



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E  
ANTIOXIDANTE DE *Croton heliotropifolius* KUNTE e *Croton  
blanchetianus* BAILL**

**ELISSANDRA COURAS ANGÉLICO**

**PATOS -PB**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E  
ANTIOXIDANTE DE *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton  
blanchetianus* BAILL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Área de Concentração em Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido.

**Elissandra Couras Angélica**

**Orientador:** Prof. Dr. Onaldo Guedes Rodrigues

**Co-Orientador:** Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

**Patos-PB  
2011**

**FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CAMPUS DE PATOS -  
UFCG**

A582a

Angélico, Elissandra Couras.

2011

Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL / Elissandra Couras Angélico. - Patos – PB: UFCG, CSTR. 2011.

86p.: il. Color.

Inclui bibliografia

Orientador: Onaldo Guedes Rodrigues

Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde Tecnologia Rural.

1 –Plantas medicinais - Dissertação. I - Título

CDU: 633.88



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**TÍTULO:** “AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE *Croton heliotropifolius* KUNTE E *Croton blanchtianus* BAILL.”

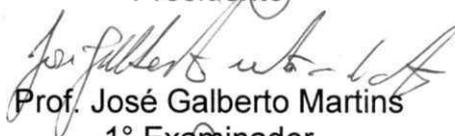
**AUTORA:** ELISSANDRA COURAS ANGÉLICO

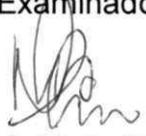
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ONALDO GUEDES RODRIGUES

**JULGAMENTO**

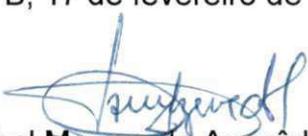
**CONCEITO:** APROVADO

  
Prof. Onaldo Guedes Rodrigues  
Presidente

  
Prof. José Galberto Martins  
1º Examinador

  
Prof. Marco Antônio Dias Gomes  
2º Examinador

Patos - PB, 17 de fevereiro de 2011

  
Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva  
Coordenador

*Aderbal Marcos de Azevêdo Silva*  
Coordenador PPGZ / UFCG / CSTR  
Mat.: 334974-8

*O senhor é o meu pastor e nada me falta. Em verdes pastagens me faz repousar; para fontes tranqüilas me conduz, e restaura minhas forças. Ele me guia por bons caminhos por causa do seu nome. Embora eu caminhe por um vale tenebroso, nenhum mau temerei, pois junto a mim estás. (Salmo: 23)*

**DEDICO**

*A Deus pela realização desse trabalho.*

*A minha família, em especial aos meus pais, Maria Couras e Valdeci, pelo amor e dedicação.*

*A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas a inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência. Os sonhadores mudaram a história da humanidade. Eles fizeram da derrota, o pódio para a vitória; das críticas, o palco, de onde receberam os aplausos. “Sonhos perseguidos com perseverança, sempre acabam em realidade”.*

*(Augusto Cury)*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e por seu infinito amor. Por ter me dado forças quando pensei em fraquejar e ter me ensinado que quando estou fraco é que sou forte, pois o Seu poder se aperfeiçoa em nossas fraquezas.

Aos meus pais, **Maria Couras Angélico** e **Valdeci Francisco Angélico**, pelo amor, apoio e a compreensão da ausência quando eles mais precisavam de mim.

Ao Orientador Prof. **Dr. Onaldo Guedes Rodrigues** pela orientação, pela amizade e por confiar e acreditar no meu trabalho.

Meu agradecimento especial ao Prof. **Dr. José Galberto Martins da Costa** por ser um dos maiores responsáveis pelo meu crescimento profissional. Antes de ser um orientador, você foi um grande amigo, apoiando e sempre disponível a me ajudar. A minha eterna gratidão pelos ensinamentos, pelas oportunidades concedidas e por sempre acreditar e confiar na minha capacidade.

A uma amiga muito especial, **Fabiola Fernandes Rodrigues**, pelos anos de amizade, o companheirismo, a presença nos momentos difíceis e alegres, o apoio e principalmente pela sua disponibilidade em sempre me ajudar. Por meio de suas palavras e atitudes aprendi que nunca devemos desistir dos nossos sonhos e que sempre somos capazes de torná-los realidade. Obrigada pela sua colaboração na realização desse trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação que pelos ensinamentos, colaboraram para a concretização de mais uma etapa da minha vida.

Ao Coordenador da Pós-Graduação em Zootecnia, **Prof. Dr. Aderbal Marcos Azevêdo Silva**, por sua dedicação ao curso.

Aos Professores **Dr. Olaf Andreas Bakke** e **Dra. Ivonete Alves Bakke** pela amizade, os ensinamentos e exemplo de humildade.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação, **Arimatéia Cruz Guedes**, pelos auxílios prestados no decorrer do curso.

Aos colegas do mestrado: **Nadjanara, Gabriela, Maiza, Francianne, Josembergue, Paulo, Isabele, Ernane, Giulliana e Jucelin** pela amizade, pelo espírito cooperativo e agradável convívio.

A Profa. **Dr. Maria de Fátima** do Herbário da Caatinga da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, pela identificação das espécies.

Ao Prefeito da UFCG **Jeroan** pela disponibilização de transporte para a realização das coletas.

Aos **alunos de graduação** do Curso de Ciências Biológicas pelo carinho e a convivência e principalmente a troca de conhecimento durante o estágio a docência, no qual contribuíu para o meu crescimento profissional.

Aos bolsistas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais- LPPN- da URCA, **Samara, Fábio, Thiago, Eidla, Emanuela, Valmir, Estefânio, Erlânio, Carla, George, Liana**, pela atenção e ajuda na execução das análises laboratoriais.

As amigas **Maiza, Juliana, Daiana, Gabriela, Nadjanara, Francianne e Giovanna** pela amizade, apoio, companheirismo e a presença nos momentos difíceis e alegres.

Ao Professor **Dr. Ary Junior Fernandes** da Universidade Estadual de São Paulo, por ter me dado a oportunidade de estagiar no Laboratório de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP.

À **Universidade Federal de Campina Grande**, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para a concretização desse trabalho. Muito obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE QUADROS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
<b>CAPÍTULO 1 Revisão de Literatura- Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de <i>Croton heliotropiifolius</i> Kuntze e <i>Croton blanchetianus</i> Baill</b>	
1. INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Informação Botânica	19
2.1.1 Gênero <i>Croton</i>	19
2.1.2 <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	20
2.1.3 <i>Croton blanchetianus</i> Baill	21
2.2 Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial de espécies de <i>Croton</i>	23
2.3 Óleo Essencial	25
2.4 Atividade Antibacteriana	26
2.5 Atividade moduladora	28
2.6 Atividade Antioxidante	29
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
RESUMO	39
<b>CAPÍTULO 2 Composição química dos óleos essenciais das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> Baill e do <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.</b>	
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Local do experimento	43
2.2 Seleção das Espécies Botânicas	43
2.3 Coleta e identificação do material	43
2.4 Extração dos óleos essenciais	43
2.5 Análises da composição química dos óleos essenciais	44

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Obtenções dos óleos essenciais	45
3.2 Análises da composição química dos óleos essenciais	45
4. CONCLUSÃO	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
<b>CAPÍTULO 3 Atividade antibacteriana dos Óleos Essenciais e extratos das folhas de <i>Croton heliotropifolius</i> Kunth e do <i>Croton blanchetianus</i> Baill.</b>	
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Local do experimento	58
2.2 Coleta e identificação do material vegetal	58
2.3 Extração dos óleos essenciais	58
2.4 Ensaio microbiológico com os óleos essenciais	58
2.4.1 <i>Screening</i> antibacteriano	58
2.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	60
2.4.3 Avaliação da atividade moduladora do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i>	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Obtenções dos óleos essenciais	63
3.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana dos óleos essenciais	63
3.3 Resultado da Concentração Inibitória Mínima – CIM	66
3.4 Resultado da atividade moduladora por microdiluição	68
4 CONCLUSÃO	70
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
<b>CAPÍTULO 4 Atividade Antioxidante do extrato etanólico das folhas de <i>Croton heliotropifolius</i> Kunth e do <i>Croton blanchetianus</i> Baill.</b>	
RESUMO	75
ABSTRACT	76
1 INTRODUÇÃO	77
2 MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 Local do experimento	79
2.2 Coleta e Identificação do material	79

2.3 Preparação dos extratos etanólicos	79
2.3.1 Prospecção fitoquímica dos extratos	79
2.4 Avaliação da atividade antioxidante	79
2.4.1 Método de seqüestro do radical DPPH.	79
2.4.2 Análises estatísticas	80
3 RESULTADO E DISCUSSÃO	81
3.1 Obtenção dos Extratos	81
3.2 Análises fitoquímica dos extratos etanólicos	81
3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante	82
4 CONCLUSÃO	84
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b> Rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>C. blanchetianus</i> e <i>C. heliotropiifolius</i>	45
<b>Tabela 2</b> Constituintes químicos identificados nos óleos essenciais das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> e <i>C. blanchetianus</i>	48

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1</b> Rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>C. blanchetianus</i> e <i>C. heliotropiifolius</i>	63
<b>Tabela 2</b> Valores das médias do halo de inibição do crescimento microbiano em mm do óleo essencial de <i>C. heliotropiifolius</i>	64
<b>Tabela 3</b> Valores das médias do halo de inibição do crescimento microbiano em mm do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i>	64
<b>Tabela 4</b> Valores em µg/mL Concentração Inibitória Mínima - CIM dos óleos essenciais das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> e <i>C. blanchetianus</i>	66
<b>Tabela 5</b> Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do óleo essencial das folhas de <i>C. blanchetianus</i>	68

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1</b> Dados relacionados à obtenção dos extratos etanólicos das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> e <i>C. blanchetianus</i>	81
<b>Tabela 2</b> Classe de metabólitos secundários identificados nos extrato etanólico das folhas de <i>C. blanchetianus</i> e <i>C. heliotropiifolius</i>	81
<b>Tabela 3</b> Resultados da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> e <i>C. blanchetianus</i> utilizando o radical DPPH	82

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1</b> <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	21
<b>Figura 2</b> <i>Croton blanchetianus</i> Baill	22

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1</b> Avaliação da atividade antibacteriana	59
<b>Figura 2</b> Placa de microdiluição com as concentrações finais dos extratos no meio de cultura	61
<b>Figura 3</b> Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	61
<b>Figura 4</b> Resultado da atividade antibacteriana do óleo de <i>C.heliotropiifolius</i> e <i>C. bblanchetianus</i> sobre <i>Bacillus cereus</i> nas concentrações de 10%, 5%, 2,5%, 1,25 %, 0,6% e 0,3%	65
<b>Figura 5</b> Resultado da CIM do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> e <i>C. heliotropiifolius</i>	66

**LISTA DE QUADROS****CAPÍTULO 2**

<b>Quadro 1</b> Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG/EM presente nos óleos essenciais de <i>C. blanchetianus</i> e <i>C. heliotropiifolius</i>	49
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A	- Atividade Antioxidante
ANOVA	- Análise de Variância
ATCC	-American Type Culture Collection
BHA	- butilhidroxianisol
BHI	-Brain Hear Infusion Broth
BHT	- Butil hidroxitolueno
CE <sub>50</sub>	. Concentração Efetiva
CG/EM	- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- Clinical and Laboratory Standards Institute
<sup>0</sup> C/min	-Graus Celsius por minutos
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 1,1- difenil-2picril-hidrazila
eV	- Eletrovolt
g	- Grama
GP	- galato de propila
i.d.	- Indicativo de Densidade
IR	- Índice de Retenção
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
mL/mim	- Mililitro por minutos
min	- Minuto
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Sulfato de sódio
nm	- Namômetro
p/v	- Peso por volume
PCA	- Plate Count Agar
TBHQ	- terc butil hidroquinona
UFC/mL	- Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UV	- Ultravioleta
µg/mL	- micrograma por mililitro
µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
µM	- Micromol

## CAPÍTULO 1

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kuntze e *Croton blanchetianus* Baill.** Patos- PB: UFCG, 2011. 24p. (Dissertação- Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido).

### RESUMO

*Croton heliotropiifolius* Kuntze e *Croton blanchetianus* Baill (*Euphorbiaceae*) são plantas medicinais nativas do nordeste do Brasil. Conhecidas popularmente como “velame” e “marmeleiro”, são usadas largamente na medicina popular na forma de chás, infusões, cataplasmas e laxativos. Essas espécies mostram-se de potencial valor terapêutico em virtude da presença de diversos metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides e terpenóides. O presente trabalho descreve a análise química, as atividades antibacterianas e moduladoras dos óleos essenciais, bem como a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas frescas por hidrodestilação e os constituintes químicos foram identificados por CG/EM. Destacaram-se como majoritários o eucaliptol (16,9%),  $\beta$ -cariofileno (15,9%) e germacreno-D (14,5%) para *C. heliotropiifolius* e o cedrol (28,4%), eucaliptol (17,4%) e  $\alpha$ -pineno (10,5%) para *C. blanchetianus*. Os extratos etanólicos foram obtidos das folhas pelo método de extração exaustiva a frio e submetidos a análises fitoquímica, nos quais foi possível identificar a presença de classes de metabólitos como taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavononóis, catequinas e xantonas. Em seguida, os extratos foram analisados quanto à atividade antioxidante por seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Os óleos essenciais foram avaliados quanto à atividade antibacteriana pelo método de difusão em Agar e em interação direta, e indiretamente com antibióticos aminoglicosídeos, por microdiluição em caldo frente a linhagens de bactérias padrão e multirresistente Gram positivas e Gram negativas. Os resultados preliminares da atividade antibacteriana mostraram que ambos os óleos foram mais efetivos frente à linhagem Gram-positiva *Bacillus cereus*. Na verificação da concentração inibitória mínima observou-se que o óleo essencial de *C. heliotropiifolius* não mostrou atividade inibitória frente às linhagens testadas, com exceção para a multirresistente *Staphylococcus aureus* (MR 358) com CIM 512 $\mu$ g/mL. Para o óleo essencial de *C. blanchetianus* o resultado foi mais significativo para *Staphylococcus aureus* com CIM de 64  $\mu$ g/mL. O óleo de *C. blanchetianus* potencializou os antibióticos amicacina, canamicina e gentamicina frente à linhagem *Bacillus cereus*, mostrando um efeito sinérgico. Nos testes antioxidantes *in vitro* por seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), foi observado que ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante, sendo que o extrato das folhas de *C. blanchetianus* foi o que apresentou uma atividade mais eficiente com CE<sub>50</sub> de 6,5 $\pm$ 0,5  $\mu$ g/mL.

**Palavras-chave:** atividade moduladora, aminoglicosídeo, metabólitos secundários.

## CHAPTER 1

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Evaluation of the antibacterial and antioxidant properties of *Croton heliotropiifolius* Kunte and *Croton blanchetianus* Baill.** Patos, PB: UFCG, 2011. 24p. (Master Degree in Animal Science – Agrossilvipastoral Systems in the Semi-arid).

### ABSTRACT

*Croton heliotropiifolius* Kunte and *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) are medicinal plants native of northeast Brazil. Known popularly as "velame" and "marmeleiro", these plants are commonly used as teas, infusions, poultices and laxatives. The therapeutic potential of these species results from the presence of several secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids and terpenoids. This paper describes the chemical composition, the antibacterial and modulating activities of essential oils, and the antioxidant activity of leaf ethanolic extracts of these species. Essential oils were extracted from fresh leaves by hydrodistillation and the chemical constituents were identified by GC/MS. Eucalyptol (16.9%),  $\beta$ -caryophyllene (15.9%) and germacrene-D (14.5%) were the main essential oils extracted from *C. heliotropiifolius*, and cedrol (28.4%), eucalyptol (17.4%) and  $\alpha$ -pinene (10.5%) from *C. blanchetianus*. Ethanol leaf extracts were obtained by the exhaustive cold extraction method and analyzed phytochemically. Classes of metabolites such as tannins, flavonoids, flavonones, flavonols, flavonoids, catechins and xanthenes were identified on these extracts. Subsequently, the antioxidant activity of these extracts were evaluated according to the free radical sequestration potential by DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Antibacterial activity of the essential oils was evaluated by the direct interaction and Agar diffusion methods, and indirectly with aminoglycoside antibiotics, by broth microdilution and growth of standard and multidrug-resistant Gram positive and Gram negative bacteria strains. Preliminary results of the antibacterial activity showed that both oils were more effective on *Bacillus cereus* Gram-positive strain. In verifying the minimum inhibitory concentration (MIC), it was observed that the essential oil of *C. heliotropiifolius* showed no inhibitory activity, except on the multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* (MR 358) strain for MIC=512 $\mu$ g/mL. *Croton blanchetianus* essential oil inhibited more significantly *Staphylococcus aureus* for MIC=64  $\mu$ g/mL. *Croton blanchetianus* oil increased synergistically the activity of amikacin, kanamycin and gentamicin on *Bacillus cereus* strain. In vitro antioxidant tests by DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical sequestering, showed antioxidant activity for both extracts, and leaf extract of *C. blanchetianus* were the most efficient, with EC<sub>50</sub>=6.5  $\pm$  0.5  $\mu$ g/mL.

**Key words:** Modulating activity, aminoglycoside, secondary metabolites

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as propriedades terapêuticas das plantas medicinais obtidas à partir da medicina popular, vem sendo acumulado durante séculos e esse conhecimento empírico simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. O uso e a eficácia de plantas medicinais são atribuídos as observações populares que contribuem de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem apesar de não terem seus constituintes químicos muitas vezes conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas ao longo dos anos (MACIEL et al., 2002).

O interesse popular no uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido muito significativo nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. De acordo com a OMS, entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certas drogas vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SCOPEL, 2005).

Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos (WALL; WANI, 1996). Segundo a Organização mundial de Saúde, dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente de origem vegetal (GURIB-FAKIM, 2006).

No entanto, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (BARROS, 2008).

Apesar do longo tempo que se conhece o potencial curativo das plantas, apenas recentemente estas se tornaram objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas

propriedades medicinais (NOVAIS et al., 2003). O conhecimento a respeito dessas propriedades é requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Sendo assim, pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas.

Nas últimas décadas, dentre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA et al., 2006).

Devido ao aumento progressivo da resistência, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais de plantas poderia ser uma alternativa, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (NOVAIS et al., 2003). Nos últimos anos, muitas plantas têm sido avaliadas não somente pela atividade antibacteriana, mas também como agente modificador de resistência antibiótica (GIBBONS, 2004).

A região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema, com predominância de Caatinga, uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do globo (MAIA, 2004). Diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de microorganismos, buscou-se realizar um trabalho que viabilize um maior conhecimento das espécies existentes na região, especificamente das espécies de *Croton blanchetianus* e *Croton heliotropiifolius* que permita principalmente contribuir para identificação de novas substâncias com atividades biológicas definidas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar a composição química, e avaliar as atividades antibacterianas, moduladoras e antioxidantes dos óleos essenciais e extratos das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 Informações Botânica

#### 2.1.1 Gênero *Croton*

*Croton* foi proposto por Linnaeus em 1753 ao descrever 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Depois dessa proposta, o gênero já recebeu atenção de diversos estudiosos (e.g., Baillon 1858; Mueller 1865, 1866, 1873; Bentham 1880), destacando-se Webster (1992, 1993, 1994, 2001), que propôs a classificação infragenérica mais recente para o gênero (SILVA; SALES & CARNEIRO-TORRES, 2009).

Taxonomicamente esse gênero é de difícil classificação devido ao seu elevado número de espécies, problemas de delimitação específica, de nomenclatura e polimorfia de seus representantes (WEBSTER, 1993). Diversos novos táxons de *Croton* têm sido propostos para o Brasil desde a revisão de Müller (1873), geralmente em trabalhos esparsos, o que tem tornado ainda mais confusa a taxonomia do gênero, dificultando especialmente a identificação.

A literatura (CRAVEIRA, 1981) descreve o gênero *Croton* de acordo com a seguinte transcrição:

Espécies desse gênero são representadas por árvores, arbustos, subarbustos, ervas e raramente lianas. Podem ser monóicas ou dióicas, com tricomas de formas variadas (estrelados, escamiformes, etc.). As folhas apresentam revestimento piloso, inteiras ou raramente trilobadas com estípulas, principalmente nos ramos jovens e novos. Algumas apresentam pêlos estrelados enquanto que outras possuem pêlos lepdotos ou escamosos. As flores de ambos os sexos são pequenas, esbranquiçadas e dispostas em racemos algumas vezes especiformes, dispondo-se as masculinas, geralmente mais numerosas, na parte apical e as femininas na parte basal. Suas pétalas são livres e em número de 5 enquanto que o número de estames varia de acordo com a espécie, nunca sendo inferior a 5. Já o fruto é uma cápsula triococa, de 2 a 6 mm de diâmetro e as sementes são geralmente escuras e oleaginosas.

### 2.1.2 *Croton heliotropiifolius* Kunth

É uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro” face aos seus minúsculos pêlos (Figura1). É encontrada, freqüentemente, em vegetação de Caatinga, embora também ocorra em brejos de altitude (florestas montanas), restingas e cerrados. Na medicina popular é utilizado para dor de estômago, mal estar gástrico, vômitos, diarreia com sangue e para atenuar a febre (RANDAU et al., 2001). A nomenclatura dessa espécie era *C. rhamnifolius*, sendo que atualmente segundo Govaert; Frodin & Radcliffe-Smith (2000) esse nome foi reajustado para *C. heliotropiifolius* Kunth.

Segundo Silva, Sales & Carneiro-Torres (2009), *Croton heliotropiifolius* Kunth é um arbusto 0,7-2,5 m, monóico, látex incolor ou laranja quando oxidado. Os ramos são cilíndricos e verde-acinzentados. As Folhas alternas a subopostas no ápice dos ramos; estípulas 1,4-1,8 x 0,3 mm, persistentes, não foliáceas, elípticas, sem glândulas; pecíolo 0,5-1,5 cm, não viscoso; sem nectários, inflorescência 2,6-6,5 cm, terminal, racemiforme, contínua entre as címulas estaminadas e pistiladas; címulas estaminadas 2-3 flores, flores pistiladas solitárias curtamente pediceladas ou sésseis; brácteas 1-2 com 0,8-1,2 x 0,3-0,4 mm, inteiras, lanceoladas, e glandulares.

A espécie caracteriza-se ainda pela presença de tricomas estrelado-porrectos adensados nas estruturas vegetativas e reprodutivas, dando um aspecto tomentoso. Além disso, geralmente não apresenta nectários no pecíolo ou quando presente estes são inconspícuos, globosos e muitas vezes encobertos pelos tricomas. Floresce em maio, junho, julho e novembro e frutifica em maio e junho (SILVA, SALES & CARNEIRO-TORRES, 2009). Diferencia-se de *C. campestris* pelas folhas concolores, inflorescência eglandular, sementes lisas e ramos com tricomas dendríticos (SÁTIRO & ROQUE, 2008).



**Figura 1** *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Fonte:** ANGÉLICO, E. C. CSTR/UFCG, (2009).

### **2.1.3 *Croton blanchetianus* Bail**

Essa espécie é exclusivamente brasileira (Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), ocorrendo em vegetação de carrasco (Ceará) e de Caatinga (GOMES, 2006). Popularmente é conhecida como marmeleiro. Na medicina popular é utilizado via oral para inchaço (FRANCO & BARROS, 2006), hemorragia uterina, hemoptise, dor de estômago, vômitos e diarreia (MATOS, 1999). De acordo com Govaert; Frodin & Radcliffe-Smith (2000) a nomenclatura dessa espécie foi reajustada de *C. sonderianus* para *C. blanchetianus*.

Cresce de forma silvestre ocupando as áreas desmatadas e formando grandes conjuntos relativamente homogêneos na caatinga que somam alguns milhares de hectares (LORENZI & MATOS, 2002). Isso se deve a sua grande resistência à seca e a capacidade de rebrotar intensamente na época das chuvas mesmo sendo cortada pelo homem, permitindo que o marmeleiro se difunda por quase toda a área da caatinga, com exceção apenas, dos espaços extremamente secos.

De acordo com Silveira (1979) a espécie *Croton blanchetianus* pode ser descrita botanicamente como:

“Planta arbustiva, podendo chegar à pequena árvore. Apresenta ramos, pecíolos, racemos e na página inferior das folhas, delicado indumento de pelos estrelados de cor acinzentada, às vezes com brilho vítreo, densamente tomentoso e não lepdoto. Os ramos são quase cilíndricos, apresentando sua secção transversal elítica. As folhas medem cerca de 10 a 14 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura na parte mais inferior são triangular-ovais ou quase triangular-lanceoladas, de ápice acentuadamente acuminados e levemente cordatas na base, glandulosas, peninérvias, com 4 a 6 nervuras secundárias que se aproximam da base, apresentando estípulas cetáceas, alongadas, levemente lacinadas. O pecíolo é 4 a 5 vezes mais curto que o limbo. Os racemos possuem flores abundantes com brácteas linear-lanceoladas cada uma com uma flor. A flor feminina destituída de pétalas apresenta cálice pentafendido, com lobos orbicular-ovais, obtusos, ondulados nas margens e acrescente superando quase a metade da cápsula. Os lacínios subsaccato-reflexos apresentam sinuosidades. O ovário é viloso-tomentoso. As cápsulas medem cerca de 7 mm de comprimento, são depresso-globosas e as sementes 5 mm de comprimento por 4 mm de largura e aproximadamente 2 mm de espessura (Figura 2).



**Figura 2:** *Croton blanchetianus* Baill. **Fonte:** ANGÉLICO, E. C. CSTR/UFCG, (2009).

## 2.2 Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial de espécies de *Croton*

As espécies de *Croton* têm sido largamente estudadas em relação aos seus constituintes voláteis e não-voláteis. Muitas espécies são produtoras de um grande número de substâncias pertencente às classes dos alcalóides, fenilpropanóides e terpenóides (RANDAU et al., 2004).

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Croton* de ocorrência brasileira têm proporcionado ao isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais tais como diterpenos (35,6%), alcalóides (24,8%) flavonóides (12,8%) e triterpenos (11%) (TORRES, 2008).

Os fenilpropanóides, como anetol e derivados do eugenol, comuns nos óleos de erva-doce, cravo e manjerição têm sido relatados como os principais componentes dos óleos essenciais de espécies de *Croton* encontradas em diferentes partes do mundo, como por exemplo, *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*, no Brasil (MORAIS et al., 2006); *C. molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ et al., 2005); *C. pseudonivenus* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR; MONROY & BUSTAMANTE, 2007).

Estudo realizado com óleo essencial extraído de diferentes partes de *C. blanchetianus* (folhas, flores, raízes e cascas do lenho) coletadas em diferentes regiões do estado do Ceará, em diferentes horas do dia, possibilitou investigar e identificar 32 compostos dentre os quais  $\beta$ -felandreno, (20,4%), (folhas), biciclogermacreno (29,1%) nas flores e (17,7%) nas folhas,  $\beta$ -elemeno (17,8%) nas flores e (22,0%) nas cascas do caule, cipereno (14,2%) nas raízes e germacreno D (12,8%) nas cascas do caule sendo os constituintes majoritários (DOURADO, 2005).

Avaliando a atividade antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*, Santos et al., (2005), obtiveram resultados promissores e ainda conseguiram identificar 11 compostos majoritários, dentre eles podem ser citados: biciclogermacreno (10,2%), cis-calameneno (10,8%) e guaiazuleno (8,3%)

De acordo com Block (2006) o óleo essencial das folhas de *C. zambesicus* possui como constituintes majoritários, os compostos óxidos de cariofileno (19,5%),  $\beta$ -cariofileno (10,8%),  $\alpha$ -copaeno (6,3%), linalol (6,1%) e  $\beta$ -pineno (5,2%).

Sylvestre et al., (2006) verificaram que no óleo essencial das folhas de *C. flavens* há 47 compostos, dos quais o viridifloreno (12,2%), a germacrona (5,2%), o (E)-  $\gamma$ -bisaboleno (5,2%) e o  $\beta$ -cariofileno (4,9%) são os compostos principais.

A espécie *C. nepetaefolius*, comumente conhecida como “marmeleiro sabiá”, foi estudada quimicamente e foram identificados como constituintes majoritários o 1,8-cineol (37,5%), o  $\beta$ -cariofileno (23,0%) e o  $\gamma$ -elemeno (12,0%) (CRAVEIRO et al., 1980). A composição do óleo essencial das cascas de *C. aubrevillei* e folhas de *C. zambesicus* foram estudadas por Menut (1995) que constatou que em ambas as espécies possuem os mesmos constituintes majoritários, porém em proporções diferentes: Linalol (34,6% e 9,9%),  $\beta$ -cariofileno (11,9% e 9,9%).

As atividades biológicas são investigadas utilizando tanto óleo essencial, como extratos ou frações, principalmente as constituídas de alcalóides e compostos fenólicos. O diterpeno clerodano trans-desidrocrotonia (DCTN), isolado de *C. cajucara*, apresentou diversas atividade como hipoglicêmica, hipolipidêmica, antigenotópica, antiulcerogênica, antitumoral, antiinflamatória e antinociceptiva, antiestrogênica e cardiovascular (COSTA et al., 2007). Ensaio com flavonóides extraído dessa mesma espécie também foi observada atividade antiinflamatória e antioxidante (NARDI et al., 2007).

Análises químicas realizada por Fontenell et al., (2008) mostraram que *C. nepetaefolius* tem metil-eugenol (15,7%) e biciclogermacreno (14,1%) como principais constituintes, enquanto que os principais constituintes *C. argyrophyloides* são espatulenol (20,3%) e biciclogermacreno (11,7%), e os de *C. zehntneri* são estragol (72,9%) e anetol (14,3%). O óleo essencial de *C. zehntneri* apresenta atividade antifúngica (FONTENELL et al., 2008). Essa atividade pode ser atribuída ao estragol principal constituinte e/ou anetol, que já demonstraram propriedades antifúngicas contra *Aspergillus parasiticus* (SINGH et al., 2006).

Os principais constituintes identificados no óleo essencial extraído das folhas de *C. palanostigma* foram linalol (25,4%), (*E*)-cariofileno (21,0%), metileugenol (17,2%) e  $\beta$ -elemeno (6,0%) o qual foram analisados por CG e CG-EM. Já o óleo da casca do tronco *C. palanostigma* mostrou atividade larvicida com  $CL_{50}$ ,  $3,71 \pm 0,01$  mg.mL<sup>-1</sup>), podendo ser considerado altamente tóxico (BRASIL et al., 2009), pois quanto menor o valor de  $CL_{50}$  maior a atividade biológica.

Um total de 22 compostos foi identificado no óleo essencial de *C. grewioides* perfazendo 98,6 e 99,9 % dos óleos de caule e folha, respectivamente. Desses 22 compostos, somente (*E*)-anetol, metil-eugenol, (*E*)-metil-isoeugenol,  $\beta$ -cariofileno,  $\delta$ -cadineno e óxido de carifileno foram encontrados simultaneamente nos óleos de caule e folhas (SILVA, 2007).

O óleo essencial de *C. grewoides* mostrou atividade inseticida quando avaliada sobre o caruncho do feijão *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) sendo a ação do óleo essencial das folhas 3,4 vezes menor do que a estimada para o óleo essencial do caule. (SILVA, 2007).

No levantamento bibliográfico realizado por Torres (2008) quanto à composição química, os diterpenos que compõem a classe dos terpenóides e os alcalóides foram os compostos encontrados com maior frequência em espécies do gênero *Croton* estudadas no Brasil.

### 2.3 Óleo Essencial

Nos últimos anos, tem se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO & YUNES, 1997). Neste sentido, dentre os agentes terapêuticos provenientes de plantas destacam-se os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis ou óleos etéreos.

Os óleos essenciais do ponto de vista químico são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. São extraídos de diversas partes das plantas (flores, inflorescências, sementes, folhas, gravetos, cascas, frutos e raízes) por processos específicos. São dotados de aroma quase sempre agradável, incolores quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados de aparência oleosa. Tem como característica principal a volatilidade, que os difere dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas obtidos geralmente de sementes (SIMÕES et al., 2007).

As substâncias químicas encontradas nos óleos essenciais são formadas por ésteres de ácidos graxos, terpenóides, fenilpropanonas, alcoóis, aldeídos e em alguns casos, por hidrocarbonetos alifáticos. No entanto, óleos essenciais são constituídos principalmente de terpenos, sesquiterpenos, ésteres, alcoóis, fenóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos (ROCHA & SANTOS, 2007). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos são os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos, podendo também está presente os diterpenos quando extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES et al., 2007).

A composição e a concentração das substâncias que constituem os óleos essenciais podem sofrer influência de fatores como a radiação, temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, época de coleta e outros (GOUINGUENÉ & TURLINGS, 2002).

Os óleos essenciais demonstram uma imensa variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Dentre estas ações

estão à antiparasitária, antimicrobiana, analgésica, diurético, antimalárico, antihemorroidário, miorelaxante, antiespasmótico, antiinflamatório, anticonvulsivante e gastroprotetora (OLIVEIRA et al., 2001; ABDON et al., 2002).

#### **2.4 Atividade Antibacteriana**

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antibacterianos desencadeou resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO et al., 2004). A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006).

Em decorrência do aumento da resistência, a busca por substâncias antibacterianas derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos (COELHO et al., 2004).

No entanto, os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiência e outras (CLARDY; WALSH, 2004). Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias.

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidos empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente (JANSEN, SCHEFFER, BAERHEIM, 1987).

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencente à diferente classe de metabólitos secundários, tais como, cumarina, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWAN, 1999). Várias pesquisas realizada com plantas demonstraram que os compostos fenólicos como os flavonóides já possuem potente ação antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2000).

Dentre as plantas já estudadas e que apresentaram potencial antimicrobiano podemos citar a *Mentha suaveolens* que é conhecida como mentrasto e pertencente à família

Lamiaceae, onde o óleo essencial sinalizou uma capacidade de inibição do crescimento sobre bactérias Gram positivas e negativas (OUMZIL et al., 2000).

Alzoriky & Nakahara (2003) estudando a ação de extrato de *A. absinthium* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria sp*, *Salmonella sp* e *Escherichia coli*, observaram a concentração inibitória mínima variando entre 165 a 2640 mg/mL. Já Imai et al., (2001) testando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais das espécies *Mentha piperita* L. e *Mentha arvensis* L. verificaram ação contra as bactérias *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*, tanto linhagens sensíveis como resistentes a antibióticos.

Um total de 32 extratos hexânicos e etanólicos de *Protium bahianum*, *P. heptaphyllum*, *C. sellowii*, *C. rhamnifolius*, *C. jacobinensis*, *C. micans* e *Muntingia calabura*, foram avaliados para atividade antibacteriana, pelo método de difusão em disco. A presença de atividade antibacteriana foi observada com os extratos hexânicos das flores de *M. calabura* contra *B. subtilis*, e extratos etanólicos das folhas contra *S. aureus* and *B. subtilis* na concentração de 1mg/mL. (RAMOS et al., 2009).

Pelissari, Pietro e Moreira (2010) analisaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais obtido a partir de partes aéreas de *M. divaricatum*, utilizando-se o método de difusão em disco frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e as cepas de campo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Serratia marcescens*. Os resultados obtidos mostraram que apenas as espécies Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) foram sensíveis ao óleo essencial, e as demais espécies testadas não tiveram seu crescimento inibido.

Na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos e das frações acetato de etila e do composto *n*-butanol isolado das folhas e galhos de *C. psidiiflorus* apresentaram “moderadamente ativas” frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Enquanto que a substância isolada 8-hidróxicalameneno apresentou-se “fortemente ativa” frente às bactérias *S. aureus* (CMI = 7,8 µg/mL e CMB = 15,6 µg/ mL) e *B. subtilis* (CMI e CMB = 7,8 µg/mL) (DOMINGUES et al., 2010).

Mendonça, Onofre e Sideney (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo da resina de *Copaifera multijuga*, pela a técnica de difusão em ágar em meio Muller-Hinton frente às linhagens *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Os resultados mostraram que o óleo possui capacidade de inibir o crescimento das três bactérias avaliadas, apresentando com isso uma concentração inibitória mínima de 1,56, 3,12 e 12,5% para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

O óleo essencial das folhas de *L. camara* mostrou considerável atividade antibacteriana frente às linhagens *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) na qual foi mais significativo contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 10390) (COSTA et al., 2009).

Acredita-se que a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antimicrobiano através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo. Mas especificadamente, altera a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio ( $H^+$ ) e potássio ( $K^+$ ), causando a interrupção dos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN & DEANS, 2000).

## 2.5 Atividade moduladora

Combinações múltiplas de drogas estão sendo cada vez mais importantes no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Vários relatos mostram que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicadas em clínicas são comuns, é o caso da combinação de penicilina com a gentamicina. Essa combinação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal que vai alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO et al., 2008).

Quando esses produtos naturais interferem de forma positiva aumentando a atividade do antibiótico, provoca um efeito sinérgico. Já o efeito antagônico ocorre quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente ao produto natural (CANTON & ONOFRE).

Estudos científicos com extratos e óleos essenciais de diversas plantas têm sido relatados, além de suas propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica, demonstrando um efeito sinérgico ou antagônico.

Zago et al., (2009) estudando as possíveis interações entre óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume Lauraceae), capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), hortelã pimenta (*Mentha piperit*), gengibre (*Zingiber officinale*), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) combinados a oito drogas antimicrobianas frente a doze linhagens de *Staphylococcus aureus* e doze de *Escherichia coli* isoladas de

humanos, verificaram que *S. aureus* foi mais suscetível às interações óleos e drogas, tendo o óleo de capim cidreira apresentado sinergismo com as oito drogas testadas, seguido pelo óleo de hortelã com sete drogas.

Estudo realizado por Oliveira et al., (2006) para verificar a interferência dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham, *Plectranthus amboinicus* Lour Spr., *Conyza bonariensis* L. e *Eucalyptus citriodora* sobre o efeito de antibióticos, mostrou comportamento sinérgico e antagônico nas interações com cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. De outra forma, observou-se uma menor interferência dos óleos essenciais no efeito dos antibióticos sobre as cepas Gram negativas, principalmente *P. aeruginosa*.

De acordo com Nascimento et al., (2010) não foi verificado o efeito sinérgico da associação entre antibióticos comerciais e o óleo essencial de *Eucalyptus* sp frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

O extrato etanólico das folhas de *Mormodica charantia* quando analisado para a atividade antibacteriana frente a *E. coli* multirresistente, não foi observado atividade do ponto de vista clínico com CIM  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ , porém, quando combinado em associação a amicacina e neomicina apresentou sinergismos com efeito aditivo (COUTINHO et al., 2009)

## 2.6 Atividade Antioxidante

O organismo humano produz constantemente radicais livres por meio de suas atividades metabólicas normais que envolvem reações de transferência de elétrons. Os radicais livres são definidos como sendo moléculas ou átomos que possuem elétrons de valência desemparelhados, tornando-os altamente reativos. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidante, conseqüentemente ocorre o estresse oxidativo, originando processos fisiopatológicos como aterosclerose, diabetes, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, como o envelhecimento (SALVADOR e HENRIQUES, 2004). Os principais alvos de ataque dos radicais livres são os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA) (HENRIQUES et al., 2001) comprometendo desta forma a integridade celular.

Os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Podem ser divididos em sintético, substâncias utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se o BHT, BHA, GP, TBHQ (SOUSA et al.,

2007).ou naturais tais como:  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (SOUSA et al., 2007) os quais são os responsáveis pela remoção dessas espécies reativas.

As evidências de que alguns compostos antioxidantes sintéticos largamente utilizados na indústria podem promover o desenvolvimento de células tumorais (BOTTERWECK et al., 2000) tem levado a um aumento crescente na procura de similares naturais, dentre estes os extratos vegetais e os óleos voláteis constituídos por compostos terpênicos com importante atividade antioxidante (SACCHETTI et al., 2005).

Portanto, o interesse pela pesquisa sobre novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos, levando as indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticos a ter maior atenção em novas fontes, principalmente às de origem vegetal. Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (RAZAVI et al., 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que vários extratos de plantas, particularmente os que contêm flavonóides, parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres, e conseqüentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes radicais (NUNES, 2007).

Osakabe et al., (2000) mostraram que o extrato de sementes de cacau (*Teobroma cacao* L.), possui efeito antioxidante devido a presença de proantocianidinas. Fenglin et al. (2004) estudando o extrato metanólico das folha de 300 plantas medicinais chinesas, encontraram 56 espécies, ricas em taninos e flavonóides, com grande capacidade de seqüestro de radicais livres.

Estudos realizados com extratos etanólicos das diferentes partes de *C. chelidonioides* utilizando o modelo fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) demonstraram atividade antioxidante, principalmente na maior concentração usada (250  $\mu$ g/mL) (FALCÃO et al., 2006). Ramos e folhas de *Maytenus ilicifolia* também mostraram uma boa atividade antioxidante (NEGRI; POSSAMAI; NAKASHIMA, 2009).

No trabalho realizado por Barreiros et al., (2003) foi avaliada a capacidade antioxidantes de substâncias isoladas de *D. violacea* e *E. numulária*, onde foi possível constatar que as substância epicatequina ( $IC_{50} = 171,68$  mg/L) demonstrou maior atividade, superando o BHT ( $IC_{50} = 480,69$  mg/ L) e a quecertina ( $IC_{50} = 184,41$  mg/L) 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona (buteína) ( $IC_{50} = 279,49$  mg/L) e 3',4',7-triidroxiflavanona (butina) ( $IC_{50} = 318,89$  mg/ L) também apresentaram atividade considerável.

Saldanha (2005) avaliando a atividade antioxidante *in vitro* das diferentes concentrações de extratos de erva-mate verde e tostada e chá verde, observou que, utilizando o sistema M-caroteno/ácido linoléico, apenas os extratos aquosos e éteres de chá verde, na concentração de 0,5 mg/mL, apresentaram resultados inferiores ao BHT (padrão), sendo que os demais, para ambas as concentrações (0,5 e 1,0 mg/mL) apresentaram ótima inibição da oxidação lipídica (semelhante ao padrão).

Analisando a atividade antioxidante de extratos metanólicos das folhas de *L. camara* em quatro diferentes idades de desenvolvimento, Ganjewala, Sam e Khan (2009) verificaram um potencial antioxidante de todos os extratos, sendo as melhores atividades observadas para os extratos obtidos das folhas nas primeiras fases iniciais do desenvolvimento.

Segundo Basile et al., (2005), o extrato das folhas de bardana, indicou atividade antioxidante, podendo este atuar como sequestrante de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, contribuindo para a prevenção ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo.

### 3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDON, A. P. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35:: 1215-1219. 2002.

ALZORIKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80:: 223-230. 2003.

BAILLON, H. Etude générale du grupo dès Euphorbiacées. **Victor Masson**, Paris. 1858.

BENTHAM, G. Note on Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v 37:: 185-267. 1880.

BOTTERWERCK AAM, VERHAGEN H, GOLDBOHN RA, KLEINJANS J, BRANDT PA. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry Toxicology**, v.38:: 599-605. 2000.

BARREIROS, A. L. B. S.; BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; QUEIROZ, L. P. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13:: 08-11. 2003.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S. BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102:: 32-36. 2005.

BLOCK, S.; FLAMINI, G.; BRKIC, D.; MORELLI, I.; QUETIN-LECLERCQ, J. Analysis of the essential oil from leaves of *Croton zambesicus* Muell. Arg. growing in Benin, **Flavor Fragrance Journal**, v. 21:: 222-224. 2006.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17:: 444-447. 2007.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown.** 2008. 162p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

BRASIL, D. S. B., MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20:: 1188-1192. 2009.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12:: 564-582. 1999.

CRAVEIRO, A. A., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F.J. A.; ALENCAR, J. W.; DANTAS, T. N. C. Fixe and volatile constituents of *Croton aff. nepetifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 43:: 756-757. 1980.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza. UFC, 1981.

CRAVEIRO, A. C.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos Essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza, CE: Edições UFC. 1981.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432::829-837. 2004.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90:: 135-143. 2004.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14:: 97-103. 2004.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 20(3):: 348-354. 2010.

DOURADO, R. C. M., SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation, **Journal of Essential Oil Research**, v. 17::36-40. 2005.

COSTA, M. P.; MAGALHÃES, N. S. S.; GOMES, F. E. S.; MACIEL, M. A. M.; DONNICI, C. L. A review of the biologicaz activities of trans-desidrocrotonina a natural product obtained from de *Croton cajucara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17:: 275-286. 2007.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIO, J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18:: 670-675. 2008.

COSTA, J. G. M. SOUSA, E. O.; RODRIGUES, FABÍOLA. F. G. LIMA, S. G.; FILHO, R. B. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana sp*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19:: 710-714. 2009.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O. FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47:: 1056–1059. 2009.

DOMINGUES, E. A.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, M. C.; TEIXEIRA, T. S.; PEIXOTO, J. L. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20:: 23-27. 2010.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88:: 308-316. 2000.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7::1-16. 2006.

FENGLIN, H.; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 74:: 14-23. 2004.

FILHO, V. C., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v 21:: 99. 1998.

FALCÃO, D. Q.; EDLAINE, R.; COSTA, ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KUSTER, R. M.; MENEZES, F. S.. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16:: 73-76. 2006.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, F. R. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8:: 78-88. 2006.

FONTENELLE, R. O. S., MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104::1383-1390. 2008.

GOVAERTS, R., FRODIN, D.G. & RADCLIFFE-SMITH, A.. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, **Kew**,. v.1-4:: 1-1622. 2000.

GOINGUENÉ, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**. v. 129::1296-1307. 2002.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21:: 263-27. 2004.

GOMES, A. P. S. **Revisão das espécies sulamericanas de *Croton* L. subgen. *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (Crotonoideae- Euphorbiaceae)**. 2006. 124p. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27:: 1-93. 2006.

GANJEWALA, D.; SAM, S.; KHAN, H. Biochemical compositions and antibacterial activities of *Lantana camara* plants with yellow, lavender, red and white flowers. **Erasian Journal of Biosciences**, v. 3: 69-77. 2009.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L. A., DE BARROS N. M., AZEVEDO J. L. (Eds.), *Biotecnologia na agricultura e na indústria*. **Guaíba: Agropecuária**, v 1:: 227-256. 2001.

IMAI, H.; OSAKA, K.; YASUDA, H.; HAMASHIRA, H.; ARAI, T. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint on the growth of pathogenic bacteria. **Microbios**. v 106:: 31-39. 2001.

JANSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie**. v 45:: 70. 1987.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2002.

MENUT, C., LAMATY, G., BESSIÈRE, J. M., SEULEIMAN, A. M., FENDERO, P., MAIDOU, E., DÉNAMGANAI, J. Aromatic plants of tropical central África. XXII. Volatile constituents of *Croton aubrevillei* J. Léonard and *C. zambesicus* Muell. Arg. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7:: 419-422. 1995.

MUELLER, J. Euphorbiaceae. **Linnaea**. v 34:: 77-142. 1865.

MUELLER, J. *Croton*. In Candolle, A. P. (ed.). *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. **Victor Masson**, Paris. v. 15:: 511-708. 1866.

MUELLER, J.. *Croton*. In Martius, C.F.P. & Eichler, A.G. (eds.). **Flora brasiliensis**, Fleischer, Lipsiae. vol 11:: 81-274. 1873.

MATOS, F.J. A. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: Ed.UFC. 1999.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIRO, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25:: 429-438. 2002.

MAIA, G.N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª Ed. Leitura & Arte. 2004. 19-31p.

MORAIS, S. M. L., CAVALCANTI, E. S. B., BERTINI, L. M. OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B. & CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Assoc.** v. 22:: 161-164. 2006.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, SIDENEY, B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19:: 577-581. 2009.

NASCIMENTO G. G. F, LUCATELLI, J. F. P.C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31:: 247-256. 2000.

NOVAIS, T.S; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.L.P; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14:: 05- 08. 2003.

NARDI, G. M.; DALBO, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107:: 73-8. 2006.

NUNES, R. S. **Avaliação da atividade antioxidante e antimutagênica da acerola (*Malpighia glabra* L).** 85p. 2007. Dissertação de mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada. Universidade Luterana do Brasil.

NEGRI, M. L. S., POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revevista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19:: 553-556. 2009.

NASCIMENTO, A. R.; SERRA, J. L.; ALMEIDA, A. G. L. M., FILHO, J. E. M., ARAGÃO, N. E.; ANDRADE, L. S. Efeito inibitório do óleo essencial do *eucalyptus* sp., puro e associado a antibióticos, frente a cepas de *escherichia coli* e *staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, alimentos, areia e água do mar. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 28:: 141-148. 2010.

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOUI, M.; ILIDRISSI, A.; TETOUAMI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytother Research**, v. 16:: 727-731. 2000.

OSAKABE, M.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; YAMAGISSHI, M.; HIRANO, R.; TARIZAWA, T.; ITAKURA, M.; KONDO, K. Effects of cação liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, Limerick, v. 7:: 164-168. 2000.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C.F.; MORAIS, S.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34:: 1471-1474. 2001.

PEREZ-AMADOR M. C., MONROY, M. A. & BUSTAMANTE, G. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C. suberosus* (Euphorbiaceae) species. **Phyton**, v 53:: 109-112. 2003.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16(1):: 77-82. 2006.

PELLISSARI, G. P.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20:: 70-74. 2010.

RANDAU, K. P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacoquímico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm. (Euphorbiaceae).** 2001. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife- PE.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14:: 89-96. 2004.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L.; O uso comercial e popular do *Eucalypto eucalyptus Globulus Labill*- Myrtaceae. **Revista Duque de Caxias**, v. 2:: 23-24. 2007.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 18: 1-5. 2008.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G. CASTELAR, IVAN.; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19:: 376-381. 2009.

SILVEIRA, E.R. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste – *Croton sonderianus* Muell. Arg.** 1979. Tese apresentada ao Departamento de Química Orgânica – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R.; Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford. v. 91:: 621-632. 2005.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas, RS: Ed. ULBRA. 2004.

SCOPEL, M. **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl. e Avaliação Preliminar da Estabilidade.** 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre. 2005.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*).** 2005. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP. 2005.

SUÁREZ, A.I., L.J. VÁSQUEZ, M.A. MANZANO & R.S. COMPAGNONE. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Journal Flavour Fragrance**, v 20:: 611-614. 2005.

SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciencia**, v. 77:: 2953-2963. 2005.

SINGH, G., MAURYA, S., LAMPASONA, M.P. AND CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food control**, v. 17:: 745–752. 2006.

SYLVESTRE, M., PICHETTE, A., LONGTIN, A., NAGAU, F., LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103:: 99-102. 2006.

SILVIA, C. G. V. **Bioatividade de extratos etanólicos de *Croton* sobre *Plutella xylostella* (L.) e Ação fumigante e composição química de óleos essenciais de *Croton greivoides* (Baill.) sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boheman)**. 2007. 56p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. 6<sup>a</sup>, Porto Alegre, ED. UFRGS, 2007.1102p.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30:: 351-355. 2007.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio Rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 22:: 99-118. 2008.

SILVA, J. S.; SALES, F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *croton* (euphorbiaceae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 4:: 879-901. 2009.

TORRES, M. C. M. **Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* Var. *matosii* (Euphorbiaceae)**. 2008. 8p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará.

WALL, M. E, WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v. 51:: 239-254. 1996.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of thesection of the genus *Croton* (Euphorbiaceae) **Taxon**. v 42:: 793-823. 1993.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19:: 828-833. 2009.

## CAPÍTULO 2

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Composição Química dos Óleos Essenciais das folhas de *Croton blanchetianus* Baill e do *Croton heliotropiifolius* Kunth.** Patos- PB: UFCG, 2011. 15p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido).

### RESUMO

O gênero *Croton* (*Euphorbiaceae*) possui aproximadamente 1.200 espécies, das quais 300 ocorrem no Brasil. Muitas espécies de *Croton* são produtoras de óleos essenciais cuja composição química é rica em mono- e sesquiterpenóides, além de fenilpropanóides. Devido à grande diversidade das propriedades biológicas apresentadas por esses constituintes químicos, o gênero *Croton* está entre os mais ricos da família *Euphorbiaceae* como fonte de compostos bioativos. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth e do *C. blanchetianus* Baill. Os óleos essenciais foram obtidos das folhas frescas por hidrodestilação e a sua composição química foi analisada por meio de CG-EM. Com essa técnica, foi possível identificar 32 constituintes químicos, destes, o eucaliptol (16,9%), o  $\beta$ - cariofileno (15,9%) e o germacreno-D (14,5%) foram os compostos majoritários do óleo de *C. heliotropiifolius*. Para *C. blanchetianus*, os compostos majoritários foram cedrol (28,4%), eucaliptol (17,4%) e  $\alpha$ - pineno (10,5%). Nas análises dos óleos foi possível reconhecer a presença de mono- e sesquiterpenos como componentes predominantes em ambas as espécies.

**Palavras chave:** Euphorbiaceae, eucaliptol, sesquiterpenos.

## CHAPTER 2

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Chemical Composition of Essential Oils from the leaves of *Croton blanchetianus* Baill and the *Croton heliotropiifolius* Kunth.** Patos, PB: UFCG, 2011. 15p. (Master Degree in Husbandry Science – Agrossilvipastoral Systems in Semi-arid).

### ABSTRACT

The genus *Croton* (Euphorbiaceae) has approximately 1.200 species, of which 300 occur in Brazil. Many species of *Croton* are producers of essential oils whose chemical composition is rich in mono- and sesquiterpenoids, and phenylpropanoids. The wide diversity of biological properties of these chemical constituents, the genus *Croton* is among the richest family Euphorbiaceae as a source of bioactive compounds. This study aimed to analyze the chemical composition of essential oils from leaves of *C. heliotropiifolius* Kunth and *C. blanchetianus* Baill. Essential oils were obtained from fresh leaves by hydrodistillation and its chemical composition was analyzed by GC-MS. With this technique, we identified 32 chemical constituents of these, eucalyptol (16.9%), the  $\beta$ -caryophyllene (15.9%) and germacrene-D (14.5%) were the major components of the oil *C. heliotropiifolius*. For *C. blanchetianus*, the compounds were cedrol (28.4%), eucalyptol (17.4%) and  $\alpha$ -pinene (10.5%). In the analysis of oils was possible to recognize the presence of mono- and sesquiterpenes as predominant components in both species.

**Keywords:** Euphorbiaceae, eucalyptol, sesquiterpenoids.

## 1 INTRODUÇÃO

*Croton*, um dos maiores gênero da família *Euphorbiaceae*, é constituído por aproximadamente 1200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Compreendem plantas de hábitos heterogêneos que vão desde árvores, arbustos, subarbustos, ervas e trepadeiras (RADULOVIC et al., 2006). Com cerca de 300 espécies, o Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, que está representado nos mais variados ambientes e tipos vegetacionais (BERRY et al., 2005). No Nordeste, a maioria das espécies é conhecida popularmente como marmeleiro, canela e velame.

Espécies desse gênero são freqüentemente utilizadas na medicina popular (na forma de infusões, chás e emplastos) para aliviar dor (ABREU et al., 2001), para tratamento de câncer, constipação intestinal, diarréia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas, inflamação, febre e hipertensão (SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007). Estudos realizados com algumas espécies têm revelado várias atividades farmacológicas, como: antidiabético (BARBOSA-FILHO et al., 2005), antiinflamatória, antiulcerogênica, analgésica e anti-hipertensiva (PALMEIRA-JUNIOR et al., 2006), dentre outras.

Muitas espécies de *Croton* possuem forte potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido aos diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides (PAYO et al., 2001), que conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies. A maioria das espécies são produtoras de óleos essenciais cuja composição química é rica em mono- e sesquiterpenos, além de fenilpropanóides (PALMEIRA-JUNIOR et al., 2006). Esses componentes voláteis, que são os responsáveis pelo agradável aroma dessas plantas (RANDAU et al., 2004), apresentam uma enorme diversidade estrutural, o que aumenta as chances desses óleos essenciais de se tornarem verdadeiras fontes de substâncias bioativas.

*C. blanchetianus* Baill (sinônimo *Croton sonderianus* Müll. Arg.), conhecida como marmeleiro preto, é um arbusto difundido largamente no nordeste do Brasil. As folhas e cascas são usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, reumatismo e cefaléia (CHAVES AND REINHARD, 2003). Possui um alto teor de óleo essencial que pode variar de 0,5% para 1,5% no seu rendimento (CHAVES & REINHARD, 2003). Além disso, é uma planta rica em diterpenos, com atividades biológicas diversificadas (McCHESNEY et al., 1991).

A espécie *C. heliotropiifolius* Kunth, endêmica do Nordeste do Brasil, é conhecida popularmente como velame. Na medicina tradicional é usado para dores de estômago, mal-estar gástrico, vômitos, diarreia e banhos para atenuar a febre (RANDAU, 2001).

Portanto, tendo em vista a importância de contribuir com o conhecimento químico destas espécies, este trabalho teve por objetivo analisar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth e do *C. blanchetianus* Baill.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais – LPPN da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-Ceará, e Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais – LAMPA da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

### 2.2 Seleção das Espécies Botânicas

As espécies estudadas foram selecionadas a partir de um levantamento bibliográfico, identificando-se plantas referenciadas com vários potenciais terapêuticos. Foi realizado um mapeamento na área de caatinga para a localização, identificação e coleta das amostras desejadas.

### 2.3 Coleta e identificação do material

As folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* foram coletadas nos meses de outubro e novembro de 2009 às 8:00 horas, no sítio São José do Bonfim – município de Patos, entre as coordenadas geográficas de latitude de 07<sup>o</sup> 08' 20 9" e longitude 037<sup>o</sup> 18' 062". Em seguida uma mostra representativa de cada espécie foi identificada pela professora Maria de Fátima e depositada no herbário da Caatinga da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos- PB, sob o registro de número # 496 e # 497, respectivamente.

### 2.4 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas frescas de *C. blanchetianus* (820,0g) e *C. heliotropiifolius* (652,95g) foram obtidos por hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de duas horas (MATOS et al., 1999). Em seguida, os óleos foram secos com sulfato de sódio anidro para retirar o excesso de água e foram mantidos em refrigerador no período de 30 dias até as análises.

## 2.5 Análises da composição química dos óleos essenciais

A identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* foram obtidos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), em um espectrômetro Hewlett-Packard modelo 5971, operando com energia de ionização de 70 eV. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme) e carreador de gás hélio com fluxo de 1 mL/min com split. As temperaturas do injetor e detector foram programadas de 250 °C e 200 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 35 °C a 180°C a 4°C/min e, em seguida de 180°C a 280°C a 10°C/min. Os espectros de massa foram obtidos de 30 a 450 m/z.

Os Componentes individuais foram identificados por correspondências de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados, usando a biblioteca construída através do espectrômetro (Wiley, 229) e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (ALENCAR et al., 1990) bem como através de comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (ADAMS, 2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenções dos óleos essenciais

Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das espécies estudadas apresentaram rendimentos de 0,075% e 0,72% conforme estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** Rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*

Planta	Massa (g)	Volume (mL)	Teor (%)
<i>C. heliotropiifolius</i>	652,95	1	0,075
<i>C. blanchetianus</i>	820,02	5	0,72

Na literatura, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais obtidos de várias espécies de *Croton* variam entre 0,05 e 3,15% extraídos de várias partes das plantas. Segundo Dourado e Silveira (2005) o óleo essencial obtido das folhas de *C. blanchetianus* descreve um rendimento de 0,5% inferior ao que foi encontrado nesse estudo. Silva (2008), avaliando o óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*, descreve um rendimento de 0,18% superior ao encontrado para a espécie em estudo.

Diante desses resultados, e apesar de termos buscado limitar os fatores que poderiam interferir com a qualidade das amostras a serem testadas, observa-se que houve uma variação no rendimento do óleo essencial das espécies em estudo. Essas variações podem ser atribuídas a vários fatores tais como, qualidade dos solos, unidade do ar, temperatura ambiente, época de colheita, método e tempo de destilação, além da diversidade genética da espécie, entre outros (SILVA et al., 2006).

#### 3.2 Análises da composição química dos óleos essenciais

Pela análise em CG-EM foi possível identificar e quantificar 23 constituintes (Tabela 2). Para *C. heliotropiifolius* foram identificados 18 constituintes correspondendo a 98,8%, com 13,2% monoterpênicos e 80,7% sesquiterpênicos. Entre os compostos identificados estão eucaliptol (16,9%) como composto majoritário seguido de  $\beta$ -cariofileno (15,9%) e germacreno-D (14,5%). Para *C. blanchetianus* foram identificados 15 constituintes (79,4%),

sendo 39,2% monoterpenos e 10,3% constituintes sesquiterpenos. Os compostos majoritários foram cedrol (28,4%), eucaliptol (17,4%) e  $\alpha$ -pineno (10,5%).

O perfil químico dos óleos foi semelhante, porém revelou uma proporção diferente para as espécies, mostrando uma elevada quantidade de sesquiterpenos para o óleo de *C.heliotropiifolius*, enquanto que para o *C.blanchetianus* observa-se uma predominância de monoterpenos. No entanto, essa composição química é compatível com dados da literatura para espécies de *Croton* cujos óleos essenciais são caracterizados pela predominância de monoterpenos e sesquiterpenos como principais componentes (MECCIA et al., 2000).

Silva (2008) destacou a presença de  $\alpha$ -pineno, sabineno, linalol, acetato de bornila,  $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -humuleno, biciclogermacreno, espatulenol e o eucaliptol como compostos majoritários, no óleo essencial extraído das folhas de *C.heliotropiifolius* corroborando com os dados desse estudo. Já no talo dessa espécie foi verificado a presença de *p*-cimeno,  $\alpha$ -pineno, eucaliptol, linalol,  $\beta$ -cariofileno e germacreno D semelhantes aos identificados nas folhas. No óleo essencial das folhas de *C.heliotropiifolius*, Craveiro et al. (1981), identificou 15 constituintes químicos, onde os componentes majoritários foram *p*-cimeno (20,3%), eucaliptol (11%) e  $\alpha$ -felandreno (9,9%). O eucaliptol (conhecido também como 1,8-cineol) é um óxido monoterpênico e é o principal constituinte de vários óleos essenciais, dentre eles, os óleos das espécies de *Croton*, *Eucalyptus*, *Psidium*, *Hyptis*, *Pectis*, *Melaleuca* e muitos outros (SANTOS & RAO, 2000).

O óleo essencial de *C. blanchetianus* é produzido por todas as partes da planta e apresenta-se como 1 % do peso seco da planta, sendo constituído de mono e sesquiterpenos (CRAVEIRO et al., 1982; MATOS 1999). De acordo com Oliveira (2008) na composição química do óleo essencial *C blanchetianus* estão presentes o  $\alpha$ -pineno (10,5%),  $\beta$ -pineno (1,4%),  $\beta$ -mirceno (1,9%), no qual todos foram identificados no presente trabalho.

Na análise realizada com o óleo essencial de *C. blanchetianus*, coletadas em diferentes regiões do estado do Ceará em diferentes horas do dia e a partir de partes diferentes da planta (folhas, flores, raízes e cascas do lenho) foram identificados 32 compostos dentre os quais  $\beta$ -felandreno (20,4%), folhas, biciclogermacreno (29,1%) nas flores e (17,7%) nas folhas,  $\beta$ -elemeno (17,8%) nas flores e (22,0%) nas cascas do caule, cipereno (14,2%) nas raízes e germacreno D (12,8%) nas cascas do caule como os constituintes majoritários (DOURADO, 2005).

Amaral (2004) também verificou a presença de  $\beta$ -cariofileno e espatulenol no óleo essencial de *C. blanchetianus* e Silva (2008) observou  $\beta$ -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol e o eucaliptol no *C.heliotropiifolius*. O  $\beta$ -cariofileno e

germacreno D são comum em óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*. Silva et al., (2010), avaliando a composição química dos óleos essenciais de *C. blanchetianus*, coletados em diferentes horários do dia; verificaram que houve uma diferença na composição química, sendo que o  $\beta$ -cariofileno foi comum em ambos os horários. O  $\beta$ -cariofileno é descrito em diversos óleos por possuir forte aroma e diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória (PASSOS et al., 2007), antialérgica (GHELARDINI et al., 2001), anestésica local (COSTA et al., 2000), antifúngica (ZHENG, KENNY & LAM, 1992) e anticarcinogênica (CHINOUE et al., 1996).

De acordo com Brasil et al. (2009), os principais constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *C. palanostigma* Klotzsch (syn. *C. benthamianus* Müll. Arg.) foram linalol (25,4%), (*E*)-cariofileno (21,0%), metileugenol (17,2%) e  $\beta$ -elemeno (6,0%); no óleo dos ramos finos foram  $\alpha$ -pineno (41,4%), limoneno (29,0%), sabineno (11,5%) e  $\beta$ -pineno (5,7%).

Costa et al., (2008) verificaram na espécie *C. zehntneri*, Estragol (76,8%), como compostos majoritários, além de 1,8-Cineol (7,0%), Eugenol (5,3%), Mirceno (4,4%), Bicyclogermacreno (1,7%),  $\beta$ -ocimeno (1,6%), sabineno (0,61%) sendo que em menor quantidade. Os resultados encontrados neste estudo se apresentam semelhantes aos já descritos por Silva (2008), que identificou na espécie *C. rhamnifolius* também, o 1,8-cineol como composto majoritário.

Contudo, a maioria dos constituintes químicos identificados na composição dos óleos de *C. blanchetianus* e *C. heliotripiifolius* é diferente aos observados em óleos obtidos de espécies do gênero *Croton* proveniente da Americana Central, Venezuela e México, (SUÁREZ et al., 2005), porém semelhante aos constituintes verificados nos óleos de espécies encontrada na Região Nordeste (SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007).

Acredita-se, que essa diferença na produção dos óleos essenciais esteja integrada à fisiologia da planta, na qual a sua composição e quantidade dependem de enzimas específicas que catalisam a produção de compostos voláteis em um órgão, do estágio de desenvolvimento e de estresses abióticos, como a salinidade do solo, a umidade do ar e a temperatura ambiente (SANGWAN et al., 2001).

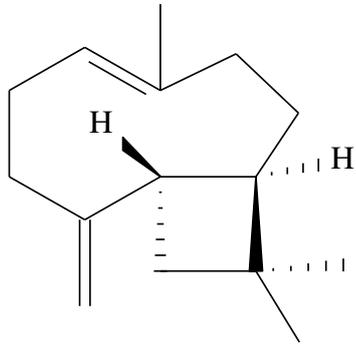
Portanto, diante dos resultados obtidos, destaca-se que os constituintes cedrol, alloaromadendreno e criptona presentes no óleo essencial de *C. blanchetianus* foram identificados apenas nesse trabalho, podendo estar relacionados com a existência de quimiotipos dessa espécie encontradas apenas no bioma da Caatinga.

**Tabela 2** Constituintes químicos identificados nos óleos essenciais das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*.

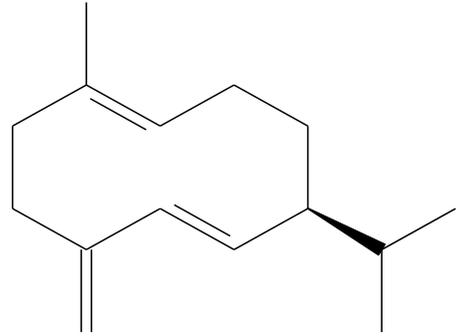
Constituintes	<i>C.heliotropiifolius</i>		<i>C.blanchetianus</i>	
	RI*	(%)	RI*	(%)
$\alpha$ -pineno	939	3,5	939	10,5
$\beta$ -pineno	-	-	980	3,0
Sabineno	976	2,4	-	-
$\beta$ -mirceno	991	5,5	991	1,5
<i>p</i> -cimeno	1026	5,4	1026	4,2
Eucaliptol	1033	16,9	1033	17,4
$\gamma$ -terpineno	1062	4,5	-	-
Linalool	1098	1,1	1098	1,5
acetato de bornila	1285	3,5	-	1,3
acetato de terpinila	1346	1,7	-	-
$\alpha$ -copaeno	1346	1,7	-	-
$\beta$ -cariofileno	1418	15,9	1418	3,8
$\alpha$ -humuleno	1452	2,1	1452	1,3
germacreno D	1480	14,5	-	-
biciclogermacreno	1494	10,4	-	-
$\delta$ -cadineno	1524	1,1	-	-
Espatulanol	1576	3,7	1576	2,8
óxido de cariofileno	1581	1,7	1581	1,2
Viridiflorol	1590	1,2	-	-
Cedrol	-	-	1589	28,4
alloaromadendreno	-	-	1458	1,2
<i>p</i> -cimen-8-ol	-	-	1189	1,3
criptona	-	-	1186	1,3
Monoterpenos		13,2		39,2
Sesquiterpenos		80,7		10,3
<b>Total identificado</b>		<b>98,8%,</b>		<b>79,4%</b>

\*Índices de Retenção (Adams, 2007).

**Quadro 1** Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG/EM presente nos óleos essenciais de *C. blanchetianus* e *C. heliotropifolius*.



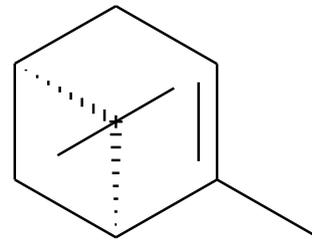
(1)  $\beta$ -cariofileno



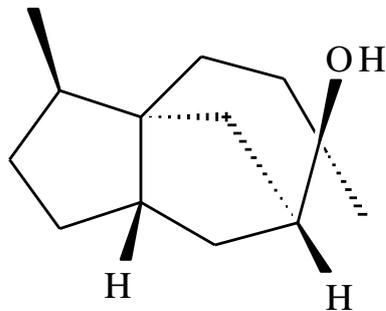
(2) germacreno D



(3) eucaliptol



(4)  $\alpha$ -pineno



(5) cedrol

## 4 CONCLUSÃO

Apartir dos resultados obtidos, conclui-se que os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais das plantas pertencem à classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, tendo como compostos majoritários o eucalipto,  $\beta$ -cariofileno e o germacreno-D para a espécie *C. heliotropifolius* e cedrol, eucaliptol e o  $\alpha$ -pineno para *C. blanchetianus*.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, v. 13:: 282-284. 1990.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois: **Allured Publishing Corporation**, 2001.
- ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica**, v.1:: 1-9. 2001.
- AMARAL, J. F.. **Atividade antiinflamatória, Antinociceptiva e Gastroprotetora do Óleo Essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg** 2004. 40p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F.; Modesto-Filho J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 15:: 392-413. 2005.
- BERRY, P. E. CORDEIRO, I. WIEDENHOEFT, A. C., VITTORINO-CRUZ, M. A. & LIMA, L. R.. Brasiliocroton, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae from eastern Brazil. **SystemBot.** v. 30:: 357-365. 2005.
- BRASIL, D. S. B.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20:: 1188-1192. 2009.
- CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21:: 2571-2574. 1982.
- CHINOU, I. B.; ROUSSIS, V.; PERDETZOGLU, D.; LOUKIS, A.. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. **Planta Médica**, v. 62 (4):: 377-379. 1996.
- COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v 72:: 111-117. 2000.
- CHAVES, S.A.M.; REINHARD, K.J. Palespharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. **Memoirs Institute de Oswaldo Cruz**, v. 98:: 207-11. 2003.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O. CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R., SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de

*Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18:: 583-584. 2008.

DOURADO, R. C. M., SILVEIRA, E. R.. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation, **Journal of Essential Oil Research**, v. 17:: 36-40. 2005.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **II Farmaco**, v. 56:: 387-389. 2001.

McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenos of *Croton sonderianus* II. ent- Beyer – 15-en-18-oic. **Pharmaceutical Research**, v. 8.: 1243-7. 1991.

MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L., CRAVEIRO, A. A., BARBOSA-FILHO, J. M. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11:: 41-44. 1999.

MATTOS, F. J. A. Mattos, **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**, UFC, Fortaleza, 1999. 80 p.

MECCIA, G., L. B. ROJAS, C. ROSQUETE & A. SAN FELECIANO. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. **Journal Flavour Fragrance**, v 15:: 144-146. 2000.

PAYO, H. A.; DOMINICIS, M. E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M. & SARDUY, R.. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 35:: 203-206. 2001.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110:: 323-333. 2007.

PALMEIRA-JUNIOR, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONVERSA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16:: 397-402. 2006.

OLIVEIRA, A. P. R. **Efeito do Óleo Essencial do *Croton sonderianus* Muell.Arg. sobre o Trato Gastrointestinal**. 2008. 135p. Dissertação (Mestrado em Ciências fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

RANDAU, K. P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm. (Euphorbiaceae)**. 2001. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco. Recife- PE.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S.; Estudo Farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* pax & hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14:: 89-96. 2004.

RADULOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTENAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34:: 648-653. 2006.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cinole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v.14:: 240-244. 2000.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plant. **Plant. Growth Regulation**, v 34:: 3-21. 2001.

SUÁREZ, A. I.; VÁSQUEZ, L. J.; MANZANO, M. A.; COMPAGNONE, R. S. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Journal Flavour Fragrance**, v. 20:: 611-614. 2005.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill. N.E.BR.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8:: 52-55. 2006.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v 18:: 11-33. 2007.

SILVA, F. K. S. **Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae)**. 2008. 162p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, L. L. S.; LIMA, E. O.; NASCIMENTO, S. C.; MOTA, D. L.; SILVA, N. H.; ALMEIDA, E. R.; SILVA, M. G. S. Avaliação da Atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20::208-214. 2010.

ZHENG, G. Q.; KENNY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryphyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal Natural Product**, v. 55:: 999-1003. 1992.

### CAPÍTULO 3

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Atividade antibacteriana dos Óleos Essenciais e extratos das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth e do *Croton blanchetianus* Baill.** Patos, PB: UFCG, 2011. 21p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido).

#### RESUMO

A procura por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas vem sendo intensificada devido ao aumento significativo de microorganismos resistentes a fármacos convencionais. A utilização das plantas para investigações de novos antimicrobianos é justificável devido à grande variedade de substâncias químicas presentes nas diferentes partes das plantas com ação farmacológica como cumarina, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos. Em vista disso, objetivou-se avaliar o efeito antibacteriano dos óleos essenciais de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus* e a sua interferência sobre a ação dos antibióticos aminoglicosídeos frente às linhagens de bactérias padrão Gram-positivas e Gram-negativas e uma multirresistente. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação os quais apresentaram rendimentos de 0,075% e 0,72%, respectivamente, para *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. A atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima (CIM) foram determinadas pelo método de difusão em Agar (técnica do poço) e microdiluição em caldo. Os resultados preliminares da atividade antimicrobiana mostraram que ambos os óleos foram mais efetivos frente à linhagem Gram-positiva *Bacillus cereus*. *C. heliotropiifolius* não mostrou atividade inibitória frente às linhagens testadas, com exceção para a multirresistente *Staphylococcus aureus* (MR 358) com CIM 512µg/mL. Para o óleo essencial de *C. blanchetianus* o resultado foi mais significativo para *Staphylococcus aureus* com CIM de 64 µg/mL. O óleo essencial do *C. blanchetianus* reforçou significativamente a atividade da amicacina, canamicina e gentamicina frente à linhagem *Bacillus cereus*, mostrando um efeito sinérgico. Os resultados apresentados indicam que os óleos essenciais são uma fonte de produtos naturais que possuem atividade antibacteriana oferecendo dessa forma, uma importante contribuição para ampliar o conhecimento biológico das espécies.

**Palavras-chave:** Terpenóides, microdiluição, *Bacillus cereus*.

### CHAPTER 3

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Antibacterial activity of essential oils and extracts from the leaves of *Croton heliotropiifolius* Kunth and the *Croton blanchetianus* Baill.** Patos, PB: UFCG, 2011. 21p. (Master Degree in Husbandry Science – Agrossilvipastoral Systems in Semi-arid).

#### ABSTRACT

The search of new antimicrobial plant compounds has been intensified due to the significant increase of microorganism resistance to conventional drugs, and the variety of bioactive chemicals such as coumarin, flavonoids, terpenoids, alkaloids and tannins, found in different plant parts. Thus, the antibacterial effects of *C. heliotropiifolius* and *C. blanchetianus* essential oils and their interference on the action of aminoglycoside antibiotics on standard Gram-positive and Gram-negative bacteria strains were evaluated. Essential oils were obtained by hydrodistillation, resulting in 0.075% and 0.72% of oils, respectively, for *C. heliotropiifolius* and *C. blanchetianus*. The antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by agar diffusion method (pool technique) and microdilution. Preliminary results of the antimicrobial activity showed that both oils were more effective on the Gram-positive *Bacillus cereus* strain. *Croton heliotropiifolius* essential oil showed no inhibitory activity on the tested bacteria strains, except on the multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* (MR 358), with MIC 512 µg/mL, while *C. blanchetianus* essential oil was more active on *Staphylococcus aureus*, with MIC of 64 µg/mL. *Croton blanchetianus* essential oil increased synergistically the activity of amikacin, kanamycin, gentamicin on *Bacillus cereus* strain. These results contribute to the biological understanding of species, and indicate that essential oils are a source of natural products that have antibacterial activity.

**Key words:** Terpenoids, microdilution, *Bacillus cereus*.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, registra-se um número significativo de populações bacterianas resistentes a antimicrobianos, principalmente as de origem hospitalar, que vem causando um sério problema de saúde pública. Essas bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas rotineiramente usadas na clínica, hoje se apresentam resistentes a todos ou quase todos os fármacos disponíveis no mercado, como descrito para várias bactérias multirresistentes (SAKAGAMI & KAJAMURA, 2006). Isso vem acontecendo devido à utilização inadequada de alguns antimicrobianos, que perdem muito rapidamente sua eficácia e principalmente, ao uso indiscriminado desses agentes, dentre outros fatores. Como exemplo, podemos citar o caso das cepas de *Staphylococcus aureus* que tem se tornado um grande problema no tocante as infecções hospitalares, devido à freqüente resistência adquirida, desde a descoberta das penicilinas e, em seguida, outros  $\beta$ -lactâmicos (SILVA et al., 2009). Em razão disso novas alternativas terapêuticas vem sendo implementadas, principalmente as que utilizam plantas medicinais no combate e/ou controle dos microrganismos patogênicos.

O interesse pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à grande variedade de substâncias químicas presentes nas diferentes partes das plantas com ação farmacológica, como cumarina, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWA, 1999). Neste sentido, as pesquisas mais recentes envolvem o *screening* de extratos vegetais e óleos essenciais, para desta forma, conhecer os metabólitos secundários com relevante atividade biológica (KNIGHT et al., 2003). Como exemplo, temos os compostos fenólicos como os flavonóides os quais possuem potente ação antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2000). Os óleos essenciais rico em diterpenos apresentam ação seletiva contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (USHIMARU et al., 2007)

A família *Euphorbiaceae* compreende uma das mais extensas famílias das Angiospermas, abrangendo cerca de 7.500 espécies, representadas por 300 gêneros. Entre os gêneros da família *Euphorbiaceae* com potencial uso farmacológico, destaca-se o gênero *Croton* por seu expressivo número de espécies (1200) distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais (HELUANI et al., 2000). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, de hábito e habitat diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação (PALMEIRA, 2005).

Dentre as espécies de *Croton* com forte potencial econômico e terapêutico devido ao seu alto teor de óleos essenciais, temos *C. blanchetianus* e o *C. heliotropiifolius*, nativas da região nordeste e conhecidas popularmente como marmeleiro preto e velame.

Pesquisas publicadas com o óleo essencial do *C. blanchetianus* têm demonstrado efeito antinociceptivo (AMARAL, 2004), antiinflamatória, gastroprotetora e antimicrobiana (MECCHESENEY et al., 1991). Já estudos realizados com extrato da raiz de *C. heliotropiifolius* revelou atividade anfilarial (NYASSE et al., 2006) antiespasmódica (MACIEL; PINTO.; ARRUDA, 2000), antitumoral (TORRANCE, WIEDHOPF & COLE, 1977) e antimicrobiana (PERES et al., 1997)

Os estudos direcionados à avaliação da atividade antimicrobiana de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* frente a microrganismos prejudiciais ao homem ainda é escasso na literatura científica. Em vista disso, objetivou-se nesse estudo avaliar o efeito antibacteriano dos óleos essenciais e a interferência dos mesmos sobre a ação dos antibióticos testados frente às linhagens de microrganismos patogênicos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais – LPPN da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-Ceará e Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais – LAMPA, da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

### 2.2 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* foram coletadas nos meses de outubro e novembro de 2009 às 8:00 horas, no sítio São José do Bonfim – município de Patos, entre as coordenadas geográficas de latitude de 07<sup>o</sup> 08' 20 9" e longitude 037<sup>o</sup> 18' 062". Em seguida uma mostra representativa de cada espécie foi identificada pela professora Maria de Fátima e depositada no Herbário da Caatinga da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos- PB, sob o registro de número 496 e 497, respectivamente.

### 2.3 Extração de óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas frescas (820,02g) de *C. blanchetianus* e das folhas frescas (652,95g) de *C. heliotropiifolius* foram obtidos por hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de duas horas (MATOS et al., 1999). Em seguida, os óleos coletados foram secos com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para retirar o excesso de água e mantidos sob refrigeração no período de 24 horas até a realização das análises.

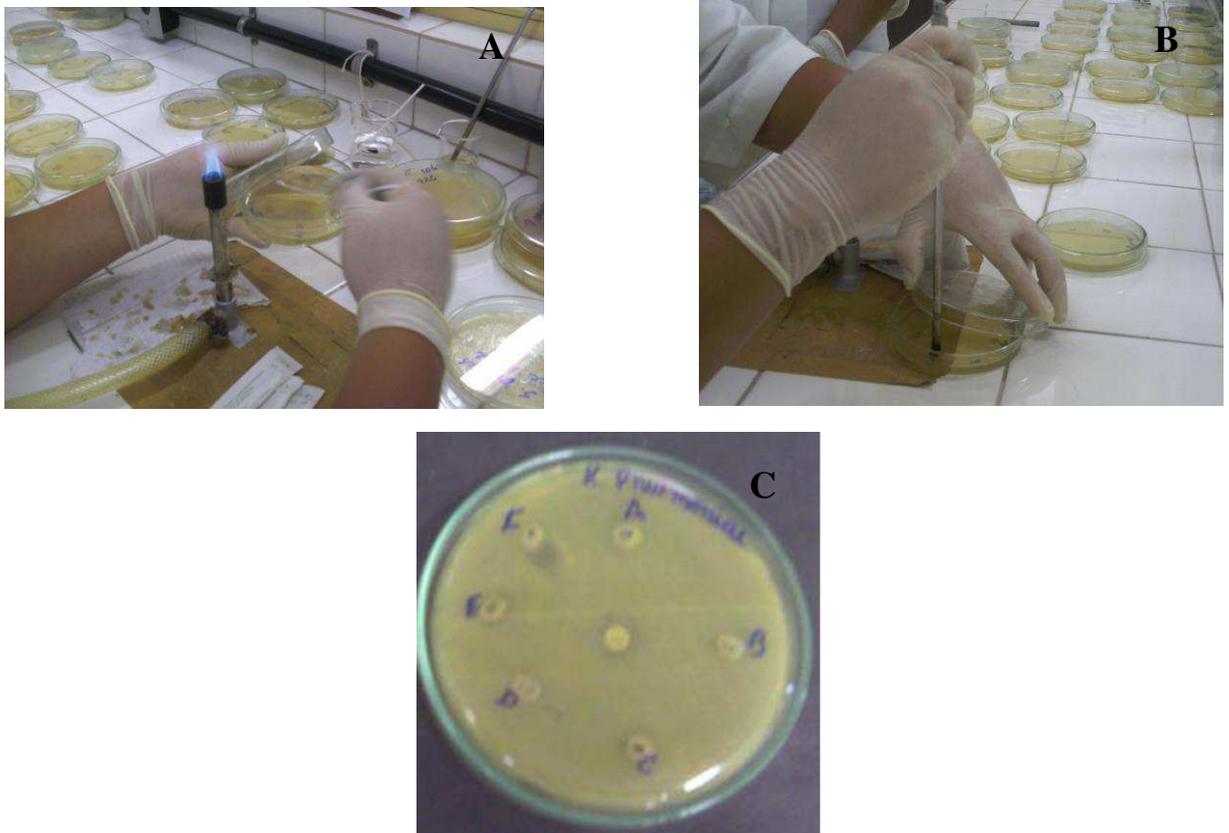
### 2.4 Ensaios microbiológicos com os óleos essenciais

#### 2.4.1 *Screening* antibacteriano

Na avaliação preliminar da atividade antibacteriana foram utilizadas cinco linhagens bacterianas padrão cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, sendo três Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (15442), *Klebsiela pneumoniae* (10031), e *Escherichia*

*coli* (25922), duas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATTC 12692), *Bacillus cereus* (ATTC 33018) e uma linhagem multirresistente isolada de material clínico *Staphylococcus aureus* (MR 358), a qual foram reavivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas por 24 horas a 37 °C.

A ação antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em Agar por cavidade em gel (BAUER et al., 1966) adaptado por Koneman et al., (1993) e Romeiro (2001). As bactérias foram inoculadas, com auxílio de um swab estéril, em placas de Petri previamente preparadas com Agar Muller-Hilton nas quais foram feitas cavidades (6 mm de diâmetro) preenchidas com 20µL das soluções preparadas com os óleos essenciais das plantas (diluídos em DMSO) nas seguintes concentrações 10; 5; 2,5; 1,25; ,0,6 e 0,3 % (Figura1). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Os ensaios foram realizados em duplicata, acompanhados de controle positivo com os antibióticos amicacina (30µg) e clorafenicol (30µg) e como controle negativo DMSO e água destilada. Foi considerado como resultado final de cada amostra a média das medidas dos halos e como suscetível halo de inibição igual ou acima de 10 mm de diâmetro, correspondente ao diâmetro da cavidade no meio de cultura (ROMEIRO, 2001).



**Figura 1** Avaliação da atividade antibacteriano. Inoculação das bactérias no meio de cultura (A), perfuração de poços com cilindro de aço inoxidável (B) e disposição nas placas de Petri do óleo em várias concentrações (C), 10(A); 5 (B); 2,5 (C); 1,25 (D); 0,6 (E) e 0,3% (F).

## 2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

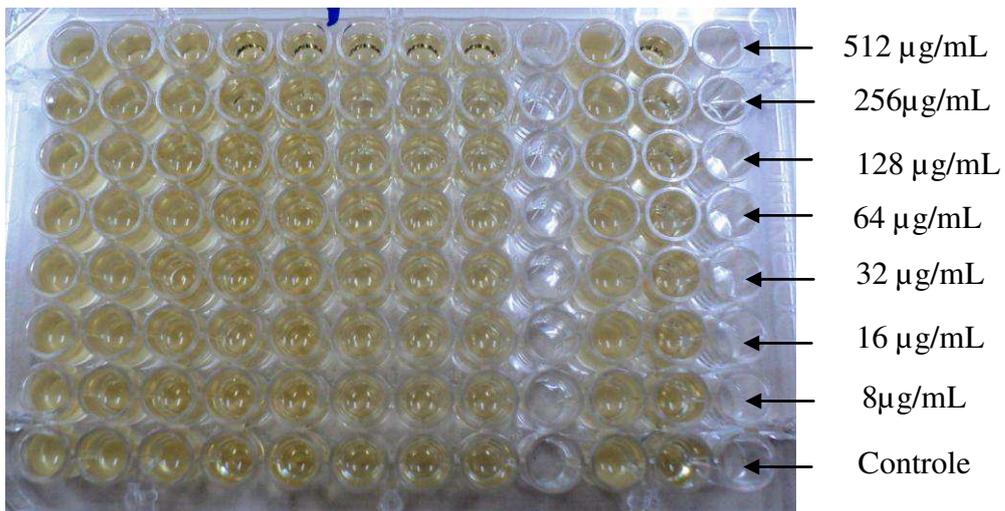
Os óleos testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima- CIM pela técnica de microdiluição em caldo, com base no documento CLSI/NCCLS M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003).

Foram utilizadas cinco linhagens padrão cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, sendo duas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Bacillus cereus* (ATCC 33018), três Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (15442), *Klebsiella pneumoniae* (10031), *Escherichia coli* (25922) e uma linhagem multirresistente isolada de material clínico: *Staphylococcus aureus* (358).

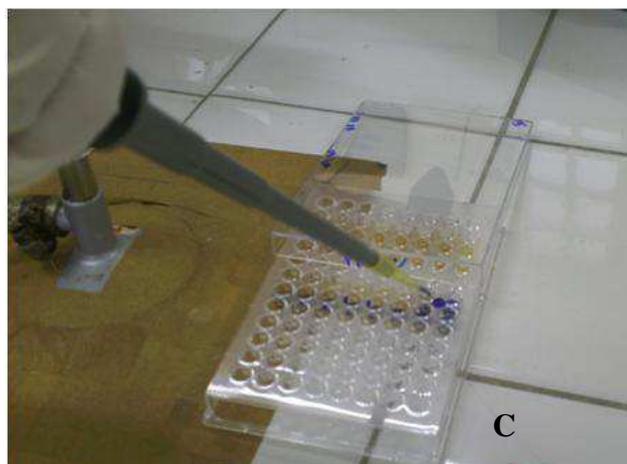
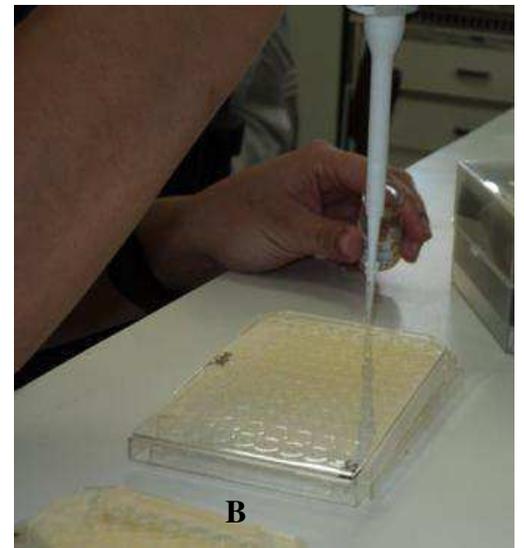
Previamente aos testes, as linhagens bacterianas foram inoculadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI) caldo a 3,8% e incubadas durante 24 h a  $35 \pm 2$  °C. Após este pré-cultivo, procedeu-se à padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em BHI a 3,8%, com turvação correspondendo a 0,5 da Escala McFarland ( $10^8$  UFC/mL). A seguir, esta suspensão foi diluída até  $10^6$  UFC/ mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados em placa de microdiluição com 96 poços, acrescido de diferentes concentrações dos óleos, resultando num inóculo final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL (Figura 3A)

As soluções dos óleos essenciais foram preparadas utilizando 10mg das amostras solubilizadas em 1 mL dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10mg/mL. A partir desta concentração realizaram-se diluições em água destilada para obter uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais dos óleos no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL (Figura 2 e 3B)

Os testes foram efetuados em duplicata e as placas foram incubadas a  $35 \pm 2$ °C durante 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996). Como revelador, foi adicionado em cada poço, 25 µL de resazurina sódica (SIGMA) preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v), por um período de 30 min em temperatura ambiente (Figura3C). O controle negativo foi realizado com 100µL BHI caldo acrescido do inóculo bacteriano padronizado. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu. A leitura dos resultados para determinação da CIM foi considerada como positivo para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT et al., 2001)



**Figura 2** Placa de microdiluição com as concentrações finais dos extratos no meio de cultura



**Figura 3** Determinação da Concentração Inibitória Mínima. Adição de BHI a 10% com inoculo (A); Adição das soluções dos óleos essenciais nos poços (B). Adição da resazurina a 0,01% (C).

### 2.4.3 Avaliação da atividade moduladora do óleo essencial de *C. blanchetianus* por microdiluição

Para a avaliação do óleo essencial como modulador da atividade antibiótica, os CIMs dos antibióticos aminoglicosídeos convencionais (neomicina, canamicina, amicacina e gentamicina), foram determinados na presença e ausência do óleo essencial pelo método de microdiluição, modificado a partir do documento CLSI/NCCLS M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003). Foram utilizadas concentrações subinibitórias (CIM 1/8) em BHI a 10%.

Foram utilizadas no teste duas cepas de bactérias padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sendo as duas Gram-positivas – *Bacillus cereus* (ATCC 33018) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692). As linhagens padrão foram selecionadas devido o óleo essencial de *C. blanchetianus* apresentar à menor CIMs nos ensaios antibacterianos.

Em tubo estéril foi adicionado 0,39 mL do óleo essencial e 4,96 mL do meio de cultura BHI em caldo, obtendo-se uma solução de 5 mL do óleo. Em seguida, colocou-se 100 µL da solução nos poços de uma placa de microdiluição contendo 100 µL da bactéria teste. As soluções dos antibióticos foram preparadas com adição de água de forma a obter uma concentração correspondente a 1024 µg/mL. Depois, adicionou-se um volume de 100 µL de cada solução dos antibióticos em todos os poços com e sem o óleo. As concentrações finais dos antibióticos no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8, 4 e 2 µg/mL. Após incubação das placas a 37°C por 24 horas, a interferência dos óleos essenciais sobre o efeito dos antibióticos foi evidenciada pelo uso de resazurina sódica como especificado anteriormente.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenções dos óleos essenciais

Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das espécies estudadas apresentaram rendimentos de 0,075% e 0,72% conforme estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** Rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*.

Planta	Massa (g)	Volume (mL)	Teor (%)
<i>C. heliotropiifolius</i>	652,95	1	0,075
<i>C. blanchetianus</i>	820, 02	5	0,72

Na literatura, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais obtidos de várias espécies de *Croton* variam entre 0,05 e 3,15% extraídos de várias partes das plantas. Segundo Dourado e Silveira (2005) o óleo essencial obtido das folhas de *C. blanchetianus* mostrou um rendimento de 0,5% inferior ao que foi encontrado nesse estudo. Silva (2008), avaliando o óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*, obteve um rendimento de 0,18%.

Diante desses resultados, observa-se que houve uma variação no rendimento do óleo essencial das espécies em estudo, comportamento semelhante observado com o óleo essencial de *Croton blanchetianus*. Essas variações podem ser atribuídas aos mesmos fatores tais como, qualidade dos solos, unidade do ar, temperatura ambiente, época de colheita, método e tempo de destilação, além da diversidade genética da espécie, entre outros (SILVA et al., 2006).

#### 3.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

No teste de susceptibilidade para a verificação da atividade antibacteriana, observou-se que o óleo essencial de *C. heliotropiifolius* não apresentou atividade frente a todas as bactérias testadas exceto contra a cepa Gram-positiva *Bacillus cereus*, com uma média do halo de inibição 11,5 mm conforme a Tabela 2.e a Figura 4. Na concentração de 10%, as cepas *Staphylococcus aureus* e *Klebsiela pneumoniae* apresentaram halos de inibição menores que 10 mm sendo considerado não-significativo. As linhagens Gram-negativas *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus* multirresistente mostraram-se resistentes ao óleo visto que não houve formação de halo de inibição.

**Tabela 2** Valores das médias do halo de inibição do crescimento bacteriano em mm do óleo essencial de *C.heliotrofifolius*.

Bactérias	Média dos Halos de Inibição (mm de diâmetro) (Média + Desvio Padrão)							
	Concentração do óleo (%)						Controles (+)	
	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3	CLO*	AMI*
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	23,5±2,1	23,5±0,7
<i>S. aureus</i>	5,5±7,77	-	-	-	-	-	0,0±0,0	19,5±0,7
<i>S. aureus</i> M.R	-	-	-	-	-	-	21,0±1,4	21,5±3,5
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	0,0±0,0	19,0±4,2
<i>K. pneumoniae</i>	5±7,07	-	-	-	-	-	0,0±0,0	26,5±2,1
<i>B. cereus</i>	11,5±2,12	-	-	-	-	-	17,5±0,7	22,0±4,2

\*Concentração usada (CLO) Clorafenicol 30µg; (AMI) Amicacina 30µg.

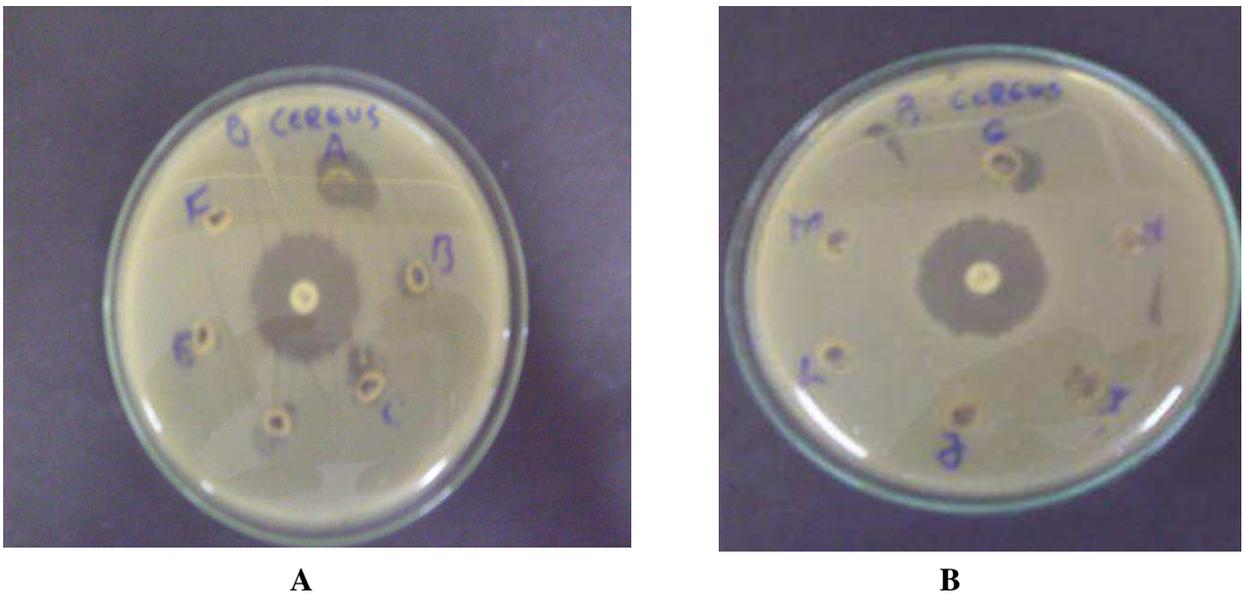
Para o óleo de *C.blanchetianus*, observou-se somente atividade contra a cepa Gram positiva *Bacillus cereus* com o halo de inibição de 13,5 mm na concentração de 10% (Tabela 2 e Fig. 4). Para a linhagem *E.coli* não houve formação de halo de inibição em nenhuma concentração, enquanto que nas demais linhagens o halo de inibição foi menor que 10 mm mostrando com isso uma alta resistência desses microrganismos à ação dos componentes presentes no óleo nas concentrações testadas.

**Tabela 3** Valores das médias do halo de inibição do crescimento bacteriano em mm do óleo essencial de *C.blanchetianus*

Bactérias	Média dos Halos de Inibição (mm de diâmetro) (Média + Desvio Padrão)							
	Concentração do óleo (%)						Controles (+)	
	10	5	2,5	1,25	0,62	0,3	CLO*	AMI*
<i>P. aeruginosa</i>	-	4,5±6,36	-	-	-	-	23,5±2,1	23,5±0,7
<i>S. aureus</i>	4±5,65	3,5±4,94	-	-	-	-	0,0±0,0	19,5±0,7
<i>S. aureus</i> M.R	6,5±9,19	5±7,07	-	-	-	-	21,0±1,4	21,5±3,5
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	0,0±0,0	19,0±4,2
<i>K. pneumoniae</i>	4,5±6,36	5±7,07	-	-	-	-	0,0±0,0	26,5±2,1
<i>B. cereus</i>	13,5±4,94	8,5±0,7	5±7,07	3,5±4,94	-	-	17,5±0,7	22,0±4,2

\* Concentração usada (CLO) Clorafenicol 30µg; (AMI) Amicacina 30µg;

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, verificou-se que o comportamento de ambos os óleos quando avaliado pela metodologia adotada, mostraram uma melhor atividade inibitória frente à linhagem Gram-positiva *Bacillus cereus*. O efeito evidenciado dos óleos essenciais sobre a mesma linhagem pode ser atribuído à totalidade e a proporção dos componentes presentes nos óleos. Conforme relata Koyama et al. (1997), muitos componentes dos óleos essenciais, os quais são diferentes, possuem uma habilidade específica para romper ou penetrar na estrutura bacteriana.



**Figura 4** Resultado da atividade antibacteriana do óleo de *C. heliotropiifolius* (A) e *C. bblanchetianus* (B) sobre *Bacillus cereus* nas concentrações de 10% (A), 5% (B), 2,5% (C), 1,25 % (D), 0,6% (E) e 0,3% (F).

### 3.3 Resultados da Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. Os valores de CIM foram determinados pela leitura visual após revelação com resazurina sendo considerada como positiva para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT et al., 2001).

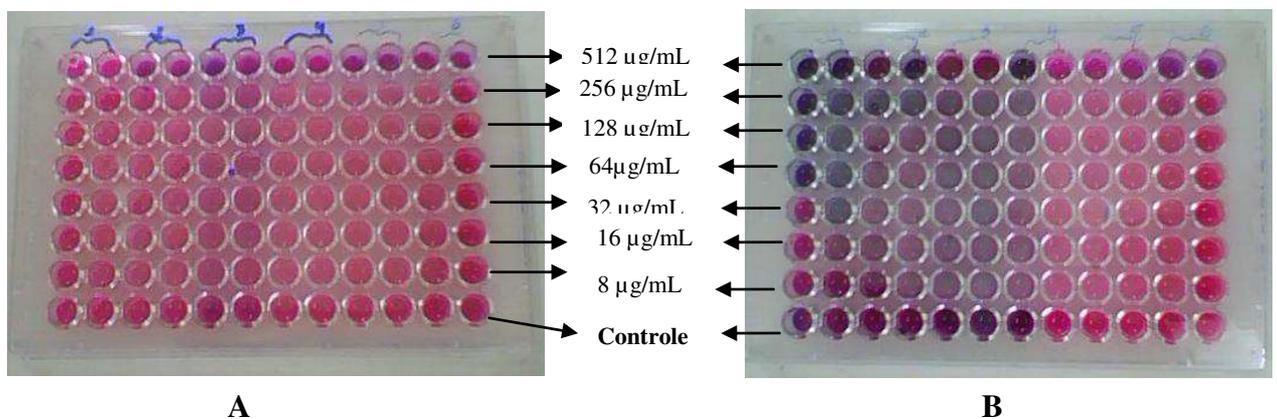
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 e figura 5, verificou-se que o óleo essencial de *C. heliotropiifolius* mostrou atividade inibitória somente para a linhagem multirresistente *Staphylococcus aureus* (MR 358) com CIM 512µg/mL. Enquanto que, para

as demais linhagens testadas o óleo não conferiu atividade antimicrobiana satisfatória. Já o óleo essencial de *C. blanchetianus* mostrou atividade inibitória frente às linhagens *E.coli* (CIM 512µg/mL), *Bacillus cereus* (CIM 256 µg/mL) e para *Staphylococcus aureus* representando o resultado mais significativo com uma menor CIM de 64 µg/mL. Entretanto, nas concentrações testadas, os óleos não foram capazes de inibir o crescimento das cepas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* considerando a CIM  $\geq 1024$  µg/mL).

**Tabela 4** Valores em µg/mL Concentração Inibitória Mínima - CIM dos óleos essenciais das folhas de *C.heliotropiifolius* e *C.blanchetianus*.

Bactérias	CIM (µg/mL)	
	OECh	OECb
<i>P. aeruginosa</i>	$\geq 1024$	$\geq 1024$
<i>S. aureus</i>	$\geq 1024$	64
<i>S. aureus</i> M.R	512	$\geq 1024$
<i>E. coli</i>	$\geq 1024$	512
<i>K. pneumoniae</i>	$\geq 1024$	$\geq 1024$
<i>B.cereus</i>	$\geq 1024$	256

**OECb:** Óleo essencial de *C. blanchetianus* **OECh:** Óleo essencial de *C.heliotropiifolius*



**Figura 5** Resultado da CIM do óleo essencial de *C. blanchetianus* (A) e *C. heliotropiifolius* (B)

A ausência de atividade inibitória dos óleos essenciais sobre as bactérias Gram-negativas, segundo Silva et al., (2007), talvez esteja relacionada com as diferenças estruturais existente entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas, em que pese as Gram positivas serem consideradas mais sensíveis a exposição de produtos antibacterianos, enquanto que, de maneira geral, as bactérias negativas são mais resistentes à essa ação com óleo essencial (RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002) pelo fato de apresentarem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, responsáveis pelo caráter hidrofílico da superfície, dificultando a

penetração das substâncias hidrofóbicas tais como os constituintes de muitos óleos essenciais (DORMAN & DEANS, 2000).

MCCHESENEY et al., (1991) analisou o constituinte 3,4-*seco*-traquilobanóico isolado das raízes de *C. blanchetianus*, no qual apresentou efeito antibacteriano contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Gonçalves (2007), relata que o extrato de *C. blanchetianus* mostrou resistência frente as cepas *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* e *S. aureus*.

Estudos com as espécies *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* com atividade antibacteriana ainda são bastante escassos. Provavelmente se deve ao fato destas espécies serem nativas da Caatinga com variações sazonais e principalmente produzirem óleos com baixo rendimento. No entanto, observa-se atividade antimicrobiana com óleos essenciais para outras espécies de Croton, tais como *Croton nepetaefolius* (LEMOS; MONTE; & GUIMARÃES, 1992), *Croton tiglium* (TSAI & CHANG, 2004) e *Croton lechleri* L. (FROLDI et al., 2009) .

Os constituintes pertencente à classe dos sesquiterpênicos, como o  $\beta$ -cariofileno e biciclogermacreno D (quadro 1) relatado nesse estudo, tem mostrado notável atividade antibacteriana (OZÜRK et al., 2009). O (*E*)-cariofileno também apresentou atividade antimicrobiana (JULIANNI Jr. et al., 2002) e o óxido de cariofileno apresentou efeito analgésico e anti-inflamatório (CHAVAN, SHINDE e NIRMAL, 2006). Já o constituinte germacreno D, majoritário do *C. heliotropiifolius*, mostrou-se inativo contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E.coli*, quando avaliado pelos métodos de difusão em Agar (BIAVATTI et al., 2001) e microdiluição em caldo (DEUSCHLE et al., 2007).

Embora não tenha demonstrado atividade antibacteriana frente às linhagens testadas, segundo Francescato et al., (2007) o constituinte germacreno D pode ter contribuído para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* realizado nesse estudo.

Devido à natureza complexa dos óleos essenciais, ficaria difícil atribuir à atividade observada a qualquer componente único presente no mesmo. Portanto, para se conhecer o modo de ação dos óleos seria necessário examinar separadamente cada componente do óleo essencial, e a combinação para averiguar se os constituintes químicos têm ação inibitória sozinhos ou em sinergismo.

### 3.4 Resultados da atividade moduladora por microdiluição

As linhagens bacterianas que apresentaram as menores concentrações inibitórias (CIM) foram submetidas à determinação da atividade moduladora do óleo essencial frente aos antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos.

Na análise dos resultados, observou-se que o óleo essencial de *C. blanchetianus* não potencializou a atividade dos antibióticos aminoglicosídeos quando testado frente à linhagem *Staphylococcus aureus* na concentração de 64 µg/mL (CIM 1/8) quando comparado com o CIM do antibiótico na ausência do óleo essencial (Tabela 5). Já na concentração de 256 µg/mL (CIM 1/8) o óleo demonstrou uma ação sinérgica sobre a atividade da canamicina, amicacina e gentamicina na interação com a linhagem *Bacillus cereus*, sendo que o valor mais expressivo foi com a canamicina com redução da CIM de 8 para 2 µg/mL (Tabela 5).

**Tabela 5** Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*.

Antibióticos	<i>S.aureus</i> (ATCC)		<i>B.cereus</i> (ATCC)	
	CIM	OECh (64 µg/mL)	CIM	OECh (256 µg/mL)
Amicacina	8	8	8	4
Neomicina	32	32	8	8
Canamicina	16	16	8	2
Gentamicina	2	2	4	2

**OECh:** Óleo essencial de *C. blanchetianus*

Os estudos de eficácia com óleos essenciais (LACHOWICZ et al., 1998) e em combinação com os antimicrobianos convencionais (FILOCHE et al., 2005) têm sido realizados, mas não em grande profundidade. Na literatura, há alguns trabalhos que indicam combinações de diferentes antibióticos analisados *in vitro* e aplicados nas clínicas, mas combinação de produtos naturais e drogas sintéticas ainda não são bem informadas (SOUZA et al., 2010).

Oliveira et al., (2006), mostraram que o óleo essencial de algumas espécies de plantas em associação com o antibiótico gentamicina apresentou um efeito antagônico sobre a cepa *S.aureus*. Rodrigues, Costa e Coutinho (2009) relataram que a atividade do antibiótico gentamicina contra *P. aeruginosa* foi reforçada na presença do óleo essencial de *Croton zehneri*, apresentando um efeito sinérgico. Entretanto, na literatura ainda não tinha sido

relatado à ação potencializadora de óleos essenciais de espécies de Croton sobre a atividade de aminoglicosídeos.

Zago et al., (2009) estudando o efeito sinérgico entre vários óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens bacterianas, verificou que o *S. aureus* é mais suscetível às interações quando comparado com a *E. coli*, na qual não condiz com os nossos resultados, provavelmente este resultado tenha sido observado pelo fato da espécie em estudo ser diferente daquela usada neste estudo.

Neste sentido, estudos realizados por Oliveira et al., (2006) pôde-se concluir que de uma forma geral, a característica da interferência exercida pelo óleo essencial sobre a ação dos antibióticos varia de acordo com o tipo do antibiótico, tipo do óleo essencial testado em associação, e tipo de cepa bacteriana ensaiada.

## 4 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que os óleos essenciais das plantas quando avaliados na concentração de 10% apresentam uma maior atividade antibacteriana frente à cepa Gram-positiva *B. cereus*. Com relação à avaliação da concentração inibitória mínima, o óleo essencial de *C. heliotropiifolium* é ativo somente frente à cepa *S. aureus* multirresistente com CIM de 512 µg/mL. Enquanto que o óleo essencial de *C. blanchetianus* apresenta ação antibacteriana com uma CIM variando de 512 a 64 µg/mL, demonstrando ser mais eficiente para *S. aureus* (64 µg/mL).

O óleo essencial de *C. blanchetianus* atua sinergisticamente com os antibióticos amicacina, canamicina e gentamicina frente à linhagem *B. cereus*.

Apesar dos óleos essenciais não apresentar atividade inibitória frente a todas as linhagens patogênicas testadas, esses resultados são promissores e indicam que os mesmos são uma fonte de produtos naturais que possuem atividade antibacteriana oferecendo dessa forma, uma importante contribuição para ampliar o conhecimento biológico das espécies.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, J. F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg.** 2004. 151p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
- BAUER AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45:: 493-496. 1966.
- BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ALBUQUERQUE, S.; MAGALHÃES, C. M. I.; PAGNOCCA, F. C. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian *Rutaceae* species. **Phytomedicine**, v. 8:: 121-124. 2001.
- COWAN, M. M.. Plants products as antimicrobial agents. **Version of Clinical Microbiology**, v. 12:: 564-582. 1999.
- CHAVAN, M. J.; SHINDE, D. B.; NIRMAL, S.A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark. **Natural Products Research**, v. 20:: 754-757. 2006.
- DEUSCHLE, R. A. N.; CAMARGO, T.; ALVES, S. H.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Velloso e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17:: 71-75. 2007.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88:: 308-16. 2000.
- DOURADO, R. C. M., SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation, **Journal of Essential Oil Research**, v. 17:: 36-40. 2005.
- FILOCHE, S. K., SOMA, K., SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20:: 221–225. 2005.
- FRANCESCATO, L. N.; DEUSCHILE, R. A. N.; MALLMANN, C. A.; ALVES, S. H.; HEINZMANN, B. M. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43:: 240-245. 2007.
- GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I.; DESSOY, E. C.; MOREL, A. F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69:: 773-775. 2003.
- HELUANI C. S, CATALAN C. A. N, HERNÁNDEZ L. R, TAPIA E. B, NATAN P. T, Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal Natural Products**, v .63:: 222-225. 2000.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL-JUNIOR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico Microbiológico** - Texto e Atlas Colorido. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda. 1993.

KOYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kiso hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacology**, v. 28:: 797-804. 1997.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Journal of Applied Microbiology**, v. 62:: 446-458. 2003.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. New antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39:: 3107-3113. 1996.

JULIANI, H. R. Jr; BIURRUN, F; KOROCH, A. R; OLIVA, M. M; DEMO, M. S; TRIPPI, V. S; ZYGADLO, J. A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xênica*. **Planta medica**, v. 68:: 762-764. 2002.

LE MOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; GUIMARÃES, A. M. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton nepetaefolius*. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Resumo, p.103, 1992.

LACHOWICZ, K. J., JONES, G. P., BRIGGS, D. R., BIENVENU, F. E., WAN, J., WILCOCK, A., COVENTRY, M. J. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology** 26, 209–214. 1998.

MATTOS, F. J. A. Mattos, **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**, UFC, Fortaleza, 1999. 80 p.

McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus* II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. **Pharmacology Research**, v. 8:: 1243-1247. 1991.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacy**, v. 70:: 41-45. 2000.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals against antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31:: 247-256. 2000.

NCCLS- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically. 6. ed. Wayne, PA: **NCCLS Approved Standard M7-A6**, 2003.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA EL, TOLEDO MS, SILVA-FILHO RN Estudo da interferência de óleos

essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16:: 77-82. 2006.

OZÜRK, M.; DURU, M. E.; AYDOGMUS-OZTURK, F.; HARMANDAR, M.; MAHLIÇLI, M.; KOLAK, U.; ULUBEEN, A. CG-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. **Natural Products Communication**, v. 4:: 109-114. 2009.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFC. 2001.

RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. S.; GELLI, D. S. O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubislaw. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.61:: 131-133. 2002.

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16:: 1052-1055. 2009.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32:: 293-297. 2001.

TSAI, J.C., TSAI, S., CHANG, W. C. Effect of ethanol extracts of three Chinese medicinal plants with laxative properties on ion transport of the rat intestinal epithelia. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27:: 162–165. 2004.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant Enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v. 56:: 140-144. 2006.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill. N.E.BR.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8:: 52-55. 2006.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17:: 572-577. 2007.

SILVA, F. K. S. **Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae)**. 2008. 162p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S. V.; GURGEL, A. P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; DE SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19:: 790-794. 2009.

SOUZA, E. O. SILVA, N. F., RODRIGUES, F. F. G., CAMPOS, A. R.; LIMA S. G., COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. **Pharmacognosy Magazine**, v.6:: 82. 2010.

TORRANCE, S. J.; WIEDHOPF, R. M.; COLE, J. R. Anti tumor agents from *Jatropha macrorhiza* (Euphorbiaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66:: 1348-1349, 1977.

USHIMARU, P. I.; SILVA, M. T. N.; DI STASI, L. C.; BARBOSA, L.; JUNIOR, A. F. Antibacterial activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38:: 717-719. 2007.

ZAGO, J. A. A., USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N., JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 4:: 828-833. 2009.

## CAPÍTULO 4

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Avaliação da Atividade Antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth e do *Croton blanchetianus* Baill.** Patos, PB: UFCG, 2011. 12p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvipastoris no Semiárido).

### RESUMO

Antioxidantes são compostos que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Muitas doenças e processos degenerativos estão associados à superprodução de radicais livres os quais têm estimulado vários grupos de pesquisa a investigarem o potencial antioxidante de substâncias produzidas por diversas famílias da flora mundial. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários presente nos extratos etanólicos das folhas de *Croton blanchetianus* e *Croton heliotropiifolius*, bem como avaliar o seu potencial antioxidante. Os extratos etanólicos foram obtidos das folhas pelo método de extração exaustiva a frio com rendimento de 3,29% e 3,26%. Em seguida, os extratos foram submetidos a análises fitoquímica, nos quais foi possível identificar a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavanonóis, catequinas e xantonas. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* realizada por meio do seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Ambos os extratos foram capazes de seqüestrar o radical livre DPPH, sendo que o extrato de *Croton blanchetianus* mostrou ser mais eficiente do que o BHT (controle positivo), com  $CE_{50} = 6,5 \pm 0,5$  mg / mL. Contudo, os resultados observados para os extratos etanólicos, possivelmente sejam atribuída à presença e a concentração de compostos fenólicos pertencentes a classes dos taninos e flavonóides, os quais foram identificados nesse estudo.

**Palavras-chave:** Radicais livres, fitoquímica, fotolorimétrico.

## CHAPTER 4

ANGÉLICO, Elissandra Couras. **Evaluation of Antioxidant Activity of *Croton heliotropiifolius* Kunth and *Croton blanchetianus* Baill ethanol leaf extracts**. Patos, PB: UFCG, 2011. 12p. (Master Degree in Animal Science – Agrossilvipastoral Systems in the Semi-arid).

### ABSTRACT

Antioxidants are compounds that, at optimal concentrations in relation to oxidable substrates, react with free radicals preventing or reducing oxidative stress. Many diseases and degenerative processes are associated with overproduction of free radicals. This stimulated several research groups to investigate the antioxidant potential of substances produced by several families of the world flora. Thus, this study identified the major classes of secondary metabolites present in ethanol leaf extracts of *C. blanchetianus* and *C. heliotropiifolius*, and assessed their antioxidant potential. Ethanol extracts were obtained by the exhaustive extraction method cold and resulted in 3.29% and 3.26% extraction efficiency. Then phytochemical analyses were performed on the extracts to investigate the presence of tannins, flavonoids, flavonones, flavonols, catechins and xanthones. The antioxidant activity of extracts was determined by in vitro photolorimetric method based on the sequestration of free radicals, using DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl). Both extracts were able to sequester DPPH free radical. *Croton blanchetianus* extract activity showed to be more efficient than BHT (positive control), with  $EC_{50}=6.5 \pm 0.5$  mg/mL. *Croton heliotropiifolius* extract showed lower antioxidant activity, with  $EC_{50}=50.15 \pm 0.21$  but still higher than that observed for BHT. However, the results observed for the ethanol extracts are possibly the result of the presence and concentration of phenolic compounds such as tannins and flavonoids, which were identified in this study.

**Key words:** free radicals, phytochemistry, photolorimetric.

## 1 INTRODUÇÃO

O organismo humano produz constantemente radical livres por meio de suas atividades metabólicas. Apesar de ser um processo normal na vida dos organismos vivos, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, como artrites inflamatórias (HADJIGOGOS, 2003), úlceras (LA CASA et al., 2000 ) diabetes (EL-REMESSY et al., 2003), e processos degenerativos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose e o envelhecimento precoce (SIKORA et al., 2008) dentre outras.

Para impedir os efeitos deletérios associados ao excesso dessas espécies reativas de oxigênio, o organismo apresenta defesas antioxidantes. No entanto, os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001). Os antioxidantes presentes no organismo podem ser de origem endógena agindo enzimaticamente, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), ou não-enzimaticamente, como glutatona reduzida (GSH) (PIMENTEL, 2006).

Além destes antioxidantes produzidos no organismo, existem os sintéticos, substâncias utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se o BHT, BHA, GP, TBHQ e os naturais tais como:  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (SOUSA et al., 2007) os quais são os responsáveis pela remoção dessas espécies reativas.

O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído, devido a suspeita de atividades como promotores de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos (CARVALHO, 2004). Nesse contexto, a procura por substâncias antioxidantes naturais tem aumentado nas últimas décadas, em especial os produtos naturais extraídos de plantas medicinais.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros. A ação antioxidante da maioria dessas substâncias naturais se deve a presença de hidroxilas fenólicas e as suas propriedades de oxirredução, pois eles agem como agentes redutores, doadores de

hidrogênio. Além desses compostos, vários outros com atividade antioxidante têm sido isolados de diversas famílias de plantas (FONSECA et al., 2009; REBELO et al., 2009).

De acordo com a literatura, estudos mostram que tanto óleos essenciais (SOUZA et al., 2007) como componentes não voláteis (extratos), extraídos de plantas (BALESTRIN et al., 2008; NUNES et al., 2008), têm sido estudados quanto à avaliação do seu potencial antioxidante, demonstrando alta eficiência.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos das folhas de *C.blanchetianus* e *C.heliotropiifolius* bem como avaliar o seu potencial antioxidante pelo ensaio de captura de radicais DPPH.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais –LPPN da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-Ceará.

### 2.2 Coleta e Identificação do material

As folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* foram coletadas no mês de julho de 2010 às 8:00 horas, no sítio São José do Bonfim – município de Patos, entre as coordenadas geográficas de latitude de 07<sup>o</sup> 08' 20 9" e longitude 037<sup>o</sup> 18' 062".

### 2.3 Preparação dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos das folhas foram obtidos pelo método de extração exaustiva a frio (MATOS, 1988). As folhas frescas de *C. heliotropiifolius* (300 g) e *C. blanchetianus* (280 g) foram previamente trituradas e submetidas à extração com etanol durante 72 horas. Após o período de extração, o solvente foi destilado em evaporador rotatório a 80 °C sob pressão reduzida. Os extratos etanólicos brutos obtidos foram pesados e armazenados a temperatura ambiente até a realização das análises fitoquímicas e ensaios antioxidantes.

#### 2.3.1 Prospecção fitoquímica dos extratos

Os testes fitoquímicos para identificar as classes de metabolitos secundários foram realizados seguindo a metodologia descrita por MATOS (1997), que é baseado na mudança de cor ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

### 2.4 Avaliação da atividade antioxidante

#### 2.4.1 Método de seqüestro do radical DPPH.

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* realizada por meio do seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) (MENSOR et al., 2001). Essa análise é baseada na

habilidade de compostos em doar um próton para o DPPH e formar estruturas de ressonância estáveis, estabilizando assim o radical livre.

As amostras para a realização do ensaio foram preparadas adicionando-se 1 mL da solução de DPPH (60  $\mu$ M) em 2,5 mL de soluções dos extratos que foram diluídas em etanol na concentrações de 5, 10, 25, 50, 125  $\mu$ g/mL em triplicata.

A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a atividade antioxidante de uma amostra pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução de DPPH, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (NUNE et al., 2008). Após o tempo de reação de 30 min das amostras preparadas, as absorvâncias foram lida com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis com comprimento de onda ajustado para 520 nm.

Um teste em branco foi realizado adicionando-se 1 mL de etanol a 2,5 mL das concentrações dos extratos. Como controle negativo foi usada a mistura de 1 mL da solução de DPPH com 2,5 mL de etanol e como controle positivo utilizou-se o 2,5 mL das concentrações de BHT ( butil-hidroxitolueno) e 1 mL da solução de DPPH.

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorvância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes (AA) percentuais obtidas por regressão linear, para cada fase, chegando-se assim à concentração das amostras que promovesse a diminuição para a metade da concentração inicial de DPPH (50%), definida como Concentração Efetiva ( $CE_{50}$ ) (MENSOR et al., 2001).

A atividade antioxidante (AA) das amostras por seqüestro do DPPH foi expressa em percentagem, segundo a equação:

$$AA\% = 100 - \{ [ Abs_{extrato} - Abs_{branco} ) \times 100 ] / Abs_{controle} \}$$

Onde AA%: atividade antioxidante em porcentagem

Abs<sub>extrato</sub>: absorvância da amostra

Abs<sub>branco</sub>: absorvância do branco

Abs<sub>controle</sub>: absorvância do controle positivo

#### 2.4.2 Análises estatísticas

As análises estatísticas das médias em triplicata (n=3)  $\pm$  desvio padrão foram realizadas usando a Análise de Variância (ANOVA) seguida por Student-Newman Keuls-test Múltipla comparação. Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas usando o programa software GraphPad Prism 5.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção dos Extratos

As massas e os rendimentos dos extratos etanólicos obtidos das folhas das plantas estão mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1** Dados relacionados à obtenção dos extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*.

Espécie	Massa das folhas (g)	Massa do extrato bruto (g)	(%)
<i>C. heliotropiifolius</i>	300	9,87	3,29
<i>C. blanchetianus</i>	280	9,15	3,26

#### 3.2 Análises fitoquímica dos extratos etanólicos

Nos extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* foram identificados a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavanonóis, catequinas e xantonas (Tabela 2). Randau et al. (2004), constatou a existência de proantocianidinas condensadas (taninos catéquicos), e flavonóides nas folhas e raízes de *C. heliotropiifolius* corroborando com os resultados desse estudo.

**Tabela 2** Classe de metabólitos secundários identificados nos extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*.

Metabólitos secundários	<i>C. blanchetianus</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>
Taninos	*	*
Fenóis	-	-
Antocianinas e Antocianidinas	--	--
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	---	***
Chalconas e Auronas	--	--
Flavanonóis	*	-
Leucoantocianidinas	-	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	*	*
Flavanonas	*	*

(\*) Presença de compostos; (-) Ausência de compostos.

### 3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

Na análise dos resultados da atividade antioxidante (AA%) frente ao radical DPPH, considerou-se como valor de referência a  $CE_{50}$  de  $35,50 \pm 0,50$   $\mu\text{g/mL}$  do BHT (controle positivo) para comparar com a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas frescas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*, pois o BHT é bastante utilizado como padrão para a atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001).

Na Tabela 3 estão representados os resultados quantitativos da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das plantas. Portanto, observa-se que os extratos apresentaram atividade antioxidante como seqüestradores do radical livre DPPH, sendo que o extrato de *C. blanchetianus* demonstrou uma maior atividade em comparação ao BHT, com  $CE_{50}$  de  $6,5 \pm 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ . O extrato das folhas *C. heliotropiifolius* mostrou menor atividade antioxidante, com o valor da  $CE_{50}$  de  $50,15 \pm 0,21$  superior ao observado para o BHT.

**Tabela 3** Resultados da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* utilizando o radical DPPH.

$\mu\text{g/mL}$	<b>EFcb</b>	<b>EFCh</b>	<b>BHT</b>
5	$34,42 \pm 2,38$	$9,35 \pm 3,78$	$3,30 \pm 0,06$
10	$73,81 \pm 2,57$	$13,56 \pm 1,85$	$10,52 \pm 0,11$
25	$88,65 \pm 1,35$	$28,72 \pm 1,6$	$31,82 \pm 0,22$
50	$98,12 \pm 1,85$	$48,43 \pm 8,15$	$60,12 \pm 0,11$
125	$93,29 \pm 0,96$	$92,06 \pm 0,5$	$88,03 \pm 0,49$
$CE_{50\%}$	$6,5 \pm 0,5$	$50,15 \pm 0,21$	$35,50 \pm 0,50$

\***EFcb**: Extrato das folhas de *C. blanchetianus*; **EFCh**: Extrato das folhas de *C. heliotropiifolius*. **BHT**: Butil hidroxitolueno.

A diferença na atividade antioxidante observada para os extratos etanólicos das espécies em estudo, possivelmente sejam atribuída à presença e a concentração de compostos fenólicos pertencentes a classes dos taninos e flavonóides verificados nos extratos. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (BASILE et al., 2005).

Esses compostos derivados de plantas medicinais com atividade antioxidante têm sido isolados das mais diversas famílias de plantas (BOUDET, 2007; RAZAVI et al., 2008) e os flavonóides são, por certo, as substâncias representativas desta atividade (VAN DEN BERG et al., 2000), uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. No entanto, a intensidade da ação antioxidante exibida por estes fitoquímicos é

diferenciada, principalmente devido ao número e posição de hidroxilas presentes nas moléculas (MELO et al., 2008).

A atividade antioxidante têm sido descritas em algumas espécies de Croton, como *C. celtidifolius* (NARDI et al., 2003), *C. nepetaefolius* (MORAIS et al., 2006) e o *C. argyrophylloides* (CATUNDA Jr; LUCIANO & MORAIS, 2002). No entanto, ainda não há relatos de estudos do potencial antioxidante com extratos das espécies de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*, somente com óleos essenciais.

Portanto, os resultados descritos neste estudo são promissores e estimulam a continuidade da pesquisa para avaliar o poder antioxidante de substâncias isoladas das espécies estudadas.

## 4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que os extratos etanólicos apresentam atividade antioxidante sendo que, o extrato de *C.blanchetianus* mostra uma melhor atividade quando comparado com o controle positivo BHT podendo atuar como seqüestrante ou por meio da redução de radicais livres.

Contudo, esses estudos preliminares servem como ponto de partida para estudos posteriores como o isolamento, a purificação e a elucidação estrutural das substâncias que funcionam como antioxidantes, além de ajudar a inferir sobre um possível mecanismo de ação dessas substâncias, finalizando por testar a viabilidade terapêutica em antioxidantes para seu uso futuro.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASILE A, FERRARA L, DEL POZZO M, MELE G, SORBO S, BASSI P, MONTESANO D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v 102:: 32-36. 2005.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v 68:: 22-24. 2007.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL'STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multififormis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 18:: 230-235. 2008.

CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.4:: 23-29. 2002.

EL-REMESSY, A. B., BEHZADIAN, M. A., ABOU-MOHAMED, G., FRANKLIN, T. CALDWELL, R. W., CALDWELL, R. B. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. **American Journal of Pathology**, v.162:: 1995-2004. 2003.

FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; SOUZA, J. S. N, MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDEL, G. A.; BRAZ-FILHO R, LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19:: 193-198. 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life sciences. **Nature Publishing Group**, v. 1:: 1-7. 2001.

HADJIGOGOS, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Panminerva Médica**, v.45:: 7-13, 2003.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALACRÓN DE LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71:: 45-53, 2000.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**, 1 ed. UFC, 1997. 141p.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Research**, v.15:: 127-130. 2001.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JÚNIOR F. E. A.; SILVA, A. R. A.; STONE, J.; NETO, M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29:: 907-910. 2006.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44:: 193-201. 2008.

NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v.10::176-84. 2003.

PIMENTEL, F. O. Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas-São Paulo.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo Farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* pax & hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14:: 89-96. 2004.

NUNE, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C.O.; SILVA, M.V.B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18:: 718-723. 2008.

RAZAVI, S. M. Nazemiyeh H, Hajiboland R, Kumarasamy Y, Delazar A, Nahar L, Sarker SD. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 18:: 1-5. 2008.

REBELO, M. M.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 19:: 230-235. 2009.

SOUSA, C. M, SILVA, H. R. E, VIEIRA-JR, G. M, AYRES, M. C. C, COSTA, C. L. S, ARAÚJO, D. S, CAVALCANTE, L. C. D, BARROS, E. D. S, ARAÚJO, P. B. M, BRANDÃO, M. S, CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v 30:: 351-355. 2007.

SOUZA, T. J. T, APEL, M. A, BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I, ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17:: 368-372. 2007.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107:: 50-55. 2008.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.; VAN DEN BERG, H.; VANDER, V.W. BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, v.703:: 391-395. 2000.