

Flavonoides del género *Croton*

P. Puebla*, M.F. Guerrero** y S.X. Correa**

Resumen

Los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Actualmente existe un gran interés en los efectos de los flavonoides sobre la salud humana, numerosos estudios sugieren que estos compuestos protegen contra el stress oxidativo, enfermedades coronarias y ciertos cánceres. Este artículo describe los flavonoides conocidos hasta el momento en el género *Croton*.

Palabras clave: Euphorbiaceae, *Croton*, Flavonoides

Summary

Flavonoids from *Croton* genus

Flavonoids are a class of secondary metabolites widely distributed in the vegetable kingdom. Currently, there is broad interest in the effects of flavonoid on human health, many studies suggest that these compounds protect against oxidative stress, coronary diseases and certain cancers. This paper describes the flavonoids presently known in the *Croton* genus.

Key words: Euphorbiaceae, *Croton*, Flavonoids

Introducción

El género *Croton*, perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, comprende más de 1500 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de todo mundo, muchas de estas especies son utilizadas por la tradición popular para el tratamiento de numerosas enfermedades. Gran número de poblaciones indígenas, especialmente de Sudamérica utilizan el látex o infusiones de las hojas o corteza de diferentes especies de *Croton* para el tratamiento de heridas, dolencias estomacales, inflamación, hipertensión y cáncer (1-5), habiéndose identificado ciertos flavonoides como posibles responsables de algunas de estas actividades (6-8).

El género *Croton* es una fuente rica en compuestos de naturaleza diterpénica sobre los

cuales se han publicado muchos trabajos y revisiones (9-11), sin embargo no se han encontrado revisiones sobre la presencia de flavonoides en este género; debido al creciente interés que existe sobre estos compuestos, en este trabajo se describen los flavonoides aislados hasta el momento de diferentes especies del género *Croton*.

Los flavonoides constituyen una gran familia de metabolitos secundarios polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde están implicados en una gran variedad de funciones como en la pigmentación de flores,

Recibido para evaluación: 15 de marzo de 2004

Aceptado para publicación: 15 de mayo de 2004

* Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, España. E-mail: puebla@usal.es Fax: 34 23 294515.

** Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá AA 14490, Colombia.

E-mail: mfguerrero@unal.edu.co Fax: 57-1-3165060.

frutos y semillas, en la protección de la radiación ultravioleta, en la defensa frente a microorganismos patógenos y en la fertilidad y germinación del polen (12), al estar presentes en numerosos frutos y vegetales son constituyentes importantes de la dieta humana.

Actualmente hay un interés creciente sobre los compuestos polifenólicos debido a los efectos beneficiosos en la salud humana, atribuidos principalmente a su capacidad antioxidante (13-15), numerosos estudios han puesto de manifiesto un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo acciones antibacterianas, antiinflamatorias, antialérgicas, antivirales, antimutagénicas, antineoplásicas y vasorrelajantes (16-21), entre las más importantes.

Hasta el momento se han descrito más de 6000 flavonoides diferentes y se siguen identificando nuevas estructuras (22). Todos ellos comparten el mismo esqueleto básico formado por dos anillos aromáticos unidos por un fragmento de tres carbonos, los flavonoides naturales están oxigenados con grupos hidroxilo y metoxilo, y frecuentemente uno o varios grupos hidroxilos están unidos a azúcares dando lugar a glicósidos, el azúcar principal es la glucosa pero también son frecuentes otros como la galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; otro gran número de flavonoides están sulfatados, conteniendo uno o más grupos sulfato unidos a los hidroxilos en el flavonoide o en el azúcar. Los flavonoides naturales también se presentan frecuentemente como dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros.

Clasificación

La estructura básica de los flavonoides está basada en un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆, compuesto por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un fragmento de tres carbonos (23), las diferentes clases de flavonoides difieren en el

estado de oxidación de la unidad C₃, mientras que los compuestos individuales difieren en la diferente sustitución de los anillos A y B, en la figura 1 se muestran los diferentes grupos, las chalconas y auronas se apartan algo de la estructura general, las primeras poseen una forma de cadena abierta y las segundas poseen un heterociclo de cinco miembros en lugar de seis. Otros autores prefieren separar los derivados flavánicos, antocianósidos e isoflavonoides y mantener el término de flavonoide para el resto de los grupos (24).

Biosíntesis de flavonoides

Los dos anillos tienen diferente origen biosintético, el anillo A proviene de la vía del acetato y el anillo B del ácido sikímico. La unidad iniciadora es la *p*-cumaril-CoA, que se incorpora intacta, posteriormente se incorporan secuencialmente tres unidades de malonil-CoA dando lugar a la estructura de chalcona, que por posterior cierre del anillo, subsiguientes hidroxilaciones y reducciones las plantas son capaces de formar las diferentes clases flavonoides (Fig. 2) (25-27).

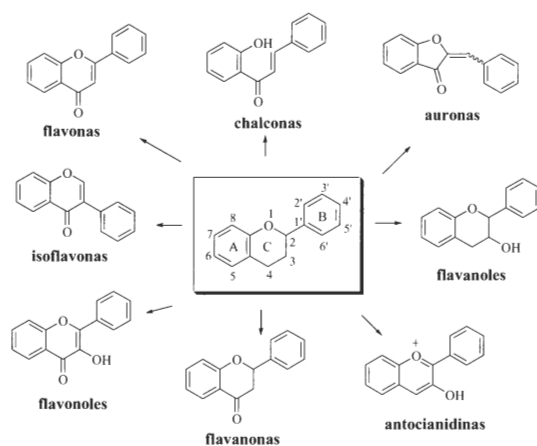


Figura 1. Clasificación de flavonoides.

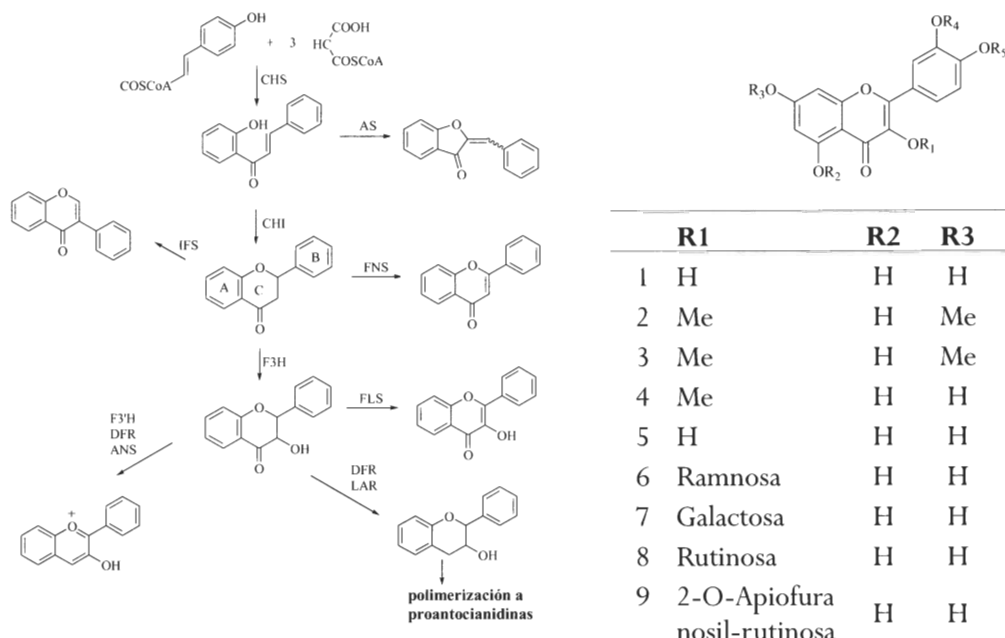


Figura 2. Biosíntesis esquemática de los flavonoides (adaptado de Schijlen, 2004). Abreviaturas de los enzimas implicados en la ruta biosintética: CHS: chalcona sintasa, AS: aureosidina sintasa, CHI: chalcona isomerasa, IFS: isoflavona sintasa, FNS: flavona sintasa, F3H: flavanona hidroxilasa, FLS: flavonol sintasa, DFR: dihidroflavonol-4-reductasa, LAR: leucantocianidina reductasa, F3'H: 3'-flavonoide hidroxilasa, ANS: antocianidina sintasa.

Resultados

Los tipos de flavonoides que se han encontrado en diferentes especies del género *Croton* incluyen flavonoles, flavanoles y flavonas.

Flavonoles

2.1.1. Derivados de quercetina

Los flavonoles se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en la posición C-3 que puede estar metilado o glicosilado, de este grupo los más abundantes en el género *Croton* son los derivados de quercetina de los que se han aislado e

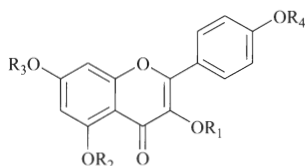
	R1	R2	R3	R4	R5
1	H	H	H	H	H
2	Me	H	Me	H	Me
3	Me	H	Me	H	H
4	Me	H	H	H	H
5	H	H	H	Me	H
6	Ramnosa	H	H	H	H
7	Galactosa	H	H	H	H
8	Rutinosa	H	H	H	H
9	2-O-Apiofuranosil-rutinosa	H	H	H	H

identificado nueve compuestos. Quercetina (1), ha sido aislado de las hojas de *C. oblongifolius* (28) (Tailandia); 3,4',7-tri-O- metilquercetina (ayanina) (2) se ha encontrado en la parte aérea de *C. glabellus* (29) (Colombia) y de *C. schideanus* (6) (Colombia), presentando actividad vasorrelajante; 3,7-di-O-metilquercetina (3) y 3-O-metilquercetina (4) fueron aislados de parte aérea de *C. schideanus* (30,31); 3'-O-metilquercetina (isoramnetina) (5) se ha encontrado en las hojas de *C. oblongifolius* (32); el resto de flavonoles se encuentran glicosilados en el hidroxilo de la posición 3, 3-O- α -L-ramnosidoquercetina (quercitrina) (6) se ha aislado de las hojas de *C. glabellus* (33), *C. schideanus* (31) y de *C. bonplandianus* (32) (India) y en el látex de *C. panamensis* (34) (Costa Rica), este flavonoide ha presentado actividad antihipertensiva (33); 3- β -D-galactosido quercetina (hiperosido) (7) se ha aislado de las hojas de *C. oblogifolius* (32), y los flavonoles 3-O-rutinosidoquercetina (rutina) (8) y 3-O-(2-O- β - D-apiofuranosil) rutinosidoquer-

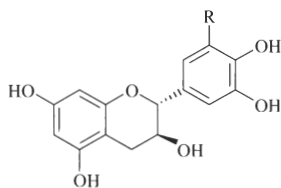
cetina (9) se han encontrado en las hojas de *C. menthodorus* (7) (Ecuador), estos dos últimos compuestos también poseen actividad vasorrelajante (7).

Derivados de kanferol

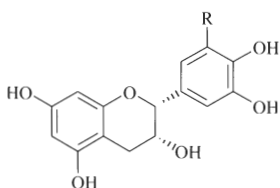
Se han aislado e identificado cinco derivados de kanferol. 3,7-di-O-metilkanferol (kumataquina) (10) y 3,4',7-tri-O-metilkanferol (12) se han aislado de las hojas de *C. cajucara* (35) (Brasil); 4',7-di-O-metilkanferol (11) de la parte aérea de *C. pyramidalis* (36) (Méjico); 3-O-rutinosidokanferol (nicotiflorina) (13) y 3-O-(2-O-trans-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosidokanferol (14) se han extraído de las hojas



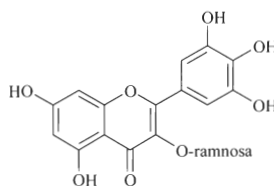
	R1	R2	R3	R4
10	Me	H	Me	H
11	H	H	Me	Me
12	Me	H	Me	Me
13	rutinosa	H	H	H
14	3-O-(2-O-trans-p-cumaroil)- β -D-glucosa	H	H	H



16 R= H
18 R= OH



17 R= H
19 R= OH



15

de *C. menthodorus* (7), todos ellos presentaron actividad vasorrelajante.

Derivados de miricetina

3-O-ramnosidomiricetina (miricitrina) (15) es el único flavonol aislado dentro de este grupo, y ha sido obtenido del látex de *C. panamensis* (34).

Flavanoles

Se caracterizan por la ausencia del grupo carbonilo en la posición C-4, y presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3, se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros.

En el género *Croton* se han aislado cinco monómeros, cinco dímeros, dos trímeros, y cuatro oligómeros.

Monómeros

(+)-Catequina (16) se ha aislado del látex de *C. lechleri*³⁷ (Ecuador), *C. panamensis* (34) y de la corteza de *C. urucurana* (38) (Brasil); (-)-epicatequina

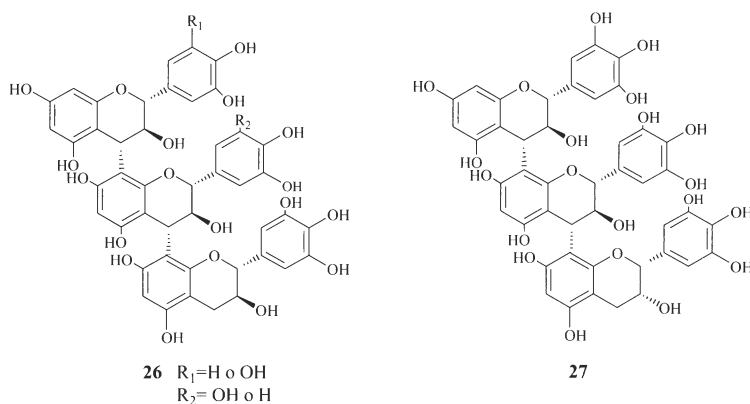
(17) ha sido extraído del látex de *C. lechleri* (37) y *C. panamensis* (34); (+)-galocatequina (18) aislado del látex de *C. lechleri* (37), *C. draconoides* (39,40) (Perú) y *C. panamensis* (34) y de la corteza de *C. urucurana* (38) y (-)-epigalocatequina (19) obtenido del látex de *C. lechleri* (37), *C. draconoides* (39) y *C. panamensis* (34) y el flavanol 3,3',5,5',7-pentahidroxiflavano (20) del látex de *C. draconoides* (39), estos compuestos presentaron actividad antiviral (40,41).

Dímeros

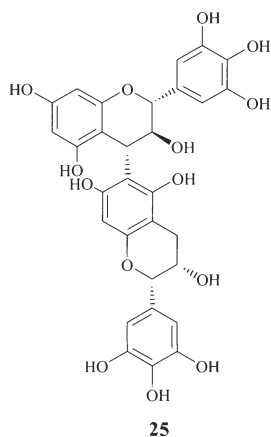
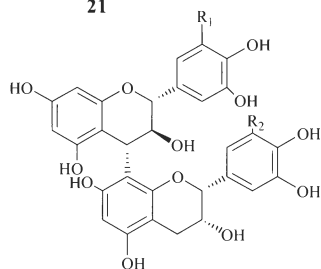
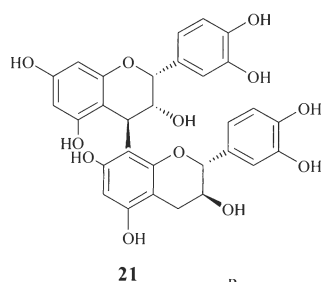
Epicatequina-(4 β →8)-catequina (procianidina B-1) (21); catequina-(4 α →8)-epicatequina (procianidina B-4) (22); catequina-(4 α →8)-epigalocatequina (23); galocatequina-(4 α →8)-epicatequina (24) y galocatequina-(4 α →6)-epigalocatequina (25) fueron aislados del látex de *C. lechleri* (37), todos estos

compuestos presentaron actividades antitumorales y antibacterianas (42).

Trímeros

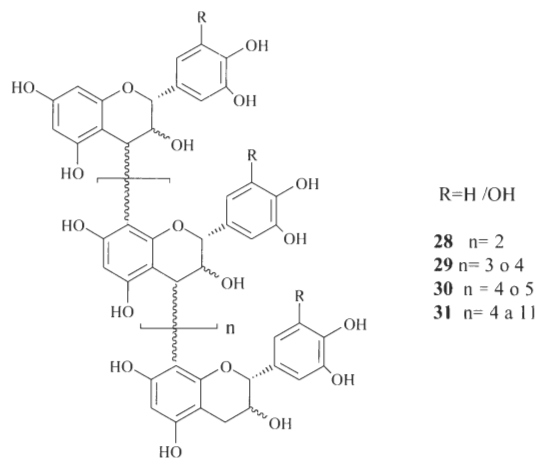


Del látex de *C. lechleri* (37) se aislaron los dos trímeros representados: Catequina-(4 α →8)-galocatequina-(4 α →6)-galocatequina (26) y galocatequina-(4 α →8)-galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina (27), estos compuestos también presentaron actividades antitumorales y antibacterianas (42).

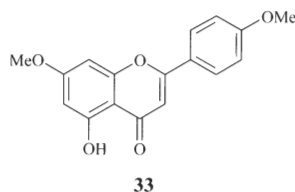
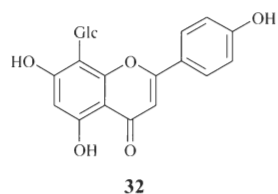


Oligómeros

De los cuatro oligómeros obtenidos a partir del látex de *C. lechleri* (37,43), destaca el alto contenido de galocatequina y epigalocatequina, el compuesto 31 denominado SP-303, posee una media de siete subunidades y es un potente agente antiviral (44).



Flavonas



Se caracterizan por la presencia de un grupo carbonilo en la posición C-4 y la ausencia de grupo hidroxilo en la posición C-3. Sólo se han aislado dos flavonas, vitexina (32) presente en las hojas de *C. hovarum* (45) especie endémica de Madagascar, y 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona (33), aislada de la parte aérea de la planta brasileña *C. betulaster* (46).

Conclusiones

Se ha descrito la presencia de treinta y tres flavonoides (15 flavonoles, 16 flavanoles y 2 flavonas) en trece especies del género *Croton*, la mayoría de estas especies se encuentran en Sudamérica, algunos de estos flavonoides han presentado importantes propiedades biológicas destacando actividades antihipertensivas, antitumorales y antivirales.

Agradecimientos “Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo” (CYTED) Subprograma X: Proyecto: “Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas”. Los autores agradecen al Dr. D.A. Olmedo (Universidad de Panamá) la ayuda prestada en la parte bibliográfica.

Tabla 1. Distribución de flavonoides en *Croton*.

Especie	Compuestos	Referencias
<i>C. oblongifolius</i>	1, 5, 7	28, 32
<i>C. glabellus</i>	2, 6	29, 33
<i>C. schiedeanus</i>	2, 3, 4, 6	6, 30, 31
<i>C. bonplandianus</i>	6	32
<i>C. panamensis</i>	6, 15, 16, 17, 18, 19	34
<i>C. menthodorus</i>	8, 9, 13, 14	7
<i>C. cajucara</i>	10, 12	35
<i>C. pyramidalis</i>	11	36
<i>C. lechleri</i>	16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31	37, 41, 42, 43, 44
<i>C. urucurana</i>	16, 18	38
<i>C. draconoides</i>	18, 19, 20	39, 40
<i>C. hovarum</i>	32	45
<i>C. betulaster</i>	33	46

Bibliografía

1. R. Marini Bettolo y M.L. Scarpati, Alkaloids of *Croton draconoides*, *Phytochemistry*, 18, 520 (1979).
2. H. García, “Flora Medicinal de Colombia,” Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, 1975, T. II, p. 87.

3. J. Correa y H. Bernal, "Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello," Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, 1992, T. VII, p. 14.
4. L.C. Di Stasi, C.A. Hiruma, E.M. Guimaraes y C.M. Santos, Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon, *Fitoterapia*, 65, 529 (1994).
5. J.E.C. Martins, Plantas medicinais de uso na Amazonia, en: "Centros de Estudos Jurídicos do Pará", Belém, Brazil, 1989, p. 92.
6. M.F. Guerrero, P. Puebla, M.L. Martín, R. Carrón, L. San Román, M.T. Reguero y L. Arteaga, Inhibitory effect of N(G)-nitro-l-arginine methyl ester on the anti-adrenergic response elicited by ayanin in the pithed rat, *Planta Med.*, 68, 322 (2002).
7. A. Capasso, S. Piacente, N. De Tommasi, M. Ragucci y C. Pizza, Constituents of *Croton menthodorus* and their effects on electrically induced contractions of the guinea-pig isolated ileum, *Phytother. Res.*, 14, 156 (2000).
8. C. Desmarchelier, F. Witting Schaus, J. Coussio y C. Cicca, Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals, *J. Ethnopharmacol.*, 58, 103 (1997).
9. A.T. Merritt y S. Ley, Clerodane diterpenoids, *Nat. Prod. Report.*, 9, 243 (1992).
10. M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, S.N. Bravo y M.N. Silva, Terpenoids from *C. cajucara*, *Phytochemistry*, 49, 823 (1998).
11. H. Itokawa, I. Ichihara, H. Kogima, K. Watanabe y K. Takeya, Nor-clerodane diterpenes from *C. cajucara*, *Phytochemistry*, 28, 1667 (1989).
12. R.A. Dixon y N.L. Paiva, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085 (1995).
13. J.K. Prasain, C.C. Wang y S. Barnes, Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples, *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 1324 (2004).
14. K.E. Heim, A.R. Tagliaferro y D.J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.* 13, 573 (2002).
15. J.L. Rios, S. Mañez, M. Paya y M.J. Alcaraz, Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*, *Phytochemistry*, 31, 1947 (1992).
16. M.A. Moroney, M.J. Alcaraz, R.A. Forder, F. Carey y J.R.S. Houly, Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids, *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 787 (1988).
17. S.M. Kuo, Dietary flavonoids and cancer prevention: evidence and potential mechanism, *Crit. Rev. Oncogen.*, 8, 47 (1997).
18. C.S. Yang, J.M. Landau, M.T. Huang y H.L. Newmark, Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev. Nutrition*, 21, 381 (2001).
19. J.E. Middleton, C. Kandaswami, y T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacol. Rev.*, 52, 673 (2000).
20. J. Duarte, R. Jiménez, I.C. Villar, F. Pérez-Vizcaíno, J. Jiménez y J. Tamargo, Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta, *Planta Med.*, 67, 567 (2001).
21. M. Ajay, A. H. Gilani y M.R. Mustafá, Effects of flavonoids on vascular smooth muscle, *Life Sciences*, 74, 603 (2003).
22. J.B. Harborne y C.A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 554, 481 (2000).

23. V. Cody, Middleton, E. y J.B. Harborne (Ed.), *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationship*, New York, 1986, vol. 213, p. 15.
24. J. Bruneton, Flavonoides, en: "Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales", Ed. Acribia, Zaragoza, 2001, p. 305.
25. E.G.W.M. Schijlen, C.H. Ric de Vos, A.J. van Tunen y A.G. Bovy, Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants, *Phytochemistry*, 65, 2631 (2004).
26. G. Di Carlo, N. Mascolo y A.A. Izzo, Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 65, 337 (1999).
27. P. Gil Ruiz, "Productos Naturales", Universidad Pública de Navarra, Pamplona, 2002, p. 78.
28. V.N. Aiyar y T.R. Seshadri, Chemical components of *Croton oblongifolius*. VIII, *Curr. Sci.*, 41, 839 (1972).
29. L.A. de García, D.L. Guarín y M.C. Tobar, Obtención de ayanina de las hojas de *Croton glabellus*, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 15, 95 (1986).
30. M.F. Guerrero, P. Puebla, R. Carrón, M.L. Martín, y L. San Román, Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht, *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1373 (2002).
31. S.X. Correa, "Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Acción Relajante Vascular de *Croton schiedeanus* Schlecht", Trabajo de Grado, Dpto. de Química Farmacéutica y Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y Dpto. de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2004.
32. S.S. Subramanian, S. Nagarajan y N. Sulochana, Flavonoids of some Euphorbiaceae plants, *Phytochemistry*, 10, 2548 (1971).
33. B.E. Novoa, A.C. Céspedes, L.A. de García y J.E. Olarte, Quercitrina: Un flavonoide con actividad hipotensora obtenido de *Croton glabellus*, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 4, 7 (1985).
34. I. Kostova, T. Iossifova, J. Rostan, B. Vogler, W. Kraus y H. Navas, Chemical and biological studies on *Croton panamensis* latex (Dragon's blood), *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 9, 34 (1999).
35. M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, A.C. Arruda, S.G.S.R. Pamplona, F.A. Vanderlinde, A.J. Lapa, A. Echevarría, N.F. Grynberg, I.M.S. Colus, R.A.F. Farias, A.M. Luna Costa y V.S.N. Rao, Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*, *J. Ethnopharmacol.*, 70, 41 (2000).
36. L. Rodríguez-Hahn, A. Valencia y R.S.E. Díaz, Aislamiento y estructura de los componentes químicos de *Croton pyramidalis*, *Rev. Latinoamer. Quím.*, 12, 16 (1981).
37. Y. Cai, J. Evans, M.F. Roberts, J.D. Phillipson, M.H. Zenk, y Y.Y. Gleba, Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*, *Phytochemistry*, 30, 2033 (1991).
38. M.T.L.P. Peres, F.D. Monache, A.B. Cruz, M.G. Pizzolatti y R.A. Yunes, Chemical Composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae), *J. Ethnopharmacol.*, 56, 223, (1997).
39. R. Aquino, M.L. Clavatta y F. de Simone, Catechins from *Croton draconoides*, *Fitoterapia*, 62, 454 (1991).
40. N. Mahmood, C. Pizza, R. Aquino, N. de Tommasi y S. Piacente, Inhibition of HIV infection by flavonoids, *Antiviral Res.*, 22, 189 (1993).

41. E. Risco, F. Ghia, R. Vila, J. Iglesias y E. Alvarez, Immunomodulatory activity and chemical characterisation of Sangre de Drago (Dragon's blood) from *Croton lechleri*, *Planta Med.*, 69, 785 (2003).
42. Z.P. Chen, Y. Cai y J.D. Phillipson, Studies of the anti-tumor, anti-bacterial and wound-healing properties of Dragon's blood, *Planta Med.*, 60, 541 (1994).
43. R. Ubillas, S.D. Jolad, R.C. Bruening, M.R. Kernan, S.R. King, D.F. Sesin, M. Barrett, C.A. Stoddart, T. Flaster, J. Kuo, F. Ayala, E. Meza, M. Castanel, E. McMee-kin, E. Rozhon, M.S. Tempesta, D. Barnard, J. Huffman, D. Smee, R. Sidwell, K. Soike, A. Brazier, S. Safrin, R. Orlando, P.T.M. Kenny, N. Berova y K. Nakanishi, SP-303, an antiviral oligomeric proant-hocyanidin from the latex of *Croton lechleri* ("Sangre de Drago"), *Phytomedicine*, 1, 77 (1994).
44. R. Orozco-Topete, J. Sierra-Madero, C. cano-Dominguez, J. Kershenovich, G. Ortiz-Pedroza, E. Vazquez-Vall, C. García-Cosio, A. Soria-Cordoba, A.M. ArmwNDARIZ, X. Terán-Toledo, J. Romo-García, H. Fernández y E.J. Rozhon, Safety and efficacy of Virend for topical treatment of genital and herpes simples lesions in patients with AIDS, *Antiviral. Research*, 35, 91 (1997).
45. H.C. Krebs y H. Ramiarantsoa, Clerodane diterpenes of *Croton hovarum*, *Phytochemistry*, 45, 379 (1997).
46. P.R. Barbosa, M. Fascio, D. Martins, M.L.S. Guedes y N.F. Roque, Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae), *Biochem. System. Ecol.*, 31, 307 (2003).