSI et al., 2009; RIVAS et al., 2013).

Entre os vários tipos de marcadores destaca-se o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), que possui a maior taxa multiplex de todos os sistemas de marcadores via PCR, mais de 100 fragmentos de restrição podem ser amplificados simultaneamente (MYBURG et al., 2001). Por apresentar melhor reprodutibilidade, resolução e sensibilidade do que outras técnicas (por exemplo, RAPD e ISSR), o AFLP tem sido utilizado de forma eficiente na identificação da variabilidade genética (HASBÚN et al., 2012). Além disso, para a utilização do marcador AFLP não é necessário conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção de *primers* (FALEIRO et al., 2001). Como desvantagens o AFLP apresenta a dominância do marcador, o alto custo e as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

Com objetivo de aumentar a eficiência e rendimento do processo, pesquisadores propuseram a utilização de corante IRDye® infravermelho (IRD) ou outros iniciadores oligonucleotídicos marcados por fluorescência, ao invés dos radioativos e análise de fragmentos com um sequenciador de DNA automatizado, em vez de eletroforese em gel de poliacrilamida (MYBURG et al., 2001; HASBÚN et al., 2012). Estas modificações aumentaram a eficiência e rendimento do processo (HARTL e SEEFELDER, 1998; HUANG e SUN, 1999).

No presente estudo, a fosforamidita foi escolhida para a marcação específica, por promover rapidez e confiabilidade, além de gerar um gel que pode ser visualizado em tempo real e lido por programas computacionais específicos. As imagens produzidas dos fragmentos são mais nítidas e de fácil detecção além de propiciar a realização de análises multiplex (MYBURG et al., 2008; LI-COR BIOSCIENCES, 2010).

O estudo da diversidade genética de plantas medicinais com marcadores moleculares tem sido amplamente empregado e a associação entre dados genéticos e perfil de marcadores químicos é fundamental para se estabelecer estratégias de conservação (MELO et al., 2009; BERTONI et al., 2010; MENDONÇA et al., 2012; SILVA et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a diversidade química e genética entre os indivíduos de *C. antisiphiliticus* por marcador molecular AFLP e quantificar o ácido ent-kaur-16-en-18-oico de folhas por HPLC.

2.2. Específicos

- Identificar combinações polimórficas para o estudo da variabilidade genética;
- Estimar as frequências alélicas e parâmetros genéticos básicos;
- Avaliar a estrutura genética populacional;
- Avaliar a divergência genética e padrões espaciais;
- Avaliar a variabilidade da concentração do ácido ent-kaur-16-en-18-oico, entre e dentro, das populações naturais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto (SP). Foram coletadas folhas jovens de seis populações naturais de *C. antisiphiliticus*, nos municípios de Catalão e Jataí (GO), Sacramento, Pratinha e São Gonçalo (MG) e Pedregulho (SP). As folhas foram utilizadas para os experimentos de biologia molécula e análise fitoquímica. A escolha das áreas de coleta foi aleatória e a localização determinada com GPS (sistema de posicionamento global) (Tabela 4 e Figura 6).

3.2. Extração de DNA

Folhas jovens de vinte indivíduos de cada população foram utilizadas como fonte de material genético.

Tabela 4: Municípios, códigos e coordenadas geográficas dos acessos de *C. antisiphiliticus* para estudo da diversidade genética.

Município	Código	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	Nº de indivíduos
Jataí	Jat	17°50'55,4"	51°29'55,5"	882	20
Catalão	Cat	18°00'30,0"	47°48'26,1"	867	20
Pratinha	Pr	19°49'01,0"	46°24'21,1"	1154	20
São Gonçalo	Sg	18°25'30,5"	43°29'57,1"	1099	20
Sacramento	Sac	19°46'06,7"	47°12'49,2"	1073	20
Pedregulho	Ped	20°13'25,9"	47°28'17,3"	1020	20
Total de indivíduos					120

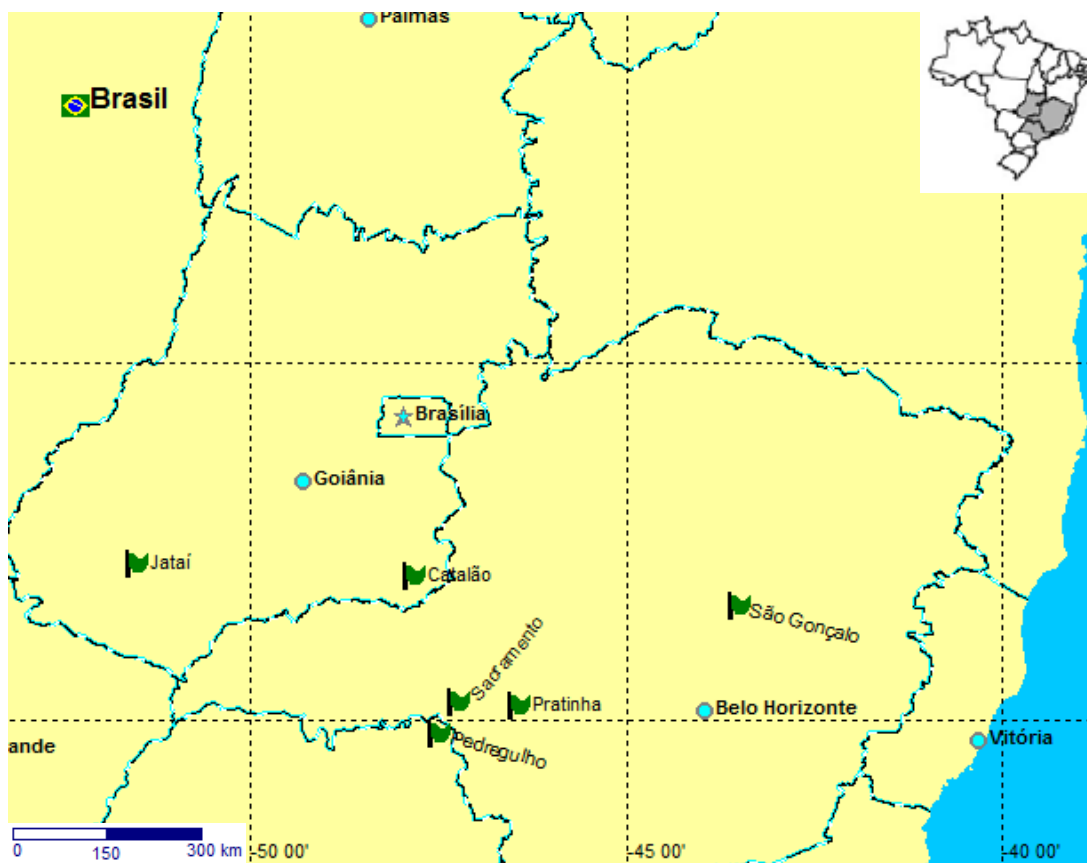


Figura 6: Locais de coleta das populações de *C. antisiphiliticus* nos três estados brasileiros (Fonte: GPS TrackMaker 13.9 FERREIRA, 2014).

Devido a dificuldade em obter material genético íntegro, dois protocolos de extração de DNA para a espécie *C. antisiphiliticus* foram avaliados:

Protocolo 1

Em um tubo de eppendorf de 2 mL foram pesadas 100 mg de folhas jovens, em seguida acrescentou-se sílica 60 e nitrogênio líquido. Posteriormente, iniciou-se a maceração com bastão de vidro esterilizado até a pulverização completa do material. Este procedimento foi realizado no gelo. Após a maceração, 1000 µL de tampão de extração (100 mM de Tris HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; solução 2% p/v de CTAB; solução 0,2% v/v 2 mercaptoetanol; PVPP 3% p/v; PVP 1% p/v) foram adicionados aos tubos, que foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 65°C por 30 min. As amostras foram

colocadas à temperatura ambiente para resfriamento, em seguida adicionaram-se 600 µL de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1).

O material foi centrifugado a 20817 g durante 5 minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo e adicionados 1/10 do volume da solução CTAB 10% (CTAB 10% e NaCl 1,4 M) e homogeneizada. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofil. O material foi homogeneizado e centrifugado a 17843 g durante 5 minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo e adicionada 2/3 do volume de isopropanol gelado. Em seguida, misturado calmamente e levados ao freezer por 2 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 11151 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

O sedimento (DNA) foi lavado duas vezes em etanol 70% e uma vez com etanol absoluto. Após a secagem, à temperatura ambiente, o ““pellet”” foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada. Foram adicionados 2 µL de enzima RNase (10 mg/mL) e incubado a 37° C por 20 minutos. A integridade e a quantidade dos ácidos nucleicos foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1 %) em tampão TBE 1X (108g Tris base, 53g Ácido bórico, 40mL EDTA 0,5M (pH 8) e 1000mL Água destilada qsp.), com voltagem de 5-9V/cm (DOYLE e DOYLE, 1987, com adaptações).

Protocolo 2

Em um tubo de eppendorf de 2 mL foram pesadas 100 mg de folhas jovens, em seguida acrescentou-se sílica 60 e nitrogênio líquido. Posteriormente, iniciou-se a maceração com bastão de vidro esterilizado até a pulverização completa do material. Foram adicionados 1 mL de tampão de lavagem (100mM Hepes, 0,1% (m/v) PVP, 4% (v/v) β-mercaptoetanol), os tubos foram vortexados 3 minutos e centrifugado por mais 3 minutos a 12000g. O sobrenadante foi descartado. O processo de lavagem foi repetido por mais cinco vezes.

Em seguida foi adicionado 1 mL de tampão de extração (15% (m/v) Sacarose, 50 mM Tris-HCl (ph 8), 50 mM EDTA (pH 8), 500 mM NaCl) ao precipitado e centrifugou-se por 5 minutos a 8400 g. O sobrenadante foi descartado e 450 µL de tampão de ressuspensão (20mM (Tris-HCl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8)) juntamente com 80 µL de SDS

(10%) foram adicionados, os tubos foram incubados a 70°C por 15 minutos.

As amostras foram colocadas à temperatura ambiente para resfriamento, em seguida adicionaram-se 300 µL de acetato de amônio (7,5M) e incubou-as em gelo por 40 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12000g a 4°C por 15 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para um eppendorf e adicionado um volume igual de isopropanol gelado, os tubos foram vertidos bruscamente e centrifugados a 12000g a 4°C por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado duas vezes com etanol 70% com posterior centrifugação a 12000g a 4°C por 3 minutos. Após a secagem, o “pellet” foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada e adicionaram-se 2 µL de enzima RNase (10 mg/mL) com posterior incubação a 37°C por 20 minutos. Após a extração procedeu-se com a purificação do DNA por tratamento com acetato de amônio. O DNA extraído foi ressuspensionado em 250 µL de água deionizada e acrescentaram-se 150 µL de acetato de amônio (7,5M), após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 15 minutos. Posteriormente, procedeu-se com a centrifugação a 10000g a 4°C por 30 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionou-se o dobro do volume de etanol absoluto e as amostras foram incubadas por 1 hora a -20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000g a 4°C por 10 minutos, o “pellet” foi lavado com etanol 70% e colocados para secar. Os “pellet”s foram ressuspensionados em água e armazenados em freezer até serem utilizados (DESHUMUKH et al., 2007, com adaptações).

3.3. Marcador molecular AFLP

Para a determinação do marcador molecular AFLP oito combinações aleatórias foram selecionadas para as análises, sendo os *primers* *EcoRI* marcados com fluorescência (fosforamidita). As análises foram realizadas usando o kit “IRDye® *fluorescent* AFLP® Kit *For Large Plant Genome Analysis*” (Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA. 2007) segundo as recomendações do fabricante, no equipamento 4300 DNA *Analyser* LI-COR® (LINCOLN, NEBRASKA, USA, 1997). Todas as reações foram realizadas no gelo. O protocolo proposto baseia-se na digestão do DNA com enzimas específicas (*EcoRI* e *MseI*), ligação de adaptadores, pré-amplificação e amplificação seletiva, como descrito a seguir.

3.3.1. Digestão

Para digestão do material genético (100ng em $\leq 9\mu\text{L}$) utilizou-se 2,5 μL buffer 5x, 1,0 μL mix de enzima EcoRI/MseI, completando o volume final para 12,5 μL com água deionizada. A solução foi gentilmente agitada, seguida por um spin e, posteriormente, incubada a 37°C por 2 horas, e a 70°C por 15 minutos.

3.3.2. Ligação dos adaptadores

Após a digestão, os fragmentos foram ligados aos adaptadores complementares aos sítios de restrição das enzimas, utilizando-se 0,5 μL T₄ DNA *ligase* (67U/ μL , Biolab's), 12,0 μL mix de adaptadores, 12,5 μL solução de digestão, resultando no volume final de 25 μL . A solução foi gentilmente agitada, seguida por um spin e, posteriormente, incubada a 20° C por 2 horas e a 70° C por 15 minutos.

3.3.3. Pré-amplificação

O produto da ligação foi diluído na proporção 1:10 (mix:água). Posteriormente, 2,5 μL foram utilizados para a reação de pré-amplificação, aos quais foram adicionados 18,0 μL mix *primers* pré-amplificação AFLP®, 2,5 μL tampão 10x (Fermentas), 2,0 μL cloreto de magnésio, 0,5 μL Taq DNA polimerase (5U/ μL , Fermentas), resultando no volume final de 25,5 μL . A solução foi gentilmente agitada, seguida por um spin e submetida à 29 ciclos: 94° C por 30 segundos, 56° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto.

3.3.4. Amplificação seletiva

O produto da pré-amplificação foi diluído na proporção 1:10 (mix:água), desta diluição foram utilizados 2,0 μL para reação de amplificação seletiva. Foram adicionados 6 μL de Working mix (200 μL para 33 reações) 131,6 μL água deionizada, 40 μL buffer 10x amplificação, 26,4 μL cloreto de magnésio, 2 μL Taq DNA polimerase (5U/ μL ,

Fermentas), 2µL solução pré-amplificação, 2µL primer *MseI*, 0,5µL *EcoRI* Dye 700 nm, 0,5µL *EcoRI* Dye 800 nm. As condições de ciclagens foram: 94°C por 30 segundos; 65°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; 12 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C decrescendo 0,7°C/ciclo por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; 23 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto. As reações foram congeladas a -20° C.

3.3.5. Desnaturação das amostras

As reações da amplificação seletiva foram diluídas para a desnaturação. Nesta etapa foram utilizados 10 µL de água deionizada acrescidos de 2 µL tampão de corrida (*Stop Blue Solution*) + 3 µL da reação seletiva. A desnaturação ocorreu a 95°C por 5 minutos.

3.3.6. Montagem da placa, eletroforese e leitura da placa

Os fragmentos resultantes dos processos de amplificação seletiva foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida (20mL Matriz de poliacrilamida 6,5% (KB^{Plus}), 150,0µL Solução APS 10%, 15,0µL TEMED) em placa de 25x25 cm montada com espaçadores de 0,25 mm e pente de 48 poços (formato “dente de tubarão”) também de 0,25 mm de espessura.

Após a polimerização da matriz foi realizada a pré-corrida sob condições controladas de 1500 V, 40 W, 40 mA, 45° C por 25 minutos.

Foram aplicados 0,6 µL para cada amostra e 0,8 µL para o marcador de peso molecular (50 a 700 pb). As condições de corrida foram: 1500 V, 40 W, 40 mA, 45°C por 3 horas e 30 minutos. A visualização do gel aconteceu em tempo real e a leitura da placa foi realizada no programa LI-COR SAGA^{MX} *Automated AFLP Analysis* v.3.3, que gerou uma matriz de dados a partir da presença/ausência de bandas.

3.4. Extração e isolamento do ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC de folhas de *C. antisiphiliticus*

Folhas de nove indivíduos de cada população de *C. antisiphiliticus* escolhidos ao acaso, foram maceradas em nitrogênio líquido e peneiradas em peneira de 48 mesh. Posteriormente, 600 mg de pó das folhas de cada indivíduo foram pesados e divididos em três frascos (3 x 200 mg). Em seguida adicionou-se 5 mL de metanol a cada frasco e estes foram submetidos a banho em ultrasson por 30 minutos (Figura 7). Os extratos foram filtrados, secos em capela e armazenados em freezer até análise em HPLC.

Para análise por HPLC as amostras foram solubilizadas em MeOH : H₂O (85 : 15) e aplicadas em cartucho de C18 (Supelco® - LC18 reorder 57054), previamente ativado com 1 mL de MeOH, seguido de 1 mL de MeOH : H₂O nas mesmas condições de preparo das amostras (85 : 15). Um mililitro da amostra solubilizada na concentração de 18 mg foi adicionada ao cartucho e, após adsorção, foram acrescentados 3 mL da solução MeOH : H₂O (85 : 15) para a eluição dos compostos de interesse. Os analitos em solução (6 mg.mL⁻¹) foram filtrados em membrana 0,22 µm (Millipore®) e 20 µL da solução foram submetidos à injeção em HPLC Shimadzu (LC-10 AD vp), acoplado a detector de arranjo di-iodo (SPD-M10A), coluna supelcosil LC-18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5µ), usando como fase móvel metanol : água + ácido acético 0,1% (85 : 15) por 45 minutos com fluxo de 1 mL/min. e detecção $\lambda = 210$ nm, modo isocrático (Pereira et al., 2012).

Além das folhas, também foi avaliado o teor do ácido ent-kaur-16-en-18-oico em extrato de raiz de *C. antisiphiliticus* coletadas *in situ* para efeito de comparação do teor desta substância em diferentes partes da planta.



Figura 7: Preparo dos extratos de *C. antisiphiliticus*: as folhas foram cortadas (A); maceradas em nitrogênio líquido (B); peneiradas em peneira de 48 mesh (C); o procedimento foi realizado em triplicata (D); detalhe do processo de filtração dos extratos (E). Fonte: Arquivo pessoal.

3.5. Análises estatísticas

A genotipagem dos indivíduos foi realizada através dos dados binários, presença ou ausência de bandas (1 e 0). Os parâmetros de variabilidade genética através do índice de Nei e a porcentagem de locus polimórficos e o cálculo da frequência alélica e análise molecular de variância (AMOVA), foram efetuadas através dos *softwares* Popgene32 e Genes

v. 2009.7.0 com 1000 simulações.

A distância geográfica foi calculada com o programa TrackMaker v.13.8 e possibilitou a análise de correlação entre distância genética e geográfica pelo teste de Mantel (FILHO, 2000) utilizando o programa Genes v. 2009.7.0 com 1000 simulações.

O agrupamento baseou-se no modelo UPGMA e a consistência dos ramos foi obtida com *bootstrap* de 1000 réplicas. A estrutura genética dos genótipos foi analisada através da Análise em Coordenadas Principais (PCoA), pelo programa GenAlEx v 6.5 (Genealex, PEAKALL e SMOUSE, 2006), e o programa STRUCTURE v.2.2.4 (PRITCHARD et al., 2000) através de agrupamento baseado no modelo Bayesiano e modelo de mistura (*Admixture model*) usando *burn-in* 200.000 seguido de uma extensão (*run length*) de 500.000, com cinco interações independentes e valores de K variando de 1 a 7. Para determinar o número de grupos genéticos utilizou-se o critério proposto por Evanno et al. (2005).

Os dados de concentração do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico em *C. antisiphiliticus* foi submetido à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Scott Knott 5% com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA

Uma das dificuldades encontradas durante o processo de extração de DNA da espécie *C. antisiphiliticus* foi a presença de viscosidade e oxidação das amostras, embora tenha sido utilizado PVP nos dois protocolos. O protocolo 2 (DESHUMUKH et al., 2007, com adaptações) foi o que apresentou melhor integridade do material genético e uma concentração média de DNA de 393,43 ng/μL. A superioridade deste protocolo pode ser resultado das várias lavagens as quais as amostras foram submetidas, possibilitando amostras sem viscosidade e menos degradadas. Por isso, este protocolo foi escolhido para a realização

do trabalho. Outros estudos também para espécies tropicais tem relatado a dificuldade de se obter DNA íntegro devido à presença de compostos secundários, principalmente, da classe dos fenólicos (RATH et al., 1998; DA SILVA, 2003; DESHUMUKH et al., 2007). Por isso, a importância da elaboração de protocolos específicos, ou adaptações, que atendam as particularidades das plantas estudadas.

4.2 Marcador AFLP

A leitura através do programa SAGA^{MX} possibilitou a visualização de 255 bandas a partir de oito combinações de *primers*, o número de bandas por combinação foi no máximo 51 e no mínimo 10, sendo todas polimórficas (Tabela 5).

Em relação à porcentagem de polimorfismo temos as populações de Pratinha e Jataí apresentando os maiores valores de 92,16% e 91,76%, respectivamente, e Sacramento a menor porcentagem (78,43%) (Tabela 6). Essa elevada porcentagem de polimorfismo encontrada na espécie, provavelmente, está relacionada ao tipo de polinização e dispersão. Embora, não haja estudos de fenologia com *C. antisyphiliticus*, trabalhos realizados com espécies do mesmo gênero mostram que há predominância de polinização cruzada e dispersão de semente por insetos (DOMÍNGUEZ e BULLOCK, 1989; PASSOS, 1995; ALMEIDA et al., 2003b; PIRES et al., 2004; PAULA, 2010) e se isso for um padrão para o gênero, pode explicar o elevado nível de polimorfismo encontrado em *C. antisyphiliticus*.

Tabela 5: Combinação nucleotídica e número de fragmentos amplificados.

Combinação <i>EcoRI/MseI</i>	Total de fragmentos
ACA/CGA	51
AAC/CTA	39
AAG/CAT	41
ACC/CTG	42
ACG/CAG	28
AGC/CTA	24
AGG/CAT	20
ACT/CTG	10
TOTAL	255
MÉDIA	31,87

As distâncias genéticas de Nei (h) variou de 0,2733 a 0,3540 e o índice de Shannon de 0,4136 a 0,5195. O coeficiente de correlação entre os índices de Nei (h) e de Shannon foi de 0,998 demonstrando forte correlação positiva entre os mesmos. Pedregulho apresentou a menor diversidade para ambos os índices e Catalão e Pratinha apresentaram o aior (Tabela 6). Esta última população também mostrou os melhores resultados para os parâmetros: porcentagem de *loci* polimórficos, número de alelos observados e número de alelos efetivos.

Tabela 6: Estatística descritiva básica de seis populações de *C. antisiphiliticus* por marcadores AFLP.

Populações	$\tilde{N}$	na	P	Ne	h	I
Catalão	20	1,9176	91,76	1,5583	0,3209	0,4770
Jataí	20	1,8627	86,27	1,5407	0,3104	0,4602
Sacramento	20	1,7843	78,43	1,4931	0,2841	0,4212
Pratinha	20	1,9216	92,16	1,6262	0,3540	0,5195
São Gonçalo	20	1,8627	84,71	1,4916	0,2896	0,4358
Pedregulho	20	1,8471	86,27	1,4614	0,2733	0,4136
Média	20	1,8660	86,60	1,5286	0,3054	0,4546

Tamanho médio da amostragem ($\tilde{N}$) número de alelos observados (na) e porcentagem de *loci* polimórficos (P), número efetivo de alelos (Ne), diversidade genética de Nei (1978) (h) e índice de Shannon (I). Resultados obtidos pelo programa POPGENE (YEH et al., 1999).

A variabilidade dentro da população foi maior (61,97%) do que entre as populações (38,03%) e apesar de ser uma espécie com tendência à alogamia, o fluxo gênico entre as populações foi baixo, $Nm = 1,18$, e considerado restrito, provavelmente em consequência da antropização das áreas onde as populações foram coletadas. Este mesmo padrão de distribuição da variabilidade foi encontrado em outros estudos com espécies do Cerrado, a exemplo de *Palicourea rigida* (SILVA et al., 2013), *Stryphnodendron adstringens* (MENDONÇA et al., 2012), *Jacaranda decurrens* (BERTONI et al., 2010), *Lychnophora ericoides* (MELO et al., 2009) e *Myracrodruon urundeuva* (FREITAS et al., 2005).

A alta variação intrapopulacional é esperada em espécies alógamas e o fluxo gênico é inversamente proporcional a divergência dentro das populações, ou seja, quanto maior o fluxo gênico, menor a divergência intrapopulacional (LOVELESS e HAMDRICK, 1984).

Segundo Ennos (1994), o sucesso do fluxo gênico entre populações de plantas está na dependência do êxito dos agentes dispersores de pólen e sementes e, em condições naturais os dois mecanismos se mesclam. Assim, em relação a *C. antisiphiliticus* sua dispersão é realizada, principalmente, por formigas, visto que a semente possui a carúncula, uma estrutura que tem a capacidade de atrair esses dispersores (WEBSTER, 1994).

Além disso, estudos com espécies do gênero *Croton* demonstram que o pólen é dispersado, principalmente, pelo vento e de forma secundária por insetos, especialmente abelhas (DOMINGUEZ e BULLOCK, 1989; PASSOS, 1995; SANTOS et al., 2005; JUHÁSZ et al., 2009).

Nesse sentido, o baixo fluxo gênico ($Nm=1,18$) encontrado nas populações avaliadas de *C. antisyphiliticus* pode ser resultado da dificuldade de dispersão, tanto de sementes como de pólen, visto que a localização dos indivíduos coletados foi restrita a pequenas faixas de vegetação à beira das estradas e área isolada de proteção permanente (APP).

Smouse et al. (2001) afirmam que quanto maior a estruturação menor será a dispersão de pólen e, conseqüentemente, menor será o fluxo gênico. Essa afirmativa está de acordo com os nossos resultados visto que o índice de fixação de alelo (F_{st}) encontrado foi de 0,3803 (Tabela 7), valor acima do limite proposto por Wright (1978) que é de 0,25, indicando um valor de estruturação populacional muito alto. Esse resultado corrobora com os dados obtidos por Silva et al. (2013) com a espécie *Palicourea rigida* ($F_{st}=0.3601$) também coletada em área antropizada.

De acordo com Frankham et al. (2007), quanto maior o valor de F_{st} menor a capacidade de dispersão, o que aumenta a probabilidade destas populações tornarem-se endogâmicas. Os autores afirmam ainda que, em pequenas populações a endogamia e a perda de diversidade genética são inevitáveis, reduzindo as taxas de reprodução e sobrevivência em curto espaço de tempo. Além disso, as populações endogâmicas tem pouca capacidade de adaptação as mudanças ambientais, o que aumenta o risco de extinção (ELLSTRAND et al., 1993; SILVA et al., 2013). Assim, os valores dos índices de fixação de alelo e de fluxo gênico refletem a situação da *C. antisyphiliticus* nos locais coletados, ou seja, regiões fortemente antropizadas e, conseqüentemente, fragmentadas, resultando em populações estruturadas em modelos de ilhas.

Tabela 7. Análise Molecular de Variância (AMOVA) entre e dentro de uma amostragem das populações de *C. antisiphiliticus* baseada em marcadores AFLP.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	S.Q.M.	Componentes de variância	% total de variação	P	Estatística -PHIst
Entre populações	5	2571,325	514,265	23,776	38,0293	<0,001	0,3803
Dentro de populações	114	4416,85	38,7242	38,7743	61,9707	-	-
Total	119	6988,175	58,7242	62,5203	100,00	-	-

G. L., grau de liberdade. S. Q., soma dos quadrados. S. Q. M., soma dos quadrados médios. p, nível de significância da estimativa de variação genética, utilizando 1000 permutações.

Estatística PHIst, variação genética estimada para fonte de variação, análoga à estatística- *Fst* de Wright. Resultados obtidos pelo programa GENES, 2006.

O padrão espacial determinado pelo teste de Mantel com base em 1000 permutações foi de $r = 0,17$, indicando não haver correlação significativa entre as distâncias geográficas e genéticas. Resultado similar foi encontrado por Bertoni (2003) em populações de *Zeyheria montana* e Mendonça et al. (2012) em populações de *Stryphnodendron adstringens*. Segundo Evanno et al. (2005), a estrutura genética de populações nem sempre reflete a proximidade geográfica dos indivíduos. Populações que não são discretamente distribuídas podem, contudo, ser geneticamente estruturadas.

A abordagem Bayesiana através do programa STRUCTURE foi usada para a confirmação dos resultados que indicam a formação de três grupos. As seis populações foram estruturadas em três grupos (Figuras 8, 9 e 10), assim como já havia sido indicado pelas análises do dendograma e de PCoA. O Grupo (1) foi formado pelas populações de Catalão e Jataí, grupo (2) formado por São Gonçalo e Pedregulho e o grupo (3) representado por Sacramento e Pratinha.

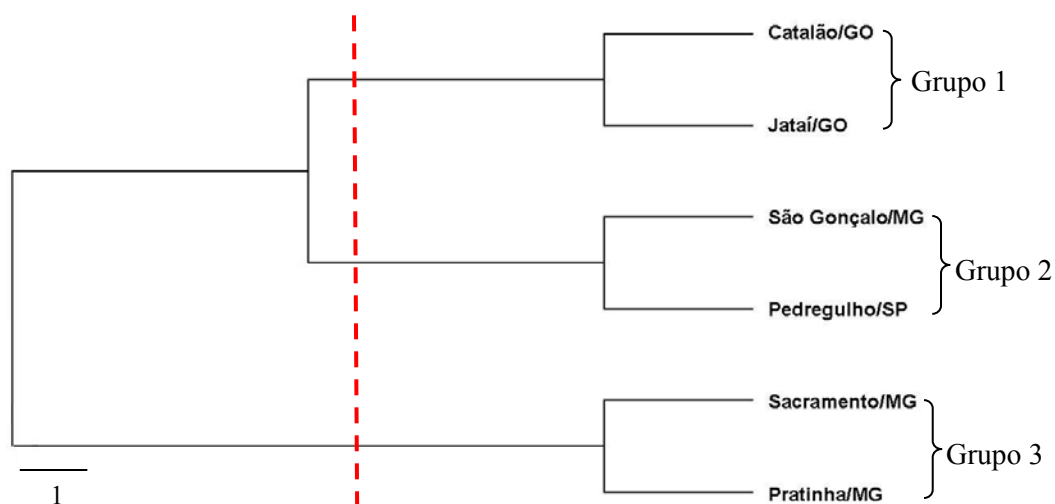


Figura 8: Dendrograma das populações de *C. antisiphiliticus*.

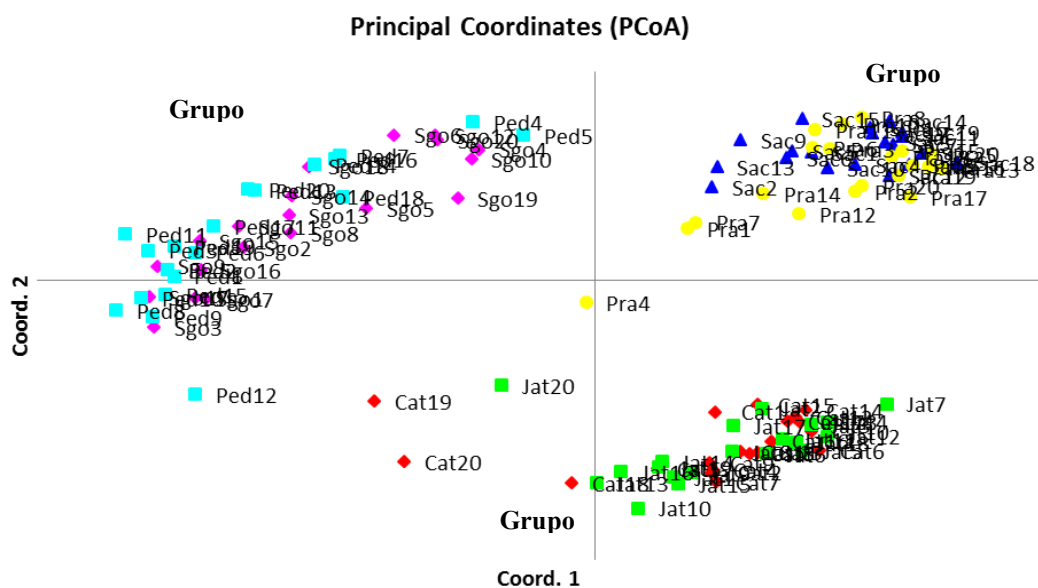


Figura 9: Análise em coordenadas principais (PCoA) das populações de *C. antisiphiliticus*.

Os resultados gerados pelo programa STRUCTURE distribuíram os 120 indivíduos em seis grupos genéticos (Figura 10), a mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo.

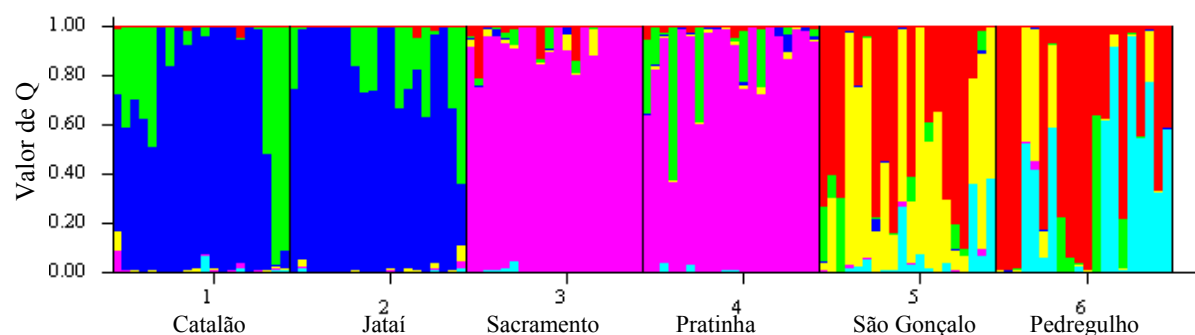


Figura 10: Composição dos grupos genéticos das populações de *C. antisiphiliticus* identificados através do programa STRUCTURE.

Apesar de não ter sido constatada correlação entre distâncias genéticas e geográficas, observou-se grande compartilhamento de indivíduos de populações geograficamente próximas (Figura 7), a exemplo dos grupos genéticos representados pelas cores azul e lilás. A partir dos dados da composição dos grupos identificados pelo programa STRUCTURE é possível estabelecer uma estratégia de coleta priorizando as populações de Catalão, Sacramento e Pedregulho, por serem representantes da maior diversidade genética.

De maneira geral, as Figuras 8, 9 e 10 refletem como as populações estão estruturadas, evidenciando a fragmentação dessa espécie em populações menores. Além disso, a Figura 10 mostra tendência das populações de São Gonçalo e Pedregulho de se dividirem em subpopulações, visto que, apresentam praticamente 50% do seu genoma dividido em cada grupo genético. Esse dado merece atenção especial pois, uma das consequências da fragmentação pode ser a restrição de indivíduos de uma espécie a pequenas áreas, isolando-os parcial ou totalmente das outras populações. Sabe-se que a fragmentação, do ponto de vista genético, poderá alterar o fluxo gênico entre as populações de maneira que

elas se tornem mais susceptíveis aos processos de endogamia e deriva genética (YOUNG et al., 2001; GALETTI JR et al., 2008).

Além disso, com a fragmentação do *habitat*, há redução no tamanho efetivo da população, onde pode ocorrer perda de indivíduos portadores de composição alélica favorável. Assim, no decorrer das gerações os indivíduos que restaram começam a acumular alelos idênticos como consequência da elevação dos níveis de endogamia, reduzindo o valor adaptativo nesses indivíduos (YONG et al., 2001; MELO, 2012).

Por isso estudos como este que avaliam a estrutura genética de uma espécie são imprescindíveis para que medidas efetivas de conservação sejam tomadas.

4.3. Extração e isolamento do ácido ent-kaur-16-en-18-oico por HPLC de folhas de *C. antisiphiliticus*

Houve diferença no teor do ácido ent-kaur-16-en-18-oico entre e dentro das populações (Tabelas 8 e 9), com destaque para os indivíduos coletados no estado de Goiás, pois enquanto em Jataí todos apresentaram o diterpeno, em Catalão o mesmo não foi detectado em nenhum dos indivíduos analisados, o que mostra a presença de quimiotipos na espécie *C. antisiphiliticus*. Além disso, foi também na população de Jataí que se obteve a maior concentração do diterpeno.

As variações quantitativas e qualitativas nos metabólitos secundários é afetada pelos fatores genéticos e ambientais e, a interação desses fatores, geram diversidade biológica que podem constituir os chamados quimiotipos (D'ANDREA et al., 1995; HU, et al., 2007; ZHANG et al., 2011).

Os resultados obtidos a partir da quantificação do ácido ent-kaur-16-en-18-oico dentro das populações sugerem que a presença ou ausência desta substância esta mais relacionada a fatores genéticos do que ambientais. Outro dado importante a ser considerado é que há uma similaridade genética entre as populações de Jataí e Catalão e ao mesmo tempo uma divergência química entre elas, o que revela não haver correlação entre os agrupamentos genéticos e químicos, uma vez que os genes envolvidos na produção do ácido

ent-kaur-16-en-18-oico estão sendo expressos numa população e não na outra. A população de Jataí apresentou a maior concentração (56,29 ug.g⁻¹ PS).

Esse resultado é reforçado por estudos os quais supõe que, como determinados compostos químicos são controlados por poucos genes distribuídos de forma reduzida no genoma, esses podem não ter sido detectados pelo marcador AFLP (HONG, et al., 2005; HADIAN et al., 2011; ZHANG et al., 2011; BENINI et al., 2012).

Outros estudos que comparam dados químicos e genéticos de diversas espécies também não obtiveram correlação entre estes dois parâmetros; a exemplo de *Panax notoginseng* (HONG et al., 2005), *Vitex rotundifolia* (HU et al., 2007), *Coriandrum sativum* L.(LÓPEZ et al., 2008), *Lippia alba* Mill. (MANICA-CATTANI et al., 2009), *Centella asiatica* (ZHANG et al., 2011), *Zataria multiflora* Boiss. (HADIAN et al., 2011), *Cananga odorata* (BENINI et al., 2012), *Crocus sativus* L. (SIRACUSA et al., 2012) e *Erigeron breviscapus* (LI et al., 2013).

Além da comparação genética e química realizada em folhas indivíduos da espécie *C. antisiphiliticus*, foi realizada também uma comparação dos teores do diterpeno oriundos de diversas parte do vegetal como, folhas (Jat1), calos (24º dia) e raízes (*in situ*). Houve diferença no teor do ácido ent-kaur-16-en-18-oico nas distintas partes do vegetal (Tabela 10). As raízes apresentaram maior concentração do diterpeno (275,76 ug/g PS), seguida pelas folhas (190,22 ug/g PS) e por último os calos (109,84 ug/g PS). Esses dados foram diferentes dos demonstrados para outras espécies que produzem maior teor do composto ativo em condição *in vitro* do que *in natura*, a exemplo de *Centella asiatica* (KIONG et al., 2005; JAMES et al., 2008), *Cordia verbenacea* (LAMEIRA et al., 2009), *Rhodiola crenulata* (SHI et al., 2013) e *Maytenus ilicifolia* (BUFFA FILHO et al., 2002; BULFFA FILHO et al., 2004; COPPEDE et al., 2014).

Apesar do alto teor do ácido ent-kaur-16-en-18-oico encontrado na raiz de *C. antisiphiliticus*, ser maior do que nas folhas e nos calos, a eliminação da planta para obtenção desse diterpeno a partir das raízes compromete a sobrevivência da espécie, visto que a mesma ainda não foi domesticada e/ou cultivada. Além disso, o fato da espécie ser uma erva e apresentar sistema radicular reduzido limita ainda mais a produção do ácido ent-kaur-16-en-18-oico a partir das raízes.

Outro ponto importante a ser considerado é que a produção de folhas também é restrita, não ultrapassando o número de dez por indivíduo e durante o outono e no inverno a planta perde as folhas, não havendo material disponível ao longo do ano para obtenção permanente do ácido ent-kaur-16-en-18-oico.

Ao comparar a produção de diterpeno em calos e raiz é possível estimar que calos produziram 275,76 ug/g PS de ácido ent-kaur-16-en-18-oico em aproximadamente 60 dias, enquanto que as raízes de plantas adultas, acumulariam a mesma quantidade com a idade superior a 2 anos. Assim, a produção do diterpeno por meio de calos, que é obtido ininterruptamente *in vitro*, é o mais viável do que por folhas e raízes obtidas *in situ*.

Tabela 8: Teor de diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico dentro das populações *C. antisiphiliticus*.

População	Jat	Pra	Ped	Sac	Sgo	Cat
Individuo	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g
1	190,22 ^a	27,37 b	0,00b	10,50 d	14,88 b	0,00a
2	66,26c	11,80 c	0,00b	18,13 c	16,66 b	0,00a
3	21,01d	27,96 b	0,00b	42,97 a	19,59 a	0,00a
4	51,94c	0,00 d	9,31 a	24,02b	19,78 a	0,00a
5	16,91d	25,18 b	0,00b	15,26 c	14,36 b	0,00a
6	40,70d	9,61 c	0,00b	8,54 d	21,18 a	0,00a
7	20,96d	13,45 c	0,00b	13,06 c	0,00 c	0,00a
8	89,42b	110,29 a	0,00b	9,57 d	0,00 c	0,00a
9	9,21d	14,15 c	0,00b	0,00 e	0,00 c	0,00a
C.V.	22,00	17,72	0,00	27,74	13,64	0,00

Populações = Jat: Jataí; Pr: Pratinha; Ped: Pedregulho; Sac: Sacramento; Sgo: São Gonçalo e Cat: Catalão. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Tabela 9: Teor de diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico entre as populações *C. antisyphiliticus*.

População	Diterpeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PS)
Catalão	0,00b
Pedregulho	1,03 b
Sacramento	15,78 b
São Gonçalo	17,74 b
Pratinha	26,65 b
Jataí	56,29 a
CV	77,12

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Tabela 10: Concentração do ácido ent-kaur-16-en-18-oico em calos, folha e raiz de *C. antisyphiliticus*.

Partes da planta	Diterpeno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PS)
Raiz*	275,76a
Folha*	190,21b
Calos	109,84c
C.V.	5,8

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. *Material coletado *in situ*.

5. CONCLUSÕES

As auxinas utilizadas induziram calogênese em explante de *C. antisiphiliticus*, sendo o 2,4-D a auxina mais eficiente.

O melhor rendimento do ácido ent-kaur-16-en-18-oico foi obtido aos 36 dias embora o maior acúmulo de biomassa seca e do teor do diterpeno não tenham sido coincidentes.

O marcador molecular AFLP foi eficiente para caracterizar a variabilidade genética em populações de *C. antisiphiliticus* e concluiu-se que estas populações estão estruturada em modelo de ilhas, o que esclarece o nível de vulnerabilidade da espécie.

A espécie *C. antisiphiliticus* apresenta quimiotipos quanto ao ácido ent-kaur-16-en-18-oico e a diversidade química encontrada entre e dentro das populações está relacionada tanto a fatores genéticos quanto a ambientais.

Jataí foi a população que produziu o maior teor do ácido ent-kaur-16-en-18-oico.

A produção do ácido ent-kaur-16-en-18-oico é mais viável por cultura de tecido do que a partir de plantas coletadas *in situ*.

REFERÊNCIAS

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 6, p. 494 - 497, sept., 1999. doi:10.1002/(SICI)1099573(199909)13:6<494::AIDPTR490>3.0.CO;2-9.

ABREU A. S. et al, Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *glabrior* (Euphorbiaceae) **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA** Vol 1, No 2, Julho 2001 Página 1 de 9 disponível em: <<http://www.ufpa.br/revistaic>> . Acesso em: 13 de nov. 2014.

ADEROGBA, M.A., et al. Isolation and characterization of novel antioxidant constituents of *Croton zambesicus* leaf extract. **Natural Product Research**, v. 25, p. 1224-1233. 2011
ADOLF, W. et al. Skin irritant diterpene orthoesters of the daphnane type from *Peddiea africana* and *P. Volkensii* **Phytochemistry**, v. 24, p. 2047-2049, 1985.

ALFONSO-CASTRO, A. J. et al. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 438 - 442, mar., 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112000104>>. Acesso em: 12 mar. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.009>.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p

ALMEIDA, A. B. A. et al. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic

croton in obtained from *Croton cajucara* Benth., **European Journal of Pharmacology**, v. 472, n. 3, p. 205 – 212, jul., 2003a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299903019095>>. Acesso em: 13 out. 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01909-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01909-5).

ALMEIDA, D. et al. **Plantas visitadas por abelhas e polinização**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, 40 p. - (Série Produtor Rural, Edição Especial) ISBN 1414-4530, 2003b.

ALMEIDA, C. V. de; YARA, R.; ALMEIDA, M. de. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p.467-470, 2005.

ALMEIDA, T. S. et al. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630 - 633, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012005171>>. Acesso em: 11 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.010>.

ALMEIDA, V. P.; SHEPHERD, S. L. K. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): *in vitro* cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 381-384, dez. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84041999000300005;script=sci_arttext>. Acesso em: 12 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84041999000300005>.

ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 101 - 105, april, 2005. doi: 10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x.

ARIAS, M. et al. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundários. **Dyna**, v. 76, n. 157, p. 109 - 121, mar., 2009. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49611942011>>. Acesso em: 12 oct. 2013.

AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p.665-669, 2010.

AZEVEDO, K.S. Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos de anatomia foliar de

Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). 2003. 86p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Agronomia/ Fitotecnia) - Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AZEVEDO, M. M. B. et al. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves of two morphotypes of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 4, p. 351 - 357, 2012. doi: 10.1080/10412905.2012.692902

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. Academic Press, London. 2001.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research** v. 14, p. 1-16. 2004.

BERRY, P. E. et al. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, sept. 2005.

BERTONI, B. W. et al. Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 532-538, July, 2010.

BERTONI, B. W. **Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart.**.2003.165f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**.Springer-Verlag, New York. 1982.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M.. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ª ed. Plenum Press, New York. 1994.

BEZERRA, D. P. et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224 – 1231, aug. 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200800253/abstract;jsessionid=84343C037AE2EAD03AF38E15B0754391.f04t02>>. Acesso em: 12 out. 2013. doi:10.1002/cbdv.200800253.

BLECHERT, S., GIUENARD, D. **Taxus alkaloids**. In: BROSSI, A.(Ed.), The Alkaloids, vol. 39. Academic Press, San Diego. 1990.

BRAQUET, P. **Ginkgolides: chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives**. Barcelona: J. R. Prous, 1988

BRITO, A.R. et al. Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *C. cajucara*. **Planta Medica**. V. 64,p. 126–129, 1998.

BUFFA FILHO, W. *In vitro* propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reversephase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, part IV, p. 137-146, Sept. 2004.

BUFFA FILHO, W. et al., Quantitative determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 75-78, Mar./Apr. 2002.

CAMILLO, J. et al., Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.184-189, 2009.

CARNEIRO, M. R. B.; SANTOS, M. L. Os recursos vegetais medicinais utilizados pela população da região Centro Oeste do Brasil: uma compilação de espécies ou Checklist de Fanerógamas. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science** v. 2, n. 1, p.28-42, 2013.

CARNEIRO-TORRES, D. S.; FRANÇA, F.; CORDEIRO, I. A família Euphorbiaceae na flora de inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 31-47, 2002.

CARVALHO, J .C. T. et al. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *C. cajucara*. Part 1. **Planta Med**. V. 62, p. 402–404. 1996.

CARUZO, M. B. R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo Crotoneae Dumort. (Euphorbiaceae s.s.)

no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 571-585, 2007.

CARVALHO, F. K. **Análise fitoquímica e atividade biológica de *Croton antisyphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon**. Tese (doutorado) 224f- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2013.

CAVÉCHIA, L. A.; PROENÇA, C. E. B. Resgate cultural de usos de plantas nativas do Cerrado pela população tradicional da Região do atual Distrito Federal. **Heringeriana**, Brasília, v. 1, n. 2, p.11 - 24, 2007.

CELEDÓN, P. A. et al. Utilização de nutrientes por células de algodoeiro cultivadas em suspensão. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3. p. 431-437, jul./set. 2000.

CHAVES, E. **Composição florística e descrição morfológica das espécies herbáceo-arbustivas de uma mata de galeria em Alto Paraíso, Goiás, Brasil**. 2006. 136f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, São Paulo, 2006.

CLEMENTE, M. S. **Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

COPPEDE, J. S. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots *in natura* **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 118, p. 33–43. 2014.

COSTA, J. G. M. et al . Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa , v. 18, n. 4, p. 583 - 586, out./dez. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0102-695X2008000400015;lng=en;nrm=iso>. Acesso em:11 out 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400015>.

COSTA, M. P., et al. Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 275-286, 2007.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Análise multivariada e simulação**. Editora UFV. Viçosa (MG). 175p. 2006

D'ANDREA, A. et al.. Examen del Aceite esencial de *Lippia alba* (mill.) N.E.Br la salvia morada de Corrientes., **IX Sesion de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas** de la UNNE; p. 74. 1995.

DA SILVA, M. A. S. **VARIABILIDADE GENÉTICA E FITOQUÍMICA DE *Casearia sylvestris* Sw. EM POPULAÇÕES DO CERRADO E MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DE SÃO PAULO**. 2003. 155f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. Disponível em:< <http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/175323>> Acesso em: 23 set 2013.

DEMETZOS C. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cisclerodane type diterpenes. **Planta Medica**. v. 67, n. 7, p. 614-618, 2001.

DESHUMUKH, V. P. et al. A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arijuna* (Roxb.) Whight and Argot. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.10, n. 3, p. 468-472, 2007.

DOYLE, J. J.; J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin** v. 19, p. 11-15, 1987.

DOMINGUEZ, C.A.; BULLOCK, S.H. La reproducción de *Croton suberosus* (Euphorbiaceae) en luz y sombra. **Revista de Biología Tropical** v. 37, p.1-10, 1989.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetics on sequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217-242, 1993.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v.72, p.250-259, 1994.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47, 2005.

FACANALI, R. **Estudo da biologia reprodutiva, diversidade genética e química de populações de *Ocimum selloi* Benth.** 2008. 129 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103243>>. Acesso em 23 out 2013.

FARIAS, F. R. et al. Bark anatomy in *Croton draco* var. *draco* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 12, p. 2155–2167, 2009.

FARMACOPÉIA POPULAR DO CERRADO. **Farmacopéia Popular do Cerrado**. Goiás/GO: Articulação Pacari, 2009, 347 p.

FEITOSA et al., Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v 29, n 2, p. 370-377, 2013. disponível em <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14007>> Acesso em: 24 nov 2014.

FELFILI, J. M. et al. Composição florística da Estação Ecológica de Águas Emendadas no Distrito Federal. **Heringeriana**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 25-85, 2007.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369 - 394, 2006.

FERNANDES, V. C. et al. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1005-1011, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613246>>. Acesso em: 13 out 2013. <http://dx.doi.org/10.4238/2013>.

FERNANDES, E. F. A. **Estudo do metabolismo *in vitro* do diterpeno ácido caurenoico**. 61f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2013

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.1 - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows**.

Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2005. Download gratuito. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2013.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética – cap. 4. In: **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3º edição. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 62-68, 1998.

FILHO, J. A. F. D. Taxas de evolução e comparação de matrizes. In: **Métodos Filogenéticos Comparativos**. Ribeirão Preto: Editora Holos, p. 62-64, 2000.

FLORA BRASILIENSIS. v. 11, n. 2, p. 207-209. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/index>>. Acesso em: 27 out. 2010.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1383 – 1390, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03707.x/abstract>>. Acesso em: 12 out. 2013. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03707.x

FORZZA, R. C. et al. Lista de espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; LIMA, G. P. P. Avaliação da aplicação exógena de poliaminas no crescimento de calos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, dec. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0100-29452009000400040;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 13 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452009000400040>.

FRANÇA, F.; MELO, E.; SANTOS, C. C. Flora de inselbergs da Região de Milagres, Bahia, Brasil: I. Caracterização da vegetação e lista de espécies de dois inselbergs. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 17, p. 177-184, jul./dez. 1997.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRIOSCOE, D.A. **A Primer Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 220. 2007

FREITAS et al. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr.

All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, n. 68, p. 21-28, ago. 2005

FREIXA, B. et al. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 6, p. 427 - 430, sept. 1998. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199809)12:6<427::AID-PTR338>3.0.CO;2-X

FUJITA, Y. Industrial production of shikonin and berberine. In: Bock, G., Marsh, J. (Eds.), **Application of Plant Cell and Tissue Culture**. CIBA Foundation Symposium, vol. 137. Wiley, Chichester, UK. p. 228–235, 1988.

GARCÍA, P. A. et al. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, p. 455–483, 2007. ISSN 1420-3049

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Review**, Oxford, v.80, p. 413-443, 2005.

GHISALBERTI, E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, p. 303–325. 1997

GOOD, M. J. W. et al. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. **Conservation Biology**, v. 10, p. 796-805, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1, p.43 - 76. 1998.

GU W. Z. et al.. Isolation, purification, and characterization of immunosuppressive compounds from tripterygium: triptolide and triptolide. **International Journal Immunopharmacology**.v. 17, n. 5, p. 351-356, 1995.

GUARIM NETO G.; MORAIS R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica** v. 17, n. 4, p. 561-584. 2003.

GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético . **Biociência**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.24-33, nov/dez . 2009.

GURGEL, L. A. et al. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 409 – 412, feb. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104006142>>. Acesso em 13 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.033>.

HABER, L. L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster*** MART. 2008. 138f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008. Disponível em:< www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0255.pdf>. Acesso em: 14.jan.2015

HADIAN, J, et al. Chemical and Genetic Diversity of *Zataria multifloraboiss.* Accessions Growing Wild in Iran. **Chemistry & biodiversity**. v. 8, n. 1, p. 176-188, 2011.

HAGIWARA, H. et al.. A total synthesis of an antibacterial clerodane, 16-hydroxycleroda-3,13(14)Zdien-15,16-olide. **Journal Chemical Society Perkin Trans.** v. 1, p 757–764. 1995.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN- BROYLES, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. **New Forest**. v. 6, p. 95–124, 1992.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.

HARTL, L.; SEEFELDER, S. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. **TAG**, v. 96, p. 112–116, 1998.

HEDRICK, P.W. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v.53.n.2, p. 313-318, 1999.

HIRUMA-LIMA C. A. Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Phytomedicine**. v. 8, n. 2, p. 94-100, 2001.

HONG, D. Y. Q. et al. Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 53, n. 22, p. 8460-8467, 2005.

HU, Y et al. Association between chemical and genetic variation of *Vitex rotundifolia* populations from different locations in China: its implication for quality control of medicinal plants. **Biomedical Chromatography**. v. 21, p. 967–975, 2007. (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/bmc.841

HUANG, J.; SUN, M. A modified AFLP with fluorescence-labelled *primers* and automated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants. **Biotechnology Tech** v. 13, p. 277–278, 1999.

ICHIHARA, Y. et al. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *C. cajucara*. **Planta Medica**, v. 58, p. 549–551. , 1992.

JAMES, J. T. et al. Characterization of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoids in callus, cell suspensions and leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 94, n. 1, p. 91-99, July 2008.

JEONG, S.-Il, et al. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

JÚNIOR, F. E. B. et al. Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, Article ID 579346, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/579346

KELLER L. F., WALLER D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology Evolution** v. 17, n. 5, p. 230–241, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534702024898> >. Acesso em: 11 jan. 2015 . doi:10.1016/S0169-5347(02)02489-8

KIERAN, P. M.; MACLOUGHLIN, P. F.; MALONE, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations, **Journal of Biotechnology**, v. 59, n. 1 - 2, p. 39 - 52, dec. 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165697001636>>. Acesso em: 11 out. 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00163-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00163-6).

KIONG, A. L. P. et al. Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus cultures. **Pakistan Journal Biol Scientia** v. 8, p. 1160–1169. doi:10.3923/pjbs.2005.1160.1169, 2005.

LANGAT, M. K. et al. Ent-kauren-19-oic acid derivatives from the stem bark of *Croton pseudopulchellus* Pax. **Phytochemistry Letters**. v., 5, n. 3, p. 414-418, 2012.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Biotecnologia**. p. 97-108, 2000.

LEÓN, K. ; SANTIAGO, J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. **Revista Sociedad Química Perú**, Lima, v. 73, n. 3, p. 158 – 165, jul. 2007. Disponível em <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S1810-634X2007000300005;lng=es;nrm=iso>. Acesso em: 11 out. 2013.

LI, X. et al. The Relationships between Chemical and Genetic Differentiation and Environmental Factors across the Distribution of *Erigeron breviscapus* (Asteraceae). **PloS one** v. 8, n. 11, e74490, 2013.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* BAILL. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev., 2006

LIMA, R.B.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2 abr/jun, 2008.

LONDE, L. N. et al. Divergência genética entre populações de *Anacardium humile* St. Hill. por marcadores AFLP. **Circular Técnica EPAMIG**, Belo Horizonte, n. 105, 2010. ISSN: 0103-4413.

LOPES E LOPES, M.I. et al. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal Ethnopharmacology**. v. 95, p. 437-445. 2004.

LÓPEZ, P. A., et al. Assessing phenotypic, biochemical, and molecular diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) germplasm. **Genetic resources and crop evolution**, v. 55, n. 2, p. 247-275, 2008.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p.65-95, 1984.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer, New York, 1970.

MACIEL, M. A. M. et al. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against ehrlich carcinoma and human K562 leukemia cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 2, Apr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0103-50532007000200022;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 14 jan. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000200022>.

MACIEL, M. M. et al. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v.49, n. 3, p 823-828, 1998.

MACIEL, M. M. et al. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n.1, p. 41-55, 2000.

MAISTRO, E. L. et. al. Dragon's blood *Croton palanostigma* induces genotoxic effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 406 - 411, may 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113001827>> Acesso em: 7 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.026>.

MANICA-CATTANI, M. F., et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill.(Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**. v. 69, n. 2, p. 375-380, 2009.

MARASCHIN, M. et al. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical analysis of *Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 6, p. 633-643, jun., 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0100-879X2002000600002;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 13 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2002000600002>.

MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. R. Germinação de sementes de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville de diferentes origens submetidas a tratamentos para superação de dormência. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.32, n.6, p.1059-1067, 2008

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 3º edição. New York. Pergamon Press, England, 270p. 1989.

MCLAUGHLIN, J. F. et al. Climate change hastens population extinctions. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6070–6074, 2002.

MEDEIROS, D.; VALLE, L. S.; ALVES, R. J. V. Euphorbiaceae nativas de Cerrado e campo rupestre da Serra de São José, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 323-349, abr./jun. 2008.

MEDINA, J. M. et al. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1B, p. 207-211, 2009.

MENDES, M. D. S. **Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado) Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2007.

MENDES, R. C. et al. Tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 1, p.187-194, 2009.

MENDONÇA, P.C et al. Genetic diversity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville determined by AFLP molecular markers **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 41, p. 16–20, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014 (<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>)

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Quarto relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica: Brasil**. Brasília: MMA, 248 p2011.

MONTOPOLI, M. et. al. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 747 - 753, dec. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112007234>>. Acesso em: 5 may. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.032>.

MORAIS, T.P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1, p.110 - 121, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S1516-05722012000100016;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 17 jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000100016>.

MULHOLLAND, D. A. et al. Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant, *Croton gratiissimus* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 1381–1386, 2010.

MUNHOZ, C. B. R.; FELFILI, J. M. Florística do estrato herbáceo-subarbustivo de um campo limpo úmido em Brasília, DF, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 205-215, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-97, 1962.

MYBURG, A. A; REMINGTON, D. L. Protocol for High-Throughput AFLP Analysis Using LI-COR IR² Automated Sequencers. **North Carolina State University**, Raleigh, p. 2-44, 2008.

NADER, T. T. et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do Cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico** (Online), São Paulo, v. 77, n. 3, p. 429-433, jul./set., 2010. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/nader.pdf>. Acesso em: 12 out. 2013.

NAKANISHI, K. **Diterpenes. Natural products chemistry**. New York: Academic Press, 1974. p. 185.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, San Diego, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaíba. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.33, p.109-20, 2004.

OLIVEIRA, I. S. et al . Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. dec. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0102-695X2008000400016;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 11 out. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400016>

OLIVEIRA, T. G. et al . Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1712-1718, Oct. 2011 . Available from
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-847820110010000006&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Aug. 014.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-847820110010000006>

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v. 2, p.128-47.

PASSOS L.C. **Fenologia, polinização e reprodução de duas espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) em mata semidecídua**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. 1995.

PAULA, J. E. et al. Levantamento florístico e sua distribuição diamétrica da vegetação de um cerrado sensu stricto e de um fragmento de floresta de galeria no Ribeirão Dois Irmãos na APA de Cafuringa, DF, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 35-46, set. 2009.

PAULA, O. C. **Morfologia e desenvolvimento floral em *Croton* L. e *Astraea* Klotzsch (Euphorbiaceae sensu stricto)**. 2010. 61f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2010

PAZ T.A., et al. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by *in vitro* adventitious roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **BioMed Research International**: 485837. (2013) doi:10.1155/2013/485837

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PERAZZO, F.F., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of terpenoids from *C.*

cajucara Benth. In: **II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare**. ICMAP-ISHS-SAIPA, Mendoza, Republica Argentina, p. 378 1997.

PEREIRA, S. et al. An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 8851-8858, 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/17/8/8851>>. Acesso em: 11 out. 2013. doi:10.3390/molecules17088851. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17088851>

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.

PERES, M. T. L. P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 223 – 226, mai. 1997. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874197000391>. Acesso em: 11 out. 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00039-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00039-1).

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. 206f Tese (Doutorado). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PIETERS, L. et al. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 6, p. 899-906, jun., 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350090>>. Acesso em 12 out. 2013.

PINHO, M. S. L. Pesquisa em Biologia Molecular: Como Fazer? **Molecular Biology Research**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2006.

PIO VIANA, A. et al. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, dez. 2003.

PIRES, M. M. Y. et al. Biologia floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente

em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v.26, n. 2, p 209-215. 2004.

PIZZOLATTI, M. G., et al. Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana* baillon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n.4, p. 609-614, 2013.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93 – 98, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18298533>>. Acesso em 12 out. 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00214-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00214-8).

POZO, J. C. D. et al. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v. 123, p. 173-183, 2005.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PURDY, B. G.; BAYER RANDALL, J.; MACDONALD E. S. Genetic variation, breeding system evolution, and conservation of the narrow sand dune endemic *Stellaria arenicola* and the Widespread *S. longipes* (Caryophyllaceae). **American Journal of Botany**, v. 81, n. 7, p. 904-911, 1994. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2445771>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

RAMACHANDRA R., S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101 – 153, mai. 2002, Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975002000071>. Acesso em: 11 out. 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1).

RATH et al. Phylogenetic Analysis of dipterocarps using Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Annals of Botany**, v. 82, p. 61-65, 1998.

REIS, G. O. et al. *Croton antisiphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology**, aug., 2013. Online ISSN 1568-5608. DOI 10.1007/s10787-013-0184-6.

RIBEIRO et al. Diversidade genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis.) coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil **Revista Brasileira de**

Plantas Medicinais., Botucatu, v.12, n.4, p.443-451, 2010.

RITLAND K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetical Research**, Cambridge, v. 67, p. 175–185, 1996.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, p. 455-461, 2004. doi 10.1191/0960327104ht473oa

ROENGSUMRAN S. et al. Croblongifolin, a new anticancer clerodane from *Croton oblongifolius*. **Planta Medica**. v. 68, n. 3, p. 274-277, 2002.

ROSSI, D. et al. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2–3, p. 139 – 144, 2003. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304702068>. Acesso em 13 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1078/094471103321659843>.

SAINT-HILARIE, A. **Plantas usuais dos brasileiros**. In: PIGNAL, M.; BRANDÃO. M. G. L. (Org.). Belo Horizonte: IDM Composição e arte Ltda. p. 329-333, 2009.

SANDOVAL, M. et al. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80 n. 2 -3, p. 121 – 129, may., 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007701>>. Acesso em 12 out. 2013.

SANTOS et al. Utilização e formas de aproveitamento da flora do Cerrado pela população de Anápolis -GO. In: Bernardes GD, Morais RP (Org.). **Políticas Públicas: Meio Ambiente e Tecnologia**. Goiânia: Vieira, p. 219-241, 2010.

SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Wiild). **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.510-514, mai-jun, 2005.

SANTOS, B.R. et al. Crescimento *in vitro* de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* A. St.-Hil.): influência da polaridade e luminosidade. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 19 - 26, 2009.

SANTOS, H. S. et al. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae), **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, 2008.

SARASWATY, V., SETIYANTO, H.; NURHAJATI, J. Antibacterial activity from *Croton argyratus* stem bark extract. **International Journal Pharm Tech Research**, v. 4, n. 1, p. 190-193. jan – mar. 2012. Disponível em: <<http://scialert.net/fulltext/?doi=pjbs.2013.1574.1578>>. Acesso em 12 out. 2013.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 2569-2587, 2006.

Shi, L, et al. Production of salidroside and tyrosol in cell suspension cultures of *Rhodiola crenulata*. **Plant Cell Tissue Organ Culture** v. 114, p. 295–303, 2013. doi:10.1007/s11240-013-0325-z

SHIRAKABE, H. et al. Clinical evaluation of teprenone, a mucosal protective agent, in the treatment of patients with gastric ulcers: a nationwide, multicenter clinical study. **Clin. Ther.**, v. 17, n. 5, p. 924-935, 1995.

SILVA JUNIOR, I. E. et al . Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, p. 242 - 248, mar. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0102-695X2009000200011;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 11 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200011>.

SILVA, S. R. et al. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Brasília: TRAFFIC, 63p, 2001.

SILVA, J. S. et al. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010

SILVA, M. S. et al. Association of loganin contents with the genetic characterization of natural populations of *Palicourea rigida* Kunth determined by AFLP molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 189–194, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.08.032>

SILVA, R. F. et al. Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela População do Município de Jataí, Goiás. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 4, n. 2, p. 174-177, nov. 2009.

SILVA, V. A. et al. Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária. **Revista de Odontologia**, Araraquara, v. 40, n. 2, p. 69 – 72, mar./abr., 2011. Disponível em:
<http://www.revodontolunesp.com.br/files/v40n2/v40n2a03.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2013.

SILVEIRA, D. C. et al. Saber local e meio ambiente no Alto Jequitinhonha. **IV Encontro Nacional da Anppas**, Brasília, DF, 2008. 16p. Disponível em:
<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT3-532-242-20080518210052.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2010.

SIRACUSA, L. et al. Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (*Crocus sativus* L.) of different origin by LC-UV-vis-DAD and AFLP analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 60, n. 2, p. 711-721, 2013.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In **Ecological Genetics**, Editado por L. Real. Princeton, 1994.

SMOUSE, P. E. et al. Two-Generation Analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. **Evolution**, Lawrence, v. 55, n. 2, p. 260-271, 2001.

SOUZA, M. A. A. et al. Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, supl., p. 599 - 610, dez. 2006. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0102-695X2006000500004;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 11 out. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500004>.

SUÁREZ, A. I., et al. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. **Revista latinoamericana de química** v. 41, n. 3, p. 161-170, 2013.

SUN, M. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. bongkongensis*. **Conservation Biology**, v. 10, p. 785-795, 1996.

THONGTAN, J. et al. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 868 – 870, 2003. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np030067a>>. Acesso em: 11 out. 2013. DOI: 10.1021/np030067a

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 128p, 2000.

TORRES, L.F. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arabica***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. 111p. 2013.

TRESVENZOL, L. M. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.1, p. 23 - 28, 2006.

VAN VUUREN, S.F.; NAIDOO, D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 552 – 558, aug. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411000365X>>. Acesso em: 12 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.045>.

VASCONCELOS, J. N. C. et al . Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu , v. 14, n. 4, p. 592 – 597, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S1516-05722012000400004;lng=en;nrm=iso>. Acesso em: 18 fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400004>.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Seed viability, longevity and dormancy in a tropical rain forest. In Anais do **II Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais** (M.B. Figliolia, coord.). Instituto Florestal, São Paulo, p.175-196, 1991.

VIEIRA, R. F. et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers **Biochemical Systematics and Ecology**, v29, p. 287-304, 2001.

VIEIRA, H. S. et al. Novel Derivatives of Kaurenoic Acid Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity. **Journal. Brazilian Chem. Society**, v.13, n.2, pp. 151-157, 2002.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 32, n. 3, p. 140 - 147, 1996. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/20064896>>. Acesso em: 13 out. 2013.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 13, supl. 1, p. 64 - 66, 2003. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2003000300024;script=sci_arttext>. Acesso em: 12 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300024>

VINAYAKA, et al.: Antibacterial, antifungal and free radical scavenging activity of *Croton gibsonianus* Nimm. Grah. (Euphorbiaceae). **Journal of Natural Pharmaceuticals**, -v. 1, n. 1, p. 46 – 50, out. dez., 2010. Disponível em: <<http://www.pharmacognosy.in/archives/269>>. Acesso em: 12 out. 2013.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEBSTER, G. L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annal of the Missouri Botanical Garden**. 81(1):1-144, 1994.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. London: Editora The University of Chicago Press. 613p, 1978.

WU, S.; ZU, Y.; WU, M. High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 33 – 43, dec. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165603002244>>. Acesso em: 12 out. 2013.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.009>.

YOUNG A.; BOYLE, T.; BROWN, T The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 413–418, 1996.

ZHANG, X. G. et al.Genetic diversity of *Centella asiatica* in China analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: combination analysis with chemical diversity. **Journal Nat**

Med 2011. DOI 10.1007/s11418-011-0572-4

ZHONG J. J. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 72, p.1 - 26, 2001. DOI: 10.1007/3-540-45302-4_1