

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

**Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante,
citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de
Croton tricolor Klotzsch ex Baill.**

INÁCIO RICARDO ALVES VASCONCELOS

JOÃO PESSOA
2015

INÁCIO RICARDO ALVES VASCONCELOS

**Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante,
citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de
Croton tricolor Klotzsch ex Baill.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa

JOÃO PESSOA

2015

V331i Vasconcelos, Inácio Ricardo Alves.

Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill / Inácio Ricardo Alves Vasconcelos.- João Pessoa, 2015.

90f. : il.

Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima

Coorientadora: Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. Plantas medicinais. 3 *Croton tricolor*. 4. Óleos essenciais. 5. Atividade antibacteriana. 6. Atividade antioxidante. 7. Citotoxicidade. 8 . Genotoxicidade.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

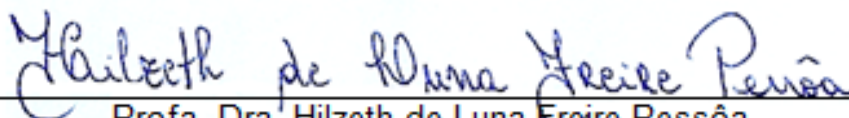
INÁCIO RICARDO ALVES VASCONCELOS

**Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante,
citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de
Croton tricolor Klotzsch ex Baill.**

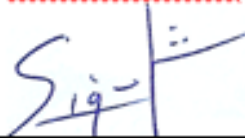
Banca Examinadora



Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora



Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Co-Orientadora



Prof. Dr. Jose Pinto de Siqueira Junior
Membro interno



Profa. Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
Membro externo

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Membro suplente

À minha família...

Meus pais: Seráfico Ricardo Vasconcelos (*In memoriam*)

Maria das Mercês Alves Vasconcelos

Meus sogros: Izonel Guimarães (*In memoriam*)

Maria Cleide Neves Guimarães (*In memoriam*)

Minha tia: Apolônia Miquelina Lacerda (*In memoriam*)

Minha irmã: Simone Alves Vasconcelos

Minha esposa: Mara Fernanda Neves Guimarães Vasconcelos

Minha filha: Lara Maria Guimarães Vasconcelos

...Por todo amor, carinho, compreensão e apoio.

Dedico

“Para cada tempestade; um arco-íris.
Para cada lágrima, um sorriso
Parar cada cuidado, uma promessa.
Para cada problema, a vida lhe traga
alguém fiel com quem possa dividi-lo.
Para cada olhar, uma doce canção.
Para cada oração, uma grande resposta.”
Pe. Fábio de Melo

AGRADECIMENTOS

À Deus, pai bondoso, por tudo!

À Nossa Senhora, intercessora fiel.

Aos meus pais, Seráfico (*in memorian*) e Maria das Mercês, por todo amor dedicado aos filhos, pelo exemplo de vida e dedicação à família, sempre incentivando e apoiando as conquistas.

Aos meus sogros, Sr. Izonel (*in memoriam*) e D. Cleide (*in memorian*), por me acolherem como um filho e torcerem por mim.

À minha querida tia, Apolônia (*in memoriam*), minha segunda mãe, por todo amor.

À minha irmã, Simone, pelo companheirismo e amor fraterno.

À minha esposa, Mara, por todo amor, dedicação, paciência e compreensão. Pelas palavras de apoio e incentivo nessa conquista.

À minha filha, Larinha, por compreender minha ausência durante o desenvolvimento das minhas atividades.

À minha orientadora, profa. Edeltrudes de Oliveira Lima, por ter me aceitado nesta orientação, pela paciência e consideração de sempre. Exemplo de profissionalismo.

À minha co-orientadora profa. Hilzeth de Luna Freire Pessoa, pela grande oportunidade de aprendizado tendo me aceitado nesta orientação, pela paciência, atenção, me disponibilizando seu precioso tempo... Eu não teria chegado até aqui sem o seu apoio.

À profa. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, pelo apoio para a realização desse objetivo.

À todos os professores do mestrado do PgPNSB, pelos ensinamentos.

Aos membros da banca, Prof. Jose Pinto de Siqueira Junior e Profa. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima, pela disponibilidade para a avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas, Karla Germana, Rubens e João Carlos, pelo incentivo.

A todos os colegas de pós-graduação, que de forma direta ou indireta contribuíram e fizeram parte dessa etapa de aprendizado.

Às colegas de laboratório, Camila e Ingrid, pelos momentos de companheirismo.

Aos funcionários do PgPNSB que me apoiaram nessa conquista, em especial Caroline Manguiera, sempre atenciosa, paciente e prestativa.

A todos os meus amigos e familiares que torciam por mim.

RESUMO

VASCONCELOS, I. R. A. **Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill.** 89p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

A utilização de produtos naturais pelo homem remonta às origens da espécie humana, que ao longo do processo evolutivo, foi aprendendo a selecionar plantas para a sua alimentação e para o alívio de seus males e doenças. Óleos essenciais são constituintes orgânicos complexos, produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários, conhecidos por suas propriedades medicinais. *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill pertencente a família Euphorbiaceae com propriedades antimicrobiana e antioxidante. Este estudo objetivou avaliar a atividade antibacteriana frente a linhagens bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli*), bem como as atividades antioxidante, citotóxica e genotóxica do óleo essencial do caule de *C. tricolor* (Ct-OEc). A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição e a caracterização do efeito bactericida por plaqueamento e espectrofotometria. A citotoxicidade *in vitro*, foi determinada pela quantificação da hemólise frente a eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O. A investigação da genotoxicidade *in vivo* foi realizada através do teste de micronúcleo em camundongos Swiss. Os resultados obtidos indicam a presença de atividade antibacteriana do Ct-OEc frente as cepas de *S. aureus* ATCC 25925 e *E. coli* ATCC 2536, *E. coli* ATCC 8539, *E. coli* 101 e *E. coli* 105 na concentração de 1 mg.mL⁻¹ (CIM). O Ct-OEc não apresenta efeito oxidante nas concentrações testadas e apresenta efeito antioxidante na concentração de 1000µg/mL. A avaliação da atividade hemolítica do Ct-OEc frente aos eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O promoveu hemólise de baixa a moderada até a concentração de 100 µg/mL. Na avaliação do potencial genotóxico, através do teste do micronúcleo em camundongos, verificou-se que o Ct-OEc não provocou o aumento da frequência de micronúcleos no sangue periférico dos camundongos. Sendo assim foi concluído que o óleo essencial de *Croton tricolor* apresenta atividade antibacteriana, sem efeitos sobre a membrana celular, quando em baixas concentrações, sem induzir atividade oxidante, apresenta atividade antioxidante, sem efeitos aneugênicos e clastogênicos.

Palavras chave: Produtos naturais, plantas medicinais, *Croton tricolor*, óleos essenciais, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, citotoxicidade, genotoxicidade.

ABSTRACT

VASCONCELOS, I. R. A. **Research of antibacterial effects, antioxidant, cytotoxic and genotoxic of the essential oil of the stem of *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill.** 89p. (Master's Degree in Bioactive Synthetic and Natural Products – Concentration Area: Pharmacology) – Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2015

The use of natural products by man goes back to the origins of the human species, which over the evolutionary process, was learning how to select plants for their food and for the relief of their ailments and diseases. Essential oils are complex organic constituents produced by aromatic plants as secondary metabolites, known for its medicinal properties. *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill is a species belonging to Euphorbiaceae family, with antimicrobial and antioxidant properties. This study aimed to evaluate the antibacterial activity against Gram positive bacterial strains (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*), as well as antioxidant activity, cytotoxic and genotoxic of the essential oil of *C. tricolor* stem (Ct-OEC). The antibacterial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution technique and characterization of the bactericidal effect by plating and spectrophotometry. The oxidant and antioxidant activities were determined in human blood type O erythrocytes in the absence and presence of phenylhydrazine. The in vitro cytotoxicity was determined by quantification of the hemolysis against human red cells of blood types A, B and O. The investigation of genotoxicity in vivo was performed using the micronucleus test in Swiss mice. The results indicate the presence of antimicrobial activity Ct-OEC front strains of *S. aureus* ATCC 25925 and *E. coli* ATCC 2536, *E. coli* ATCC 8539, *E. coli* 101 and *E. coli* 105 at a concentration of 1 mg. ml⁻¹ (MIC). The Ct-OEC has no oxidizing effect at the concentrations tested and displays antioxidant effect at the concentration of 1000µg/mL. In evaluating the genotoxic potential by micronucleus test in mice, it was found that Ct-OEC not led to increased frequency of micronuclei in the peripheral blood of mice. Thus it was concluded that the essential oil of *Croton tricolor* has antibacterial activity, no effects on cell membrane, in low concentrations, without inducing oxidative, has antioxidant activity, without aneugenic and clastogenic effects.

Key-words: Natural products, medicinal plants, *Croton tricolor*, essential oils, antibacterial activity, antioxidant activity, cytotoxicity, genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica da família Euphorbiaceae	24
Figura 2	Localização do Bioma caatinga no Brasil.	25
Figura 3	Distribuição geográfica do gênero <i>Croton</i>	26
Figura 4	<i>Croton tricolor</i> Klotsch ex Baill	28
Figura 5	Efeito do Ct-OEc sobre as linhagens de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	49
Figura 6	Efeito do Ct-OEc frente a hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos.	51
Figura 7	Efeito do Ct-OEc frente a hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.	52
Figura 8	Efeito do Ct-OEc sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A.	53
Figura 9	Efeito do Ct-OEc sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B.	54
Figura 10	Efeito do Ct-OEc sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O.	54
Figura 11	Efeito do Ct-OEc sobre os cromossomos de camundongo.	55
Figura 12	Fotomicrografia ilustrativa da ocorrência de micronúcleos.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constituintes do Ct-OEc	40
Tabela 2	Concentração inibitória mínima (CIM) do Ct-OEc frente às linhagens bacterianas	48
Tabela 3	Efeito do Ct-OEc frente à hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos.	50
Tabela 4	Efeito do Ct-OEc frente à hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.	51
Tabela 5	Porcentagem de hemólise induzida por Ct-OEc frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O.	53
Tabela 6	Número de micronúcleos formados após tratamento com o diluente da amostra, Ct-OEc e ciclofosfamida.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- **ATCC**- American Type Culture Collection
- **AVMA** - Associação Americana de Medicina Veterinária
- **Bioger** - Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia
- **CAT** - Catalase
- **CBM** - Concentração bactericida mínima
- **CCS** - Centro de Ciências da Saúde
- **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- **CFMV** - Conselho Federal de Medicina Veterinária
- **CIM** - Concentração inibitória mínima
- **CIS** - Comissões Interinstitucionais de Saúde
- **Ct-OEc** – Óleo essencial do caule de *Croton tricolor*
- **DBM** - Departamento de Biologia Molecular
- **DMSO** – Dimetilsulfóxido
- **DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- **ERN** - Espécies reativas de nitrogênio
- **ERO** - Espécies reativas de oxigênio
- **GPX** - Glutathione peroxidase
- **Hb** - Hemoglobina
- **LB** - Luria Bertani
- **MetHb** - Metahemoglobina
- **MS** - Ministério da Saúde
- **OMS**- Organização Mundial de Saúde
- **PH** - Fenilhidrazina
- **rpm** - Rotações por minuto
- **SOD** - Superóxido dismutase
- **SUS** - Sistema Único de Saúde
- **UFC** - Unidades formadoras de colônias
- **UFPB** - Universidade Federal da Paraíba
- **UESB** - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

SUMÁRIO

	Pag
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Produtos Naturais.....	16
2.2 Plantas medicinais.....	17
2.3 Metabolismo Secundário Vegetal.....	19
2.4 Óleos essenciais.....	20
2.5 Família Euphorbiaceae.....	23
2.6 Genero <i>Croton</i>	26
2.7 <i>Croton tricolor</i> Klotzsch ex Baill.....	27
2.8 Resistência bacteriana.....	29
2.9 Atividade Oxidante e antioxidante.....	31
2.10 Toxicidade dos produtos de origem vegetal.....	34
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Geral.....	38
3.2 Específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Local da Pesquisa.....	39
4.2 Óleos essenciais.....	39
4.3 Preparação da Amostra de Ct-OEc para os ensaios.....	40
4.4 Cepas Bacterianas.....	41
4.5 Meios de Cultura.....	41
4.6 Obtenção do Inóculo Bacteriano.....	42
4.7 Avaliação da atividade antibacteriana.....	42
4.7.1 Caracterização da atividade antibacteriana.....	43
4.7.2 Caracterização do mecanismo de ação bactericida.....	43
4.8 Eritrócitos humanos.....	44
4.9 Avaliação da atividade Oxidante e Antioxidante.....	44
4.10 Avaliação da atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos.....	45
4.11 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico pelo teste do micronúcleo em roedores <i>in vivo</i>	45
4.12 Análise Estatística.....	46

5. RESULTADOS.....	48
5.1 Avaliação da atividade antibacteriana.....	48
5.2 Caracterização da atividade antibacteriana.....	48
5.3 Caracterização da atividade bactericida.....	49
5.4 Avaliação da atividade Oxidante e Antioxidante.....	50
5.5 Avaliação da atividade hemolítica	52
5.6 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico	55
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para o tratamento e cura de enfermidades remonta às origens da espécie humana. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas foi, talvez, uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JR., 2006).

Observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Assim, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém válida a prática de consumo de fitoterápicos, tornando relevantes informações terapêuticas que foram sendo adquiridas durante séculos (MACIEL, 2002).

Grande parte dos componentes ativos de medicamentos têm como fonte os produtos naturais, incluindo plantas, animais e minerais, que tem sido a base do tratamento de doenças humanas (PATWARDHAN, 2004). Na atual fase de desenvolvimento de drogas, muitos candidatos promissores a medicamentos são de origem vegetal (HARVEY, 2008). Várias razões podem explicar o sucesso de produtos naturais na descoberta da droga: a sua alta diversidade química, os efeitos da pressão evolutiva para criar moléculas biologicamente ativas, a similaridade estrutural das proteínas alvo em muitas espécies, etc (HARVEY, 2007).

A pesquisa a partir de produtos naturais explora a grande variedade de estruturas que podem ser utilizadas como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos e isso tem recuperado a atenção da indústria farmacêutica para a descoberta de medicamentos a partir de fontes naturais (PATWARDHAN, 2004). Não há dúvida de que os produtos naturais têm sido, e continuarão sendo, fontes importantes de novos compostos farmacêuticos (LAHLOU, 2007).

Dentre as famílias botânicas produtoras de óleos essenciais com ações farmacológicas destacamos a família Euphorbiaceae, a qual possui cerca de 300 gêneros e mais de 8000 espécies de árvores, arbustos e ervas conhecidas. Os 300 gêneros de Euforbiáceas estão agrupados em 52 tribos e

5 subfamílias, com diversas destas tribos sendo divididas em subtribos. A distribuição geográfica dos gêneros das Euforbiáceas concentrava-se, primitivamente, na África e Madagascar, mas algumas subfamílias se dispersaram em centros neotropicais (WEBSTER, 1994; RADCLIFFE-SMITH, 2001).

Entre a diversidade de espécies da família Euphorbiaceae destaca-se a *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill, espécie nativa da caatinga do Nordeste do Brasil a qual se caracteriza pela deficiência hídrica originada da baixa pluviosidade, da elevada evapotranspiração, da má distribuição pluviométrica ao longo do ano e da baixa capacidade de retenção de água dos solos, em geral rasos e pedregosos (RODAL; SAMPAIO; FIGUEIREDO, 2013). Conhecido popularmente como marmeleiro prateado é um arbusto de ramos delgados, cilíndricos, cinerescents e escabros, sendo as cascas do caule utilizadas para tratar cólicas intestinais (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; CATUNDA JUNIOR., 2003).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, sendo o reino vegetal o maior responsável pelo fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de enfermidades que acometem os seres humanos. A variedade e a complexidade dos metabólitos secundários, biossintetizados pelas plantas e organismos marinhos, ainda é inalcançável através dos métodos laboratoriais (VIEGAS JR., 2006).

Óleos essenciais são constituintes orgânicos naturais complexos, produzidos pelas plantas aromáticas como metabólitos secundários. São voláteis e responsáveis pela fragrância de muitas plantas. São obtidos, geralmente, por hidro-destilação e conhecidos por suas propriedades medicinais, sua fragrância e propriedades antissépticas, agindo contra vírus, bactérias e fungos. São utilizados na preservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolítico. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules das plantas (BAKKALI et al., 2008; TISSERAND; BALACS, 1999).

O surgimento da resistência aos antibióticos ocorre como uma consequência natural da adaptação da célula bacteriana à exposição aos antibióticos, e o uso abusivo e indiscriminado desses agentes antimicrobianos aumenta a pressão seletiva, criando essa oportunidade que facilita a aquisição de mecanismos de resistência (SANTOS, 2004)

Considerada um grande problema para a saúde pública mundial, a resistência bacteriana é o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, visto que o número de antibióticos válidos disponíveis continua a reduzir (OLIVEIRA; SILVA, 2008; BENGHEZAL et al., 2007). Com base nisso, a busca por novos princípios ativos eficazes no combate às bactérias multirresistentes é necessária, e os vegetais são uma excelente fonte destes compostos, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003).

A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública, uma vez que estas podem desencadear reações adversas pela toxidez de seus próprios constituintes, ação sinérgica com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do paciente (idade, sexo, condições fisiológicas, características genéticas, entre outros) (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BALBINO; DIAS, 2010). Diante disso, verifica-se a importância da pesquisa de outras atividades, além das ações farmacológicas dos produtos naturais, pois alguns de seus constituintes biologicamente ativos podem ser tóxicos para as células assim como mutagênicos e/ou carcinogênicos (LOURENÇO et al., 2010).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill (Ct-OEc) frente a linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como as atividades oxidante e antioxidante, além de investigar a atividade citotóxica *in vitro* e genotóxica *in vivo* em células eucarióticas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produtos Naturais

A natureza tem continuamente nos oferecido um amplo e estruturalmente diversificado arsenal de compostos farmacologicamente ativos que continuam sendo utilizados como drogas altamente efetivas para combater várias doenças ou como estruturas básicas para o desenvolvimento de novas drogas sinteticamente modificadas (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002).

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura, dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica - escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (MACIEL, 2002).

A identificação dos produtos naturais genuínos conduz a aplicação de novas metodologias orgânicos sintéticos, biotransformação, biossíntese combinatória e combinações dessas técnicas para a modificação das ligações dos produtos naturais o que pode gerar um grande número de novos análogos estruturalmente diversos que podem ser selecionados para melhoria das propriedades ou novas atividades (LAM et al., 2007).

A maior vantagem da triagem de produtos naturais é a sua diversidade estrutural que é maior que a que é fornecida pela maioria das estratégias combinatórias baseadas em compostos heterocíclicos. Além disso, muitos produtos naturais são relativamente pequenos (<1000 Da) e eles apresentam propriedades semelhantes às drogas, isto é, são capazes de serem absorvidos e metabolizados pelo organismo. Produtos naturais bioativos frequentemente ocorrem como parte de uma família de moléculas

relacionadas de forma que é possível isolar várias moléculas homólogas e obter informações de estrutura e de atividade (HARVEY, 1999). Uma poderosa estratégia para descobrir novos metabólitos é acessar fontes de organismos que ainda não foram exploradas (GULLO; HUGHES, 2005).

Uma abordagem multidisciplinar para a descoberta de medicamentos, envolvendo a geração de diversidade molecular verdadeiramente nova a partir de fontes de produtos naturais, combinado com metodologias sintéticas totais e combinatória, e incluindo a manipulação das vias biossintéticas, vai continuar a fornecer a melhor solução para a atual crise de produtividade enfrentada pela comunidade científica envolvida na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

As indústrias farmacêuticas foram, e continuam sendo, beneficiadas pelos conhecimentos populares sobre o uso medicinal das plantas e 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006, pelo FDA, são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais. As chances de se obter novas entidades químicas de plantas, fungos, bactérias de origem terrestre ou marinha são reais (FERREIRA; PINTO, 2010).

2.2 Plantas medicinais

Ao longo do processo evolutivo, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para a sua alimentação e para o alívio de seus males e doenças. O resultado desse processo é que muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais (FERREIRA; PINTO, 2010).

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

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998).

A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas”. Neste último caso encontra-se o fitofármaco, que por definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos (WALL; WANI, 1996). As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos medicamentos (MACIEL, 2002).

A variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes, oriundas do metabolismo secundário vegetal, torna interessante a pesquisa de novos fármacos a partir de plantas.

No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS). Para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição sócio-econômica da população (VEIGA JUNIOR, 2008).

2.3 Metabolismo Secundário Vegetal

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008).

Os metabólitos secundários, aparentemente não possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta. Eles possuem ações biológicas que garantem benefícios adaptativos, protegendo as plantas contra herbívoros e infecções causadas por micro organismos patogênicos, agindo como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e dispersores de sementes, bem como funcionam como agentes de competição entre

plantas e de simbiose entre plantas e micro organismos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). Sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria entre outras (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos principais: os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados, todos provenientes do metabolismo da glicose, via ácido chiquímico e acetato (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008).

Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana e animal (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas e líquidas, sendo a volatilidade uma das suas principais

características, o que os difere dos óleos fixos e misturas de substâncias lipídicas, além de possuírem um intenso e agradável aroma, sendo, por isso, também chamados de essências (SIMÕES et al., 2007).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (BAKKALI et al., 2008).

Eles são normalmente formados em células especiais ou grupos de células, encontradas em folhas e caules, e geralmente concentrados em uma determinada região, tais como folhas, cascas e frutos (OUSSALAH et al., 2007). Pertencentes ao metabolismo secundário das plantas, a composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos e por interações entre a planta e o ambiente no qual ela se encontra, que podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Dentre os fatores ambientais podemos ressaltar interações planta-micro organismos, planta-insetos e planta-planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita, podendo, ainda, apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, exercendo influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

Os óleos essenciais têm uma composição complexa, contendo de algumas dezenas a várias centenas de constituintes, especialmente hidrocarbonetos (terpenoides) e compostos oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, óxidos, lactonas, éteres, acetais e ésteres). Ambos, os hidrocarbonetos e compostos oxigenados, são responsáveis pelos odores característicos e sabores (ANITESCU; DONEANU; RADULESCU, 1997).

Os compostos terpênicos mais frequentes encontrados nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2007). Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais, além de serem de grande importância na indústria de perfumes e fragrância, alguns

deles estão sendo reconhecidos por suas propriedades flavorizantes e medicinais. Os sesquiterpenos por sua vez, possuem um maior número de representantes, estando presentes em óleos essenciais de várias plantas, eles participam ativamente nos processos de interações entre planta-planta, planta-inseto e planta-patógeno, servindo de proteção contra ataques de predadores (FEHLBERG, 2011).

São compostos de substâncias lipofílicas, contendo os componentes de aroma voláteis do material vegetal, que também estão envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas. Os óleos essenciais representam uma pequena fração da composição de uma planta, mas confere as características para as quais plantas aromáticas são utilizadas nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria. A proporção dos compostos individuais na composição do óleo é muito diferente desde de traços até mais de 90%. O aroma de cada óleo é o resultado da combinação de todos os componentes de aromas. Componentes vestigiais são muito importantes, uma vez que dão ao óleo um odor característico e natural. Assim, é importante que o procedimento de extração utilizado para recuperar óleos essenciais a partir de matriz de planta possa manter a proporção natural dos seus componentes originais (ANITESCU; DONEANU; RADULESCU, 1997).

A extração dos óleos essenciais pode ser realizada através de diversas técnicas, entre elas enfloração, arraste por vapor d'água, extração por solventes orgânicos, prensagem (ou expressão), extração por CO₂ supercrítico, com a metodologia podendo variar de acordo com sua localização na planta (flores, folhas, cascas, raízes e rizomas) e com sua utilização (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais podem ser obtidos a partir de raízes e rizomas (como o gengibre), folhas (hortelã, orégano e eucalipto), cascas e ramos (canela, cânfora), flores (jasmim, rosa, violeta e lavanda) e frutos e sementes (laranja, limão, pimenta, noz-moscada). Em geral, o óleo essencial representa menos de 5% da matéria seca vegetal. Apesar de todas as partes da planta poderem conter óleos essenciais, a sua composição pode variar de acordo com a parte da planta utilizada como matéria-prima. Outros fatores, como o cultivo, o solo e as condições climáticas e época de colheita também

pode determinar a composição e qualidade do óleo essencial (PEREIRA et al, 2008. NAPOLI; CURCURUTO; RUBERTO, 2010).

Mesmo quando coletados em órgãos distintos, os óleos essenciais apresentam coloração e viscosidade semelhantes, todavia, a composição química, as características físico-químicas e o odor podem variar consideravelmente dependendo da época da coleta, uma vez que, algumas espécies apresentam, em períodos específicos, maior quantidade tecidual de óleos voláteis (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; CASTRO et al., 2004). Outros fatores, como o estágio de desenvolvimento da planta, condições climáticas e de solo (temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e sazonalidade), também influenciam na composição desses óleos interferindo diretamente na produção dos metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Óleos essenciais extraídos a partir de uma grande variedade de plantas e ervas foram tradicionalmente empregados na fabricação de produtos alimentares, cosméticos, produtos de limpeza, perfumes, herbicidas e inseticidas. Além disso, várias dessas plantas têm sido usadas na medicina tradicional desde a antiguidade como digestivos, diuréticos, expectorantes, sedativos, etc., e estão realmente disponíveis no mercado como infusões, comprimidos e/ou extratos (FORNARI et al., 2012).

A grande variedade de ações farmacológicas demonstrada pelos óleos essenciais, entre as quais estão ação antiparasitária, antimicrobiana, analgésica, diurética, antimalárica, antihemorroidária, miorelaxante, antiespasmótica, antiinflamatória, anticonvulsivante e gastroprotetora, os tornam potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (OLIVEIRA et al., 2001; ABDON et al., 2002).

2.5 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é composta de 334 gêneros e mais de 8.000 espécies (WEBSTER, 1994; RADCLIFFE-SMITH, 2001), de distribuição cosmopolita atingindo sua máxima densidade nas regiões

tropicais e subtropicais, nos vários tipos de vegetação e habitats (Figura 1), sendo uma das maiores, complexa e diversificada família de Angiospermas (SECCO et al., 2012). Pertencente à ordem Malpighiales, apresenta como uma das principais características botânicas a produção de plantas tóxicas latescente. Constitui a sexta maior família depois das Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Rubiaceae, sendo compreendida de espécies de ervas, subarbustos, trepadeiras e árvores, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. (SANTOS; MACHADO; LOPES, 2005; LIMA, 2006; OLIVEIRA; GIMENEZ; GODOY, 2007).

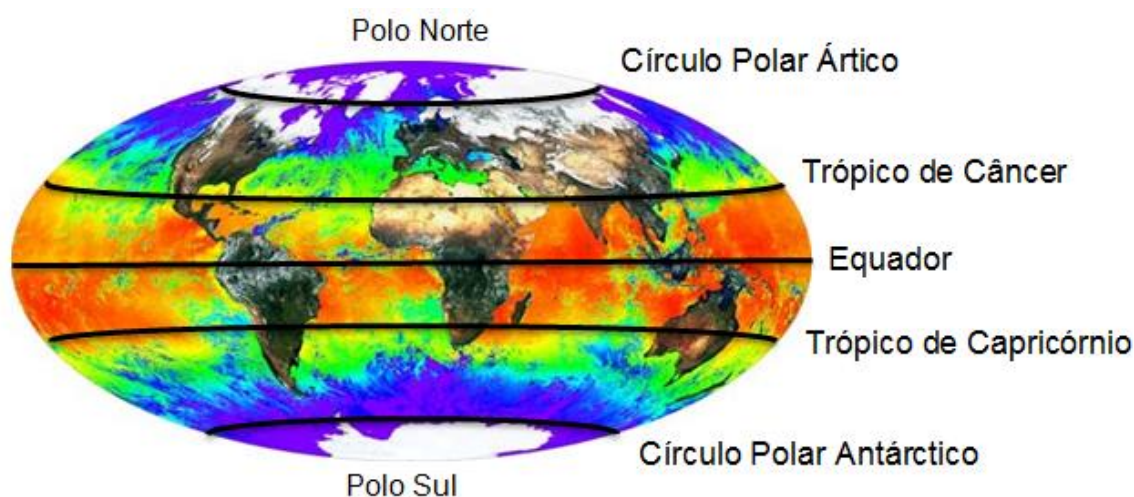


Figura 1. Distribuição geográfica da família Euphorbiaceae

Fonte: Adaptação de figura extraída de <http://diariodoverde.com/climas-do-mundo/>

Essa família é considerada uma das mais importantes do grupo das Angiospermas, destacando-se pela importância econômica de algumas espécies, especialmente no setor farmacológico-medicinal, industrial, madeireiro, ornamental e na produção de alimentos, como por exemplo *Hevea brasiliensis* (seringueira), produtora de látex, conhecida como a árvore da borracha, *Ricinus communis* (mamona), 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 *Manihot esculenta* (mandioca) é utilizada como fonte primária de alimento, de onde é extraída a farinha de mandioca que é consumida em todo o Brasil e também em muitos países Africanos, estando entre os 13 alimentos mais importantes para os

seres humanos. Muitas são utilizadas como plantas ornamentais, especialmente da *Euphorbia* (poinsettia), *Codiaeum* (Croton), *Phyllanthus* (Otaheite groselha) (SCHULTES, 1987; WATSON, 2014; VUNDA, 2011; SECCO et al., 2012, ALVES, 1998).

Entre as plantas pertencentes à família Euphorbiaceae com uso medicinal amplamente registrado na literatura etnofarmacológica podem ser destacadas *Phyllanthus niruri* L.(quebra-pedra), *Jatropha gossypifolia* L. (pinhão-roxo), *Ricinus communis* L. (mamona), além de diversas espécies do gênero *Croton* L. (PIO-CORREA, 1974; LORENZI; MATOS, 2002).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, compreendendo uma área de 844.453 km², correspondente a 9,92% do território nacional. Politicamente, coincide com grande parte da região Nordeste do país, composta por nove estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe), e pequena parte da região Sudeste (porção Norte do Estado de Minas Gerais), Figura 2 (HAUFF, 2010, IBGE, 2004). É considerada atualmente um rico bioma brasileiro, com uma diversidade vegetal de elevado potencial econômico e farmacológico. Grande parte do seu patrimônio químico e biológico é encontrado apenas no Brasil (IBAMA, 2010).

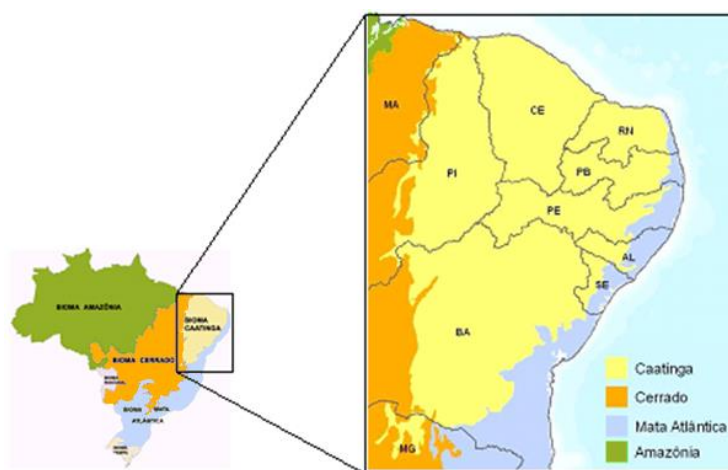


Figura 2. Localização do Bioma caatinga no Brasil.
Fonte: adaptado de Hauff, 2010 e IBGE, 2004.

Euphorbiaceae é a segunda família mais representativa da Caatinga

em número de espécies, superada apenas por Leguminosae. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies desta família, difundidas em todos os tipos de vegetação e apresentando diversas formas de vida. Seus principais gêneros com respectivos números de espécies são: *Euphorbia* (1.500), *Croton* (1200), *Phyllanthus* (400), *Acalypha* (400), *Macaranga* (400), *Antidesma* (150), *Drypetes* (150), *Jatropha* (150), *Manihot* (150) e *Tragia* (150) (BARROSO, 1991; WEBSTER, 1993; SANTOS; MACHADO; LOPES, 2005; BERRY et al., 2005).

2.6 Genero *Croton*

O gênero *Croton* é o segundo maior e mais diverso da família *Euphorbiaceae* (LIMA, 2006), subdividido em 40 seções com cerca de 1200 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais de todo mundo (Figura 3). No Brasil, é o gênero com maior número de representantes da família, com um 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; CARNEIRO-TORRES, 2006).

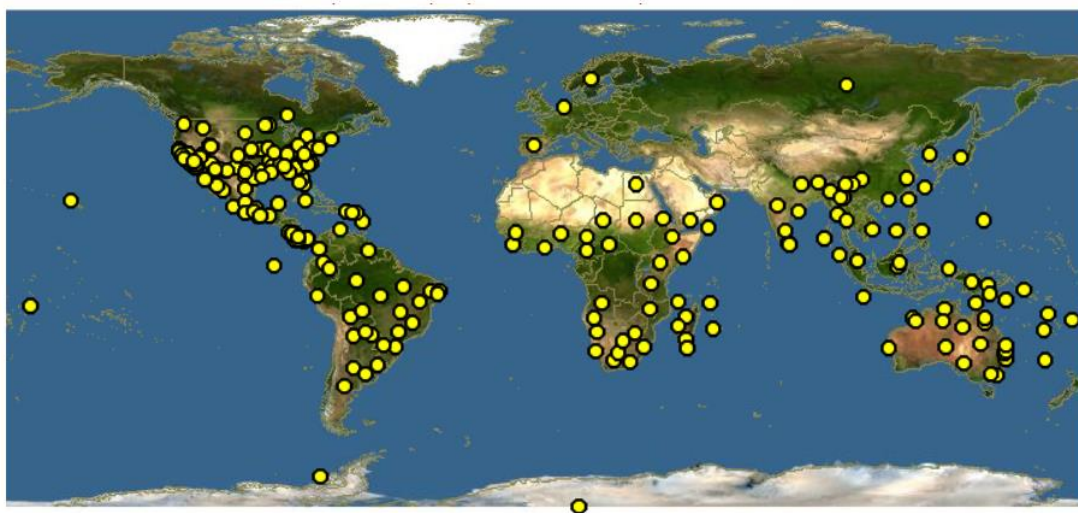


Figura 3. Distribuição geográfica do gênero *Croton* (●).

Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?&kind=Croton>

O gênero *Croton* é particularmente rico em metabólitos secundários e

estudos fitoquímicos têm conduzido ao isolamento de alcalóides, flavonóides, terpenóides, lignanas, etc. Muitas das espécies são produtoras de óleos essenciais cuja composição é rica em mono- e sesquiterpenóides além de fenilpropanóides (PALMEIRA JUNIOR; CONSERVA; BARBOSA FILHO, 2006). Várias espécies do gênero *Croton* são ricas em constituintes que apresentam atividades biológicas e desempenham papel importante na terapêutica tradicional como plantas medicinais na África, Ásia e América do Sul (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

O gênero *Croton* é representado por ervas, arbustos e árvores, difundidos em zonas tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia (Figura 3) (GOVAERTS; FRODIN; RADCLIFFE-SMITH, 2000). Em geral, preparações, na forma de infusões, chás e emplastos, com partes das espécies deste gênero são usados como: estimulante, inseticida, vermífugo, diurético, antisséptico, purgativo, analgésico, antipirético, cicatrizante e antimicrobiano. Da mesma forma preparações de espécies de *Croton* são aplicadas no tratamento de: tumor, câncer, epilepsia, anorexia, ansiedade, reumatismo, inflamação, malária, diarreia, tuberculose, dor de cabeça e em uma série de sintomas gastrointestinais (PALMEIRA JUNIOR; CONSERVA; BARBOSA FILHO, 2006).

O gênero *Croton* possui diversas espécies produtoras de óleos essenciais. Análises químicas dos óleos essenciais de algumas espécies reportam que monoterpenóides, sesquiterpenóides e fenilprenóides são os constituintes majoritários. Atualmente inúmeros trabalhos têm sido publicados tratando das propriedades biológicas dos óleos. Entre elas destacam-se as atividades gastroprotetiva, miorelaxante, antiespasmódica, antinociceptiva e sobre alterações comportamentais (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Devido a diversidade do uso popular e atividades biológicas, espécies do gênero *Croton* atraem o interesse para o seu estudo como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais bioativos (DOURADO, 2003).

2.7 *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill.

Croton tricolor, conhecido como marmeleiro prateado, é um arbusto de ramos delgados, cilíndricos, cinerescentes e escabros (figura 4). É nativo da caatinga do Nordeste do Brasil (CATUNDA JUNIOR., 2003). Apresenta padrão de distribuição disjunto entre a porção norte da América do Sul (Colômbia, Venezuela) e a porção leste do Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe, São Paulo e Paraná). Ocorre em ambientes xéricos integrando a vegetação de caatinga sobre solo arenoso ou pedregoso, sendo mencionada principalmente para serras e chapadas de origem sedimentar (Chapada do Araripe, Serra Negra no município de Floresta). (SILVA et al., 2010).



Figura 4: *Croton tricolor* Klotsch ex Baill

Fonte: <http://www.herbariova.org/imglib/seinet/ASU/ASU0028/ASU0028593.jpg>

De acordo com Morais et al. (2006a), esta espécie não é usada popularmente por causa do aspecto não atrativo de suas folhas. Alguns

trabalhos recentes mostram resultados importantes sobre a atividade antioxidante e antibacteriana do seu óleo essencial contra *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (CANUTO, 2005).

Gomes, Sales e Melo (2010), propõem *Croton argyrophylloides* Müll. Arg. como sendo um sinônimo de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill, em virtude de que Müller (1865) utilizou os caracteres da estípula e tamanho das flores para separar *C. argyrophylloides* (estípulas recurvas, flores maiores) de *C. tricolor* (estípulas incurvas, flores menores). No entanto, a análise das coleções-tipo e de materiais de diferentes localidades (Venezuela, Brasil, Colômbia) de *C. tricolor*, evidenciou que as estípulas são muito variáveis na forma (lanceoladas a auriculadas, incurvas ou recurvas) até num mesmo indivíduo. Por esse motivo, *C. argyrophylloides* é proposto como um sinônimo de *C. tricolor* Klotzsch ex Baill. Portanto, dados e pesquisas realizadas com *Croton argyrophylloides* Müll. Arg. e *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill, certamente, fazem referência a mesma espécie vegetal.

2.8 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é um fenômeno relacionado à formação de cepas não sensíveis aos antibióticos, que são capazes de se multiplicar mesmo na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas convencionais e ocorre devido à evolução natural dos micro organismos, além do uso desmedido e irracional destes agentes nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (WANNMACHER, 2004; HOEFLER et al., 2006).

Tem sido grande o impacto clínico e econômico em decorrência da presença de micro organismos resistentes, particularmente no ambiente hospitalar, citando-se *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* como os agentes multirresistentes mais comuns de infecções nosocomiais (BERNARDES; JORGE; LEÃO, 2004; SADER et al., 2001). As infecções causadas por estes patógenos constituem um importante desafio clínico, uma

vez que os *S. aureus* apresentam alta capacidade de desenvolver resistência devido a uma maior adaptação sob pressão seletiva do uso intenso de antimicrobianos e *P. aeruginosa* é caracterizada pela suscetibilidade natural a um número limitado de agentes (KOBAYASHI; SADOYAMA; VIEIRA, 2009).

Essa grande resistência que os micro organismos vêm adquirindo aos mais diversos tipos de antibióticos vem despertando o interesse de pesquisadores a buscar novos medicamentos que sejam eficazes no tratamento de doenças causadas por eles. Os vegetais são uma excelente fonte de busca, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003).

A diversidade estrutural de compostos derivados de plantas é imenso e o impacto da atividade antimicrobiana produzida contra micro organismos depende da sua configuração estrutural. Os compostos fenólicos possuem grandes variações estruturais e são um dos mais diversos grupos de metabólitos secundários. Acredita-se que os grupos hidroxila (-OH) em compostos fenólicos provocam ação inibitória (LAI; ROY, 2004), uma vez que estes grupos podem interagir com a membrana celular das bactérias para romper estruturas membranares e fazer com que haja perda de componentes celulares (XUE; DAVIDSON; ZHONG, 2013).

Os compostos fenólicos também atuam como antioxidantes. A presença de um grupo -OH livre em compostos fenólicos resulta nas propriedades antioxidantes. Esta propriedade tem sido relatado por inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como a eliminação de radicais livres reduzindo assim o potencial redox do meio de crescimento (CUEVA et al., 2010; STOJKOVIĆ et al., 2013). Esta diminuição do potencial redox pode restringir ainda mais o crescimento de micro-organismos indesejáveis (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Embora as propriedades antibacterianas de óleos essenciais sejam reconhecidas, o recente interesse em alternativas antimicrobianos de origem natural levou a um interesse científico renovado nestas substâncias. Muitos estudos *in vitro* relatam uma alta eficácia dos óleos essenciais contra os

agentes patogênicos de origem alimentar e bactérias de deterioração (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; ELGAYYAR et al., 2001; DORMAN; DEANS, 2000).

Em bactérias, a permeabilização das membranas está associada à perda de íons e de redução do potencial de membrana, o colapso da bomba de prótons e esgotamento do pool de ATP (KNOBLOCH et al., 1989; SIKKEMA; De BONT; POOLMAN, 1994; HELANDER et al., 1998; ULTEE et al., 2000, 2002; DI PASQUA et al., 2006; TURINA et al., 2006). Os óleos essenciais podem coagular o citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998) e danificar lipídios e proteínas (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; BURT, 2004). Os danos para a parede celular e membrana pode levar a perda de macromoléculas e à lise (JUVEN et al., 1994; GUSTAFSON et al., 1998; COX et al., 2000; LAMBERT et al., 2001; OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006).

Óleos essenciais de plantas têm sido usados por centenas de anos como medicamentos naturais de luta contra uma grande variedade de agentes patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

2.9 Atividade Oxidante e antioxidante

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). São produzidos continuamente durante os processos metabólicos, cumprindo funções biológicas essenciais, e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo (SHAMI; MOREIRA, 2004). Os mecanismos de geração desses radicais livres, ocorrem normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (BARBOSA et al., 2010) sendo a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, a principal fonte geradora de radicais livres (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou em resposta a uma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente. (VISIOLI; KEANEY JR; HALLIWELL, 2000; FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2000; PIETTA, 2000).

Dentre os radicais livres estão incluídos o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a hidroxila ($OH^{\bullet}$), o hidroperóxido ($HO_2^{\bullet}$), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$) (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Pequenas quantidades de EROs, incluindo radicais hidroxila (OH), ânions superóxido (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são constantemente geradas em organismos aeróbicos em resposta a ambos os estímulos, externos e internos (HURST et al., 1997; JORNOT; PETERSEN; JUNOD, 1998; MILLS et al., 1998). O radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (ANDERSON, 1996).

As ERO, bem como ERN, são produtos do metabolismo celular normal e são conhecidos por desempenhar um papel duplo, podendo ser prejudiciais ou benéficos para sistemas vivos (VALKO et al., 2006): Os efeitos benéficos das ERO ocorrem em concentrações baixas/moderadas e envolvem funções fisiológicas nas respostas celulares a agentes nocivos, como por exemplo na defesa contra agentes infecciosos e na função de um número de sistemas de sinalização celular. Um outro exemplo vantajoso das ERO em concentrações baixas/moderadas, é a indução de uma resposta mitogênica (VALKO et al., 2007).

Os efeitos nocivos dos radicais livres que causam potencial dano biológico é chamado estresse oxidativo (KOVACIC; JACINTHO, 2001; VALKO et al., 2001), ocorrendo em sistemas biológicos quando há um excesso de produção de ERO/ERN de um lado e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do outro (Valko et al., 2007), ou seja, o processo de estresse oxidativo decorre da existência de um

desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção destes (HALLIWEL; WHITEMAN, 2004).

Os principais alvos de ataque dos radicais livres são os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA) (HENRIQUES et al., 2001), comprometendo, desta forma, a integridade celular e originando processos fisiopatológicos como aterosclerose, diabetes, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outras desordens neurológicas e processos não-patológicas, como o envelhecimento (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Antioxidantes são definidos como substâncias que presentes em baixas concentrações, quando comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995).

O sistema de defesa antioxidante é, usualmente, dividido em não enzimático e enzimático. O sistema não enzimático é constituído de uma grande variedade de substâncias que podem ter origem endógena ou dietética tais como: a vitamina A (β -caroteno), a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E (α -tocoferol) e o licopeno. Podemos mencionar também algumas substâncias fitoquímicas como o resveratrol, as catequinas, a quercetina e os ácidos fenólicos também apresentam a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. O sistema enzimático é composto pelas superóxido dismutases citoplasmática (SOD-Cu/Zn) e mitocondrial (SOD-Mn) que catalisam a conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Pela catalase (CAT) que catalisa a conversão de H_2O_2 em O_2 e H_2O e pela glutathione peroxidase (GPX) que catalisa a redução de H_2O_2 a H_2O (BARBOSA et al., 2010).

Centenas de compostos (metabólitos secundários) com pontos de ebulição relativamente baixos têm sido identificados em óleos essenciais, e a grande diversidade química dos seus componentes influenciam a sua estabilidade oxidativa. Vários óleos essenciais apresentam propriedades

antioxidantes que podem ser exploradas para a proteção de rancidez de outros materiais, tais como alimentos (AMORATI; FOTI, 2012).

O desempenho geral do óleo essencial como antioxidante é o resultado de uma interação complexa entre componentes e o material oxidável a ser protegido. O uso de óleos essenciais como antioxidantes naturais é uma área de interesse crescente, especialmente na ciência dos alimentos e na medicina complementar (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

2.10 Toxicidade dos produtos de origem vegetal

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Grande parte dos consumidores de plantas medicinais sentem-se encorajados por acreditarem que estes remédios, por serem naturais, são inerentemente seguros. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

No Brasil, e em outros países, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a atividade, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (BATITUCCI, 2003).

A falta de informações adequadas sobre as propriedades das plantas medicinais (principalmente das exóticas), seu consumo concomitante com os medicamentos tradicionais (alopáticos) sem conhecimento médico, a perda do conhecimento sobre os efeitos medicinais e tóxicos das plantas, assim como a incapacidade de identificá-las corretamente pela migração da população rural para as cidades são fatores preocupantes na utilização de plantas medicinais sem estudos prévios (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Sendo assim é importante verificar outras atividades além das ações farmacológicas de extratos de plantas, pois alguns de seus constituintes biologicamente ativos podem ser tóxicos para o organismo e conter substâncias químicas conhecidas como mutagênicas ou carcinogênicas.

A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Portanto, experimentos capazes de fornecer, com razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização são fundamentais (BENIGNI, 2005). A avaliação do potencial citotóxico em eritrócitos humanos constitui um modelo experimental eficaz para investigar os efeitos tóxicos e protetores *in vitro* de uma grande variedade de substâncias (BRANDÃO et al., 2005). A estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador dos efeitos danosos de compostos sobre os eritrócitos *in vitro*, sendo utilizado para a pesquisa de citotoxicidade, e é dependente das suas propriedades físicas e estruturais (SHARMA; SHARMA, 2001). Verificando-se o potencial hemolítico, através da leitura óptica da hemoglobina liberada, avalia-se o potencial da substância em causar lesões na membrana plasmática das células, pela formação de poros ou pela ruptura total (COSTA-LOTUFO et al., 2005).

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram a base da vida, em sua estrutura físico-química, o DNA, processo classificado como mutagênese. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são tóxicos para o gene e são, portanto, chamados de genotóxicos. A palavra mutação pode ser definida como sendo qualquer alteração permanente no DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas podem levar uma série de malefícios para o organismo (SILVA; ERDTMAN; HENRIQUES, 2003).

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres

humanos. Substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucleicos. Devido à sua alta reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, a consequência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos. Além disso, recentemente foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas tais como as cardiovasculares, neurodegenerativas em adição ao processo de carcinogênese (DE FLORA, et al., 1996; ANDREASSI et al., 2000; ARUOMA, 2003; ROSS; MARGOLIS, 2005).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON; VOGELSTEIN, 1990), havendo alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (McCANN et al., 1975; PURCHASE et al., 1978).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – MS, através da Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014, determina a publicação do “Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico” que preconiza seguir o disposto no “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” para a realização de estudos não clínicos, que inclui os estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, entre os quais encontra-se o teste de micronúcleo *in vivo*, que avalia o dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014).

No Brasil, e em outros países, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a atividade, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (BATITUCCI, 2003).

Diante do exposto, objetivou-se investigar os efeitos antibacteriano, antioxidante, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzch ex Baill.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos antibacteriano, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill.

3.2 Específicos

✧ Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill sobre linhagens bacterianas de importância clínica.

✧ Avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill frente a eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O.

✧ Avaliar a atividade oxidante e antioxidante do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill frente a eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O.

✧ Avaliar o potencial clastogênico e aneugênico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill através do Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

Todos os experimentos referentes às determinações de atividade antibacteriana e citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia – Bioger (DBM/UFPB). Os estudos de genotoxicidade *in vivo* foram realizados no Biotério Prof. Thomas George da UFPB.

4.2 Óleos essenciais

O óleo essencial do caule de *Croton tricolor* (Ct-OEc) foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Baraquízio Braga do Nascimento Junior e pelo MsC. Fabrício Mendes Miranda da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

O material vegetal utilizado para extração do óleo essencial foi obtido a partir amostras de *Croton tricolor* coletadas na cidade de Jequié (13° 51' 28" S, 40° 5' 2" W) no Sudoeste da Bahia – Brasil, e encaminhadas para o Laboratório de Fitoterapia e Óleos Essenciais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde o material vegetal foi preparado (pesado e triturado) e procedeu-se a extração do óleo essencial por aparelho de Clevenger modificado por um período de 5 horas após o início da fervura da água, sendo coletado um volume de 1 ml de óleo (MIRANDA, 2012).

A análise da composição química do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* foi feita utilizando-se um cromatógrafo gasoso de alta resolução (Agilent Technologies 6850N Network GC Systems, New York, USA) acoplada a um espectrômetro de massa (Agilent 5975 Network Mass Selective Detector, New York, USA) e revelou os seguintes constituintes (Tabela 3) (MIRANDA, 2012):

Tabela 1: Constituintes do Ct-OEc.

Componentes do Ct-OEc	(%)
(+)- α -pineno	6.33
β -pineno	5.83
β -felandreno	3.18
Copaeno	3.42
Cariofileno	10.0
α -bergamotene	1.30
Humuleno	2.57
γ -selineno	0.96
β -cubeno	3.20
β -cadineno	3.77
α -cadineno	3.10
γ -cadineno	2.50
Óxido Cariofileno	2.28
(+)-ledeno	13.68
Viridifloreno	2.16
γ -himachaleno	1.33
Trans-(Z)- α -Bergamotol	2.70

Fonte: MIRANDA (2012)

O óleo essencial extraído do caule do *C. tricolor* apresentou como compostos majoritários (+)-ledeno (13,68%), cariofileno (10,00%), (+)- α -pineno (6,33%), β -pineno (5,83%) e copaeno (3,42%) (MIRANDA, 2012).

4.3 Preparação da Amostra de Ct-OEc para os ensaios

O Ct-OEc (60 mg) foi solubilizado no veículo - DMSO 5% (SIGMA) (150 µl), twen 80 (2%) (60 µl) e água destilada (3 ml) - para se obter concentração de 20 mg/mL.

4.4 Cepas Bacterianas

Foram utilizadas 6 cepas bacterianas de *E. coli*, sendo duas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) e quatro obtidas de amostras clínicas do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB, e duas cepas de *S. aureus* provenientes da ATCC.

E. coli ATCC 2536

E. coli ATCC 8539

E. coli 101

E. coli 104

E. coli 105

E. coli 108

S. aureus ATCC 25925

S. aureus ATCC 25619

4.5 Meios de Cultura

Foram utilizados os seguintes meios:

- Luria Bertani (LB): extrato de levedura (DIFCO) 10 g, triptona (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g para 1 L.

O meio de cultura foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e esterilizado por autoclavação a 121°C, 1 atm durante 15 minutos.

4.6 Obtenção do Inóculo Bacteriano

Para o preparo do inóculo bacteriano, as linhagens bacterianas foram incubadas em caldo LB e incubados a 37°C por 24h. A cultura utilizada para os testes foi ajustada até o valor 0,5 da escala de McFarland que corresponde a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml.

4.7 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do Ct-OEc foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição descrita por ELOFF (1998).

Foram preparadas diluições com o Ct-OEc em quantidade suficiente e nas concentrações a serem utilizadas no teste (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 60 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml e 5 µg/ml) e suspensão bacteriana a ser utilizada no referido experimento (9 partes de caldo LB + 1 parte do inóculo bacteriano na escala 0,5 de McFarland).

Em placas de 96 poços foram adicionados 100µL da solução de Ct-OEc nas concentrações a serem testadas e 100 µL da suspensão bacteriana previamente preparado, totalizando um volume final de 200 µL em cada poço. Foi realizada uma leitura na placa e posteriormente foi incubada a 37°C durante 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata. Após o período de incubação, foi realizada a segunda leitura dos resultados. Em seguida foi adicionado 20 µL de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), indicador metabólico, em todos os poços. Após incubação a 37°C por 1 hora a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como sendo a menor concentração do Ct-OEc que promoveu a inibição do crescimento bacteriano, verificado através da manutenção da cor azul após a incubação com o indicador metabólico. A mudança de cor do indicador metabólico de azul (resazurina) para vermelho (resofurina), indica presença células viáveis e, portanto, não houve inibição do crescimento bacteriano.

A atividade antibacteriana será classificada com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte - CIM até 500 µg/mL, inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/mL (Aligianis et al., 2001).

Controles utilizados:

Meio LB → Controle de esterilidade do meio

LB + capas bacterianas → Controle de crescimento bacteriano

LB + veículo (DMSO 5% + twen 80 2% + H₂O) → controle de interferência do veículo sobre as cepas bacterianas.

LB + Ct-OEc → Controle de esterilidade do óleo.

4.7.1 Caracterização da atividade antibacteriana

Para caracterizar a atividade antibacteriana do Ct-OEc como bactericida ou bacteriostática, foi retirado 20 µL dos poços nos quais a concentração do Ct-OEc provocou inibição do crescimento e estes foram semeados em placa contendo meio LB ágar e incubado a 37°C por 24 horas (MADINGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A ausência de crescimento bacteriano indica ação bactericida enquanto que a presença de crescimento bacteriano indica ação bacteriostática.

4.7.2 Avaliação do mecanismo de ação bactericida

Para determinar se a atividade bactericida se deve a inibição do metabolismo celular ou a lise celular as linhagens bacterianas sensíveis foram inoculadas em meio LB na presença e na ausência do óleo, na concentração bactericida mínima, incubadas a 37° C por 24h. Decorrido este tempo as culturas foram centrifugadas a 6000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante avaliado, em espectrofotômetro a 240 nm, para identificar a presença de proteínas bacterianas. O meio LB foi utilizado como controle

negativo.

4.8 Eritrócitos Humanos

Os eritrócitos humanos (A, B, O), todos Rh +, foram obtidos na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB, a partir de bolsas de sangue que não poderiam mais ser utilizadas para transfusão (sangue a ser descartado). A manipulação e o descarte do sangue foi realizado de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa - CCS/UFPB.

4.9 Avaliação da atividade Oxidante e Antioxidante

Atividade oxidante: O concentrado de eritrócitos humanos do tipo O foi misturado com NaCl 0,9%, centrifugado 2500 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos ressuspensos em NaCl 0,9%. Este procedimento foi repetido 3 vezes e em seguida foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 30% em PBS (11,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36 g Na_2HPO_4 e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) acrescida de 25µg de Triton X-100 (agente hemolítico). Amostras contendo 1 µg, 10 µg, 100 µg e 1000 µg do Ct-OEc foram acrescidas de 1,5 mL dessa suspensão, foram incubadas a temperatura de 25°C, agitadas a 100 rpm por 1 hora. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, 50 µL do sobrenadante diluído em 1,5 mL de tampão fosfato, e a porcentagem de metahemoglobina (MetHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria a 630nm e 540nm, respectivamente.

Atividade antioxidante: A suspensão de eritrócitos a 30% em PBS acrescida 25µg de Triton X-100 preparada como descrito anteriormente foi misturada com com 1 µg, 10 µg, 100 µg e 1000 µg de Ct-OEc. A amostra foi incubada a temperatura a 25°C, agitada a 100 rpm por 1 hora. Após a

incubação, foi adicionado um agente oxidante, a fenilhidrazina (PH) 1 mmol/L (SIGMA). As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação (100 rpm) por mais 20 minutos a 25 °C. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, 50 µL do sobrenadante diluído em 1,5 mL de tampão fosfato (9 g Na₂HPO₄.12H₂O, 5,7 g KH₂PO₄ para 1 L) e a porcentagem de MetHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540 nm. Os valores de MetHb entre 1,5 e 2,0% foram considerados normais enquanto que valores acima de 5% foram considerados elevados (CAMARGO et al., 2007). A porcentagem de MetHb formada foi comparada com os valores obtidos para a vitamina C (20 mmol/L), um comprovado agente antioxidante (ARBOS et al., 2008).

4.10 Avaliação da atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos

Os concentrados de eritrócitos humano dos tipos A, B e O foram misturados com NaCl 0,9%, centrifugados a 2500 rpm por cinco minutos, os sobrenadantes foram descartados e os eritrócitos ressuspensos em NaCl 0,9%. Este procedimento foi repetido 3 vezes e em seguida foram preparadas suspensões de eritrócitos a 0,5%.

Os eritrócitos oriundos de sangue humano (1,5mL) dos tipos A, B e O foram submetidos a diferentes concentrações dos óleos essenciais (1000µg, 100µg, 10µg e 1µg). Como controle negativo foi utilizado a suspensão de eritrócitos a 0,5% preparada com NaCl 0,9% e como controle positivo os eritrócitos submetidos a ação de um agente comprovadamente hemolítico (15µl Triton X-100). As amostras foram incubadas a 25°C, agitadas a 100 rpm por 1 hora e centrifugadas a 2500 rpm por cinco minutos. A hemólise quantificada por espectrofotometria a 540 nm (RANGEL et al., 1997).

4.11 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico pelo teste do micronúcleo em roedores *in vivo*

Para a avaliação do potencial clastogênico e aneugênico pelo teste do micronúcleo, foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 20 - 30 g, os quais foram mantidos em condições controle de temperatura (21 ± 1 °C) e iluminação (6 às 18 horas) e sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada de ração tipo *pellets* (Purina) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período de 14 às 20 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (BRASIL, 2013). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, com número de aprovação CEUA nº **104/2015**.

Foram utilizados grupos de três machos e três fêmeas de camundongos Swiss. O grupo teste recebeu, por via oral o Ct-OEc na dosagem máxima de 2000 mg/kg do peso do animal. O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo utilizado para diluição da amostra e o controle positivo recebeu ciclofosfamida, agente mutagênico, na dosagem de 50 mg/Kg de peso do animal (SIGMA). Vinte e quatro horas após o tratamento os animais foram anestesiados com xilazina (20 mg/kg) e quetamina (150 mg/kg), via intramuscular, e em seguida foram retiradas amostras de sangue da veia caudal para o preparo das lâminas e a contagem de micronúcleos. As lâminas foram coradas com corante panóptico e observadas ao microscópio óptico (Olympus) no aumento de 1000x. Para a contagem dos micronúcleos, foram avaliados pelo menos 2000 eritrócitos por animal (HAYASHI et al., 1994).

O procedimento de eutanásia foi realizado de acordo com a Resolução Nº 1.000/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012), com as recomendações da Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA, 2013).

4.12 Análise Estatística

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e os experimentos *in vivo* com n de 6 animais. Os resultados foram apresentados como a porcentagem da média aritmética simples. Todos os dados foram analisados pelo teste de Student utilizando o programa GraphPad Prism® versão 6.0. O nível de significância de 5% foi adotado para comparar dados de um mesmo experimento. Assim adotamos como significantes as diferenças que geraram $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antibacteriana

Na avaliação da atividade antibacteriana o Ct-OEc foi capaz de inibir o crescimento de 5 das 8 linhagens testadas com representantes Gram positivas e Gram negativa. O óleo exerceu seu efeito tanto contra bactérias padrão quanto contra bactérias de origem clínica. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como sendo 1 mg/mL para as 5 linhagens (Tabela 1).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do Ct-OEc frente às linhagens bacterianas

LINHAGEM	CIM (µg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 2536	1000
<i>E. coli</i> ATCC 8539	1000
<i>E. coli</i> 101	1000
<i>E. coli</i> 104	> 1000
<i>E. coli</i> 105	1000
<i>E. coli</i> 108	> 1000
<i>S. aureus</i> ATCC 25925	1000
<i>S. aureus</i> ATCC 25619	> 1000

5.2 Caracterização da atividade antibacteriana

Na caracterização da atividade antibacteriana as linhagens que foram inibidas pelo Ct-OEc (*E. coli* ATCC 2536, *E. coli* ATCC 8539, *E. coli* 101, *E. coli* 105 e *S. aureus* ATCC 25925) não retomaram o crescimento após serem semeadas em meio LB ágar na ausência do óleo. Sendo assim Ct-OEc apresentou atividade bactericida frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas, padrão e de origem clínica.

5.3 Caracterização da atividade bactericida

Na caracterização da atividade bactericida foi constatado que a quantidade de proteínas presente nas amostras de meio LB mais bactérias e meio LB mais bactérias mais Ct-OEc após 24 horas de incubação a 37 °C não apresentou diferença estatisticamente significativa indicando que não houve lise celular (Figura 5).

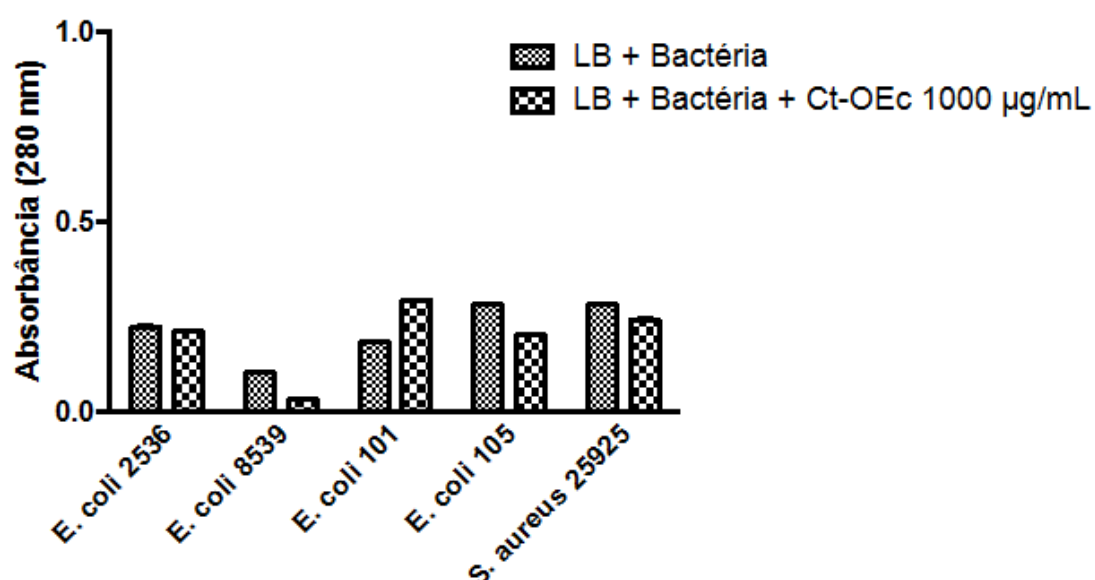


Figura 5. Efeito do Ct-OEc sobre as linhagens de *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ ($n=3$).

5.4 Avaliação da atividade Oxidante e Antioxidante

Na avaliação da atividade oxidante observamos que a quantidade de metahemoglobina (MetHb) formada na presença do Ct-OEc não apresentou diferença estatisticamente significativa do controle negativo portanto não foi capaz de oxidar a hemoglobina (Tabela 2, Figura 6).

Na avaliação da atividade antioxidante observamos que Ct-OEc nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL não só não foi capaz de impedir a formação de metahemoglobina induzida pela fenilhidrazina (PH) como o efeito oxidante foi potencializado. Entretanto na concentração de 1000 µg/mL, Ct-OEc foi capaz de reduzir a formação de metahemoglobina e consequentemente a oxidação da hemoglobina (Tabela 3, Figura 7).

Tabela 3. Efeito do Ct-OEc frente à hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos.

TRATAMENTO	MetHb(%Hb)
Hb (Controle negativo)	2,22
Hb + Ct-OEc 1 µg/mL	2,54
Hb + Ct-OEc 10 µg/mL	2,44
Hb + Ct-OEc 100 µg/mL	2,56
Hb + Ct-OEc 1000 µg/mL	3,55
Hb + PH (Controle positivo)	16,2
Hb = hemoglobina, PH = fenilhidrazina	

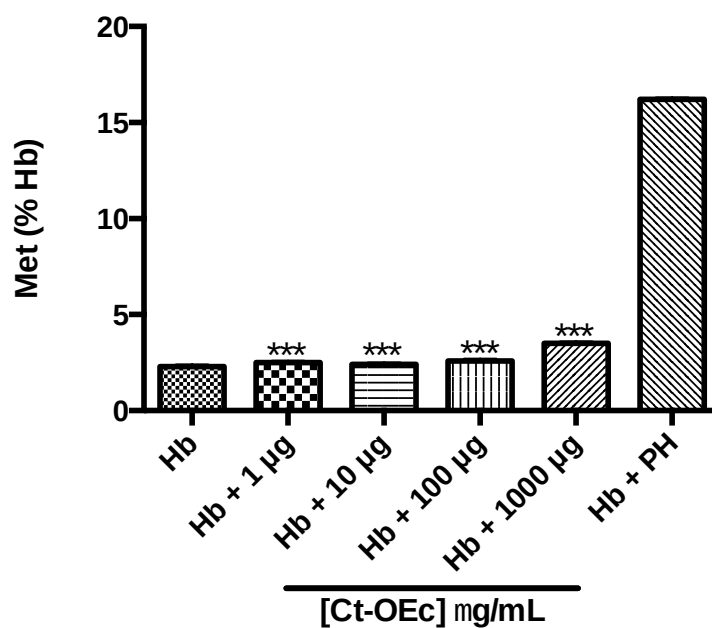


Figura 6. Efeito do Ct-OEc frente a hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ ($n=3$).

Tabela 4. Efeito do Ct-OEc frente à hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.

TRATAMENTO	MetHb(%Hb)
Hb (Controle negativo)	2,2
Hb + Ct-OEc 1 µg/mL + PH	68,7
Hb + Ct-OEc 10 µg/mL + PH	61,4
Hb + Ct-OEc 100 µg/mL + PH	55,9
Hb + Ct-OEc 1000 µg/mL + PH	11,8
Hb + PH (Controle positivo)	16,2

Hb = hemoglobina, PH = fenilhidrazina

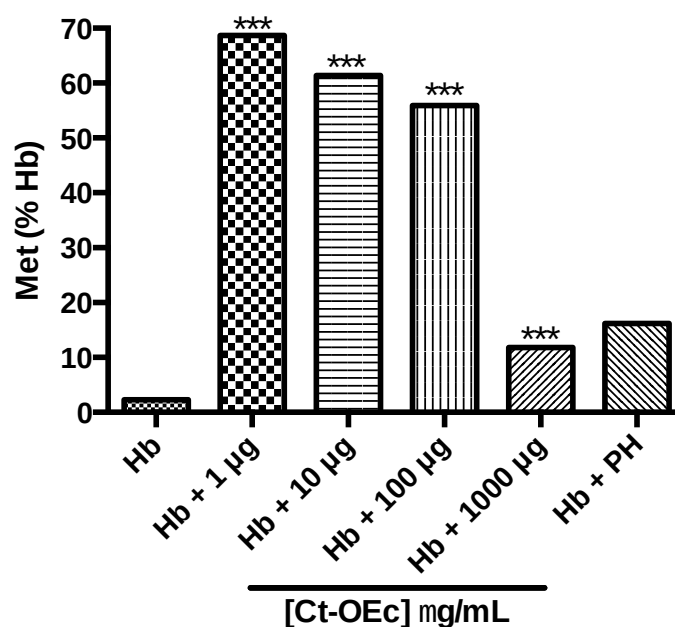


Figura 7. Efeito do Ct-OEc frente a hemoglobina oriunda de eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ (n=3).

5.5 Avaliação da atividade hemolítica

Na avaliação da atividade hemolítica verificamos que Ct-OEc induziu hemólise dos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O em todas as concentrações testadas. Entretanto o grau de hemólise foi baixo para as concentrações do Ct-OEc de 1 e 10 µg/mL e moderado para 100 µg/mL (Tabela 4, Figura 8,9 e 10).

Tabela 5. Porcentagem de hemólise induzida por Ct-OEc frente aos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O.

Ct-OEc ($\mu\text{g/mL}$)	Hemólise (%)		
	A	B	O
1	9,8	3,3	1,2
10	10,3	2,2	2,4
100	70,6	75,0	58,5
1000	100	100	100

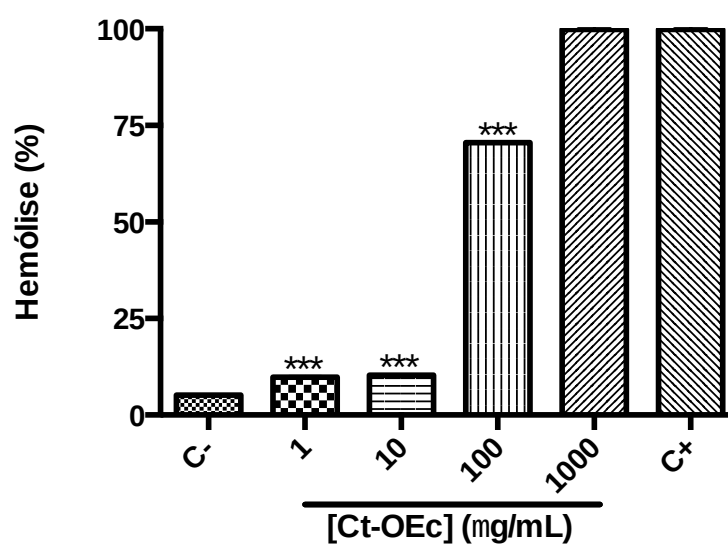


Figura 8. Efeito do Ct-OEc sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A. C- = suspensão de eritrócitos, C+ = eritrócitos + Triton X-100. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ ($n=3$).

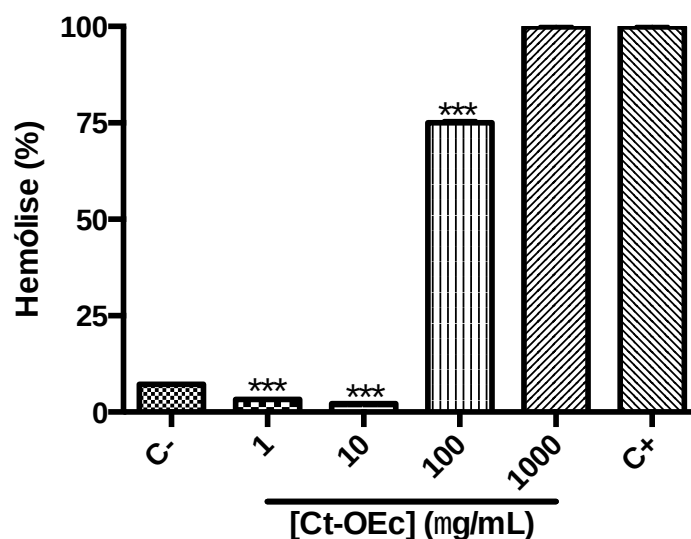


Figura 9. Efeito do Ct-OEc sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B. C- = suspensão de eritrócitos, C+ = Suspensão de eritrócitos + Triton X-100. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ (n=3).

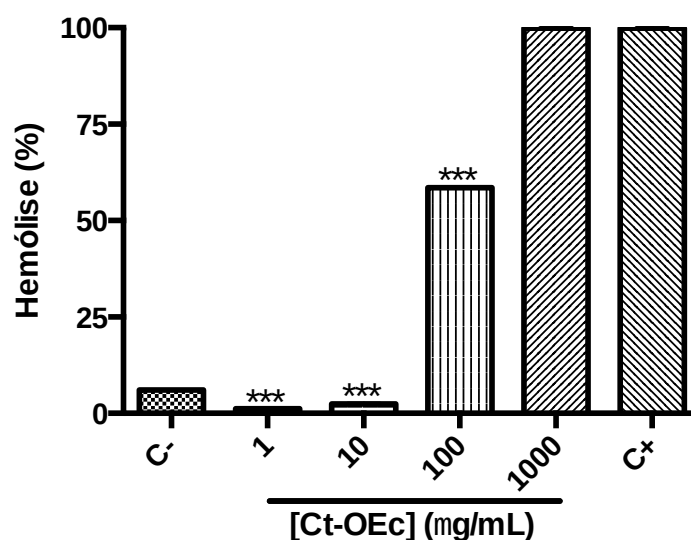


Figura 10. Efeito do Ct-OEc sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O. C- = suspensão de eritrócitos, C+ = Suspensão de eritrócitos + Triton X-100. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ (n=3).

5.6 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico

Na avaliação do potencial clastogênico (modificação da estrutura cromossômica) e aneugênico (modificação no número de cromossomos) o Ct-OEc, na dose de 2g/Kg de peso do animal o número de micronúcleos formados não apresenta diferença estatisticamente significativa do controle negativo (Tabela 4, Figura 11 e 12).

Tabela 6. Número de micronúcleos formados após tratamento com o diluente da amostra, Ct-OEc e ciclofosfamida

Grupos	Número de micronúcleos/2000 células
Diluente da amostra	5,2
Ct-OEc 2g/Kg animal	3,7
Ciclofosfamida 50 mg/Kg animal	16,7

C- = diluente, C+ = ciclofosfamida

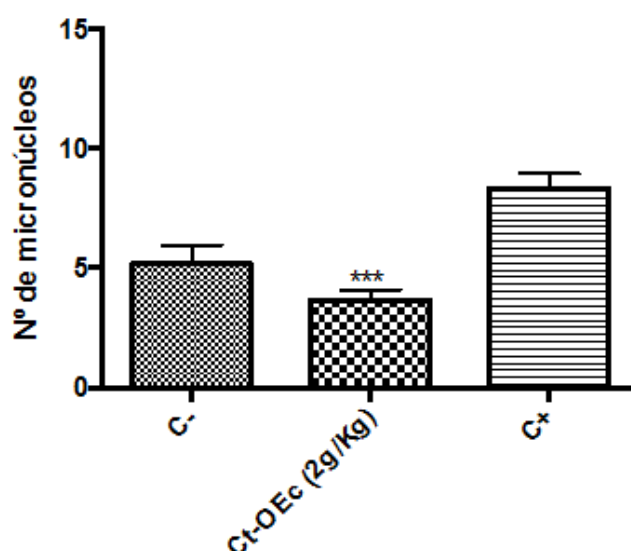
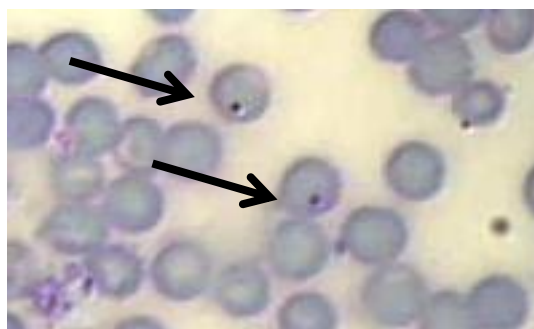


Figura 11. Efeito do Ct-OEc sobre os cromossomos de camundongo. Os resultados foram expressos como média aritmética simples. C- = diluente, C+ = ciclofosfamida. Análise por teste t *** $p < 0,0001$ (n=6).

A



B



C

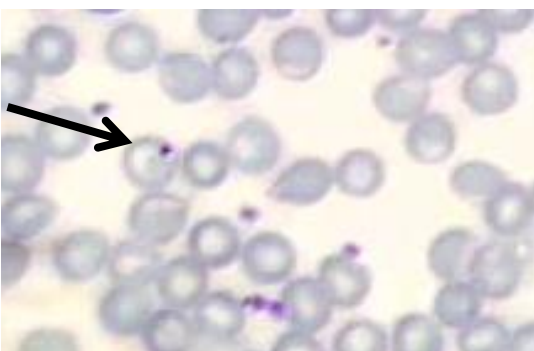


Figura 12. Fotomicrografia ilustrativa da ocorrência de micronúcleos. Controle positivo (A), controle negativo (B), Ct-OEc (C). Aumento 1000X. Fonte: VASCONCELOS, I.R.A., 2015.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliadas a atividade antibacteriana do óleo essencial do caule de *C. tricolor* (CT-OEc) frente a linhagens de importância clínica (*S. aureus* e *E. coli*), a atividade oxidante e anti-oxidante frente a eritrócitos humanos do tipo O, o potencial citotóxico frente a eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O, e o potencial clastogênico e aneugênico através do teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*.

O crescente aparecimento de resistência bacteriana impõe um fardo econômico e social enorme sobre o sistema de saúde em todo o mundo e, infelizmente, o desenvolvimento de novos antibióticos é vastamente ultrapassado por terapias atuais que estão perdendo a sua eficácia (BROOKS; BROOKS, 2014). A resistência ocorre para praticamente todas as classes de antibióticos de uso corrente. O desenvolvimento de resistência bacteriana a um dado antibiótico é prevista para se desenvolver dentro de um prazo médio de 50 anos após a utilização inicial (BHATT ET AL., 2013). A epidemia global de infecções causadas por bactérias resistentes juntamente com um declínio no número de novos antibióticos que entram na fase de desenvolvimento clínico tem levado a busca por classes alternativas de agentes antimicrobianos (SPELLBERG, 2008).

Os principais grupos de compostos que são responsáveis pela atividade antimicrobiana a partir de plantas incluem fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides, e alcalóides (CIOCAN; BARA, 2007; LAI; ROY, 2004). Variações na estrutura e composição química destes compostos resultam em diferenças em sua ação antimicrobiana (SAVOIA, 2012).

A literatura apresenta vários relatos de estudos de atividade antimicrobiana com variadas espécies de *Croton*, incluindo trabalhos com óleos essenciais; Fortes e Guedes (2006) observaram a presença de sensibilidade de linhagens de *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* ao óleo essencial de *C. argyrophylloides* Muell Arg.

Em estudo realizado por Rodrigues, Costa e Coutinho (2009), observou-se a presença de sinergismo do óleo essencial de *C. zehntneri* com gentamicina contra *P. aeruginosa*. Ajayi e Akintola (2010), avaliaram a atividade antibacteriana do extrato das folhas de *C. zambesicus* sobre patógenos entéricos de origem alimentar, verificando efetividade contra *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

Jeeshna, Paulsamy e Mallikadevi (2011), em pesquisa sobre a atividade antimicrobiana de *C. bonplandianum* Baill, demonstraram que o extrato metanólico das folhas inibiu efetivamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella typhi* e dos fungos *Mucor* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* spp. e *Pencillium* spp.

C. tricolor também tem sido objeto de pesquisa da atividade antimicrobiana por parte de alguns pesquisadores. Miranda (2012) avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas e do caule do *C. tricolor* contra linhagens bacterianas e de fungos, verificando que o óleo essencial da folha inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *E. coli* ATCC 10536 e ATCC 8733, sendo inativo contra *P. aeruginosa* ATCC 25853, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228.

Já o óleo essencial do caule inibiu o crescimento das bactérias Gram positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* e Gram negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*. A atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* para os óleos essenciais da folha e do caule foi determinada utilizando-se linhagens de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* LM 105, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. tropicalis* LM 14, *C. krusei* ATCC 6538, *C. krusei* LM 12 (MIRANDA, 2012).

Tanto o óleo essencial da folha quanto do caule de *C. tricolor* inibiram o crescimento das linhagens, com concentração inibitória mínima (CIM) de 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo do caule e de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo da folha (MIRANDA, 2012).

Ferreira (2014) avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial

das folhas do *C. tricolor* contra linhagens de bactérias Gram negativas de *E. coli* e Gram positivas de *S. aureus*. O óleo essencial das folhas de *C. tricolor* demonstrou efeito bacteriostático, com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 6,7 mg.mL⁻¹ e 1,67 mg.mL⁻¹.

Neste estudo, foi avaliado a atividade antibacteriana do óleo essencial do caule de *C. tricolor* (Ct-OEC), onde determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Verificou-se que 5 das 8 linhagens avaliadas, *E. coli* ATCC 2536, *E. coli*, ATCC 8539, *E. coli* 101, *E. coli* 105 e *S. aureus* ATCC 25925, foram inibidas pelo Ct-OEC na concentração de 1 mg.mL⁻¹ (CIM). Esse resultado corrobora os de Miranda (2012) que demonstrou atividade antibacteriana do óleo essencial do caule de *C. tricolor* contra linhagens de *S. aureus* e *E. coli*.

As bactérias Gram positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram negativas (MADINGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A membrana externa das bactérias Gram negativas é uma barreira que dificulta a entrada de várias moléculas de antibióticos e o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas vindas de fora da célula. Além disso, o antibiótico que atua sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, denominados de amplo espectro, têm uma maior aplicação médica do que aqueles que atuam apenas sobre um grupo de micro organismos (HOLETZ et al., 2002).

O Ct-OEC inibiu o crescimento tanto de bactérias padrão quanto de bactérias de origem clínica que normalmente são mais resistentes devido a pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de agentes entimicrobianos (HOEFLER et al., 2006).

Não existe correlação entre o nível de inibição aceitável para os produtos naturais quando comparados aos antibióticos utilizados na clínica médica, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos dos antibióticos, enquanto outros consideram promissores aqueles com níveis de inibição superiores. Aligianis et al. (2001), propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte - CIM até 500 µg/mL, inibição moderada – CIM

entre 600 e 1500 µg/mL e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/mL.

Os valores da CIM do Ct-OEc obtidos neste estudo e os observados por Miranda (2012) e Ferreira (2014) foram diferentes o que pode ser explicado pela utilização de diferentes partes da planta, diferentes linhagens bacterianas e fatores ambientais que podem influenciar na composição química do óleo e consequentemente no seu efeito.

Neste estudo foi observado o efeito bactericida do Ct-OEc sem ocorrência de lise celular, entretanto vários óleos essenciais conferem atividade antibacteriana por danificar a parede celular e a membrana, levando à lise celular, perda de conteúdo celular, e inibição da bomba de prótons (BURT, 2004). A hidrofobicidade, uma importante característica dos OEs e seus componentes, lhes permite interagir com os lípidos da membrana celular e mitocôndrias, perturbando as estruturas e tornando-as mais permeável (KNOBLOCH et al., 1986; SIKKEMA; De BONT; POOLMAN, 1994). Embora a perda de uma certa quantidade de material celular possa ser tolerada sem perda de viabilidade, a perda grande do conteúdo das células ou a saída de moléculas e íons críticos irá conduzir à morte (DENYER; HUGO, 1991).

Durante as atividades celulares normais, vários processos dentro das células produzem espécies reativas de oxigênio. A formação de ERO é uma consequência natural do metabolismo aeróbico e faz parte do processo de manutenção da homeostase de oxigênio nos tecidos (SEIFRIED et al., 2007; CASTRO; FREEMAN, 2001).

Espécies reativas de oxigênio apresentam um paradoxo em sua função biológica: por um lado, eles previnem doenças, auxiliando o sistema imunológico, mediando a sinalização celular, desempenhando um papel essencial na apoptose. Por outro lado, eles podem danificar importantes macromoléculas nas células e podem ter um papel na carcinogênese e doença cardiovascular (SEIFRIED et al., 2007).

O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes constitutivos - homeostase de oxigênio - é mantido através de uma série natural de reações

de oxidação-redução (redox) que envolvem a transferência de elétrons entre duas espécies químicas: compostos que perdem elétrons (oxidado) e aqueles que ganham elétrons (reduzido) (SEIFRIED et al., 2007).

A geração de radicais livres ocorre, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (BARBOSA et al., 2010, ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997).

Espécies reativas de oxigênio desempenham um papel crucial nos processos fisiológicos normais, incluindo a resposta a fatores de crescimento, a resposta imune, e eliminação apoptótica de células danificadas (SEIFRIED et al., 2007).

Quando a homeostase de oxigênio não é mantida, o ambiente celular se apresenta em estresse oxidativo (SEIFRIED et al., 2007). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio excede a capacidade das defesas antioxidantes celulares para remover estas espécies tóxicas (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). As ERO são constituídos principalmente pelo radical superóxido ($O_2\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Quando os mecanismos de proteção antioxidante se tornam ineficientes por fatores diversos, pode ocorrer a deterioração das funções fisiológicas, aumentando a liberação das EROs no organismo, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento (OLIVEIRA, 2011).

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por ERO e ERN provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo (BARREIROS; DAVID, 2006).

A formação de radicais livres, *in vivo*, ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos, tais como: xenobióticos, radiações ionizantes, metais pesados, tabagismo e ingestão de álcool. Estes fatores exógenos agem sobre a geração de radicais livres, bem como sobre a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (BARBOSA et al.,

2010; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Para combater o excesso desses radicais livres no organismo, é necessário a ação de antioxidantes, que podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS; DAVID, 2006). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pelos radicais livres ou as espécies reativas não-radicaais (BARBOSA et al., 2010). Esse sistema de defesa antioxidante é formado por antioxidantes enzimáticos (catalase, glutathione-peroxidase, superóxido dismutase) e não enzimáticos (glutathione, tióis, algumas vitaminas e metais, ou fitoquímicos tais como isoflavonas, polifenóis e flavonóides) (SEIFRIED et al., 2007).

A atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada (MANTLE et al., 1998; RUBERTO; BARATTA, 2000) e os óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro constituem fontes potenciais de antioxidantes naturais (CATUNDA JUNIOR; LUCIANO; MORAIS, 2002).

A vegetação xerófila característica é afetada pela longa e irregular seca, altas temperaturas e elevada radiação ultravioleta (DESMARCHELIER et al., 1999). Nas plantas, a síntese de metabólitos secundários antioxidantes que absorvem em 300-400 nm é significativamente aumentada por radiação UV (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996) fornecendo, portanto, um alto nível de proteção contra oxidantes prejudiciais gerados termicamente ou pela luz (LARSON, 1988).

Moraes et al. (2006b), avaliou a atividade antioxidante de espécies do gênero *Croton* do nordeste brasileiro, demonstrando a presença de atividade antioxidante das três espécies: *C. zenhtneri*, *C. argyrophylloides* e o *C. nepetaefolius*.

Ferreira (2014), demonstrou o efeito protetor do óleo essencial das folhas do *C. tricolor* contra a ação oxidativa da fenilhidrazina, um reconhecido agente oxidante. Verificou que o óleo essencial das folhas do *C. tricolor* reduziu significativamente o nível de metahemoglobina formada após a exposição à fenilhidrazina e portanto apresentou atividade antioxidante maior que a vitamina C, um comprovado agente antioxidante.

Neste estudo, foi avaliada, pela primeira vez, a atividade oxidante e antioxidante do óleo essencial do caule de *C. tricolor* frente à fenilhidrazina, que promove a desnaturação oxidativa da hemoglobina, e verificou-se que este não apresenta efeito oxidante nas concentrações testadas e apresentou efeito antioxidante na concentração de 1000 µg/mL, sendo capaz de reduzir a formação e metahemoglobina.

Propriedades antioxidantes também desempenham um papel fundamental em algumas das atividades biológicas dos óleos essenciais o que se justifica pelo envolvimento do estresse oxidativo em patologias (VALGIMIGLI et al., 2000). Estes atributos são devidos à capacidade inerente de alguns dos seus componentes, em particular fenóis, para parar ou retardar a oxidação aeróbica de matérias orgânicas, embora o procedimento através do qual o óleo é obtido a partir de matéria-prima (destilação) limita o conteúdo de compostos fenólicos na matriz final, porque muitos desses compostos não são voláteis (VALGIMIGLI, 2012).

Antioxidantes são considerados nutraceuticos importantes por causa de muitos benefícios à saúde (DROGE, 2002; LEE; KOO; MIN, 2004; VALKO et al., 2007).

A capacidade antioxidante de um extrato de produto natural dependerá essencialmente da biodisponibilidade da mistura específica dos compostos presentes, das suas interações sinérgicas para se obter a resposta antioxidante final ao nível celular (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Um bom antioxidante não é apenas um bom captador de radicais e composto redutor, mas uma molécula que pode exercer sua atividade antioxidante através da ativação de fatores transcricionais que induzem a expressão de enzimas antioxidantes, e assim, melhorando o estresse oxidativo (JONES, 2006).

A idéia por trás suplementação antioxidante é restaurar estado redox celular e dessa forma proteger contra os danos causados pelo estresse oxidativo, todavia, estudos têm indicado que a sobrecarga de compostos

reduzidores pode influir negativamente nas funções celulares normais e, dessa forma, ter efeitos nocivos à saúde humana (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais são utilizados para a produção de um grande número de fármacos (BELCAVELLO et al., 2012). O uso de preparações a base de plantas, ao contrário do senso comum, que as classifica como sendo naturais e isentas de reações adversas, podem apresentar vários agravos à saúde incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos (ERNST; PITTLER, 1998)

Devido ao grande número de componentes, os óleos essenciais parecem não ter alvos celulares específicos (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Como lipófilos típicos, que passam através da parede celular e da membrana citoplasmática, afetam a estrutura das suas diferentes camadas de polissacárideos, ácidos graxos e fosfolípidos permeabilizando-os (BAKKALI et al., 2008).

Citotoxicidade é definida como o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas (NARDONE, 1977).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002), pois o equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um composto é um requisito importante, quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000).

Os eritrócitos fornecem um modelo simples para estudar o efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias ou de situações associadas com o stress oxidativo (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; EISELE et al., 2006; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2006). Os efeitos hemolíticos dos compostos são avaliadas medindo a concentração de

hemoglobina no plasma após centrifugação e a ocorrência de hemólise pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO et al., 2005).

O eritrócito é um tipo de célula que contém concentrações elevadas de ácidos graxos polinsaturados, de oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991). Por esta razão, pode-se esperar que sejam altamente vulneráveis a reações que envolvem radicais livres, e podem ser muito sensíveis à peroxidação lipídica da membrana celular e hemólise (BRANDÃO et al., 2005; BOSI et al., 2004; DEVASENA; LALITHA; PADMA, 2001; EL-MISSIRY; ABOU-SEIF, 2000). No entanto, estas células possuem um sistema antioxidante eficiente a nível citoplasmático que as torna extremamente resistentes a peroxidação quando os radicais são produzidos dentro da célula (CLEMENS; WAILER, 1987).

O teste da atividade hemolítica permite avaliar o potencial de uma substância em causar lesões à membrana plasmática da hemácia com consequente saída da hemoglobina que livre no plasma é prejudicial a saúde causando sérios danos em órgãos vitais como fígado, rins e coração (CARVALHO et al., 2007).

Não há relatos na literatura de estudos que avaliaram a citotoxicidade do óleo do caule de *Croton tricolor*, sendo este trabalho pioneiro na determinação da citotoxicidade frente a hemácias humanas.

A avaliação da atividade hemolítica de óleo essencial do caule de *C. tricolor* frente a hemácias dos grupos sanguíneos A, B e O demonstrou atividade citotóxica de baixa a moderada até a concentração de 100 µg/mL. Esses dados diferem dos obtidos por Ferreira (2014) utilizando óleo essencial das folhas de *C. tricolor* que observou uma baixa toxicidade em uma concentração de até três vezes mais alta.

O Ct-OEC apresentou maior efeito hemolítico e consequente citotoxicidade em hemácias do tipo sanguíneo B (75%) quando comparado com os tipos sanguíneos A (70,6%) e O (58,5%) que pode ser devida a presença de diferentes antígenos N-acetil-galactosamina (sangue tipo A) e D-

galactose (sangue tipo B) na superfície da hemácia que modificam a biointeração assim como o efeito.

Toxicologia genética é o estudo dos efeitos adversos sobre o processo de hereditariedade. Estudos de toxicologia genética têm dado origem a uma série de procedimentos teste para avaliar os efeitos de substâncias químicas sobre os mecanismos genéticos e o consequente risco para os organismos, incluindo os seres humanos (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Os estudos de genotoxicidade desempenham um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; HARTMANN et al., 2001; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002), devendo ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de determinar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica assim como para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; SNYDER; GREEN, 2001).

Ensaio de genotoxicidade são ferramentas importantes para o estudo da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos ou físicos, podendo ser avaliadas tanto por testes *in vivo* quanto *in vitro* tais como: teste do micronúcleo (SCHMID, 1975), teste de Ames (AMES; McCANN; YAMASAKI, 1975), ensaio Cometa (TICE et al., 2000), entre outros.

No “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (BRASIL, 2013), estabelecido pela ANVISA – MS, estão incluídos estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, utilizando bactérias e células de roedores e de mamíferos, entre os quais a avaliação *in vivo* do dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores (teste do micronúcleo) (BRASIL, 2004).

O teste do micronúcleo é concebido primariamente para avaliar a capacidade dos agentes testados para induzir dano cromossômico estrutural (clastogenicidade) e/ou numérico (aneugenicidade). Ambos os tipos de danos estão associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores, e com resultados reprodutivos e de desenvolvimento adversos (KRISHNA;

HAYASHI, 2000).

A avaliação da frequência de micronúcleos *in vivo* é o teste primário em uma bateria de testes de genotoxicidade e é recomendado pelos órgãos reguladores em todo mundo como parte da avaliação de segurança do produto (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Neste trabalho, avaliou-se o potencial clastogênico e aneugênico pelo teste do micronúcleo em roedores *in vivo*, onde verificamos que o Ct-OEc não provocou o aumento da frequência de micronúcleos no sangue periférico de camundongos albinos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, indicando que não apresenta efeito genotóxico.

Estudos sobre genotoxicidade de espécies do gênero *Croton* através do teste do micronúcleo têm revelado ausência de genotoxicidade das espécies estudadas: *Croton cajucara*, (RODRIGUES et al 2010), óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* (FERREIRA, 2014).

Considerando-se os resultados dos ensaios biológicos do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill (Ct-OEc), os quais mostraram a presença de boa atividade antibacteriana, ausência de atividade oxidante e presença de atividade antioxidante, citotoxicidade de baixa a moderada e ausência de efeitos clastogênicos e aneugênicos *in vivo*, mais estudos serão necessários para avaliar o potencial do Ct-OEc para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico.

7. CONCLUSÕES

Na avaliação antibacteriana, citotóxica e genotóxica do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill (Ct-OEc) realizada pela primeira vez neste trabalho observou-se:

- Atividade antibacteriana frente a linhagens Gram negativas (*E. coli*) e Gram positivas (*S. aureus*) com concentração inibitória mnima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de 1 mg/mL.
- Atividade antibacteriana frente a linhagens de *E. coli* padrão e de origem clínica.
- Atividade bactericida sem ocorrência de lise celular.
- Ausência de atividade oxidante e presença de atividade antioxidante frente a hemoglobina humana na concentração de 1000 µg/mL.
- Citotoxicidade baixa a moderada, nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, frente a eritrócitos sanguíneos dos tipos A, B e O.
- Ausência de efeitos clatogênico e aneugênico *in vivo* na dose de 2g/Kg.

REFERÊNCIAS

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

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.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga; o caso do agreste de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciências**, v. 27, n. 007, p. 336-346, 2002.

_____; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidias na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.678-689, 2006.

ALIGIANIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S., CHINOUE, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, M. V. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido Pernambucano, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 3, p. 485-495, 1998.

AMES, B. N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenesis test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.

AMORATI, R.; FOTI, M. C. Oxidative stability and antioxidant properties of essential oils. In **Essential Oils as Natural Food Additives**; Valgimigli, L., Ed. Nova Science Publishers, New York, p. 75-95, 2012.

_____; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835-10847, 2013.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species

causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n.1, p.103-108, 1996.

ANDREASSI, M. G.; BOTTO, N.; COLOMBO M. G.; BIAGINI. A.; CLERICO, A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 265–9, 2000.

ANITESCU, G.; DONEANU, C.; RADULESCU, V. Isolation of Coriander Oil: Comparison Between Steam Distillation and Supercritical CO₂ Extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p. 173-176, 1997.

ARBOS, K.A.; CLARO. L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457–463, 2008.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactivecomponents in plant foods. **Mutation Research**, v. 523, p. 9-20, 2003.

AVMA. **Guidelines for the Euthanasia of Animals**: 2013 Edition.

BAKKALI, F., AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, 2010.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. **Química Nova**, v. 29,n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas no Brasil**. Editora da

Universidade de São Paulo, 1991.

BATITUCCI, M. C. P. **Estudo dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de plantas do gênero Solanum: aspectos fisiológico-farmacológicos e citogenéticos**. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo, 2003.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; BURN, C.; ORCHARD, M. G.; DEUSCHEL, C.; VALENTINO, E.; BRAILLARD, S.; PACCAUD, J. P.; COSSON, P. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1336-1342, 2007.

BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, v.105, p.1767-800, 2005.

BERG, J. M. T.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p, 2008.

BERNARDES, R. C.; JORGE, A. O. C.; LEÃO, M. V. P. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus coagulase-positivos* isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. **Revista Biociências**, v. 10, p. 73-8, 2004.

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN EE, B. W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1520–1534, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BOSI, S.; FERUGLIO, L.; DA ROS, T.; SPALLUTO, G.; GREGORETTI, B.; TERDOSLAVICH, M.; DECORTI, G.; PASSAMONTI, S.; MORO, S.; PRATO, M. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 6711–6715, 2004.

BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B. T.; Nogueira, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug And Chemical Toxicology**, v. 28, p. 397-407, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014**. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Versão 2, 2013.

BHATT, D.; KAVITHA, M.; NISHA, C. K.; MAHAJAN, Y. Nanotechnology Solutions to Combat Superbugs. **Nanowerk**, 2013.

BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 14–27, 2014.

BURT, S.; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CAMARGO, T. M., ALVES, M. I. F., OLIVEIRA, S. J., OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 95-98, 2007.

CANUTO, K. M. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial do *Croton argyrophylloides* Muell. Arg.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, 2005.

CARSON, C. F., MEE, B. J., RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914–1920, 2002.

CARVALHO, E. B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.;

MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H. MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais Metabólitos Secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: *Suprema*, 113p., 2004.

CASTRO, L.; FREEMAN, B. A. Reactive oxygen species in human health and disease. **Nutrition**, v. 17, p. 161-165, 2001.

CATUNDA JUNIOR, F. E. A. **Estudo químico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Croton***. Monografia (Lic. Plena em Química). Universidade Estadual do Ceará, 2003.

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

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. ANTIOXIDANTES DIETÉTICOS: CONTROVÉRSIAS E PERSPECTIVAS. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CFMV - CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **RESOLUÇÃO Nº 1000**, DE 11 DE MAIO DE 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 533p, 2008.

CIOCAN, I. D.; BARA, I. Plant products as antimicrobial agents. *Analele Științifice Ale Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, Secțiunea II A : Genetica și Biologie Moleculară*, v. 8, n. 2, 2007.

CLEMENS, M. R., WAILER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 45, p. 251–268, 1987.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: BARBOSA, M. R. V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; MESQUITA, A.

C. Checklist das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 71–74, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 21–30, 2005.

COX, S.D., MANN, C.M., MARKHAM, J.L., BELL, H.C., GUSTAFSON, J.E., WARMINGTON, J.R., WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170–175, 2000.

CUEVA, C.; MORENO-ARRIBAS, M.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; BILLS, G.; VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; RIVAS, C. L.; REQUENA, T.; RODRÍGUEZ, J. M.; BARTOLOMÉ, B. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, 2010.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDEATH, K.; RANDEATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; VAN SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTAS, J. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, v. 366, p. 197–238, 1996.

DENYER, S. P., HUGO, W.B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer, S. P., Hugo, W. B. (Eds.), **Mechanisms of Action of Chemical Biocides**. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series, n. 27, Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, p. 171–188, 1991.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69 – 77, 1999.

DEVASENA, T., LALITHA, S., PADMA, K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. **Clinica Chimica Acta**, v. 308, p. 155–161, 2001.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G. MAURIELLO, G. Changes in

membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 54, p. 2745–2749, 2006.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOURADO, R. C. M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Croton sonderianus* – Euphorbiaceae**. Tese (Doutorado em química orgânica e inorgânica), UFC, Fortaleza, 2003.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

EISELE, K.; LANG, P. A.; KEMPE, D. S.; KLARL, B. A.; NIEMOLLER, O.; WIEDER, T.; HUBER, S. M.; DURANTON, C.; LANG, F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, p. 116–122, 2006.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F. A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019–1024, 2001.

EL-MISSIRY, M. A.; ABOU-SEIF, M. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. **Cancer Letters**, v. 158, p. 155–163, 2000.

ELOFF, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v. 64, 1998.

ERNST, E.; PITTLER, M. H. Risks associated with herbal medicinal products. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 152, p. 183-189, 1998.

FEARON, E. R.; VOGELSTEINS, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-767, 1990.

FEHLBERG, I. **Terpenos e fenilpropanoides de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae)**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2011.

FERREIRA, S. B. **Investigação dos efeitos antimicrobiano, citotóxico e genotóxico do óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill (Euphorbiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

FERREIRA, V. F. ; PINTO, A. C. A FITOTERAPIA NO MUNDO ATUAL. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239, 2000.

FORNARI, T. VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 34–48, 2012.

FORTES, J. C.; GUEDES, I. F. G. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton argyrophylloides* MUELL ARG E DE FRAÇÕES ISOLADAS DOS EXTRATOS DE *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC** - Florianópolis, SC – Julho, 2006.

GREEN, K.; BRAND M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53 (Suppl 1), p. 110-118, 2004.

GOBBO-NETO; L. LOPES; N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v.30, n. 2, p. 374-381. 2007.

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.

GOMES, A. P. S.; SALES, M. F.; MELO, A. L. Novidades taxonômicas em *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. e *C.* sect. *Lasiogyne* Klotzsch. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 905-

908. 2010.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R de M.B. **Biodiversidade. Um Enfoque Químico-Biológico**. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 267 p, 1996.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. *Croton*. In: World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae.) **Royal Botanic Gradens Kew**, v. 2, p. 417-536, 2000.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 3, 2005.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C., WYLLIE, S. G., WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 194–198, 1998.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed., Oxford University Press, 1999.

_____. The antioxidant paradox. **The Lancet**, 355, 1179, 2000.

_____; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. The Society for Applied Microbiology, **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985–990, 1999.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.-J.; FJÄLLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843–858, 2001.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 196-198, 1999.

_____. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, 2008.

_____. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 480–484, 2007.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDERS, M. OLESON, F. B. JR; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HAUFF, S. N.; **Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga**. PNUD – PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO, Brasília, 2010.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 46, p. 3590–3595, 1998.

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

HOEFLER, R.; VIDOTTI, C. C. F.; MENEZES, E.S.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **BOLETIM FARMACOTERAPÊUTICA**, n. 4, 2006.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HURST, R.; BAO, Y.; JEMTH, P.; MANNERVIK, B.; WILLIAMSON, G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, p.

559, 1997.

IBAMA. Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento dos biomas brasileiros: bioma caatinga**. Brasília: 2010.

IBGE. Ministerio do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. 2004. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtml>> Acesso em: 01 fev. 2015.

JEESHNA, M. V.; PAULSAMY, S.; MALLIKADEVI, T. Phytochemical Constituents and Antimicrobial Studies of the Exotic Plant Species, *Croton bonplandianum* Baill. **Journal of Life Sciences**, v. 3, n. 1, p. 23-27, 2011.

JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 8, p. 1865–1879, 2006.

JORNOT, L.; PETERSEN, H.; JUNOD, A. F. Hydrogen peroxideinduced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. **Biochemical Journal**, v. 335, p. 85–94, 1998.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F. WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626–631, 1994.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, v. 17, p. 37-43, 2002.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 773–796, 2001.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H.M.; VIGENSCHOW, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: BRUNKE, E.J. (Ed.), **Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils**. De Gruyter, Berlin, p. 429– 445, 1986.

_____; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119–128, 1989.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 404-410, 2009.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155–166, 2000.

LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1451-1460, 2004.

LAHLOU, M. Screening of Natural Products for Drug Discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 697-705, 2007.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n. 6, 2007.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LARSON, R. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, p. 969–978, 1988.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 21–33, 2004.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.Ed. São Paulo: Atheneu, 344p., 2008.

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α –lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A-treated rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 98, p. 68–73, 2006.

LIMA, L. R. **Estudos taxonomicos em *Croton* seção *Lamprocroton* (Mull.Arg.) Pax. (Euphorbiaceae)**. Tese (Doutorado do Instituto de Biociências), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137–147, 2009.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1– 10, 2013.

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

LOURENÇO, J. A.; PITANGUI, C. P.; JORDÃO, A. A.; VANNUCCHI, H.; CECCHI, A. O. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 414-420, 2010.

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

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 608p, 2004.

MANTLE, D.; ANDERTON, J. G.; FALKOUS, G.; BARNES, M.; JONES, P.; PERRY, E.K. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 121, p. 385 – 391, 1998.

MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p., 2007.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of carcinogens and mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 36, n. 8, p. 539-543, 2000.

MILLS, E. M.; TAKEDA, K.; YU, Z. X. FERRANS, V.; KATAGIRI, Y.; JIANG, H.; LAVIGNE, M. C.; LETO, T. L.; GUROFF, G. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22165–22168, 1998.

MIRANDA, F. M. **Avaliação da proteção solar e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do caule e das folhas do *croton tricolor klotzsch ex. Baill.*** Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2012.

MORAIS, L. A. S. Influência dos Fatores Abióticos na Composição Química dos óleos Essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009

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

_____; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006b.

MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R., MUNTANÉ, J., MUÑOZ, M. C., BUJALANCE, I., MONTILLA, P., TUNEZ, I. Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 196–203, 2006.

NAPOLI, M. E. CURCURUTO, G. RUBERTO, G. Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 213–223, 2010.

NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. **New York: Academic**, p. 471-495, 1977.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K.; Membrane damage due to lipid oxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 201–205, 1991.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; 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.13, supl. 2, p. 5-8, 2003.

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

OLIVEIRA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P. Intoxicações com Espécies da Família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 69-71, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, A. M. C. de. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp.*** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 81p, 2011.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1046–1055, 2006.

_____; CAILLET S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

PALMEIRA JUNIOR, S. F.; CONSERVA, L. M.; BARBOSA FILHO, J. M. Clerodane diterpenes from *Croton* species: Distribution and a compilation of their C-13 NMR spectral data. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 4, p. 319-344, 2006.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHAE, M. Ayurveda and Natural Products Drug Discovery. **Current Science**, v. 86, n. 6, p. 789-799, 2004.

PEREIRA, C. G. ; GUALTIERI, I. P. ; MAIA, N. B. ; MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction applied to obtaining vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) extracts from roots cultivated hydroponically. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, p. 44-50, 2008.

PEREIRA, R. J., CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035, 2000.

PIO-CORREA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v. 5, 1974.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 125–134, 2002.

PURCHASE, I. F. H.; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J.; STYLES, J. A.; ANDERSON, D.; LEVEVRE, P. A.; WESTWOOD, F. R. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. **British Journal of Cancer**, v. 37, p. 873-959, 1978.

PUTNAM, K.P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in Vitro**, v. 16, p. 599-607, 2002.

RADCLIFFE-SMITH, A. *Drypetes* Vahl. Pp. 50–52 in **Genera Euphorbiacearum**. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, 2001.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 327p., 1997.

RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; FIGUEIREDO, M. A., organizadores. *Manual sobre métodos de estudo florístico e fitossociológico: ecossistema caatinga*. **Sociedade Botânica do Brasil**. São Paulo. 29p, 2013.

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

RODRIGUES, G.; MARCOLIN, E.; BONA, S.; PORAWSKI, M.; LEHMANN, M.; MARRONI, N. P. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetics rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, n.3, 2010.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R. L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clinical Neuroscience Research**, v. 5, p. 3-14, 2005.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174, 2000.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-24, 2001.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Brasil, **Journal Of Brazilian Chemical Society**, n. 18, p. 11-33, 2007.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular**

ao estresse oxidativo. Canoas, RS: Ed. ULBRA, 2004.

SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 361-373, 2005.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - enferm.** vol.13, 2004.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9–15, 1975.

SCHULTES, R. E. Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 94, p. 79-95, 1987.

SCOPEL, V. A. **Análise Botânica, Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nibra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schlttdt. e Avaliação Preliminar da Estabilidade.** Dissertação (mestrado em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SECCO, R.S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M. F.; LIMA, L. R.; MEDEIROS, D.; HAIAD, B. S.; OLIVEIRA, A. S.; CARUZO, M. B. R.; CARNEIRO-TORRES, D.; BIGIO, N. C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 227-242, 2012.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567–579, 2007.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes — by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 239 – 243, 2001.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SIKKEMA, J.; De BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8028, 1994.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora alcance, 422p, 2003.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2007.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1998.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H.W.; SCHELD, W.M.; BARTLETT, J.G.; EDWARDS, J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 155–164, 2008.

STOJKOVIĆ, D.; PETROVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; KUKIĆ-MARKOVIĆ, J.; PETROVIĆ, S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3205-3208, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artemed: 2009.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-222, 2000.

TISSERAND, R.; BALACS, T. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. **Churchill Livingstone**: London, 1999.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

_____; KETS, E. P.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, p. 233-238, 2000.

VALGIMIGLI, L.; VALGIMIGLI, M.; GAIANI, S.; PEDULLI, G. F.; BOLONDI, L. Measurement of oxidative stress in human liver by EPR spinprobe technique. **Free Radical Research**, v. 33, p. 167-178, 2000.

_____. Essential oils: an overview on origins, chemistry, properties and uses. In: Valgimigli, L. **Essential Oils as Natural Food Additives**, Ed. Nova Science Publishers, p. 1- 24, 2012.

VALKO, M.; MORRIS, H.; MAZUR, M.; RAPTA, P.; BILTON, R. F. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the a etiology of colon cancer? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1527, p. 161-166, 2001.

_____; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

_____.; MONCOL, J.; MAZUR, M.; LEIBFRITZ, D.; CRONIN, M. T. D.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

_____. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep?. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 409, 2000.

VUNDA, S. L. L. Estudo Químico e Biológico de Espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) Nativas do Rio Grande do Sul. 99p, **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal of ethnopharmacology**, v. 51, p. 793-823, 1996.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibiótico e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. 1992, Version: 19th August 2014. delta-intkey.com

WEBSTER, G. L. A Provisional Synopsis of the Sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, p. 793-823, 1993.

_____. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of

Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WHO. *Bulletin of the World Health Organization*. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, 1998.

XUE, J.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12720-12726, 2013.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, p. 201-210, 1997.