

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *CROTON*
(EUPHORBIACEAE) NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL**

SITA LUVANGADIO LUKOKI VUNDA

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *CROTON*
(EUPHORBIACEAE) NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada por **Sita Luvangadio
Lukoki Vunda** para obtenção do grau de mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-orientador: Profa. Dra. Miriam Anders Apel

Porto Alegre, 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12.12.2011, pela comissão examinadora, constituída por:

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon

Centro Universitário La Salle

Vunda, Sita Luvangadio Lukoki
Estudo químico e biológico de espécies de Croton
(Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul / Sita
Luvangadio Lukoki Vunda. -- 2011.
99 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.
Coorientadora: Mirian Anders Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2011.

1. Euphorbiaceae. 2. Croton. 3. óleos voláteis. 4.
amebicida. 5. antibacteriana. I. Lino von Poser,
Gilsane, orient. II. Anders Apel, Mirian, coorient.
III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia 504 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de parasitologia do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e no Instituto de Pesquisa Veterinária de Eldorado do Sul.

Aos meus pais e irmãos pelo alicerce e exemplo de vida.

Ao Flávio pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao Gabriel meu filho, pelo tempo que seria dedicado a ele.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de estudante convênio de pós-graduação (PEC-PG) por me dar essa oportunidade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos.

A Profa. Gilsane Lino von Poser pela excelente orientação, confiança, conselhos, apoio incondicional e estímulo para seguir em frente.

A Profa. Míriam Anders Apel pela co-orientação e todo apoio prestado quando necessitei.

Ao Botânico Sérgio Bordignon por todo auxílio e pela sua disponibilidade para coleta das plantas, que serviram de base deste trabalho.

Aos professores do PPGCF pelo aprendizado.

Aos colegas do laboratório, Satie, Paula, Gabriela, Flávia, Maikon, Ismael, Fernando e Damiana, pela amizade e apoio prestado durante o período de intenso trabalho, o meu muito obrigado.

Ao Manuel Falcão pelo auxílio incansável na realização da bioautografia.

A minha família pelo apoio, suporte prestado ao longo de toda minha vida.

Ao Flávio meu marido pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência, e compreensão.

Ao meu filho Gabriel por ser minha fonte de inspiração para seguir em frente.

Enfim agradeço a todos amigos e amigas que de uma forma direta ou indireta contribuíram em mais esta etapa da minha vida.

RESUMO

A família Euphorbiaceae destaca-se pela produção de compostos de importância industrial e alimentícia. Diversos representantes são de interesse devido à produção de óleos voláteis. São exemplos, espécies do gênero *Croton* que apresentam propriedades medicinais tais como anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. Algumas espécies de *Croton* nativas do Rio Grande do Sul foram investigadas visando à análise dos óleos voláteis obtidos por hidrodestilação das partes aéreas das plantas. Foram coletadas três espécies em diversas localidades do Estado, sendo elas *Croton pallidulus*, *C. isabelli* e *C. ericoides*. A composição química dos óleos foi determinada por cromatografia à gás/espectrômetria de massas. Sesquiterpenos e Monoterpenos foram os principais compostos identificados nos óleos de *C. pallidulus*, *C. isabelli* e *C. ericoides*. Adicionalmente, os óleos voláteis obtidos de cada espécie foram testados quanto a atividade frente a *Acanthamoeba polyphaga*. Tanto o óleo volátil de *C. pallidulus* quanto o de *C. ericoides* apresentaram atividade amebicida, porém este último foi mais ativo: na concentração de 0,5 mg/mL, foi capaz de inviabilizar 87% dos trofozoítos, enquanto que o óleo de *C. pallidulus*, na mesma concentração, inviabilizou apenas 29% dos trofozoítos. O óleo volátil de *C. isabelli* foi o que apresentou menor atividade, pois, numa concentração de 10 mg/mL, inviabilizou apenas 4% dos trofozoítos. Os óleos voláteis das três espécies mostraram efeito citotóxico através do método do MTT em células VERO. O óleo de *C. ericoides*, de maior atividade amebicida, foi também o que apresentou maior citotoxicidade. Além disso, os óleos voláteis de *C. pallidulus* e *C. ericoides* foram analisados quanto à atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* usando o método de bioautografia. Verificou-se que os óleos de *C. pallidulus* e *C. ericoides* inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*. Com relação a *P. aeruginosa* não houve inibição do crescimento da bactéria pelas duas espécies de *Croton*.

Palavras chaves: Euphorbiaceae, *Croton*, óleos voláteis, amebicida, antibacteriana

ABSTRACT

Chemical and Biological study of Species of *Croton* (Euphorbiaceae) native of Rio Grande do Sul

The family Euphorbiaceae has been highlighted by the production of compounds of industrial interest and importance for the food. Several representatives species are of interest due to production of volatile oils. Examples are species of *Croton* that have medicinal properties, such as anti-inflammatory, antifungal, antimicrobial and healing. Some species of the genus *Croton*, widely distributed in Rio Grande do Sul, were investigated in order to analyze the chemical composition of volatile oils obtained by hydrodistillation from the aerial parts of the plants. Three species were collected in different localities of Rio Grande do Sul, *Croton pallidulus*, *C. isabelli* and *C. ericoides*. The chemical composition of the oils was analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Sesquiterpenes and Monoterpenes were the major compounds identified in the oils of *C. pallidulus*, *C. isabelli* and *C. ericoides*. Additionally, the volatile oils obtained from each species were tested for amebicidal activity against *Acanthamoeba polyphaga*. Both the volatile oil of *C. pallidulus* and that of *C. ericoides* showed activity against *A. polyphaga*, but the latter was more active: the concentration of 0.5 mg/mL, was able to kill 87% of trophozoites, while the oil of *C. pallidulus*, at the same concentration, killed only 29% of trophozoites. The volatile oil of *C. isabelli* was the one that showed less activity; in a concentration of 10 mg/mL, the oil killed only 4% of trophozoites. The volatile oils of the three species showed a cytotoxic effect in VERO cells determined by the MTT method. The oil of *C. ericoides*, the most active against the *Acanthamoeba*, presented also the highest cytotoxicity. In addition, the volatile oils of *C. pallidulus* and *C. ericoides* were assayed for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using the bioautography method. It was found that the oils of *C. pallidulus* and *C. ericoides* inhibited the growth of *E. coli* and *S. aureus*. With respect to *P. aeruginosa* no inhibition of bacterial growth by both species of *Croton* was observed.

Keywords: Euphorbiaceae, *Croton*, volatile oils, amebicidal, antibacterial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial do gênero <i>Croton</i>	8
Figura 2 - Cromatograma do óleo volátil de <i>C. isabelli</i> obtido por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	36
Figura 3 - Cromatograma do óleo volátil de <i>C. pallidulus</i> obtido por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	36
Figura 4 - Cromatograma do óleo volátil de <i>C. ericoides</i> obtido por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	36
Figura 5 - Atividade amebicida dos óleos voláteis de <i>C. ericoides</i> , <i>C. pallidulus</i> e <i>C. isabelli</i> frente a <i>A. polyphaga</i> . As colunas representam a porcentagem de mortalidade de cada concentração de óleo testada, em relação ao controle ($p < 0,05$ vs controle).....	40
Figura 6 - Regressão linear das concentrações de óleos voláteis de <i>C. ericoides</i> , <i>C. pallidulus</i> , <i>C. isabelli</i> frente à porcentagem de mortalidade dos trofozoítos de <i>A. polyphaga</i>	40
Figura 7 - Ensaio de viabilidade celular (MTT). Ação dos óleos voláteis sobre células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle - ($p < 0,05$ vs controle).....	42
Figura 8 - Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de <i>C. pallidulus</i> frente a <i>S. aureus</i>	44
Figura 9 - Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de <i>C. pallidulus</i> de <i>C. pallidulus</i> frente a <i>E. coli</i>	44
Figura 10 - Ausência do halo de inibição do óleo volátil de <i>C. pallidulus</i> frente a <i>P. aeruginosa</i>	44
Figura 11 - Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de <i>C. ericoides</i> frente a <i>S. aureus</i>	45
Figura 12- Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de <i>C. ericoides</i> frente a <i>E. coli</i>	45
Figura 13 - Ausência do halo de inibição do óleo volátil de <i>C. ericoides</i> frente a <i>P. aeruginosa</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uso popular e atividade biológica de algumas espécies de <i>Croton</i>	8
Tabela 2. Principais propriedades farmacológicas atribuídas aos terpenóides....	24
Tabela 3. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de diferentes espécies de <i>Croton</i>	37

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Vias de formação do isopreno: via do mevalonato (a) e 1-desoxixilulose-5-fosfato (b) para biossíntese de IPP/DMPP.....	18
Esquema 2. Algumas estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos: GPP, pirofosfato de geranila.....	21
Esquema 3. Estruturas formadas pela ação da enzima δ -selineno sintase, isolada de <i>Abies grandis</i> (Douglas ex D.Don) Lindl. (Pinaceae) sobre o farnesilpirofosfato (FPP): OPP: pirofosfato.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC - American Type Culture Collection

OMS - Organização Mundial da Saúde

AV - amebas de vida livre

CDC - center for disease control and prevention

ISO - internacional standard organization

CSL - cromatografia sólido /líquido

CG - cromatografia gasosa

EM - espectrometria de massas

RMN - ressonância magnética nuclear

IV - infravermelho

UV - ultravioleta

CG/EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

IPP - difosfato de isopentenila

DMAPP - pirofosfato de dimetilalila

GPP - pirofosfato de geranila

MEV - ácido mevalônico

FPP - farnesilpirofosfato

DIC - detector por ionização de chama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2.OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivo geral.....	05
2.2 Objetivos específicos.....	05
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	06
3.1 Considerações sobre a família Euphorbiaceae.....	07
3.2 Atividade amebicida.....	10
3.3 Óleos voláteis.....	12
3.3.1 Extração dos óleos voláteis.....	14
3.3.2 Constituintes dos óleos voláteis.....	15
3.3.3 Terpenóides.....	16
3.3.4 Monoterpenos.....	19
3.3.5 Sesquiterpenos.....	19
3.3.6 Diterpenos.....	23
3.4 Propriedades farmacológicas dos óleos voláteis.....	23
3.5 Principais famílias produtoras de óleos voláteis.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Material vegetal.....	28
4.2 Extração dos óleos voláteis.....	28
4.3 Análise química.....	28
4.3.1 Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas.....	28
4.4 Análise biológica.....	29
4.4.1 Atividade amebicida contra <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	29
4.4.2 Análise estatística.....	30
4.4.3 Atividade citotóxica celular	30
4.5 Atividade antibacteriana – Bioautografia	31

4.5.1 Preparação dos meios de cultura.....	32
4.5.2 Cromatografia em camada delgada.....	32
4.5.3 Bioautografia.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Análise química dos óleos voláteis	35
5.2 Avaliação da atividade amebicida dos óleos voláteis.....	39
5.3 Ação citotóxica dos óleos voláteis sobre as células de mamíferos.....	41
5.4 Atividade antibacteriana utilizando o método de bioautografia.....	43
6. CONCLUSÕES.....	48
7.REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

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% e 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (Bagatini *et al.*, 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 e Wani, 1996). Segundo a Organização Mundial de Saúde, dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente de origem vegetal (Gurib-Fakim, 2006).

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).

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos deve-se à variedade de substâncias químicas pertencente a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como, terpenóides, alcalóides, cumarinas e flavonóides.

A família Euphorbiaceae possui muitos representantes utilizados na medicina popular e, quimicamente, vem se destacando pela produção de látex rico em diterpenos e óleos voláteis. Também apresenta importância econômica, como, por exemplo, na produção de óleo de rícino a partir de *Ricinus communis*, e na indústria alimentícia como é o caso da *Manihot esculenta*, da qual se obtém a farinha de mandioca.

De acordo com Barroso (1991), no Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, difundidas em todos os tipos de vegetação e apresentando diversas formas de vida. Seus principais gêneros em número de espécies são *Euphorbia* (1.500), *Croton* (700), *Phyllanthus* (400), *Acalypha* (400), *Macaranga* (400), *Antidesma* (150), *Drypetes* (150), *Jatropha* (150), *Manihot* (150) e *Tragia* (150) (Webster, 1993).

A partir de várias espécies do gênero *Croton* são extraídos óleos voláteis que apresentam diversas atividades como antimicrobiana, antiinflamatória, antisséptica, antifúngica, além de serem usadas na medicina popular contra gastrite, azia, má digestão e como cicatrizante. Até o momento, muitas espécies do gênero foram investigadas, porém as espécies nativas do Rio Grande do Sul carecem de estudos. A maior parte dos trabalhos com o gênero *Croton* foi realizada nos estados do nordeste do Brasil (Fernandes e Bezerra, 1990). Com isto, os objetivos deste estudo são analisar a composição química e determinar algumas atividades biológicas (amebicida frente a *Acanthamoeba polyphaga* e antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), dos óleos voláteis de três espécies de *Croton* nativas do Rio Grande do Sul, *Croton isabelli* Baill., *Croton ericoides* Baill. e *Croton pallidulus* Baill.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é realizar um estudo químico e biológico de óleos voláteis de três espécies da família Euphorbiaceae: *Croton pallidulus*, *Croton isabelli* e *Croton ericoides*, nativas do RS.

2.2 Objetivos específicos

-Extrair e definir a constituição química dos óleos voláteis de três espécies de *Croton*;

-Determinar a atividade amebicida dos óleos voláteis de *Croton* contra *Acanthamoeba polyphaga*;

-Avaliar a atividade citotóxica dos óleos voláteis frente às células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano, ATCC CCL-81);

-Determinar a atividade antimicrobiana dos óleos voláteis de *Croton* através do método de bioautografia contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

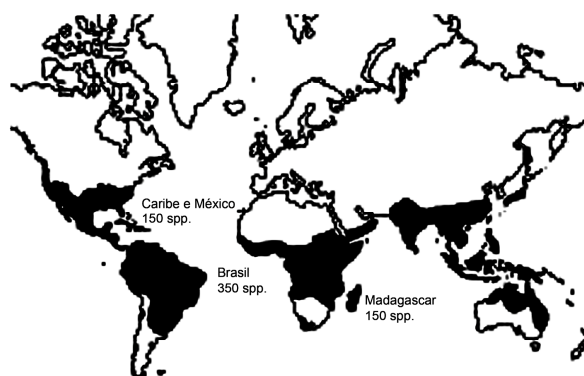
3. REVISÃO DA LITERATURA

3. 1 Considerações sobre a família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae Juss. é uma das maiores das Angiospermae, com cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo (Cronquist, 1981). As plantas desta família são árvores, arbustos, ervas e alguns gêneros são plantas trepadeiras.

As euforbiáceas (Euphorbiaceae) são plantas de distribuição cosmopolita, atingindo a sua máxima densidade nas regiões tropicais e subtropicais. Esta família destaca-se pela importância econômica de algumas espécies, como por exemplo *Hevea brasiliensis*, produtora de látex, conhecida como a árvore da borracha. Outro exemplo é a mamona (*Ricinus communis*), nativa da África, fonte de óleo de rícino, fibras vegetais e compostos químicos usados na medicina, além de óleo lubrificante aplicado em propulsores de ônibus espaciais e foguetes. A mandioca (*Manihot esculenta*) é fonte primária de alimento em boa parte do nordeste brasileiro, de onde é extraída a farinha de mandioca que é consumida em larga escala em todo o Brasil e também em muitos países Africanos. De acordo com Barroso (1991) ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies no Brasil, difundidas em todos os tipos de vegetação e apresentando diversas formas de vida.

O gênero *Croton* é subdividido em 40 seções e possui mais de 1.300 espécies de distribuição principalmente pantropical (Figura 1). Para o Brasil é o gênero com maior número de representantes da família, com total de 350 espécies, distribuídas em 29 seções (Berry *et al.*, 2005). Na região Nordeste estima-se um total de 52 espécies distribuídas em 18 seções (Cordeiro e Carneiro Torres, 2006). Muitas espécies de *Croton* são utilizadas na medicina popular e várias delas apresentam atividades biológicas comprovadas, tais como antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, inseticida, entre outras. Dentre os principais compostos bioativos do *Croton* destacam-se os terpenóides, flavonóides, fenilpropanóides, alcalóides aporfínicos e tocoferóis. Este gênero de plantas ainda é relativamente pouco estudado, considerando sua complexidade e número de representantes.



Distribuição do gênero *Croton* e principais centros de diversidade

Figura 1- Distribuição mundial do gênero *Croton* (Fonte: Berry *et al.*, 2005).

A tabela abaixo apresenta alguns trabalhos realizados com algumas espécies do gênero *Croton* e também sua utilização na medicina popular.

Tabela 1. Uso popular e atividade biológica de algumas espécies de *Croton*.

<i>Espécies</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Atividade biológica/uso popular</i>	<i>Derivado</i>	<i>Referência</i>
<i>C. cajurara</i>	Casca do caule	- Atividade antifúngica - Uso Popular: Amazônia -Diabetes, inflamações do fígado, vesícula e rins, - Diminuir o colesterol, auxiliar no tratamento de malária, contra azia, gastrite e má digestão causadas pela ingestão de bebidas alcoólicas.	Óleo volátil	Mattos, 1999; Souza <i>et al.</i> , 2006.
<i>C. argyrophyloides</i>	Entrecascas do tronco	- Atividade Antimicrobiana <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> sp, <i>Streptococcus</i> sp, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter</i> sp e <i>Serratia</i> sp. - Uso popular: Nordeste Ginecológico, anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante.	Óleo volátil	Fortes e Guedes, 2006.
<i>C. zehntneri</i>	Folhas	- Atividade Antimicrobiana sinergismo com gentamicina	Óleo volátil	Rodriguesa <i>et al.</i> , 2009.

		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .		
<i>C. zambesicus</i>	Folhas	-Vaso relaxante (aorta de ratos)	Extrato diclorometano	Bacelli <i>et al.</i> , 2010
<i>C. regelianus</i>	Folhas	Atividade antitumoral contra sarcoma modelo murino 180.	Óleo volátil	Bezerra <i>et al.</i> , 2009
<i>C. zambesicus</i>	Folhas	Atividade antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Extrato com diclorometano	Ajayi e Akintola, 2010
<i>C. bonplandianum</i>	Partes aéreas	Atividade antimicrobiana	Extrato metanólico	Ganga Rao e Raga Sudha, 2009
<i>Croton urucurana</i>	Folhas e cascas do caule	Atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas e antimicrobiana, antioxidante e efeito herbicida	Óleo volátil	Simionatto <i>et al.</i> , 2009

Além dos exemplos referidos na tabela acima sobre a atividade antimicrobiana dos óleos voláteis existem, ainda, vários estudos na literatura demonstrando atividades biológicas dos óleos voláteis; Silva e colaboradores (2011) demonstraram atividade antibacteriana de *Croton sonderianus* frente a bactérias que fazem parte do biofilme dental, como *Streptococcus salivaris*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. sobrinus*. Vieira e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos voláteis de *Croton argyrophylloides* e *Croton zehntneri* frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.

A atividade antiprotozoária também vem sendo destaque nos óleos voláteis de diversas famílias de plantas como, por exemplo, o estudo conduzido por Sauter e colaboradores (2011), demonstrando a atividade antiprotozoária do óleo volátil de *Pterocaulon polystachyum* frente à *Acanthamoeba polyphaga*. Apesar de grande número de trabalhos com óleos voláteis de diversas famílias de plantas com atividade antiprotozoária, para o gênero *Croton*, mais especificamente para espécies nativas do Rio Grande do Sul, ainda não há estudos considerando este tema.

3.2 Atividade amebicida

As amebas de vida livre constituem um grupo de protozoários amplamente disperso na natureza. Algumas espécies podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e de animais domésticos. Atualmente, as amebas de vida livre (AVL) de interesse clínico são *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e espécies do gênero *Acanthamoeba*, pertencentes ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Seu ciclo de vida apresenta dois estágios: trofozoítico e cístico. O trofozoíto, forma celular metabolicamente ativa, possui normalmente um tamanho entre 12 e 35 µm de diâmetro, podendo variar entre isolados pertencentes a diferentes espécies e/ou genótipos. A forma de divisão celular é assexuada e ocorre por fissão binária (Khan, 2006).

O cisto possui tamanho de 9 a 12 µm sendo uma estrutura de resistência formada quando o trofozoíto se encontra em situações de adversidade, como deficiência nutricional do meio, dessecação, alterações no pH e alterações de temperatura (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Os cistos são compostos por celulose e proteínas, possuindo duas paredes: o endocisto e o ectocisto.

Acanthamoeba apresenta a habilidade de sobreviver em diversos ambientes e tem sido encontrada em amostras de água da rede pública, piscinas, lagos, rios, mares, caixas d'água, reservatórios, aparelhos de ar-condicionado, esgotos, sedimentos, solo, praias, vegetais, instrumentos cirúrgicos, lentes de contatos e seus estojos e também no ar atmosférico, o que mostra sua ubiquidade (Khan, 2006).

Algumas espécies de *Acanthamoeba* são patógenos oportunistas que podem causar Encefalite Amebiana Granulomatosa e Ceratite Crônica Amebiana, mas também podem estar associadas com lesões cutâneas e sinusite em pacientes imunocomprometidos. Em países desenvolvidos, 85% dos casos de ceratite amebiana são diagnosticados em usuários de lentes de contato, levando este a ser o principal fator de risco (Saravanan *et al.*, 2008).

A higienização das lentes de contato é um processo importante para garantir que o protozoário não se instale nas lentes. A formação de biofilmes nas lentes de contato aumenta a afinidade de *Acanthamoeba* pelas lentes. Estudos mostraram que *Acanthamoeba* adere muito mais às lentes cobertas com biofilme do que quando comparadas às lentes sem biofilme (Simmons *et al.*, 1998; Tomlinson *et al.*, 2000; Beattie *et al.*, 2003). Além disso, os biofilmes aumentam a persistência dos trofozoítos nas lentes quando estas se encontram nos estojos de limpeza, provendo nutrientes para o protozoário.

A ceratite amebiana é uma inflamação crônica da córnea causada pela infecção por *Acanthamoeba* e se caracteriza pela formação de um anel neutrofílico no olho, que pode causar cegueira em casos não tratados. A doença desenvolve-se em pessoas imunocompetentes que tem a córnea exposta ao protozoário através de lentes de contato, de água ou solução das lentes de contato contaminadas (Alves, 2001; Obeid *et al.*, 2003). Seu tratamento é longo e complexo uma vez que os medicamentos utilizados não possuem uma ótima eficiência e há resistência ao tratamento pela forma cística deste parasito. O número de casos diagnosticados de ceratite amebiana provocada por *Acanthamoeba* aumentou muito durante os últimos vinte anos, sendo só nos Estados Unidos mais de 3.000 casos estimados (Qvarnstrom *et al.*, 2006). Uma investigação de 22 centros de oftalmologia nos Estados Unidos, em fevereiro de 2007, conduzida pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) revelou um aumento nacional do número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre 2004 e 2006. Este aumento foi associado ao uso da solução para lentes de contato “*Advanced Medical Optics Complete Moisture Plus*” contaminada (Visvesvara e Schuster, 2008).

Assim, a pesquisa de novos fármacos é de fundamental importância para obtenção de terapias que facilitem o tratamento. Atualmente, o tratamento é longo e muitos pacientes interrompem a utilização dos medicamentos quando verificam sinais de melhora. Porém, as recidivas decorrentes do desencistamento de *Acanthamoeba* resistentes ao tratamento são comuns.

Diversos antimicrobianos podem ser usados contra a *Acanthamoeba* e a combinação de agentes farmacológicos é geralmente recomendada para eliminar tanto os trofozoítos quanto os cistos, mais resistentes. O estudo de plantas com atividade antimicrobiana e antiparasitária é importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Algumas espécies do gênero *Croton* são utilizadas na medicina popular como antiparasitária no caso da malária, porém nenhum relato sobre atividade amebicida foi encontrado (Souza *et al.*, 2006).

3.3 Óleos voláteis

O conhecimento sobre óleos voláteis de plantas data desde alguns séculos antes da era Cristã. As referências históricas de obtenção e utilização destes óleos estão ligadas originalmente aos países orientais, com destaque, Índia, Japão, Pérsia, Egito e China. A evolução de conhecimentos técnicos sobre os óleos voláteis deu-se em meados do século XVIII, quando se iniciaram os estudos para caracterização química. Atualmente, o número de plantas utilizadas para a produção de óleos voláteis em bases econômicas é bastante grande. Tal ocorrência vai desde plantas rasteiras como é o caso da hortelã, até plantas de porte arbóreo como é o caso do eucalipto.

Entre os produtos do metabolismo vegetal mais promissores e de mais fácil acesso para pesquisa de compostos ativos encontram-se os óleos voláteis. A ISO (Internacional Standard Organization) define óleos volatéis como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões *et al.*, 2003). Embora o termo “óleo essencial” seja muito utilizado, mais frequentemente esta classe de metabólitos vegetais é denominada “óleo volátil” devido a algumas características físico-químicas como, por exemplo, volatilização à temperatura ambiente, e estes geralmente apresentam-se líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a designação de óleo (Guenther, 1948; OMS, 1992).

Sua principal característica é a volatilidade, diferindo assim dos óleos fixos. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos, sendo por isso também chamados de essências (Simões *et al.*, 2003). Nem sempre é válido supor que uma planta aromática seja simplesmente aquela que gera um odor e um sabor particular, agradável ou não. Às vezes, a planta pode não apresentá-lo em condições naturais, mas somente após um processo químico, físico ou biológico. O camazuleno, por exemplo, é obtido por extração a quente das sumidades floridas da camomila (*Matricaria recutita* – Asteraceae), por oxidação do precursor natural, a matricina (Bandoni, 2000).

De acordo com Simões e colaboradores (2003), os óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Destacando, ainda, que a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo. Portanto, o ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre sua composição química.

Estes óleos apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos. Em geral apresentam sabor acre (ácido) e picante e quando extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; são poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, de coloração levemente azulada, pelo seu alto teor em azulenos.

Em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. Devido a frequente presença nos vegetais e variedade de composição química, os óleos voláteis constituem objeto de extensivos estudos visando identificar atividades biológicas e os resultados apontam um potencial terapêutico importante. O interesse do homem pelos óleos voláteis também está baseado na possibilidade de obtenção de compostos aromáticos, os quais, de uma forma ou de outra, fazem parte do nosso cotidiano. No Brasil, grande parte da diversidade vegetal

ainda não foi explorada e poderia, eventualmente, tornar-se uma fonte de produtos químicos com utilização terapêutica e industrial.

A propriedade antimicrobiana de óleos voláteis tem sido reconhecida empiricamente durante séculos, mas foi confirmada cientificamente apenas há alguns anos atrás (Jansen *et al.*, 1991). Por ser uma das atividades que determinam aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, tem sido largamente investigada (Meeker e Linke, 1988; Lemos *et al.*, 1990; Barel *et al.*, 1991; Jedlickova *et al.*, 1992; Carson e Riley, 1995; Kuhnt *et al.*, 1995; Titrillini, 1996).

Esta propriedade dos óleos voláteis parece estar ligada a alterações da permeabilidade da membrana e da atividade respiratória celular (Knobloch *et al.*, 1986). Dentre os diversos trabalhos descritos na literatura sobre óleos voláteis, destaca-se o de Ribeiro e colaboradores (2008) que avaliaram atividade acaricida do óleo volátil de *Drimys brasiliensis* Miers frente ao carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*. Outro trabalho conduzido por Castro e Lima (2011) demonstrou atividade antifúngica dos óleos voláteis de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a espécies de *Candida*. Em outro, Pereira e colaboradores (2009) demonstraram atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Cymbopogon winterianus* L. e *Rosmarinus officinalis* L.

3.3.1 Extração dos óleos voláteis

A extração destes óleos pode ser feita usando vários métodos, sendo que estes variam de acordo com a localização do óleo volátil na planta, das características requerida para o produto final e a proposta de utilização do mesmo. Portanto, os métodos mais comuns são: Enfloração (*Enfleurage*) no caso de matérias-primas delicadas como pétalas de flores; prensagem (espressão) quando localizados em tecidos periféricos, como cascas de cítricos; extração por CO₂ supercrítico no caso de se ter interesse em determinada fração do óleo; destilação por arraste de vapor d'água no caso

de substâncias termoresistentes (Guenther, 1948; Dominguez, 1973; Schmidt e List, 1991; Simões *et al.*, 2003). Este último é o método clássico mais utilizado tanto em indústrias, quanto em laboratórios e também é o preconizado pela Farmacopeia Brasileira V (2010).

3.3.2 Constituintes dos óleos volatéis

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas. Toda essa diversidade funcional, no entanto, pode ser agrupada em duas séries principais: série aromática e série terpênic. Na série aromática são classificados os derivados do fenilpropano (C6-C3), oriundos do metabolismo do ácido chiquímico. Esses compostos são formados por reações de transaminação enzimática da fenilalanina e da tirosina que originam os ácidos cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente. Os derivados mais comuns em óleos voláteis são as cumarinas e alguns aldeídos aromáticos (Geissman e Crout, 1969; Guignard *et al.*, 1985, Limberger, 2001). Na série terpênic encontra-se em maior quantidade os monoterpenos compostos cujo esqueleto é formado por 10 átomos e os sesquiterpenos com 15 átomos de carbono, arranjados em estruturas acíclicas, monocíclicas, bicíclicas e triciclícas (Croteau, 1987; Cane, 1990). Os constituintes do óleo volátil podem ser analisados qualitativamente usando vários métodos cromatográficos tais como: cromatografia sólido /líquido (CSL) e cromatografia gasosa (CG); e a identificação dos componentes por técnicas espectroscópicas, como espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV). Para misturas complexas de produtos voláteis o CG é a técnica de escolha, porque permite a separação e quantificação em tempo relativamente curto, principalmente se associado à espectrometria de massas (CG/EM), a qual permite inferir, com segurança, sobre a identidade de muitos dos constituintes da mistura. Embora o CG seja uma técnica versátil e extremamente apropriada para a análise de óleos, seu uso requer padrões e/ou banco de dados que contenham valores de tempos de retenção e padrões de fragmentação para serem confrontados com os dados experimentais obtidos (Craveiro *et al.*, 1990).

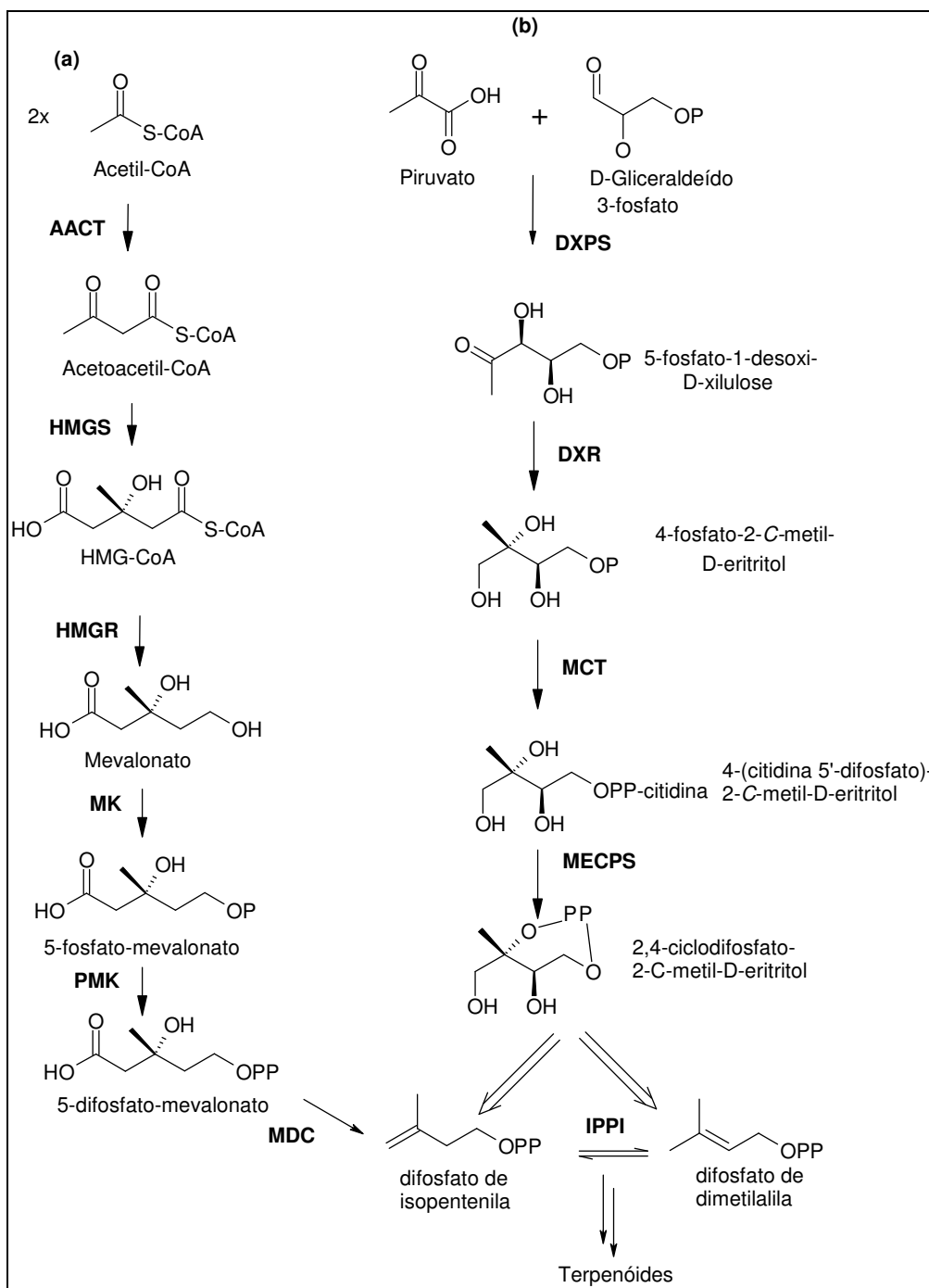
3.3.3 Terpenóides

Os terpenóides constituem a mais vasta classe e com grande variedade estrutural dentro dos produtos naturais. O termo terpenóide deve-se ao fato de estes compostos terem sido extraídos originalmente da terebintina na década de 1850 (Peters e Croteau, 2004). Constitui uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, na sua maioria em plantas ocorrendo em animais e microrganismos. Ocorrem abundantemente em partes vegetativas, frutos e flores e apresentam uma elevada concentração nas estruturas reprodutoras e nas folhas durante, e imediatamente após a floração (Dudareva *et al.*, 2005; Paduch *et al.*, 2007). Esses compostos originam-se biossinteticamente a partir de unidades de isopreno. A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (= unidades isoprênicas), de acordo com a regra do isopreno. Nos componentes de óleos voláteis predomina a condensação cabeça-cauda (Mann, 1997; Breitmaier, 1999).

Esses compostos desempenham diferentes funções nas plantas produtoras: transporte de elétrons (quinonas), componentes de membrana, regulação subcelular (prenilação de proteínas), pigmentos fotossintético (carotenóides), hormônios, compostos de defesa, (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos), fotoproteção e termotolerância oferecida pelos monoterpenos deve-se justamente a capacidade de captar radicais derivados do oxigênio oriundo do processo fotossintético (Peñelas e Llusà, 2000; Peñelas e Munné- Bosch, 2005).

Todos os compostos da série terpênica são derivados do difosfato de isopentenila (IPP). Entretanto, o primeiro passo para formação destas estruturas é a condensação enzimática de pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), e o seu isômero pirofosfato de isopentinila, IPP para formar o pirofosfato de geranila (GPP), o primeiro intermediário comum da série terpênica de 10 átomos de carbonos. Durante muito tempo se pensou que o IPP poderia ser formado a partir do ácido mevalônico, mas atualmente existem indicações que este também pode ter sua origem diretamente da glicose, via acetato (Schwender *et al.*, 1997). Existem duas rotas biossintéticas para a formação do IPP

ambos oriundas da glicose. Na primeira rota a formação do IPP é gerado a partir do ácido mevalônico, sendo conhecida também como via clássica de formação dos terpenos esta ocorre em animais e leveduras e inicia com a acetilcoenzima-A (acetil-CoA) e procede através do ácido mevalônico (MEV) como intermediário (Esquema 1). A segunda via de formação considerada como rota alternativa, o IPP é formado a partir do piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato via 1-desoxixilulose - 5- fosfato este ocorre em plastídeos de algas e plantas superiores. Ambas as rotas podem ocorrer simultaneamente num mesmo indivíduo vegetal (Schwender *et al.*, 1997; Adam e Zapp, 1998; Apel, 2001; Dubey *et al.*, 2003).



Esquema 1: Vias de formação do isopreno: via do mevalonato (a) e 1-desoxixilulose-5-fosfato (b) para biossíntese de IPP/DMPP. AACT: Acetil-CoA:acetil-CoA C-acetiltransferase; CMK: 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol quinase; DXPS: 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase; DXR: 1-desoxixilulose-5-fosfato redutoisomerase; HMGR: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase; HMGS: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase; IPPI: pirofosfato de isopentenila isomerase; MCT: 2-C-metileritritol-4-fosfato citidiltransferase; MDC: mevalonato-5-fosfato descarboxilase; MECPS: 2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato sintase; MK: mevalonato quinase; PMK: fosfomevalonato quinase (adaptado de Mahmoud e Croteau, 2002).

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos, formados por 2 unidades isoprênicas (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos, formados por 3 unidades isoprênicas. Outros terpenóides, como os diterpenos C₂₀, são encontrados em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos e raramente em óleos obtidos por arraste à vapor (Steinegger e Hansel, 1992).

3.3.4 Monoterpenos

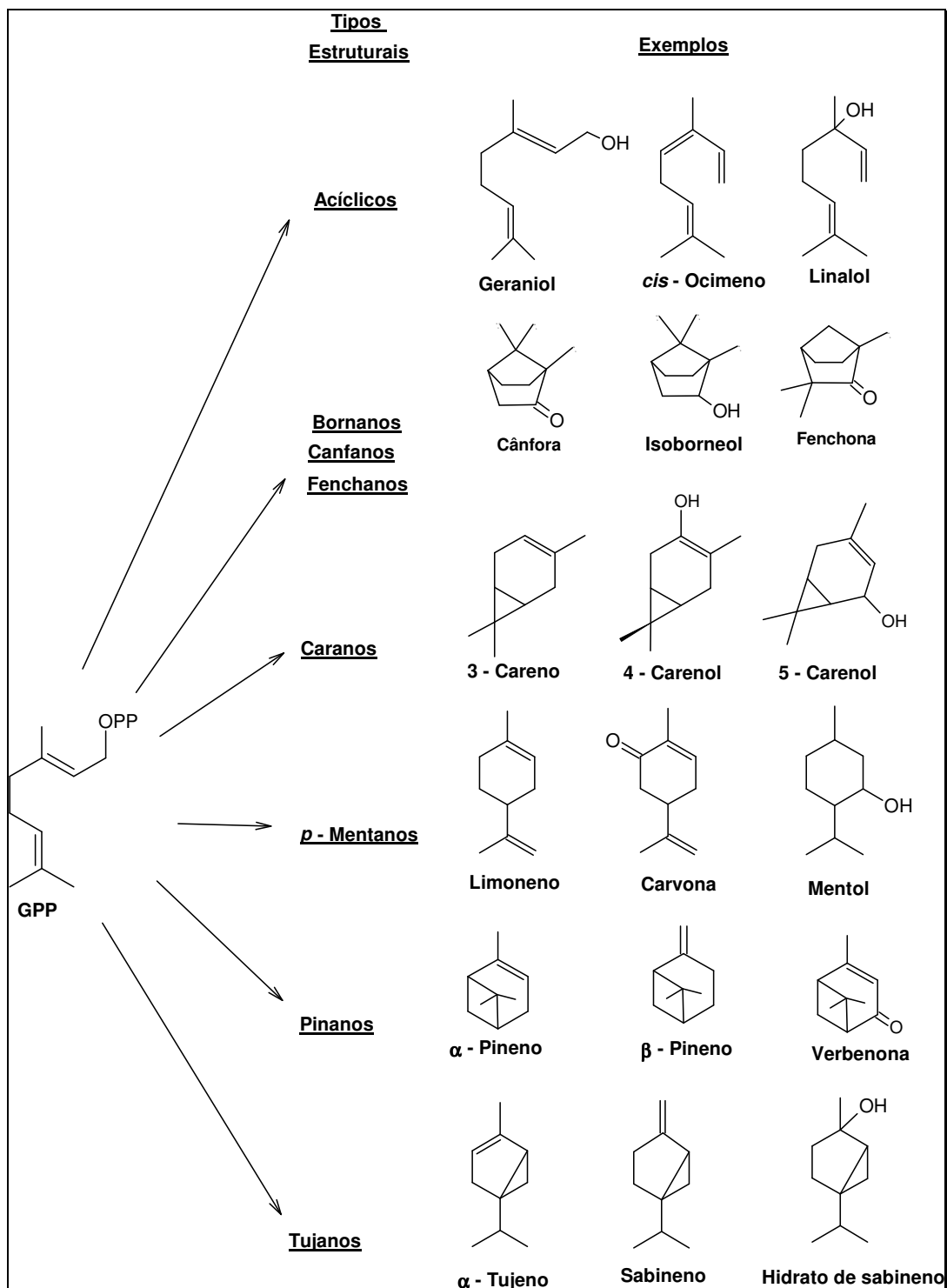
Os monoterpenos podem ainda ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (alfa-terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um destes subgrupos há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (metanona, carvonona), lactonas (os monoterpenos lactônicos são chamados de iridóides, ex. nepetalactona) e tropolonas (gama-tujaplicina).

A formação dos monoterpenos (C₁₀) ocorre após a isomerização do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) a pirofosfato de isopentenila (IPP). Em seguida sob a ação da enzima prenil transferase, pirofosfato de geranila sintase, ocorre a ionização do DMAPP e o ataque simultâneo ao carbono 5 do IPP e ao carbono 1 ionizado do DMAPP (adição eletrofílica), com a eliminação de um hidrogênio, formando o GPP que é o precursor dos monoterpenos (Esquema 2). Entretanto, os compostos cíclicos são formados através da ação de enzimas conhecidas como ciclases. Desta forma, o GPP, que possui uma configuração *trans* no C-2, é convertido em composto intermediário, o pirofosfato de linalila, que, por sua vez, possui configuração *cis* no C-2, sendo, então ciclizado.

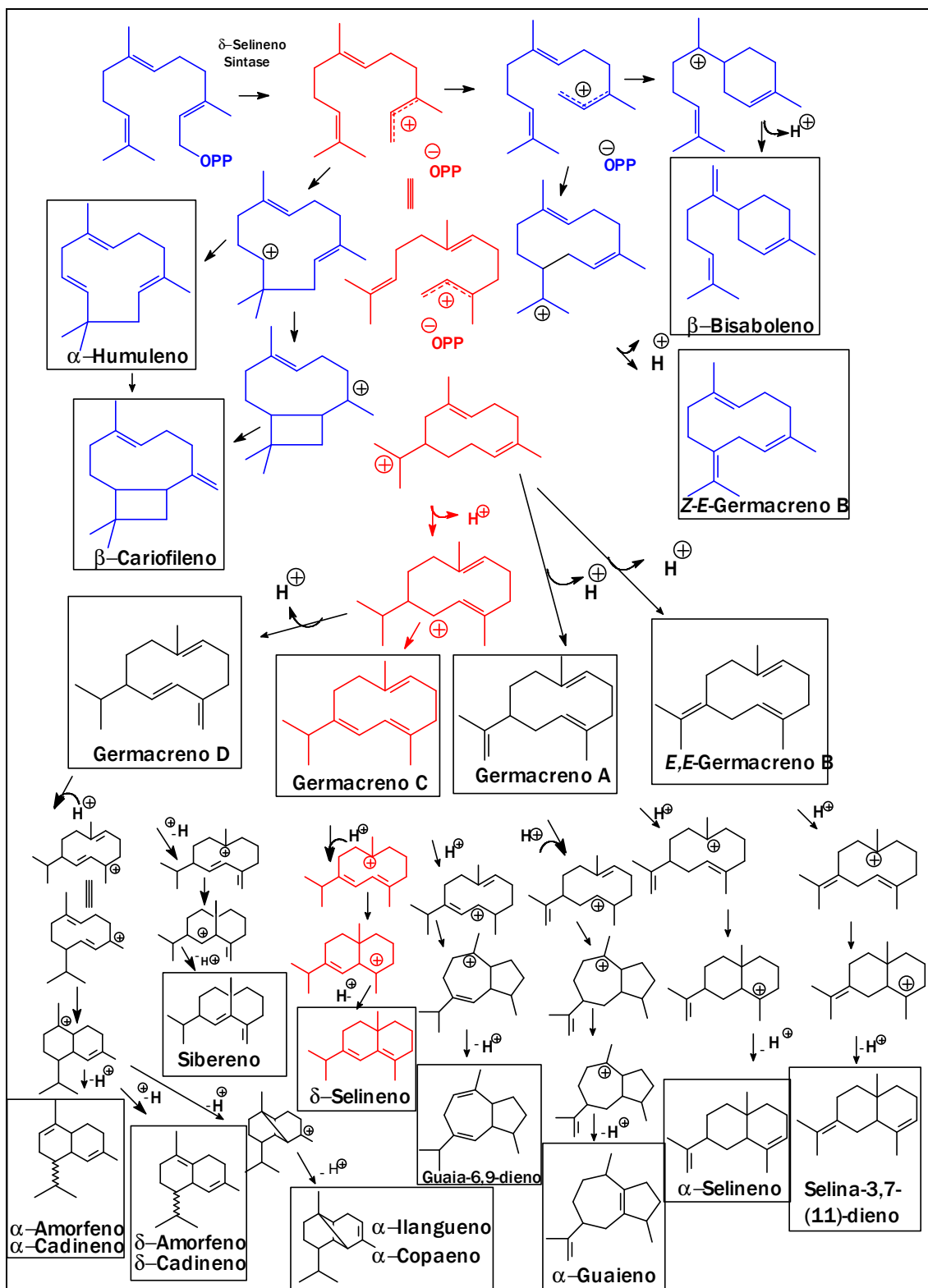
3.3.5 Sesquiterpenos

A formação dos sesquiterpenos ocorre pela adição de uma terceira unidade IPP ao GPP, também via prenil transferase, formando a unidade fundamental sesquiterpênica, o pirofosfato de farnesila (FPP), o qual pode levar à formação de

sesquiterpenos lineares e cíclicos (Esquema 3). Nestas substâncias, a adição de números de carbonos leva ao aumento de isômeros envolvendo o carbocátion e, conseqüentemente, a diversidade estrutural das ciclizações obtidas torna-se consideravelmente significativa. Os sesquiterpenos são da mesma natureza dos compostos precedentes, podendo ser divididos em: acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico) ou bicíclico (gama-bisaboleno, beta-selineno, cariofileno) ou lactonas sesquiterpênicas.



Esquema 2. Algumas estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos: GPP, pirofosfato de geranila (adaptado de Mahmoud e Croteau, 2002).



Esquema 3. Estruturas formadas pela ação da enzima δ -selineno sintase, isolada de *Abies grandis* (Douglas ex D. Don) Lindl. (Pinaceae) sobre o farnesilpirofosfato (FPP): OPP: pirofosfato (Steele, 1998).

3.3.6 Diterpenos

Os diterpenos (C₂₀) são a segunda maior classe de terpenóides, com mais de 2.200 componentes e cerca de 130 tipos de esqueletos (Sukh Dev, 1989; Deprê e Brocksom, 2010). Diterpenos também formam a base para compostos biologicamente importantes, como o retinol, retinal e fitol. Estes são conhecidos como antimicrobianos e anti-inflamatórios (Jefferies *et al.*, 1981).

Além destes, ainda existem os triterpenos C₃₀, os tetraterpenos C₄₀, e os politerpenos em caso de unidades maiores, acima de C₄₀, (sendo o representante mais significativo a borracha, látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, Euphorbiaceae), porém a medida que aumentam as unidades isoprênicas as moléculas tornam-se mais pesadas. (Schantz, 1967; Dominguez, 1973; Rucker, 1997; Gros *et al.*, 1985; Guignard, 1985; Harborne, 1989; Bruneton, 1992; Tyler *et al.*, 1996).

3.4 Propriedades farmacológicas dos óleos voláteis

Embora a principal utilização dos óleos voláteis ocorra nas indústrias de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene), também em farmácias, drogas vegetais ricas em óleos voláteis são empregadas *in natura* para preparações de infusões e/ou sob forma de preparações galênicas simples. Muitos óleos voláteis são utilizados para a aromatização de formas farmacêuticas destinadas a uso oral. Muitas atividades farmacológicas são atribuídas aos óleos voláteis, mas devido à complexidade de sua composição química é difícil relacionar tal atividade a um único composto. Geralmente, a ação atribuída a um composto isolado pode não ser exata, devido a possíveis interações que podem ocorrer entre os componentes do óleo. Em seguida destaca-se atividade farmacológica de alguns compostos isolados e em misturas do óleo volátil.

- Ação estimulante sobre o SNC e ação cardiovascular (óleo volátil contendo cânfora), ativa a circulação sanguínea (Chinou *et al.*, 1997); ação depressora do SNC (óleo volátil de melissa, capim-limão) ou mesmo provocando convulsões em doses elevadas (losna, erva-de-santa-maria, sálvia, canela); ação anti-séptica (uso externo): alguns óleos voláteis inibem o crescimento de várias bactérias e fungos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois; ação carminativa (óleo volátil de funcho, erva-doce, camomila, menta); ação antiespasmódica (óleo volátil de camomila, macela, funcho, erva-doce, sálvia); ação anestésica relacionada com a presença de acetato de linalila (Ghelardini *et al.*, 1999); terpineol, (E)- anetol, beta-cariofileno (Ghelardini *et al.*, 2001); linalol (Carson e Riley, 1995; Ghelardini *et al.*, 1999). A tabela 2 relaciona algumas das principais propriedades farmacológicas dos óleos voláteis com os respectivos princípios ativos.

Tabela 2. Principais propriedades farmacológicas atribuídas aos terpenóides.

<i>Propriedade</i>	<i>Composto</i>
Antisséptica	Ácido benzóico, cânfora, carvacrol, citral, eugenol, safrol, timol
Anti-inflamatória	Bisabolol, alfa-pineno, azuleno, camazuleno, cineol, beta-cariofileno
Antiespasmódica	Acetato de eugenol, bisabolol, benzaldeído, camazuleno, guaiol, linalool, óxido de bisabolol
Antipirética	Ácido benzóico, apiol, azuleno, cineol, metil-eugenol
Expectorante	Ácido benzóico, anetol, cineol, pineno, terpineol
Hipoglicemiante	Alil-propil-dissulfeto, dialil-sulfeto, dialil-trissulfeto
Repelente	Anetol, anisaldeído, apiol, carvona, cineol, citral, farneseno, linalol, salicilato de metila
Lactagoga	Anetol
Anestésica	Eugenol, benzaldeido, cânfora, safrol
Antialérgica	Beta-cariofileno, alfa-terpineol
Diurética	Apiol

Anti-helmíntica	Carvacrol
Antiviral	Metil-n-nonil-cetona
Anticonvulsivante	Linalol
Antimalárica	(E) gerolidol
Sedativa	Linalol
Euforizante	Limoneno
Antimicrobiana	Geranial, linalol, neral, alfa-terpineol, alfa- e beta-pineno, terpinen-4-ol, timol
Antifúngica	Linalol, timol, alfa- e beta-pineno e alfa-terpineol

Onawunmi *et al.*, 1984; Janssen, 1989; Barel *et al.*, 1991; Carson e Riley, 1995; Kuhnt *et al.*, 1995; Raman *et al.*, 1995; Tamble *et al.*, 1996; Pongprayoon *et al.*, 1997; Ghelardini *et al.*, 1999; Magiatis *et al.*, 1999.

3.5 Principais famílias produtoras de óleos volatéis e sua importância

Os óleos voláteis têm grande importância econômica pela sua utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, e pelo cultivo de espécies aromáticas. Os gêneros capazes de elaborar essa classe de metabólitos encontram-se especialmente nas famílias de angiospermas dicotiledôneas. Há controvérsias em torno do número de espécies capazes de acumular esta classe de metabólitos. Estima-se em cerca de 3.000 espécies, sendo apenas 250 comercializadas (Bandoni, 2000). Embora difícil de estimar, avalia-se que, para a obtenção de óleos voláteis de espécies da família Lamiaceae, sejam cultivados mais de 500 mil hectares (Lawrence, 1992), destacando-se como as espécies de maior utilização e respectiva produção mundial em tonelada/ano.

Estes óleos apresentam uma ampla distribuição em vegetais superiores, sendo alguns exemplos de famílias e de plantas de importância econômica citados abaixo:

-*Calendula officinalis* L. (calêndula), Asteraceae

- Chamomilla recutita* L. (camomila), Asteraceae
- Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto), Myrtaceae
- Foeniculum vulgare* Miller (funcho), Apiaceae
- Melissa officinalis* L. (melissa), Lamiaceae
- Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta), Lamiaceae
- Ocimum basilicum* L. (manjeriço), Lamiaceae
- Salvia officinalis* L. (sálvia), Lamiaceae
- Thymus vulgaris* L. (tomilho), Lamiaceae

No entanto, o universo das plantas aromáticas é muito maior se se considerar sua origem biológica e seu significado comercial. A variabilidade genética, os fatores ecológicos e culturais aliados à tecnologia agrícola e industrial contribuem para tornar imprecisa qualquer intenção de quantificar o número de plantas aromáticas. O conteúdo de óleo volátil em uma planta pode variar em função da época do ano e do seu estágio de desenvolvimento (Goralka *et al.*, 1996; Dunlop *et al.*, 2000).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Três espécies do gênero *Croton* (*C. pallidulus*, *C. ericoides* e *C. isabelli*) foram coletadas em diferentes municípios do Rio Grande do Sul. O *C. pallidulus* em Santo Antônio da Patrulha, Barrocada em 16 de Outubro de 2010; O *C. ericoides* em Santo Antônio da Patrulha, Campestre em 14 de Junho de 2011 e o *C. isabelli* foi coletado em Parobé, Santa Cristina do Pinhal em 12 de Outubro de 2011. As plantas foram identificadas pelo botânico Sérgio Bordignon (UniLaSalle).

4.2 Extração dos óleos voláteis

Os óleos voláteis foram obtidos a partir das partes aéreas das plantas frescas, reduzidas com o auxílio de triturador mecânico e submetidas à hidrodestilação em processo contínuo com aparelho de Clevenger, durante 4 horas. A quantificação foi realizada por leitura do volume coletado no tubo graduado do aparelho de Clevenger, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira. Após, os óleos obtidos foram armazenados sob refrigeração, em frascos de vidro âmbar, até a análise dos constituintes.

4.3 Análise Química

4.3.1 Cromatografia a gás acoplada ao espectrofotômetro de massas

Para análise química, os óleos voláteis obtidos por hidrodestilação foram diluídos em éter etílico na razão de 2:100 (v/v). Depois foram quantificados em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A equipado com coluna capilar de sílica fundida DB₅ (25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano, contendo 5% de grupamentos fenila com um filme de 0,25 µm de espessura) para a separação dos constituintes. O injetor (com divisão de fluxo – split/splitless) foi programado a 220 °C (razão de divisão 1:20) e a programação de temperatura foi de 60 a 300 °C a 3 °C/min (tempo total de análise 80 min), utilizando

hélio como gás de arraste a uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL por min. Injetor e detector a 220 °C e 250°C, respectivamente. Energia de ionização de 70 eV. Os componentes foram identificados por comparação de seu índice de retenção (Índice de retenção relativo) e espectro de massa com dados da literatura (ADAMS, 2001), bem como espectroscopia de aquisição (NIST 12 e NIST 62 – National Institute of Standards and Technology, Kyoto, Japão).

4.4 Análise Biológica

4.4.1 Atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga*

O trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A cepa patogênica de *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461) foi gentilmente cedida pelo Dr. Naveed Khan (School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, Universidade de Londres), sendo mantida em meio PYG (2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) a temperatura constante de 30 °C. Para os experimentos, 1 mL da cultura foi centrifugado por 5 min a 2.000 rpm, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado duas vezes com tampão fosfato salino tamponado (PBS). O sedimento de amebas foi diluído em meio PYG para obter a concentração final de $1,6 \times 10^4$ trofozoítos/mL.

Os óleos voláteis foram solubilizados com 1% de Tween 20 e água para obtenção de uma solução com concentração de 20 mg/mL. Foram testadas as concentrações finais de 10, 5, 2,5, 1 e 0,5 mg/mL. Para realização dos ensaios de atividade amebicida, 100 µL da cultura de *Acanthamoeba* (na concentração de $1,6 \times 10^4$ trofozoítos/mL) e 100 µL de cada solução teste foram inoculadas em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi selada com parafilme e incubada a 30 °C, sendo monitorada em microscópio invertido. Após 24 horas, os trofozoítos viáveis foram

contados utilizando uma câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal. A viabilidade foi verificada utilizando azul de tripan. Como controle negativo foi utilizado água estéril contendo 1% de Tween 20 (Ondarza *et al.*, 2006), testado contra a cepa de origem clínica. Os experimentos foram realizados em triplicatas com ao menos duas repetições.

4.4.2 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como porcentagem de mortalidade e/ou viabilidade. As diferenças entre as médias foram determinadas pela análise da variância (ANOVA) com comparação de médias, seguido do teste de Tukey. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4.4.3 Análise de Citotoxicidade Celular

Para determinação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), o qual se baseia na conversão do sal de tetrazólio (MTT) amarelo em um derivado de formazan púrpura na mitocôndria das células viáveis (Mosmann, 1983). As células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano, ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio Eagle's - meio essencial mínimo (E-MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (E-MEM/FBS; (GIBCO) e antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). Uma suspensão de $4,0 \times 10^4$ células por poço foi distribuída em microplaca de 96 poços e mantida a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. Quando o tapete celular apresentar mais de 80% de confluência, o meio é trocado e as células tratadas com o óleo volátil nas concentrações 10, 5, 2,5, 1, 0,5 mg/mL, dissolvidos em 1% de DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera úmida, a 5% de CO₂, e após 24 h, 40 µL de uma solução a 2 mg/mL de MTT (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), foram adicionados a cada poço e incubadas por mais 3 horas. Cem microlitros de DMSO foram adicionados a cada poço para interromper a reação e solubilizar os cristais de formazan, e incubado novamente por 10 minutos. A quantidade

de MTT-formazan formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis, que foi determinada a 550 nm em um leitor de ELISA (Anthos 2020). Foram testados três poços por concentração, em três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como o percentual de células viáveis em relação ao controle, células não tratadas.

4.5 Atividade antibacteriana - Bioautografia

Essa etapa do trabalho foi realizada no laboratório de Microbiologia e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) onde foi testada a atividade antimicrobiana contra as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* usando o método de bioautografia.

O método bioautográfico baseia-se na visualização, diretamente sobre a placa cromatográfica, das zonas de inibição de crescimento microbiano. Neste tipo de técnica, o meio de cultura, inoculado com o microorganismo na qual a substância, ou mistura de substâncias de interesse, será eluída. As substâncias contidas na placa deslocam-se para a camada de meio de cultura e aquelas dotadas de atividade antimicrobiana inibirão o desenvolvimento dos microorganismos (Valgas *et al.*, 2007; Bertucci, 2008).

A bioautografia pode ser dividida em três partes: primeiramente faz-se a preparação dos meios de cultura e microorganismos, em seguida a cromatografia em camada delgada e, finalmente, a própria bioautografia, descritas a seguir (Farmacopeia Brasileira, 1988).²³

4.5.1 Preparação dos meios de cultura

Os microrganismos foram fornecidos em forma de liofilizado, e antes do experimento colocou-se em meio líquido. Em seguida foram semeados em placa de petry por 24 horas na estufa a 37 °C para ser usado na bioautografia.

Os inóculos dos microrganismos *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (25922) foram preparados conforme o tubo 1 da escala McFarland. Para cada 100 mL do meio de cultura ágar Muller-Hinton foi inoculado 1 mL da solução padronizada de cada microrganismo (Pereira *et al.*, 2009).

4.5.2 Cromatografia em camada delgada

Na cromatofolhas de alumínio em sílica gel GF₂₅₄, 20 X 20 cm MERCK, foram aplicadas as amostras, em forma de pontos com a fase móvel indicada para este tipo de amostra (hexano e acetato de etila 93:7). Após a aplicação, as amostras eluíram de acordo com a afinidade com a fase móvel até ao topo da placa. Após a migração ocorreu a separação de alguns compostos do óleo volátil e a placa de sílica foi aerada para eliminar a possível interferência dos solventes no teste antimicrobiano. Em seguida fez-se a leitura usando a luz ultravioleta (UV 254 nm) e enumerando assim as manchas formadas do sistema cromatográfico (Wagner *et al.*, 1984).

4.5.3 Bioautografia

Após a eluição, utilizando o sistema cromatográfico específico, as placas cromatográficas contendo as amostras a serem analisadas (óleo volátil de *Croton*) foram imersas em uma placa de petry contendo o meio de cultura inoculado. Após, foi vertido novamente sobre a placa cromatográfica o meio de cultura inoculado a fim de formar uma pequena camada e incubados por 24 horas. Foi usado o antibiótico Amoxicilina como controle positivo de inibição.

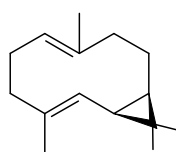
Após este período de incubação, aplicou-se sobre as placas uma solução aquosa de sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio MERCK, 10 mg/mL). As placas foram incubadas novamente a 37 °C por um período de 4 horas, seguindo-se a observação das zonas de inibição de crescimento microbiano (Rios *et al.*,1988; Dall`agnol, 2003). A visualização das zonas de inibição foi feita através do emprego de um corante vital, normalmente sais de tetrazólio ou azul de metileno (Rios *et al.*,1988).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

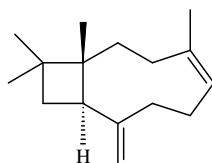
5.1 Análise química dos óleos voláteis

O rendimento dos óleos voláteis extraídos foi de 0,5%, 0,2% e 0,2% para *C. pallidulus*, *C. isabelli* e *C. ericoides*, respectivamente, baseado no seu peso fresco (p/v). A composição química dos óleos voláteis, junto com o índice de retenção e porcentagem dos componentes identificados utilizando cromatografia à gás acoplada espectrometria de massas (Figuras 2, 3 e 4), está sumarizada na Tabela 3.

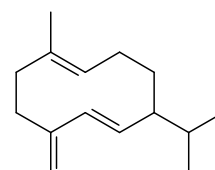
Para o óleo volátil de *C. isabelli*, 16 compostos foram identificados, representando 98,2% do óleo, sendo este caracterizado pela presença exclusiva de sesquiterpenos. Bicyclogermacreno (48,9%) (1), beta-cariofileno (14,3%) (2) e germacreno D (12,6%) (3) foram os constituintes majoritários do óleo. No óleo de *C. pallidulus*, 35 compostos foram identificados, representando 98,3% do conteúdo total. Apesar de o óleo ser caracterizado pela predominância de sesquiterpenos (82,1%), o componente principal do óleo foi o monoterpreno oxigenado terpinen-4-ol (13,6%) (4). Dentre os sesquiterpenos, beta-cariofileno (11,5%) foi o principal constituinte. O óleo volátil de *C. ericoides*, apresentou 99,9% do óleo identificado, sendo a fração monoterpênica predominante em relação a sesquiterpênica. Beta-pineno (39,0%) (5) foi o principal monoterpreno caracterizado seguido pelo linalol (7,6%) (6). Dentre os sesquiterpenos, beta- cariofileno foi o que se destacou (8,1%).



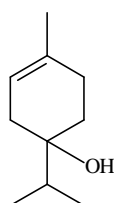
(1)



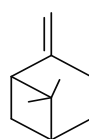
(2)



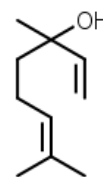
(3)



(4)



(5)



(6)

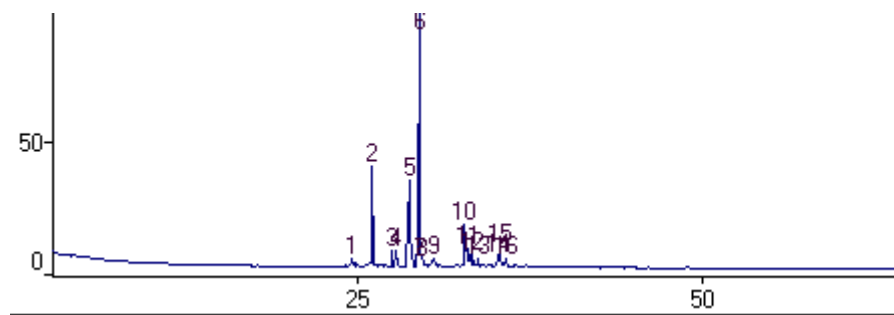


Figura 2 – Cromatograma do óleo volátil de *C. isabelli* obtido por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).

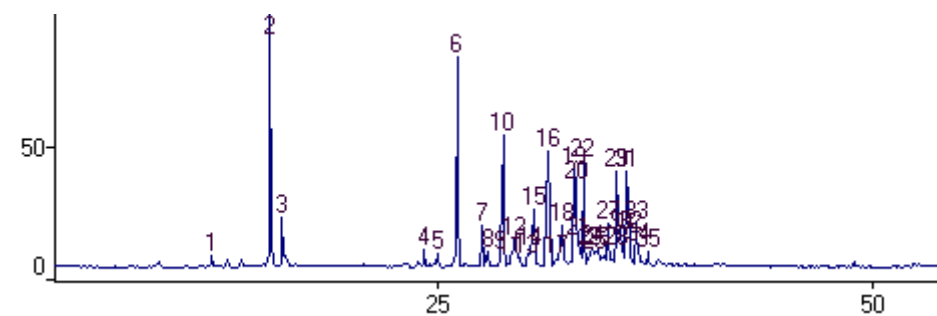


Figura 3 – Cromatograma do óleo volátil de *C. pallidulus* obtido por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).

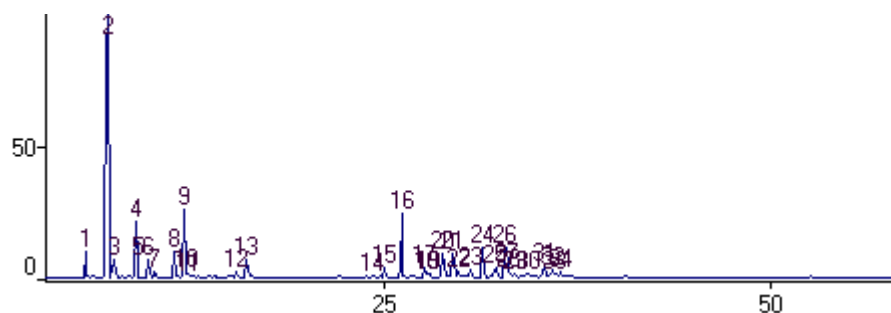


Figura 4 – Cromatograma do óleo volátil de *C. ericoides* obtido por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).

Tabela 3. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de diferentes espécies de *Croton*.

Pico	IR*	Composto	<i>C. isabelli</i>	<i>C. pallidulus</i>	<i>C. ericoides</i>
Monoterpenos hidrocarbonados			0,0	0,0	54,1
1	928	triciclono			2,7
2	971	β -pineno			39,0
3	986	mirceno			1,8
4	1024	limoneno			5,9
5	1044	<i>E</i> - β -ocimeno			1,7
6	1053	δ -terpineno			0,5
7	1084	terpinoleno			2,7
Monoterpenos oxigenados			0,0	16,2	12,4
8	1026	1,8-cineol			1,7
9	1100	linalol		0,5	7,6
10	1102	<i>N</i> -nonanal			0,7
12	1174	terpinen-4-ol		13,6	0,6
13	1189	α -terpineol		2,1	1,8
Sesquiterpenos hidrocarbonados			83,7	39,2	23,7
14	1366	α -copaeno		0,8	0,2
15	1382	β -elemeno		0,6	1,1
16	1375	β -bourboneno	0,7		
17	1408	β -cariofileno	14,3	11,5	8,1
18	1441	α -humuleno	2,2	2,3	1,1
19	1444	geranil acetona			0,5
20	1448	<i>allo</i> aromadendreno	2,1	0,7	0,3
21	1465	γ -muurolo		0,6	
22	1469	germacreno D	12,6	7,6	3,0
23	1479	valenceno		0,2	
24	1484	biciclogermacreno	48,9	1,7	3,1
25	1488	β -himachaleno	0,9		
26	1492	germacreno A	0,9		0,6
27	1500	α -muurolo		0,3	
28	1504	trans-beta-guaieno		0,9	
29	1511	δ -amorfenol		3,2	
30	1511	δ -cadineno	1,1		0,9
31	1531	α -calacoreno		6,5	3,9
32	1544	germacreno-B		0,3	
33	1552	β -calacoreno		2,1	1,0
Sesquiterpenos oxigenados			14,5	42,9	9,7
34	1568	Espatuleno	5,9	5,6	3,9
35	1572	óxido de cariofileno		4,6	1,4
36	1575	Globulol	3,2	1,6	0,7
37	1582	<i>epi</i> -globulol	1,3	6,6	0,3

38	1599	epóxido de humuleno II		0,6	
39	1605	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol		0,8	0,3
40	1619	1- <i>epi</i> -cubenol		1,9	
41	1630	<i>iso</i> -espatulenol		0,6	
42	1633	<i>tau</i> -cadinol		7,8	
43	1633	α -muurolol	3,4	1,8	1,4
44	1646	α -cadinol	0,6	5,1	0,8
45	1651	<i>cis</i> -calamenen-10-ol		1,5	0,3
46	1660	<i>trans</i> -calamenen-10-ol		2,6	0,6
47	1666	Cadaleno		1,3	
48	1678	Khusinol		0,5	
Total			98,2	98,3	99,9
Total de monoterpenos			0,0	16,2	66,5
Total de sesquiterpenos			98,2	82,1	33,4

* Índice de retenção em coluna DB₅.

Na literatura especializada não há relatos de estudos sobre o óleo volátil das espécies deste trabalho. No entanto, outras espécies do gênero *Croton* foram estudadas e tiveram o óleo volátil analisado. A partir das folhas de *C. heliotropiifolius* foi extraído o óleo volátil e identificados os seguintes compostos: α -pineno, linalol, β -cariofileno, germacreno D, δ -cadineno, α -humuleno, biciclogermacreno, espatulenol e eucaliptol. *Croton blanchetianus* teve seu óleo caracterizado principalmente pela presença de α -pineno, β -pineno e β -mirceno (Oliveira, 2008; Angélico *et al.*, 2011).

Freitas e colaboradores (2010) analisaram a composição química do óleo volátil de *C. muscicapa* e verificaram a presença de α -copaeno, β -cariofileno, germacreno-D, δ -amorfenol e óxido de cariofileno como os principais compostos. Meccia e colaboradores (2000) analisaram as folhas de *C. ovalifolius* Vahl, sendo que os constituintes majoritários foram β -cariofileno, biciclogermacreno, germacreno B, espatulenol e óxido de cariofileno.

Ainda, de acordo com Azevedo (2010) o óleo volátil de *C. cajucara* apresenta como principais componentes α -pineno, linalol e β -cariofileno. Por fim, no óleo volátil de *C. sacaquinha* estão presentes β -elemeno, germacreno D, α -muurolol, *trans*-calameneno, α -humuleno, α -copaeno e biciclogermacreno. Todos estes compostos

também foram identificados nas espécies estudadas neste trabalho, corroborando os dados encontrados.

5.2 Avaliação da atividade amebicida dos óleos voláteis

A atividade amebicida dos óleos voláteis de *C. pallidulus*, *C. isabelli* e *C. ericoides* foi testada contra trofozoítos de *A. polyphaga*, sendo escolhida uma cepa padrão, de procedência clínica (isolada de lesão de ceratite amebiana).

Através dos ensaios realizados no estudo, foi possível determinar a atividade amebicida dos óleos voláteis. Os ensaios realizados em placas de cultura celular puderam ser acompanhados por meio de microscópio óptico invertido durante o período decorrente entre o início do experimento e a realização das contagens celulares em câmara de Fuchs-Rosenthal, sendo a viabilidade celular dos trofozoítos verificada através da coloração com azul de tripan, onde os trofozoítos inviáveis apresentam-se corados. Tomando como base os tempos utilizados para os ensaios de atividade amebicida do estudo desenvolvido por Ródio e colaboradores (2008) e utilizando concentrações dos óleos verificadas em ensaios prévios, investigou-se a atividade amebicida dos óleos voláteis em 24 horas e com as concentrações finais de 10; 5; 2,5; 1 e 0,5 mg/mL.

Tanto o óleo volátil de *C. pallidulus* quanto o de *C. ericoides* apresentaram atividade amebicida contra *A. polyphaga*, sendo que nas concentrações de 10, 5 e 2,5 mg/mL foram capazes de inviabilizar todos os trofozoítos ou seja, os óleos provocaram a lise total dos trofozoitos. Porém, este último foi mais ativo: na concentração de 0,5 mg/mL, foi capaz de inviabilizar 87% dos trofozoitos, enquanto que o óleo de *C. pallidulus*, na mesma concentração, inviabilizou apenas 29% dos trofozoítos (Figuras 5). O óleo volátil de *C. isabelli* foi o que apresentou menor atividade: numa concentração de 10 mg/mL inviabilizou apenas 4% dos trofozoítos, ou seja, causou a lise de menos que 5% enquanto as concentrações de 5, 2,5, 1 e 0,5 mg/mL não demonstraram atividade frente a *A. polyphaga* (Figura 5).

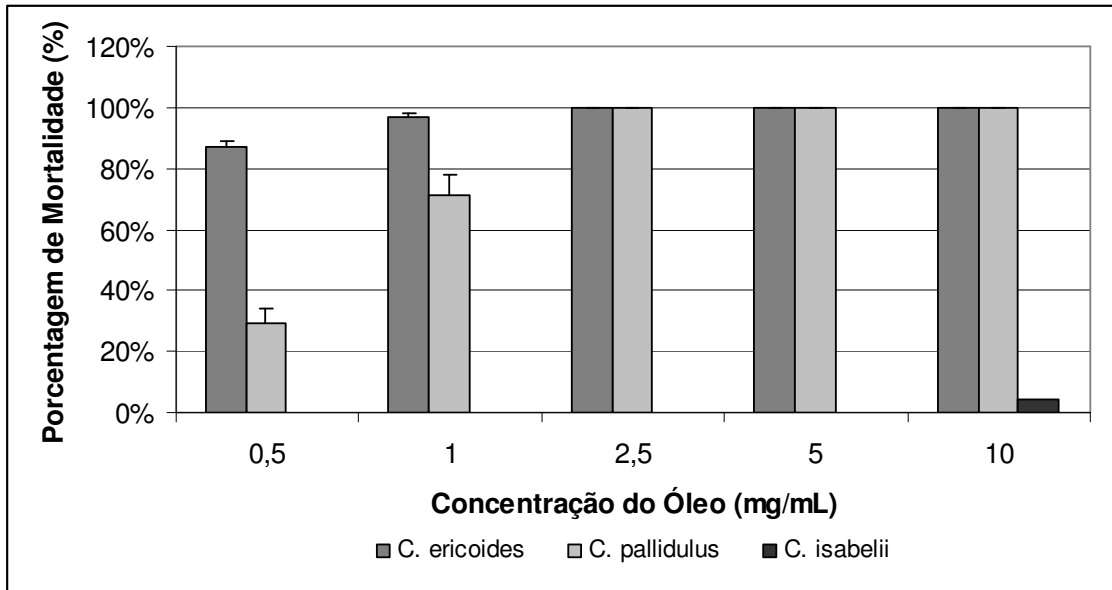


Figura 5 - Atividade amebicida dos óleos voláteis de *C. ericoides*, *C. pallidulus* e *C. isabellii* frente a *A. polyphaga*. As colunas representam a porcentagem de mortalidade de cada concentração de óleo testada, em relação ao controle ($p < 0,05$ vs controle).

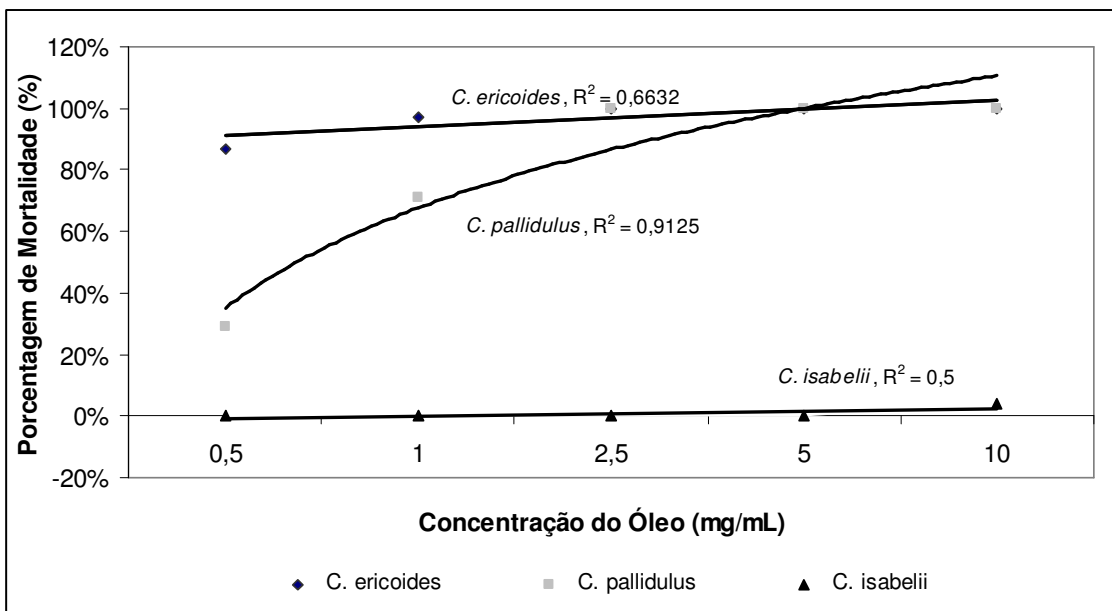


Figura 6 – Regressão linear das concentrações dos óleos voláteis de *C. ericoides*, *C. pallidulus*, *C. isabellii* frente à porcentagem de mortalidade dos trofozoítos de *A. polyphaga*.

Dentre as três espécies investigadas, *Croton ericoides* foi a que demonstrou melhor atividade amebicida, provavelmente devido a maior porcentagem de monoterpenos, pois são compostos com reconhecidas propriedades biológicas. Este achado pode ser comparando com a baixa atividade do óleo volátil de *C. isabelli*, cuja composição química não apresenta monoterpenos. O óleo de *C. pallidulus* apresentou atividade amebicida mediana. Considerando a composição química do seu óleo, verifica-se a presença, além de sesquiterpenos, de apenas monoterpenos oxigenados. Tal resultado sugere que a atividade também está relacionada à presença de monoterpenos hidrocarbonados. Uma vez que os óleos voláteis são misturas complexas e que nem sempre é fácil atribuir uma determinada atividade a um único componente, mas sim a um conjunto de componentes, deve-se considerar a ocorrência de sinergismo entre os componentes. Estudos adicionais devem ser realizados com finalidades de isolar e identificar o principal componente responsável pela atividade biológica. Entretanto, não houve encistamento nos ensaios com *A. polyphaga*, o que reforça a hipótese de que os óleos voláteis de *C. pallidulus* e *C. ericoides* são capazes de prevenir o encistamento.

Os resultados foram baseados na comparação com o grupo controle, que recebeu apenas água com 1% do agente tensoativo (Tween 20), sendo estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

5.3 Ação citotóxica dos óleos voláteis sobre as células de mamíferos

Devido à grande procura de compostos naturais para auxiliar na terapia de diversas doenças, há necessidade de um estudo prévio e aprofundado, sobre os benefícios e os possíveis danos que possam causar ao ser humano, ao fazer o uso destes compostos. Entretanto como parte do objeto de estudo deste trabalho é avaliar a atividade amebicida do óleo volátil do gênero *Croton* frente a *Acanthamoeba polyphaga* causadora da ceratite amebiana, então surge a necessidade de verificar a citotoxicidade destes óleos voláteis. Este efeito foi verificado através do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983), que possibilitou verificar se os óleos voláteis provocam danos às células de mamíferos, e assim inferir se

são capazes de danificar as células do epitélio córneo. Para o ensaio foram utilizadas células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), sendo escolhidas várias concentrações dos óleos para serem testadas.

Os resultados demonstram que os três óleos voláteis apresentam citotoxicidade significativa; *Croton ericoides* foi o que apresentou maior citotoxicidade sendo capaz de inviabilizar 100% das células da linhagem VERO, ou seja, não se verificou a existência de células viáveis após o experimento, inclusive não sendo possível de visualizar nesta escala justamente por não apresentar nenhuma célula viável. Os óleos voláteis de *Croton pallidulus* e *Croton isabelli* apresentaram uma viabilidade celular de menos de 2% ou seja os óleos voláteis das duas espécies foram tóxico para 98% das células da linhagem VERO (Figura 7).

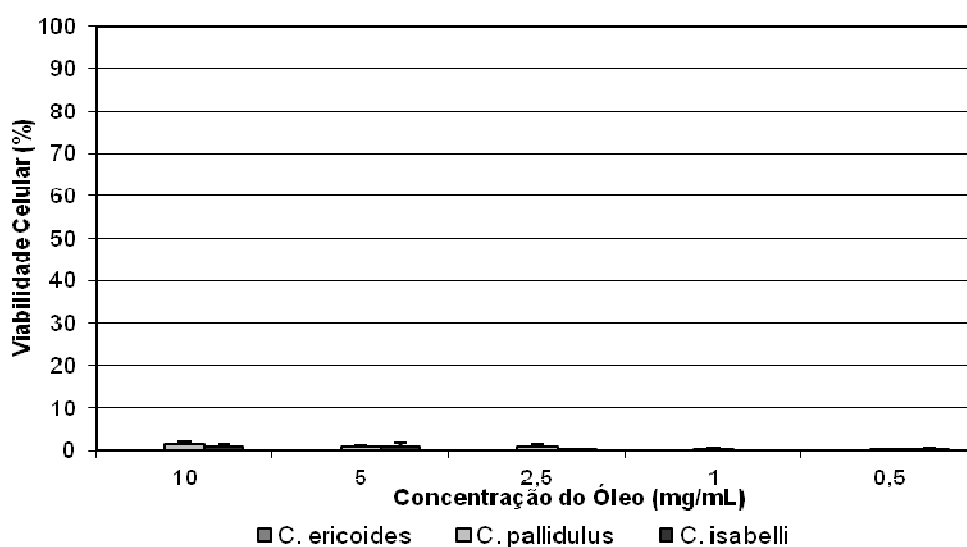


Figura 7 – Ensaio de viabilidade celular (MTT). Ação dos óleos voláteis sobre células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle - ($p < 0,05$ vs controle).

A citotoxicidade verificada para os óleos voláteis revela que sua utilização sobre a córnea não é viável. Todavia, poderia pensar-se na possibilidade de utilização destes óleos voláteis como componente de solução de limpeza de lentes de contato,

sendo esta uma alternativa para aumentar a eficiência destas soluções. A ceratite está intimamente relacionada ao uso de lentes de contato, sendo a higienização das lentes um processo de extrema importância para prevenir contaminação tanto por *Acanthamoeba* quanto por outros microrganismos. Mas esta solução de limpeza não poderia deixar resíduos nas lentes de contato após a limpeza, pois poderia ser prejudicial à córnea (Khan, 2006). Desta forma, muitos estudos adicionais devem ser realizados antes que se utilizem estes óleos voláteis para este fim.

5.4 Atividade antibacteriana utilizando o método de bioautografia

Para avaliar a atividade antibacteriana dos óleos voláteis, estes foram submetidos à técnica de bioautografia, que consiste na aspensão de uma suspensão de microrganismos sobre um cromatograma. Após, avalia-se a zona de inibição, em torno da mancha correspondente a um ou mais compostos, observando-se à luz natural ou após a aplicação de um corante. Através deste método foi possível avaliar a ação antimicrobiana dos óleos voláteis de *C. ericoides* e *C. pallidulus* frente aos microrganismos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo volátil de *C. isabelli* não foi avaliado devido a quantidade insuficiente de amostra no momento das análises.

Os óleos voláteis de *C. pallidulus* e *C. ericoides* foram submetidos à cromatografia em camada delgada conforme descrito no item 4.5.2 e quando observados em luz UV 254nm apresentaram cinco e seis manchas majoritárias, respectivamente. Os testes de bioautografia foram realizados com essas cromatografias.

O óleo volátil de *C. pallidulus* quando testado contra a *S. aureus* apresentou um halo de inibição ao redor da mancha 5 enumerada a partir da cromatografia em camada delgada, próxima ao ponto de aplicação. Essa mesma mancha apresentou halo de inibição quando testada frente a *E. coli*. Entretanto com relação a *P. aeruginosa*, o óleo volátil de *C. pallidulus* não demonstrou formação de halo ao redor das manchas (Figuras 8, 9 e 10).



Figura 8 - Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de *C. pallidulus* frente a *S. aureus* (realizado em duplicata).

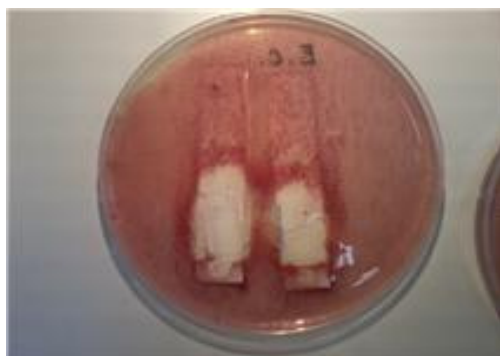


Figura 9 - Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de *C. pallidulus* de frente a *E. coli* (realizado em duplicata).

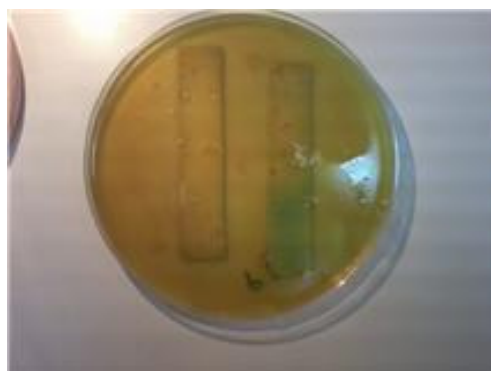


Figura 10 - Ausência do halo de inibição do óleo volátil de *C. pallidulus* frente a *P. aeruginosa* (realizado em duplicata).

O óleo volátil de *C. ericoides* quando testado frente a *E. coli* e *S. aureus* apresentou halo de inibição apenas ao redor da mancha 6, próxima ao ponto de aplicação. Com relação a *P. aeruginosa* não houve formação do halo de inibição do crescimento bacteriano na placa após migração dos componentes (Figuras 11, 12 e 13).

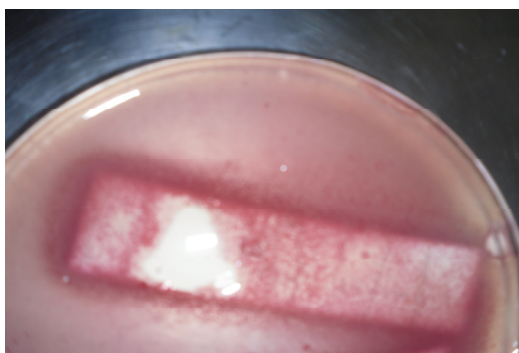


Figura 11- Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de *C. ericoides* frente a *S. aureus*

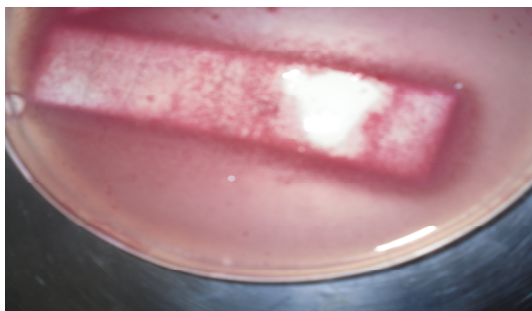


Figura 12- Presença do halo de inibição no cromatograma do óleo volátil de *C. ericoides* frente a *E.coli*

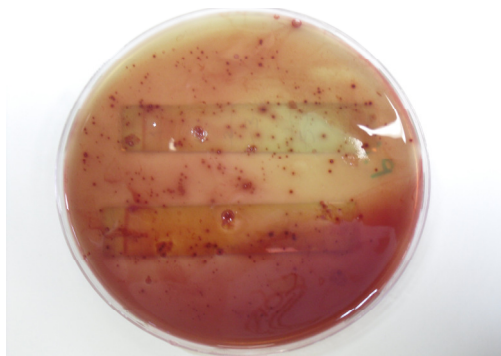


Figura 13 - Ausência do halo de inibição do óleo volátil de *C. ericoides* frente a *P. aeruginosa*

Na sequência, as manchas que apresentaram halos de inibição foram raspadas, submetidas a extração com éter etílico e analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, sendo que no caso do *C. Pallidulus*, na fração referente a mancha 5, foi possível identificar os seguintes componentes: linalol (37,6%), nonadecanol (22,9%), espatulenol (16,6%), α -terpineol (7,9%), α -cadinol (4,3%) e globulol (3,8%).

Para *C. ericoides*, a fração raspada (mancha 6) apresentou os seguintes componentes após análise por CG/EM: espatulenol (14,2%), α -cadinol (13,7%), α -muurool (7,0%), *epi*-globulol (3,5%), cubenol (82,9%), α -terpineol (2,8%), *trans*-calamenen-10-ol (2,3%) e *cis*-calamenen-10-ol (1,4%).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os dados da literatura. De acordo com estudos realizados por Moreno e colaboradores (2009), o óleo volátil da espécie *C. heterocalyx* demonstrou atividade antibacteriana frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Matias e colaboradores (2010) destacaram atividades antibacteriana do extrato metanólico de *C. campestris* frente a *E. coli* e *S. aureus*. Peixoto (2003) demonstrou a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *C. floribundus* frente a *S. aureus* e *E. coli*. Ainda, segundo a literatura vários autores já haviam relatado a atividade antimicrobiana de espécies de *Croton*

(Fortes e Guedes, 2006; Costa *et al.*, 2008; Ganga Rao e Raga Sudha, 2009; Simionatto *et al.*, 2009, Ajayi *et al.*, 2010; Azevedo 2010; Dória *et al.*, 2009; Angélico (2011).

A atividade antimicrobiana determinada para esses óleos voláteis corrobora a possível aplicabilidade dos mesmos em soluções de limpeza de lentes de contato pois os contaminantes encontrados estão as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, entre outros.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as espécies de *Croton* investigadas neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

-O rendimento dos óleos voláteis extraídos foi de 0,5%, 0,2% e 0,2% para *C. pallidulus*, *C. isabelli* e *C. ericoides*, respectivamente;

- O óleo volátil de *C. isabelli* é caracterizado pela presença exclusiva de sesquiterpenos, sendo biciclogermacreno (48,9%), beta-cariofileno (14,3%) e germacreno D (12,6%) os constituintes majoritários do óleo;

- O óleo de *C. pallidulus* também é caracterizado pela predominância de sesquiterpenos, No entanto, o componente majoritário é o monoterpene oxigenado terpinen-4-ol (13,6%). Dentre os sesquiterpenos, beta-cariofileno (11,5%) foi o principal constituinte;

- O óleo volátil de *C. ericoides*, apresentou a fração monoterpênica predominante em relação a sesquiterpênica. Beta-pineno (39,0%) foi o principal monoterpene caracterizado, seguido pelo linalol (7,6%). Dentre os sesquiterpenos, beta-cariofileno foi o que se destacou (8,1%);

- Os óleos voláteis de *C. pallidulus* e *C. ericoides* apresentaram atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga*;

- O óleo volátil de *C. ericoides* foi mais ativo; na concentração de 0,5 mg/mL, foi capaz de inviabilizar 87% dos trofozoítos, enquanto que o óleo de *C. pallidulus*, na mesma concentração, inviabilizou apenas 29% dos trofozoítos;

-O óleo volátil de *C. isabelli* foi o que apresentou menor atividade; a concentração de 10 mg/mL inviabilizou apenas 4% dos trofozoítos;

- Os óleos voláteis de *C. pallidulus* e *C. ericoides*, através do método de bioutografia, mostraram atividade frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo inativos frente à *Pseudomonas aeruginosa*.

- Os óleos voláteis das três espécies mostraram efeito citotóxico através do método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em células da linhagem VERO (rím de macaco verde Africano);

- Com base nos resultados obtidos da citotoxicidade podemos concluir que a utilização dos óleos voláteis na córnea é inviável, porém podemos pensar na possibilidade de utilização destes óleos voláteis como componente de solução de limpeza de lentes de contato, sendo assim uma alternativa para aumentar a eficiência destas soluções.

- Para tal é necessário que se faça alterações na estrutura da molécula responsável pela citotoxicidade, podendo torna-la menos tóxica para o ser humano.

- Desta forma, muitos estudos adicionais devem ser realizados a fim de se identificar e isolar o componente responsável tanto pela atividade amebicida assim como a citotoxicidade dos óleos voláteis.

7. REFERÊNCIAS

Adams, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001.

Adam, K.; Zapp, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, v.48, n.6, p.953-959, 1998.

Ajayi, A.O.; Akintola, T.A. Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants on common enteric food-borne pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.4, p.314-316, 2010.

Alves, J.M.P. Caracterização e Filogenia Moleculares de Acanthamoeba. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

Angélico, E.C.; Costa, J.G.M.; Rodrigues, O.G.; Lima, E.Q.; Medeiros, R.S. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill.: resultados preliminares. **Biofarm- Revista de Biologia e Farmácia**. v.5, n.2, 2011.

Angélico, E. C. **Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kunte e *Croton blanchetianus* Baill.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade de Campinas Grande, 2011.

Apel, M. A. **Óleos voláteis de espécies da subtribo Eugeniinae(Myrtaceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória**. Porto Alegre, UFRGS, Tese de Doutorado, 256p, 2001.

Azevedo, M.M.B. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Croton cajucara* Benth. e *Croton sacaquinha* Croizat. e obtenção de seus componentes bioativos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Bacelli, C.; Martinsen, A.; Morel, N.; Quetin-Leclercq, J. Vasorelaxant activity of essential oils from *Croton zambesicus* and some of their constituents. **Planta Medica**, v.76, n.14, p.1506-1511, 2010.

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, p. 444-447, 2007.

Barel, S.; Segal, R.; Yashiphe, J. The antimicrobial activity of essential oil from *Achillea fragrantissima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, p.187-191, 1991.

Bandoni, A. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires: **Editorial de la Universidad Nacional de La Plata**, 2000.

Barroso, G. M. Sistemática de Angiospermas no Brasil. Editora da Universidade de São Paulo, 1991.

Bertucci, A.; Haretche, F.; Olivaro, C.; Vázquez, A. Prospección química del bosque de galería del Río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p. 21-25, 2008.

Beattie, T.K.; Tomlinson, A.; McFadyen, A.K.; Seal D.V.; Grimason, A.M. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? Scotland. **Ophthalmology**, v.110, p.765–771, 2003.

Bezerra, D.P.; Filho, J.D.B.M.; Alves, A.P.N.N.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Pessoa, O.D.; Torres, M.C.; Silveira, E.R.; Viana, F.A.; Costa-Lutufu, L.V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.8, p.1224-1231, 2009.

Berry, P. E.; Hipp, A. L., Wurdack, K. J.; Van Ee, B. W.; Riina, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1520–1534, 2005.

Bretmaier, E. **Terpene**. Stuttgart: Teubner, 1999. 227 p.

Brunetton, J. Farmacognosia, **Fitoquímica, Plantas Medicinalés**, 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1992.

Cane, D.E. Enzymatic formation of sesquiterpenes. **Chemical Reviews**, v.90, p.1089-1103, 1990.

Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal Applied Bacteriology**, v. 38, n. 3, p. 264, 1995.

Castro, R.D; Lima, E.O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, 2011.

Chinou, I.B.; Roussis, V.; Perdetzoglou, D.; Tzakou, O.; Loukis, A. Chemical and antibacterial studies of two *Helichrysum* species of Greek origin, **Planta Medica**, v.63, p. 181-183, 1997.

Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.G.; Angélico, E.C.; Pereira, C.K.B.; Souza, E.O.; Caldas, G.F.R.; Silva, M.R.; Santos, N.A.; Mota, M.L.; Santos, P.F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.4, p. 586-586, 2008.

Cordeiro, I. & Carneiro-Torres, D. Euphorbiaceae. In: Barbosa, M. R. V; Sothers, C.; Mayo, S.; Gamarra-Rojas, C. F. L. & Mesquita, A. C. eds. **Checklist das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 71–74. 2006.

Craveiro, A.A. Alencar, J. M. Matos, F.J.A. Machado, M.I.L. **Química Nova**, v.13, p.282-285, 1990.

Cronquist, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia University Press, NY, 1981.

Croteau, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Review**, v. 87, p.929-954, 1987.

Dall'agnol, R. **Determinação da atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul**. Dissertação de Mestrado em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2003.

Deprê, K.P.; Brocksom, T.J. A formação do esqueleto carbônico de diterpenos tricíclicos pela reação de Diels Alder multicomponente. **Anais de Eventos da UFSCar**, v. 6, p. 2010, 2010.

Dominguez, X.A. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. Cidade de México: Limusa, 1973.

Dória, G.A.A.; Silva, W.J.; Carvalho, G.A.; Alves, P.B.; Calvacante, S.C.F. A study of larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Journal of Pharmaceutical Biology**, v.48, n. 6, p. 615-620, 2010.

Dubey, S. V.; Bhalla, R.; Luthra, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v.28, n. 5, p. 637- 646, 2003.

Dudareva, N.; Andersson, S.; Orlova I.; Gatto N.; Reichelt, M.; Rhodes, D.; Boland W.; Gershenzon, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v.102, p. 933-938, 2005.

Dulop, P.J.; Bignell, C.M.; Hibbert, D.B. Use of gas chromatograms of essential leaf oils to compare clones of *Eucalyptus camaldulensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p. 383-391, 2000.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

Farmacopeia Brasileira. 5.ed. v.1, Brasília, 2010.

Fernandes, A. & Bezerra, P. **Estudo fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus Comunicações, 205 p, 1990.

Fortes, J.C.; Guedes, M.I.F. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* Muel. Arg. e de frações isoladas dos extratos de *Astronium*

urundeuva) Allemão) Engl. **Anais da 58^a reunião Anual da SBPC-Florianópolis, SC, 2006.**

Freitas, J.V.B.; Gomes, C.L.; Vieira, M.G.S.; Queiroz, V.A.; Neto, A.C.; Gramosa, N.V. Constituintes químicos voláteis das folhas de *Croton muscicapa* Müll. Arg. **50^o Congresso Brasileiro de Química, 2010.**

Ganga Rao, B.; Raga Sudha, T. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of *Croton bonplandianum* aerial parts. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v.11, n.2, p.327-330, 2009.

Geissman, T.A.; Crout, D.H.G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism.** San Francisco: Freeman, Cooper & Company, 1969.

Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Salvatore, G.; Mazzanti, G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*, **Planta Medica**, v.65, p. 700-703, 1999.

Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Di Cesare Mannelli, L.; Mazzanti, G.; Bortolini, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene, **II Farmaco**, v.56, p.387-389, 2001^a.

Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Mazzanti, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Medica**, v.67, n.6, p. 564-566, 2001^b.

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

Goralka, J.L.R.; Schumaker, M.A.; Langenheim, J.H. Variation in chemical and physical properties during leaf development in California Bay tree (*Umbellularia californica*): prediction regarding palatability for deer. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.24, n.2, p. 93-103, 1996

Gros, E.G.; Pomillo, A.B.; Seldes, A.M.; Burton, G. **Introduccion al Estudio de los Productos Naturales.** Washington, Sec. General de la O.E.A, 1985.

Guenther, E. **The Essential Oils**, v.1. New York: D. Van Nostrand Company, 1948.

Guignard, J. L; Cosson, L; Henry, M. **Abrégé de Phytochimie.** Paris: Masson, 1985.

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

Harbone, J.B. **Phytochemical methods. A guide to Modern techniques of plant analysis.** London: Chapman and Hall, 1989.

Janssen, A.M. **Antimicrobial activities of essential oils - A pharmacognostical study.** Tese de Doutorado. Leiden: Leiden Universiteit, 1989.

Jansen, B.J.M; Groot, A. The occurrence and biological activity of drimane sesquiterpenoids. **Natural product Reports**, v.8, n.3, p. 309-318, 1991.

Jedlickova, Z.; Mottl, O.; Sery, V. Antibacterial properties of Vietnamese cajeput oil and ocimum oil in combination with antibacterial agents. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, v.36, n.3, p.303-305, 1992.

Jefferies, P.R.; Payne, R.; Branco A.H. A química da *Dodonaea* spp. VIII. Isolamento e estrutura cristalina de um diterpeno ácido de *Dodonaea petiolares*. **Jornal Brasileiro de Química**, v. 34, p. 1001-1007, 1981.

Khan, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Review**, v. 30, p. 564-595, 2006.

Knoblock, K.; Weigand, H.; Weis, N.; Schwarm; Vogenschow, H. **Action of terpenoids on energy metabolism**. In: Progress in Essential oil research (ed. E. J Brunke). Walter de Gruyter, Berlin, 1986.

Kuhnt, M.; Probstle, A.; Rimpler, H.; Bauer, R.; Heinrich, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*, **Planta Medica**, v.61, p.227-232, 1995.

Lawrence, B.M. Chemical components of Labiatae oils and their exploration. In: Harley,R.M.; Reynolds, T.(ed.). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p.399-436.

Lemos, T.L.G.; Matos, F.J. A; Alencar, J. W; Clark, A.M; McChesney, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytoterapy Research**, v.4, n.2, p.82-86, 1990.

Limberger, R. P. **Composição Química de Óleos Voláteis de Myrciinae (Myrtaceae) e Biotransformação de Terpenóides**. Tese de Doutorado, Porto Alegre-UFRGS, 2001.

Magiatis, P; Melliou, E; Skaltsounis, A; Chinou, B; Mitaku, S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. **Planta Medica**, v.65, p. 749-752, 1999.

Mahmoud, S.S.; Croteau, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends Plant Sciences**, n.7, p.366–373, 2002.

Mann, J. **Secondary Metabolism**. 2.ed. Oxford:Clarendon, p. 374, 1996.

Marciano-Cabral, F; Cabral, G; *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology**, v. 16, p. 273–307, 2003.

Matias, E.F.F.; Santos, K.K.A.; Almeida, T.S.; Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v.8, n.3, p. 294-298, 2010.

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

Meccia, G.L.B.; Rojas, C.; Rosquete, C.; San Feliciano A. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. **Journal Flavour and Fragrance**, v. 15, p. 144-146, 2000.

Meeker, H.G.; Linke, H.A. The antibacterial action of eugenol, thyme oil, and related essential oils used in dentistry. **Compendium**, v.9, n.1, p.34-35, 1988.

Moreno, P.R.H; Lima, M.E.L.; Caruzo, M.B.R; Torres, D.S.C; Cordeiro, I; Young, M.C.M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Croton heterocalyx* Baill (Euphorbiaceae) Leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p. 190-192, 2009.

Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.1665, p. 55-63, 1983.

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, p.5- 8, 2003.

Obeid, W.N.; Araújo, R; Vieira, L.A.; Machado, M.A.C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* - Relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 876-880, 2003.

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

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, n.1, p. 77-82, 2006.

Ondarza R.N.; Iturbe, A.E. In vitro antiproliferative effects of neuroleptics, antimycotics and antibiotics on the human pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. **Archives of Medical Research**, v. 37, p.723-729, 2006.

Onawunmi, G.; Yisak, W.; Ogunlana, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citrates* (DC) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, v.12, p.279-286, 1984.

Paduch, R.; Kandefer-Szerszen, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. Terpenes: substances usefull in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentali**, v.55, p. 315-327, 2007.

Peixoto, J. L.B. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Maringá, 2003.

Peñelas, J.; Llusia, J. Linking Photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, v.155, n.2, p.227, 2002.

Peñelas, J.; Munné-Bosch, S. Isoprenoides: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends Plant Sciences**, v.10, n.4, p. 166-169, 2005.

Pereira, M.A.A.; Falcão, M.A.; Milão, D.; Cassel, E. Avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia indireta dos óleos essenciais de *Cymbopogum winterianus* L. e *Rosmarinus officinalis* L. extraídos pelos métodos de arraste à vapor e extração por CO₂ supercrítico. **IV Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação-PUCRS**, 2009.

Peters, R.J; Croteau, R.B. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. In: Christou P., Klee H. (eds) *Handbook of Plant Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd, n.3, p. 609-627, 2004.

Pongprayoon, U.; Soontornsaratune, P.; Jarikasem, S.; Sematong, T.; Wasuwat, S.; Claeson, P. Topical anti-inflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*.1. The essential oil. **Phytomedicine**, v.3, n.4, p. 319-322, 1997.

Qvarnstrom, Y; Visvesvara, G. S; Sriram, R; da Silva, A. J; Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, p. 3589-3595, 2006.

Raman, A.; Weir, U.; Bloomfield, S.F. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n.4, p.242-245, 1995.

Rios, J.L.; Recio, M.C.; Villar, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of literature. **Journal Ethnopharmacology**, v.23, p. 127-149, 1988.

Ribeiro, V.L.S; Rolim, V; Bordignon, S.; Henriques, A.T.; Dorneles, G.G.; Limberger, R.P.; von Poser, G.L. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus*

(*Boophilus*) *microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v.102, n.3, p. 531-535, 2008.

Rodriguesa, F.G.; Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M. Synergy effects of antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v.16, n.11, p.1052-1055, 2009.

Ródio, C.; Vianna, D.R; Kowalski, K.P; Panatieri, L.F; von Poser, G; Rott, M.B.; In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitological Research**, v.104, p. 191–194, 2008.

Rucker, G. Sesquiterpenes. **Angewandte Chemie**, Internacional edition in English Edit, v.12, n.10, p.265-286, 1997.

Saravanan, C.; Cao, Z.; Kumar, J.; Qiu, J.; PlaunT, A.G.; Newburg, D.S.; Panjwai, N.; Milk Components inhibit *Acanthamoeba*-induced cytopathic effect. **Investigative Ophthalmology & Visual Science Invest**, v.49, n 3, p.1010 –1015, 2008.

Sauter, I.S.; Santos, J.C.; Apel, M.A.; Cibulski, S.P.; Roehle, P.M.; von Poser, G.L.; Rott, M.B. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology Research**, v.109, n.5, p. 1367-1371, 2011.

Schantz, M. Sonderabdruck aus der Farmaseuttinem Aikakauslehti. **Farmaceutiski Notisblad**, v.76, p.265.286, 1967.

Schwender, J.; Seemann, M.; Lichtenthaler, K.H.; Rohmer, M. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, steroids, prenyl side – chains of chlorophylls and plastoquinones) via a novel pyrovate/glyceraldehydes-3-phosphate non-mevalonate pathway in green alga *Scenedesmus obliquus*. **Biochemical Journal**, v.316, p.73 -78, 1997.

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

Silva V.A., Oliveira, C.R.M; Freitas, A.F.R; Costa, M.R.M; Pessôa, H.L.F; Pereira M. S.V. Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Müll. on bacteria that cause dental caries. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.40, n.2, p.69-72, 2011.

Simionatto, E.; Bonani, V.F.L.; Peres, M.T.L.P.; Hess, S.C.; Candido, A.C.S.; Diraimo, D.L.; Poppi, N.R.; Maria de Fatima.; C.M, Santos.; E.C.S.; Oguma,P.M.; De Carvalho, J.E. Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana baillon*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.12, n.3, p.250-261, 2009.

Simmons, P.A.; Tomlinson, A.; Seal, D.V.; The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. **Optometry & Vision Science**, v. 75, p. 860–866, 1998.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, Cap.18, p. 387-415, 2003.

Souza, M.A.A.; Souza, S.R.; Junior, V.F.V.; Cortez, J.K.P.C.; Leal, R.S.; Dantas.T.N.C.; Maciel, M.A.M. Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.1340-1349, 2006.

Schmidt, P.C.; List, P.H. **Phytopharmaceutical Technology**. Germany: CRC Press, University of Marburg, 1991.

Steele, C.L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. Sesquiterpene synthases from Grand Fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of δ -selinene synthase and gamma-humulene synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.4, p.2078-2089, 1998.

Steinegger, E.; Hänsel, R. **Pharmakognosie**. 5.ed. Berlin: Springer, 1992.

Sukh Dev. Terpenoids. In: J.W. Rowe. **Natural Products of Woody Plants**. Berlin: Springer-verlog, p. 697-807, 1989.

Tamble, Y; Tsujiuchi, H; Honda, G; Ikeshiro, Y; Tanaka, S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, betacaryophyllene. **Planta Medica**, v.62, p. 469-470, 1996.

Titrellini, B; Valesquez, E. R; Pellegrino, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. **Planta Medica**, v.62, n.4, p. 372-373, 1996.

Tomlinson, A.; Simmons, P.A.; Seal, D.V.; MC Fadyen, A.K. Salicylate inhibition of *Acanthamoeba* attachment to contact lenses: a model to reduce risk of infection. **Ophthalmology**, v. 107: 12–117, 2000.

Tyler, V. E; Robbers, J. E; Speedie, M. K. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins, USA, 1996.

Valgas, C; Souza, S.M; Smânia, E.F.A; Smânia Jr. A Screening method to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, n.2, p.369-380, 2007.

Vieira, P.R.N.; Cordeiro, R.; Brilhante, R.S.N.; Moraes, S.M; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Croton*

argyrophyloides e *Croton zehntneri* frente a cepas de *Trichophyton rubrum*. **47º CBQ. Iniciação Científica**, Natal- RN, 2007.

Visvesvara, G.S.; Schuster, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, p. 151-158, 2008.

Wagner, H.; Blatt, S.; Zgainski, E.M. **A thin Layer Chromatography Atlas. Plant Drug Analysis**. Berlin: Spring Verlag, 1984.

Wall, M.E; Wani, M.C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p.239-254, 1996.

Webster, G.L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae) **Taxon**, v. 42, p. 793-823, 1993.