

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Análise da citogenotoxicidade e identificação de compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth.**

**KATIANNE SOARES LOPES**

**ORIENTADOR (A): PROF. DR. ANTÔNIO LUIZ MARTINS MAIA FILHO**

**CO-ORIENTADOR (A): PROF. DR. VALDILÉIA TEIXEIRA UCHÔA**

Teresina – PI

2022

# **UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## **Análise da citogenotoxicidade e identificação de compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth.**

**KATIANNE SOARES LOPES**

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Bioprospecção e Fitoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Valdiléia Teixeira Uchôa

Teresina – PI

2022

L864a Lopes, Katianne Soares.

Análise da citogenotoxicidade e identificação de compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth / Katianne Soares Lopes. – 2022.

51 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Piauí – UESPI, Programa de Pós-Graduação em Química, *Campus* Poeta Torquato Neto, Teresina-PI, 2022.

“Orientador Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho.”

“Co-Orientadora Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa.”

“Área de concentração: Bioprospecção e Fitoquímica.”

1. *Allium* cepa. 2. Fitocompostos bioativos. 3. Marmeleiro.  
4. Velame. I. Título.

CDD: 540

# **Análise da citogenotoxicidade e identificação de compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth.**

**KATIANNE SOARES LOPES**

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Bioprospecção e Fitoquímica.

Aprovado em 20 de Julho de 2022.

Membros da Banca:



---

Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho  
(Presidente/Orientador – UESPI)



---

Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa  
(Coorientadora - UESPI)



---

Prof. Dr. Francisco Artur e Silva Filho  
(Examinador Externo – UESPI)



---

Profa. Dra. Francielle Aline Martins  
(Examinadora Interna – UESPI)

Teresina–PI  
2022

*“A Deus, pela grande oportunidade de aprendizagem que me deste, pelo amparo, amor e paciência. A meus pais, por serem meu exemplo de persistência e dedicação. A Andreina Pinheiro dos Santos, pelo incentivo, força e apoio durante todo o processo. Especialmente, à família NECE, pela dedicação amorosa na evolução da consciência.”*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, pelo dom da vida e pelo despertar da consciência.
- ❖ Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), que contribuíram para a construção da árdua jornada dos meus conhecimentos e de minha trajetória.
- ❖ Aos laboratórios e instituições onde o trabalho foi realizado: Laboratório de Geoquímica Orgânica – LAGO (Universidade Federal do Piauí – UFPI); Laboratório de Química da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) - Núcleo de Pesquisa, Biotecnologia e Diversidade (NPBio); Laboratório de Química da UESPI - Campus Alexandre Alves Oliveira (Parnaíba-PI); e Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias – GERADEC, que disponibilizou suporte laboratorial.
- ❖ A meus familiares, pela paciência e dedicação, em especial a meus irmãos, José e Christiane.
- ❖ À Andreina Pinheiro dos Santos, pelo incentivo diário e, principalmente, por acreditar no meu potencial.
- ❖ Aos mestres amigos e orientadores deste trabalho, Prof. Antônio Luiz Martins Maia Filho e Prof. Valdiléia Teixeira Uchôa, pela total dedicação, apoio e paciência.
- ❖ À turma de Mestrado da UESPI do ano de 2019 e anos anteriores, pelo auxílio constante.
- ❖ Ao apoio e incentivo, em especial da Patrícia, e à Família NECE.
- ❖ A todos que estiveram presentes na minha caminhada com compreensão, respeito e incentivo pelo desenrolar de minha evolução, mesmo nos momentos mais difíceis, mas com alto impacto em minha carreira profissional.

*“Só é feliz quem é livre. Só é livre quem assume responsabilidade.”*

*Sebastião Camargo*

## RESUMO

LOPES, K.S. **Análise da citogenotoxicidade e identificação de compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth.** 2022. 51 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como “marmeleiro” e “velame”, tem alta concentração de óleos voláteis nas folhas, sendo amplamente utilizada pela medicina popular. Os objetivos deste trabalho foram identificar os compostos fitoquímicos e analisar a citogenotoxicidade do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* Kunth. O óleo foi extraído por hidrodestilação e o perfil fitoquímico detectado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Na análise toxicogenética, as raízes de *Allium cepa* foram expostas ao Dimetilsulfóxido 1% e Metilmetanosulfonato (MMS, 10µg/mL), controles negativo e positivo, respectivamente, e ao óleo de *C. heliotropiifolius* em seis concentrações (0,32; 1,6; 8; 40; 200 e 1000 mg/L). O perfil fitoquímico apresentou 40 bandas cromatográficas e foram identificados 33 compostos. O α-pineno (16,70%) e 1,8-cineol (13,81%) foram identificados como majoritários. Alguns desses metabólitos secundários identificados apresentam atividades biológicas e farmacológicas já estudadas como antissépticas, inseticidas, viricidas, fungicidas, analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias, dentre outras. No teste *A. cepa*, observou-se citotoxicidade do óleo nas concentrações de 0,32; 1,6 e 200 mg/L e genotoxicidade em 200 e 1000 mg/L, com micronúcleos e perdas cromossômicas significativas. Tendo como base os resultados aqui apresentados, pode-se concluir que o óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* apresenta hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados, além de possuir efeito citotóxico e genotóxico nas células de *A. cepa*. Percebe-se que o projeto contribuiu significativamente para a comprovação experimental dos compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas desta planta, além de favorecer o incentivo a futuras pesquisas envolvendo seu uso terapêutico e/ou fitoquímico.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*. Fitocompostos bioativos. Marmeleiro. Velame.

## ABSTRACT

*Croton heliotropiifolius* Kunth, popularly known as “quince” and “velame”, has a high concentration of volatile oils in the leaves, and is widely used in folk medicine. The objectives of this work were to identify the phytochemical compounds and analyze the cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *C. heliotropiifolius* Kunth. The oil was extracted by hydrodistillation and the phytochemical profile was detected by gas chromatography and mass spectrometry. In the toxicogenetics analysis, *Allium cepa* roots were exposed to 1% Dimethylsulfoxide and Methylmethanesulfonate (MMS, 10µg/mL), negative and positive controls, respectively, and to *C. heliotropiifolius* oil at six concentrations (0.32; 1.6; 8; 40; 200 and 1000 mg/L). The phytochemical profile showed 40 chromatographic bands, and 33 compounds were identified.  $\alpha$ -pinene (16.70%) and 1,8-cineole (13.81%) were identified as the majority. Some of these identified secondary metabolites have biological and pharmacological activities already studied as antiseptic, insecticide, viricidal, fungicidal, analgesic, sedative, and anti-inflammatory, among others. In the *A. cepa* test, oil cytotoxicity was observed at concentrations of 0.32; 1.6, and 200 mg/L and genotoxicity at 200 and 1000 mg/L with micronuclei and significant chromosomal losses. Based on the results presented here, it can be concluded that the essential oil of *C. heliotropiifolius* leaves has monoterpene hydrocarbons, and oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes, and oxygenated sesquiterpenes, in addition to having a cytotoxic and genotoxic effect on *A. cepa* cells. It is noticed that the project contributes significantly to the experimental proof of the bioactive compounds present in the essential oil of the leaves of this plant. In addition to encouraging future research involving therapeutic and/or phytochemical use.

**Keywords:** *Allium cepa*. Bioactive phytocompounds. Quince tree. Canopy.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.1.</b> Fotografia a) Folhas de <i>C. heliotropifolius</i> e b) <i>C. heliotropifolius</i> com frutos e sementes.....	15
<b>Figura 3.1.</b> Fotografia do aparelho de Clevenger modificado por Gottlieb .....	25
<b>Figura 4.1.</b> Fotografia da amostra do óleo essencial de <i>C. heliotropiifolius</i> .....	29
<b>Figura 4.2.</b> Cromatograma da análise do óleo essencial de <i>C. heliotropiifolius</i> por CG/EM.....	29
<b>Figura 4.3.</b> Cromatograma da análise do óleo essencial de <i>C. heliotropiifolius</i> por CG/EM, com destaque para os compostos majoritários.....	30
<b>Figura 4.4.</b> Alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. Cepa</i> .....	40

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 4.1.</b> Composição fitoquímica do óleo essencial das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> por análise por CG-EM, com seus respectivos: tempos de retenção, fórmulas e massas moleculares e percentuais relativos de áreas .....	30
<b>Tabela 4.2.</b> Composição percentual do óleo essencial das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> .....	32
<b>Tabela 4.3.</b> Principais compostos majoritários e outros compostos que têm porcentagem próxima aos compostos considerados mais relevantes ao estudo, identificados por CG-EM do óleo essencial das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i> .....	35
<b>Tabela 4.4.</b> Percentual de fases de mitose, índice mitótico e alterações cromossômicas totais em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>C. heliotropiifolius</i> (OECH) .....	39
<b>Tabela 4.5.</b> Alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>C. heliotropiifolius</i> .....	40

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- BC** – Célula binucleada;
- CA** – Aderência cromossômica;
- CB** – Quebra cromossômica;
- CBr** – Ponte cromossômica;
- CG-EM** – Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas;
- CL** – Perda cromossômica;
- Cm** – C-metáfase;
- CN** – Controle negativo;
- CP** – Controle positivo;
- CS** – Controle solvente;
- DMSO** – Dimetilsulfóxido;
- H.E.** – Hematoxilina e Eosina;
- IFPI** – Instituto Federal do Piauí;
- IM** – Índice mitótico;
- LAGO** – Laboratório de Geoquímica Orgânica;
- MA** – Anáfase multipolar;
- MABr** – Anáfase multipolar com ponte cromossômica;
- MMS** – Metilmetanosulfonato;
- MPBio** – Núcleo de Pesquisa, Biotecnologia e Biodiversidade;
- NB** – Broto nuclear;
- NPPM** – Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais;
- O** – Oeste;
- OMS** – Organização Mundial da Saúde;
- Pc** – Celula poliploide;
- S** – Sul;
- SISGEN** – Gerenciamento do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado;
- UESPI** – Universidade Estadual do Piauí;
- UFPI** – Universidade Federal do Piauí.

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 Gênero <i>Croton</i> .....	13
1.2 Potencial Biológico do Gênero <i>Croton heliotropiifolius</i> .....	15
1.3 Ação citotóxica, genotóxica e mutagênica do Gênero <i>Croton</i> .....	16
<b>CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
2.1 Fitoterápicos.....	18
2.2 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).....	20
2.3 Ensaio <i>Allium cepa</i> L.....	20
<b>CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>22</b>
3.1 Materiais e Reagentes.....	22
3.2 Metodologia Geral .....	23
3.2.1 <i>Extração do óleo essencial de C. heliotropiifolius</i> .....	23
3.2.2 <i>Condições cromatográficas de análise</i> .....	25
3.2.3 <i>Ensaio Allium cepa</i> .....	26
3.3 <i>Análise estatística</i> .....	27
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
4.1 Análise dos constituintes voláteis do óleo essencial das folhas do <i>C. heliotropiifolius</i> e do ensaio <i>Allium cepa</i> .....	28
<b>CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

*A humanidade busca na natureza, desde os tempos remotos, a cura, o tratamento e a prevenção de doenças. Croton heliotropiifolius é uma planta medicinal com amplo espectro em ações biológicas como antisséptica, antiespasmódica, antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e moduladora em drogas nas funções antibacteriana e antifúngica, além de conservantes de alimentos, em distúrbios gastrointestinais e perda de peso.*

### 1.1 Gênero *Croton*

Desde a segunda metade do século XX, evidenciou-se uma crescente evolução na medicina alopática, no entanto, ainda existem obstáculos para a aquisição de medicamentos pela população carente. Por esse motivo, além da fácil obtenção e da tradição do uso de plantas, é que populações de baixa renda ainda usam muito a medicina tradicional à base de ervas<sup>1</sup>.

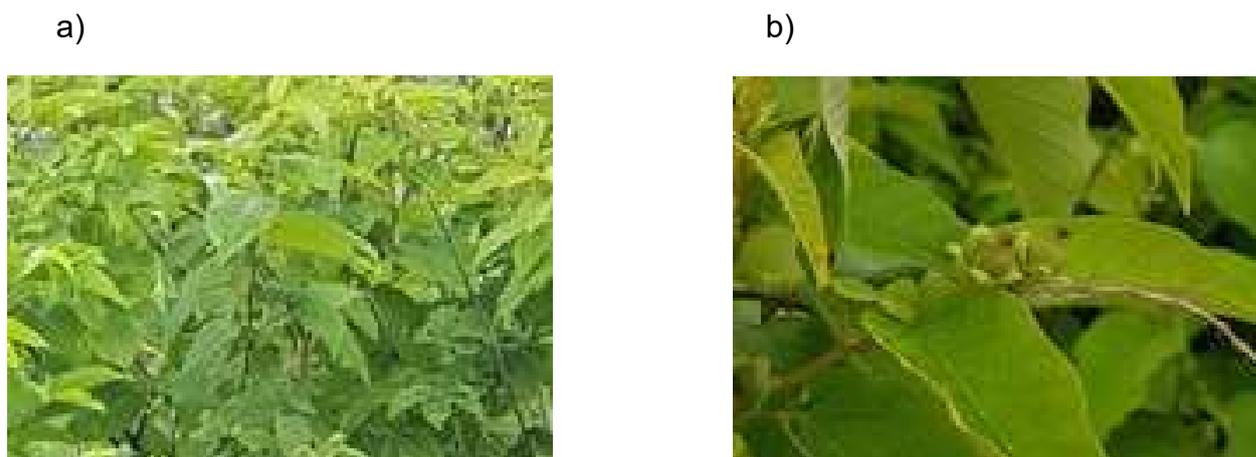
A Organização Mundial da Saúde (OMS) caracteriza “planta medicinal” como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”<sup>2</sup>. O gênero *Croton* corresponde, aproximadamente, a 300 gêneros e 8000 espécies encontradas em todo o mundo, especialmente na América e na África. Esse grupo se apresenta em habitats distintos, variando segundo o tamanho das árvores. É um gênero com flores monogâmicas e as frutas geralmente possuem cápsulas com três partes, cada uma com uma semente oleosa<sup>3</sup>. Essa família se estende por todas as regiões tropicais do globo<sup>4</sup>. A flora nacional é constituída de forma ampla, pois representa cerca de 72 gêneros e 1100 espécies conhecidas<sup>5</sup>. Alguns de seus gêneros desempenham um papel importante na medicina popular, no tratamento da diabetes, de problemas renais e até mesmo do câncer<sup>6</sup>.

Neste estudo, destacaremos o gênero *Croton*, pertencente à família Euphorbiaceae, que apresenta uma gama de espécies com grande número de metabólitos secundários<sup>6</sup>. Esse é um dos gêneros mais importantes dessa família que engloba cerca de 1200 espécies distribuídas pelas Américas<sup>4</sup>. No Brasil, encontramos uma boa diversidade desse gênero, existindo mais de 350 espécies nativas<sup>7</sup>.

Portanto, o gênero *Croton* é extremamente essencial ao ecossistema terrestre. Muitas de suas espécies são pioneiras, colonizando-se à beira de estradas, na margem de rios e em clareiras de matas, o que se verifica, justamente, por sua produção massiva de flores e frutos durante grande parte do ano, que as tornam ótimas candidatas para a restauração de áreas desmatadas<sup>8</sup>. Além disso, o gênero *Croton* possui grande variedade de metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides, o que potencializa as possibilidades de uso terapêutico dessa espécie e gera um potencial positivo para a economia, principalmente a indústria farmacêutica<sup>9,10</sup>.

Verificamos também que as plantas têm sido usadas pelo homem desde tempos remotos, seja por comunidades tradicionais seja como objeto de estudos interdisciplinares<sup>11</sup>. Para ampliar ainda mais essa busca, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, reconhecendo assim a medicina tradicional como parte dos sistemas de saúde e impulsionando ainda mais a capacidade tecnológica dessa área<sup>12</sup>.

Percebe-se, dessa forma, como é grande a importância de compreender os dois tipos essenciais de metabolismos das plantas: o primário, responsável pela fabricação de compostos essenciais ao desenvolvimento vital, e o secundário, originado no próprio metabolismo primário, que possibilita a construção de novos compostos com diversas finalidades, por exemplo, a defesa contra herbívoros e infecções por microrganismos, a proteção contra raios ultravioleta, a atração de polinizadores, dentre outros<sup>13</sup>.



Fonte: Katianne Soares Lopes. (2020)

**Figura 1.1.** Fotografia a) Folhas de *C. heliotropiifolius*; b) *C. heliotropiifolius* com frutos e sementes;

## 1.2 Potencial biológico do *Croton heliotropiifolius* Kunth

O *Croton* é popularmente conhecido pelo nome de “velame” ou “marmeleiro”, usado na medicina popular nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Leste do Brasil. O óleo essencial dessa espécie possui uma composição complexa, além de um odor forte. Tem características biológicas, como antisséptica, inseticida, viricida, fungicida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, espasmolítica e anestésica local. Além disso, o *Croton* pode ser usado como conservante de alimentos, em distúrbios gastrointestinais e para perda de peso<sup>14</sup>. As espécies do gênero *Croton* também são utilizadas para tratar diversas enfermidades, tais como problemas digestivos, diabetes e febre<sup>15</sup>.

A espécie *C. heliotropiifolius* possui atividade antimicrobiana contra variadas espécies de bactérias e fungos, além de efeito modulador sobre atividades com drogas antimicrobianas e antifúngicas<sup>16,17</sup>. Também tem sido utilizada pela medicina tradicional, em chás, infusões ou extratos para o tratamento de dores no estômago, febres e vômito<sup>18</sup>. Além disso, o óleo essencial dessa espécie serve como protetor contra o mosquito *Aedes aegypti*<sup>17</sup>.

Visto que esses compostos são muito importantes para a pesquisa farmacológica, exatamente pelas propriedades biológicas que exercem no ser humano, justifica-se o grande interesse pelos metabólitos secundários, como os polifenóis, flavonoides, isotiocianatos, glucosinolatos, taninos, triterpenos, fitoesteróis, entre outros<sup>19</sup>. O óleo

essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* apresenta como compostos químicos terpenos, em especial, os monoterpenos e sesquiterpenos<sup>20</sup>. Esse é outro fator que eleva a importância de pesquisas multidisciplinares sobre as características etnobotânicas, químicas, farmacológicas e agrônomas para ampliação de conhecimentos relativos às plantas medicinais<sup>1</sup>.

### 1.3 Ação citotóxica, genotóxica e mutagênica do Gênero *Croton*

O consumo indiscriminado de plantas medicinais pela população pode ocasionar efeitos negativos, uma vez que certas substâncias que elas contêm podem ser tóxicas. Na avaliação do potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico de frações do extrato de *Croton sp.* (Euphorbiaceae) foram observados potenciais citotóxicos e mutagênicos em *C. betaceus* e *C. lundianus*. O fracionamento demonstrou efeitos tóxicos nas espécies, com o aparecimento de aberrações cromossômicas e nucleares como: micronúcleos, quebras cromossômicas e brotos, pontes, anáfases multipolares e aderências cromossômicas, revelando possíveis efeitos nocivos ao ser humano, bem como reforçando que o uso de plantas medicinais deve ser realizado de forma consciente e responsável, pois algumas plantas possuem potenciais de intoxicação e devem, portanto, ser consumidas com atenção e cuidado<sup>21</sup>.

Na análise da mutagenicidade do extrato metílico de *C. lechleri* (sangue-de-dragão), por meio do teste de micronúcleo em *Allium cepa*, foi constatado que o extrato da seiva da casca de *C. lechleri* em concentrações de 0,1mL, 0,3mL, 0,6mL para 50mL de H<sub>2</sub>O não tem ação mutagênica, no entanto, o resultado obtido com o uso da concentração de 1mL demonstrou um alto índice de micronúcleos, o que evidencia o potencial mutagênico dessa espécie<sup>22</sup>.

Enquanto isso, na avaliação da atividade fitotóxica do extrato etanólico bruto e frações semipurificadas do caule e folhas de *C. doctoris* sobre a germinação, crescimento e índice mitótico de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*A. cepa*), em laboratório, foi possível identificar que os aleloquímicos presentes na fração acetato de etila (FAE) do caule e das folhas de *C. doctoris* causavam inibição no crescimento de alface e cebola. Um dos mecanismos de ação na inibição do crescimento, provavelmente, é a ação inibitória da FAE na etapa de divisão celular das plantas alvo. Esses resultados sugerem o alto potencial fitotóxico da espécie *C. doctoris*<sup>23</sup>.

O uso de ensaios biológicos para avaliar a bioatividade dos extratos e compostos de plantas é frequentemente aplicado para identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas. Nesse estudo, que objetivou avaliar a citotoxicidade do extrato de resina de planta medicinal *C. urucurana* por meio de bioensaio com *A. cepa* (cebola), os resultados mostraram que os extratos, nas doses e tempos de exposição avaliados, foram citotóxicos e retardaram os crescimentos radiculares das cebolas. O comprimento das raízes diminuiu com o aumento das concentrações do extrato<sup>24</sup>.

Além disso, destacamos que um dos grandes desafios apresentados diante dos trabalhos envolvendo plantas é a crença de que as plantas medicinais são seguras, sem efeitos colaterais para o organismo ou até mesmo reações tóxicas<sup>25</sup>, apesar de certas plantas apresentarem características citotóxicas já confirmadas<sup>26</sup>. Há, ainda, as características genotóxica e/ou mutagênica, sendo, portanto, essenciais estudos que verifiquem a presença ou ausência dessas características verificadas em espécimes vegetais usadas pela população<sup>27</sup>.

## 1.4 Objetivo geral

Analisar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do *C. heliotropiifolius* Kunth, a fim de que se compreenda melhor a interação desse espécime com o material genético da célula, e identificar os compostos orgânicos presentes no óleo essencial das suas folhas, em plantas cultivadas na cidade de Buriti dos Lopes - Piauí, pelo método de CG-EM.

## 1.5 Objetivos Específicos

- Analisar a citogenotoxicidade do óleo essencial do *C. heliotropiifolius*.
- Realizar a bioprospecção fitoquímica do óleo essencial do *C. heliotropiifolius*.
- Analisar os metabólitos secundários das folhas do *C. heliotropiifolius* por técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa - CG/EM.
- Correlacionar o óleo essencial e os metabólitos bioativos com a atividade biológica do *C. heliotropiifolius* já relatada na literatura.

# Capítulo 2

## REFERENCIAL TEÓRICO

---

---

*O gênero Croton, pertencente à família Euphorbiaceae, engloba uma vasta gama de espécies, as quais despertaram o interesse científico devido as suas aplicações na medicina popular. O C. heliotropiifolius, espécie estudada neste trabalho, é conhecido popularmente como “velame” ou “marmeleiro” em algumas regiões. Na medicina popular, essa espécie é utilizada no tratamento de febres e problemas digestivos, no alívio da dor de estômago e da desintéria. Há também estudos acerca de sua eficácia no combate ao mosquito Aedes aegypti. Constitui uma espécie endêmica do Nordeste brasileiro, encontrada, predominantemente, na vegetação da caatinga, em brejos, restinga e cerrado.*

### 2.1 Fitoterápicos

Tanto a utilização de produtos naturais como a pesquisa para novas aplicações aumentaram de forma evidente nas mais diversas áreas, dentre estas, a agricultura, a indústria alimentar e, especialmente, a indústria farmacêutica, na busca de substâncias com propriedades terapêuticas para tratamento de doenças relacionadas com a resistência de microrganismos<sup>28</sup>.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, chama-se “planta medicinal” toda planta (ou suas partes) que possuam componentes ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica<sup>29</sup>. Essas plantas têm sido usadas pelo homem desde tempos remotos e seu uso continua sendo valorizado, tanto nas comunidades tradicionais, como em estudos interdisciplinares, na busca de novos fármacos<sup>11</sup>. No século XIX, com o avanço científico na área da química, tornou-se possível realizar a identificação e a separação dos princípios ativos das plantas. Na atualidade, as plantas medicinais são utilizadas pela maior parte da população mundial como uma forma alternativa para a profilaxia das mais variadas enfermidades. No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de patologias tem influências da cultura africana, indígena e europeia<sup>30</sup>.

A ANVISA, no Brasil, tem como responsabilidade a regulamentação de plantas medicinais e seus derivados, visando proteger e promover a saúde da população ao garantir a segurança sanitária dos produtos<sup>31</sup>. Com as diversas buscas para ampliar a utilização de plantas, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que reconheceu a medicina tradicional como parte dos sistemas de saúde, promovendo os fitomedicamentos como um nicho forte no mercado e fortalecendo a capacidade tecnológica dessa área<sup>12</sup>.

As pesquisas científicas direcionadas para o reconhecimento da biodiversidade e para a bioprospecção de produtos naturais com atividade antimicrobiana são essenciais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, o que levará a uma melhor eficácia de medicamentos já existentes ou ao possível desenvolvimento de novos fármacos para o combate à resistência microbiana<sup>32</sup>.

O *Croton* é um dos gêneros da família Euphorbiaceae com uma ampla variedade de espécies que possuem diversos metabolitos secundários<sup>6</sup>, sendo um dos gêneros mais relevantes para essa família, que engloba cerca de 1200 espécies pelas Américas<sup>4</sup>. No Brasil, há uma grande diversidade desse gênero, cerca de 350 espécies nativas<sup>7</sup>, que são usadas para tratar problemas digestivos, diabetes e febre<sup>15</sup>. Dentro desse gênero, destaca-se o *C. heliotropiifolius*, que pertence à família Euphorbiaceae, conhecido de forma popular como “velame” e “pau-de-leite”. Com ampla distribuição na caatinga, região seca com bioma de floresta tropical que se localiza no Nordeste do Brasil. Estudos etnofarmacológicos demonstraram o uso dessa espécie nos mais diversos tratamentos, como: diabetes mellitus, Alzheimer, Parkinson, gripe, dor, inflamação, doenças de pele, dor nas costas, tosse, dor de estômago, distúrbios menstruais, anemia, distúrbios do sangue e parasitas. O *C. heliotropiifolius* apresenta propriedades antifúngicas e potencial antioxidante e é tradicionalmente utilizado em doenças fúngicas, parasitárias e degenerativas<sup>33</sup>.

## 2.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM) do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* foi realizada no cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 autoinjeter da Shimadzu), seguindo as seguintes condições de análise: injetor 250°C e temperatura inicial do forno de 50°C, apresentando uma rampa de aquecimento 5°C/min até 180°C, uma permanecendo por 4 minutos e uma segunda rampa de 10°C/min até 260, permanecendo por 10 minutos, razão Split de 1:100, temperatura da interface 250°C e fonte de 250°C, faixa de massa de 50 a 400 Daltons, ionização por impactos de elétrons 70 eV.

Para a cromatografia dos componentes, foi empregada uma coluna DB5-MS (Agilent), 30m×0,25mm, espessura do filme interno de 0,25µm, com fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano e Hélio como gás arraste. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas Nist08 e comparação com os registros de base da literatura.

O índice de retenção definido por Kovats é um índice que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos lineares de diferentes números de átomos de carbono. Esse índice de retenção fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais. Devido à grande importância comercial e farmacológica de terpenos e fenilpropanóides presentes em óleos essenciais e à dificuldade de sua caracterização, estão disponíveis na literatura várias compilações com análises, tempos de retenção e índices de retenção de Kovats, para o auxílio na caracterização de óleos essenciais<sup>34</sup>.

## 2.3 Ensaio *Allium Cepa*

É de suma importância a orientação da população sobre o potencial de toxicidade de plantas<sup>35</sup>. Das diversas metodologias usadas para esta finalidade, podemos citar os bioensaios com plantas superiores, que verificam a capacidade que uma substância tem de provocar danos celulares ou ao material genético<sup>36</sup>.

Um desses bioensaios é o teste *Allium cepa* (cebola), que tem apresentado bons resultados como bioindicador dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de plantas medicinais<sup>37</sup>. O teste *A. cepa* utiliza como parâmetro o crescimento das raízes para avaliar a toxicidade; o índice mitótico, para avaliar a citotoxicidade; e as anomalias mitóticas e aberrações cromossômicas, para avaliar a genotoxicidade<sup>38</sup>. As principais vantagens desse ensaio são o baixo custo, a confiabilidade e a concordância com outros testes de genotoxicidade<sup>39,40</sup>.

Além disso, destacamos que um dos grandes desafios apresentados nos trabalhos envolvendo plantas é a crença de que as plantas medicinais são seguras, sem efeitos colaterais para o organismo ou sem reações tóxicas<sup>25</sup>. Entretanto, certas plantas apresentam características citotóxicas já confirmadas<sup>26</sup>, além de características genotóxicas e/ou mutagênicas. Assim, são essenciais estudos que verifiquem a presença ou ausência dessas características em espécimes vegetais usadas pela população<sup>27</sup>.

# Capítulo 3

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

---

*O capítulo cita a parte metodológica desta pesquisa, bem como materiais, reagentes e equipamentos utilizados nas etapas experimentais, como: cromatografia gasosa com espectrometria de massas, tendinopatia induzida, grupos experimentais e aplicação dos materiais analisados durante a pesquisa. Além da análise da citogenotoxicidade pelo ensaio *Allium Cepa*.*

### 3.1 Materiais e Reagentes

O óleo essencial de *C. heliotropiifolius* foi extraído no laboratório da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), no Campus Alexandre Alves Oliveira, Parnaíba – PI, que disponibilizou os seguintes materiais:

- a) aparelho doseador de óleo essencial tipo Clevenger, modificado por Gottlieb;
- b) balão de fundo redondo de 5000 ml;
- c) béquer de 250 mL (X4);
- d) manta aquecedora;
- e) almofariz;
- f) pistilo;
- g) espátula (X2);
- h) papel alumínio;
- i) etiqueta;
- j) papel toalha;
- k) frasco de vidro com tampa;
- l) rotaevaporador (Büchi).

Também foram disponibilizadas as seguintes substâncias:

- a) sulfato de sódio anidro;
- b) diclorometano;
- c) água destilada.

O Laboratório de Geoquímica Orgânica da UFPI, por sua vez, disponibilizou os seguintes materiais:

- a) balança analítica (Bel ENGINEERING, UMARK 250A, máximo 250g, mínimo 0,01g, densidade 0,001g, erro 0,001g, CLASSE I);
- b) cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 autoinjeter da *Shimadzu*);
- c) algodão;
- d) etiqueta;
- e) papel toalha.

E as substâncias:

- a) difenil dimetilpolissiloxano;
- b) gás Hélio;
- c) etanol 70° e 96°.

## 3.2 Metodologia Geral

### 3.2.1 Extração do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*

As folhas da *C. heliotropiifolius* foram coletadas na localidade Cachoeira da Serragem, no município de Buriti dos Lopes - Piauí, em março de 2020, entre as coordenadas geográficas: latitude 3° 10' 46" S e longitude 41° 52' 12" O.

Uma exsicata da planta encontra-se depositada no Herbário Delta do Parnaíba, da Universidade Federal do Piauí, em Parnaíba-PI, registrada com o número 004638. O projeto para a realização desse trabalho foi cadastrado na plataforma SisGen (Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), com o número: A8B513F.

O óleo foi extraído no Campus Alexandre Alves Oliveira, da Universidade Estadual do Piauí, na cidade de Parnaíba-PI. As folhas coletadas foram higienizadas e submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho doseador de óleo essencial tipo Clevenger

modificado por Gottlieb. Esse processo consiste essencialmente em volatilizar o óleo essencial com uma corrente de vapor de água<sup>41</sup>.

Para a extração por hidrodestilação, foi utilizado o aparelho de Clevenger modificado<sup>42</sup>, acoplado a um balão de fundo redondo de 5000 mL. A utilização do aparelho de Clevenger permitiu a separação do óleo e da água, além do resfriamento do óleo, evitando possíveis decomposições. As folhas do *C. heliotropiifolius* foram higienizadas e colocadas no balão de fundo, onde foram adicionados 1500 mL de água deionizada. O recipiente foi levado para a manta aquecedora, para que as folhas sofressem o processo de hidrodestilação em aparelho doseador de óleo essencial tipo Clevenger modificado por Gottlieb. Como resultado, obteve-se o óleo essencial, que foi tratado com sulfato de sódio anidro para retirada de traços de água presentes na amostra<sup>43</sup>.

Logo em seguida, o óleo foi pesado, armazenado em frasco de vidro tipo âmbar e colocado sob resfriamento em freezer a -18° C, a fim de evitar a oxidação<sup>44</sup>. A utilização do aparelho de Clevenger permite a separação do óleo e da água, além do resfriamento do óleo, evitando possíveis decomposições. O tempo de extração foi de duas horas, contadas a partir da ebulição da amostra.

Ao final, o rendimento do processo extrativo foi determinado em duplicata pela relação massa/massa, conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de óleo essencial} = \text{massa de óleo essencial(g)} \times 100 / \text{massa de folhas(g)}$$

As massas dos óleos essenciais foram determinadas em balança semianalítica e seus valores comparados às respectivas massas das folhas do *C. heliotropiifolius* utilizadas.



**Figura 3.1.** Fotografia do aparelho de *Clevenger* modificado por *Gottlieb*.

### 3.2.2 Condições cromatográficas de análise

A cromatografia gasosa e a espectrometria de massa (CG-EM) do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* foram realizadas no cromatógrafo (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 autoinjeter da *Shimadzu*), seguindo as seguintes condições de análise: injetor 250°C e temperatura inicial do forno de 50 °C, apresentando uma rampa de aquecimento 5°C/min até 180°C, permanecendo por quatro minutos, e uma segunda rampa de 10°C/min até 260, permanecendo por dez minutos, razão *Split* de 1:100, temperatura da interface 250°C e fonte de 250°C, faixa de massa de 50 a 400 Daltons, ionização por impactos de elétrons 70 eV.

Para cromatografia dos componentes, foi empregada uma coluna DB5-MS (*Agilent*), 30m×0,25mm, espessura do filme interno de 0,25µm, com fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano e Hélio como gás arraste. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas Nist08 e comparação com os registros de base da literatura.

As caracterizações foram efetuadas através de determinação e correção dos índices de Kovats simulados, comparação com espectros de massa de substâncias sugeridas pelo banco de dados (espectroteca) (GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 autoinjeter da SHIMADZU) e dados de literatura<sup>43</sup>. Os dados

encontrados foram evidenciados através das porcentagens relativas para cada composto, calculadas via normalização das áreas dos picos cromatográficos. Observou-se a necessidade de traçar essa abordagem durante a pesquisa, a fim de descrever o comportamento de retenção do composto, além de fornecer sua sequência de dissociação<sup>45</sup>.

### 3.2.3 Ensaio *Allium cepa*

Cem sementes de *A. cepa* (cv. Vale Ouro IPA-11) foram germinadas em placas de Petri contendo água destilada em incubadora (BOD SL - 224<sup>®</sup>) com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C. Após o sistema radicular atingir cerca de 2 cm de comprimento, as sementes com as suas raízes foram submetidas aos controles e tratamentos para avaliar a citogenotoxicidade<sup>46</sup>.

As sementes foram transferidas para o controle negativo (CN) (Dimetilsulfóxido - DMSO 1% em água destilada), controle do solvente (CS) (água destilada) e controles positivos (MMS I: Metilmetanosulfonato 10 µg/mL dissolvido em DMSO 1% e MMS II: dissolvido apenas em água destilada). Foram colocados, também, nas seis concentrações (0,32; 1,6; 8; 40; 200 e 1000 mg/L) do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* diluídas em DMSO 1%, por um período de 48 h. As concentrações foram previamente determinadas no presente estudo, pois não foram tóxicas quanto ao tamanho médio das raízes (dado não mostrado).

Após os tratamentos realizados, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 etanol :1 ácido acético) por 6 - 8 h e estocadas a -20°C. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada, por 5 min cada, e hidrolisadas a 60°C, por 10 min, em HCl 1N. Após a hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, e permaneceram em local escuro por 2 h. Após esse período, as raízes foram lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético 2% e montadas com Entellan<sup>®47</sup>.

A citotoxicidade (índice mitótico) e a genotoxicidade (alterações cromossômicas) foram analisadas em cinco mil células meristemáticas (500 células/lâmina, em um total de 10 lâminas por tratamento), em microscópio de luz (Zeiss Primo Star com câmera Axiocam 105 color) com aumento de 400x. As alterações genotóxicas incluem alterações

celulares resultantes de efeitos aneugênicos (como C-metáfase, aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares e metáfases poliploides) e/ou efeitos clastogênicos (fragmentos de cromossomos na metáfase ou anáfase e pontes cromossômicas). Os micronúcleos podem surgir de efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos<sup>48</sup>.

### 3.3 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão e avaliados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste “*a posteriori*” de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), no programa BioEstat 5.3<sup>49</sup>.

# Capítulo 4

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

---

*O capítulo discorre sobre as evidências e análises admitidas nos testes realizados, nos quais o CG-EM possibilitou a identificação dos compostos de interesse do *C. heliotropiifolius*, permitindo a discussão com outros autores sobre a sua constituição fitoquímica, além das análises de sua citogenotoxicidade.*

### **4.1 Análise dos constituintes voláteis do *C. heliotropiifolius* e do ensaio *A. cepa*.**

#### **4.1.1 Resultado do cálculo do rendimento do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*.**

O rendimento do processo extrativo foi determinado em duplicata pela relação massa/massa, conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de óleo essencial} = \text{massa de óleo essencial(g)} \times 100 / \text{massa de folhas(g)}$$

(Equação 1)

A massa do óleo essencial foi determinada em balança semianalítica e seu valor comparado à respectiva massa das folhas utilizadas. A cada 600g de massa de folhas da espécie de *C. heliotropiifolius*, obteve-se um rendimento de 3,2 mL e massa de 2,8g de óleo essencial, o que forneceu uma densidade de 0,875 g/mL para um rendimento de 0,46% em relação à massa das folhas.

O rendimento do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* encontrado neste estudo é considerado satisfatório, já que o valor se enquadra entre valores já descritos na literatura para um rendimento entre 0,05% e 3,15%<sup>6</sup>. A Figura 4.1 mostra a imagem da amostra de óleo essencial *C. heliotropiifollius* produzida durante essa pesquisa.



Fig. 4.1. Fotografia da amostra do óleo essencial de *C. heliotropiifolius*.

#### 4.1.2 Análise dos constituintes voláteis do *Croton heliotropiifolius* Kunth.

Os constituintes voláteis do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* foram determinados por cromatografia gasosa, usando detecção por espectrometria de massa (CG / EM). Antes da injeção, 10  $\mu$ L do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* foi diluído em 0,5mL de metanol e 1  $\mu$ L do volume foi injetado para cada amostra estudada. A análise por CG/EM do óleo essencial das folhas *C. heliotropiifolius* forneceu o cromatograma (Figura 4.2).

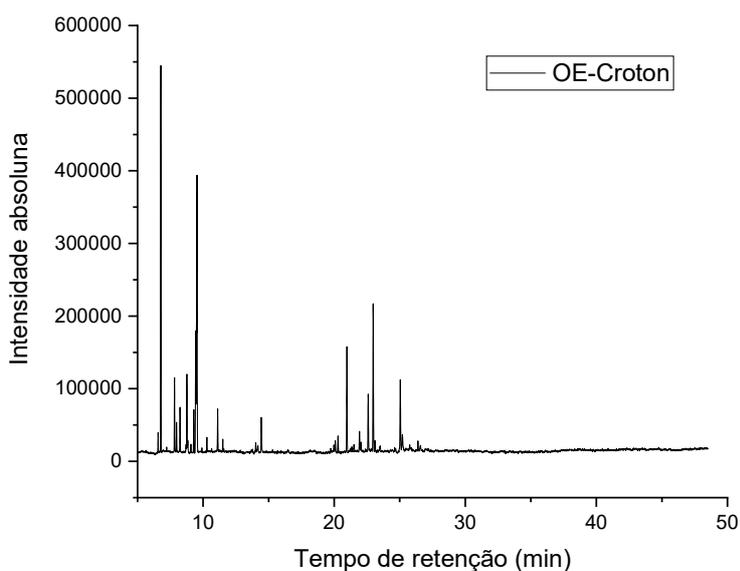
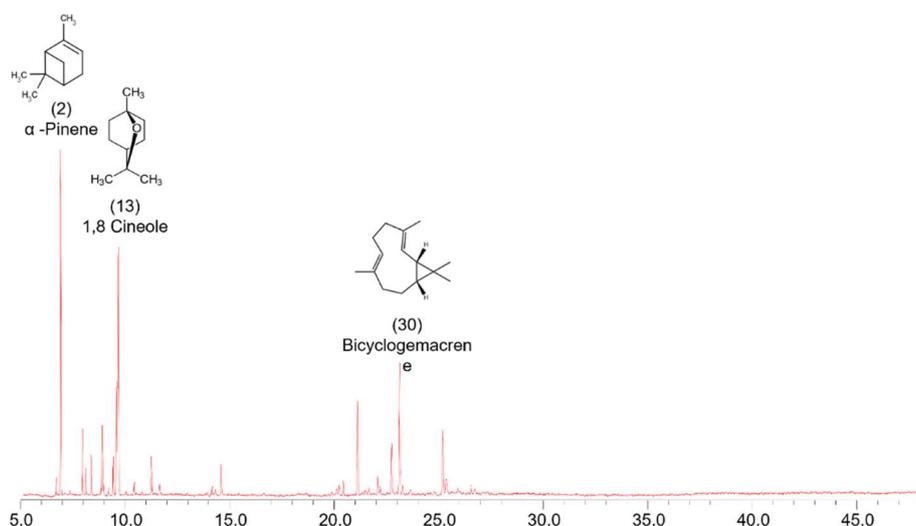


Fig. 4.2. Cromatograma da análise do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* por CG/EM

O cromatograma de *C. heliotropiifolius* mostrou 40 bandas, das quais 33 constituintes químicas foram identificados. Foi possível a identificação de 33 compostos, representando 96,77% do teor de voláteis e sete compostos não foram identificados. No óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*, os compostos presentes em maior percentual relativo de área foram:  $\alpha$ -pineno (02); 1,8-cineol (eucaliptol) (13); biciclogemacreno (30); e transcariofileno (25), apresentando as seguintes porcentagens na amostra analisada: 16,70%, 13,81%, 9,44% e 6,46%, respectivamente (Figura 4.3) (Tabela 1.1).



**Fig. 4.3.** Cromatograma da análise do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* por CG/EM, em destaque para os compostos majoritários.

**Tabela 4.1.** Composição fitoquímica do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* por análise por CG-EM com seus respectivos: tempos de retenção, fórmulas e massas moleculares e percentuais relativos de áreas.

Nº	T <sub>R</sub> (min)	Compostos	Fórmula molecular	Área Absoluta	Percentual relativo de área (%)
01	6,565	<i>alfa</i> -Tujeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	53368	0,81%
02	6,773	<i>alfa</i> -Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1099373	16,70%
03	7,820	Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	216987	3,30%
04	7,976	<i>l-beta</i> - Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	95722	1,45%
05	8,239	Mirceno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	132619	2,01%
06	8,699	Não Determinado	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	27300	0,41%
07	8,764	<i>alfa</i> -felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	252602	3,84%
08	8,834	(+) - Careno-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	43318	0,66%
09	9,072	<i>alfa</i> -Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	28532	0,43%
10	9,289	<i>Para</i> Cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	137556	2,09%

11	9,433	Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	387898	5,89%
12	9,491	<i>beta</i> -felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	378693	5,75%
13	9,535	1,8- Cineol (Eucaliptol)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	908997	13,81%
14	10,289	<i>gama</i> -terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	48025	0,73%
15	11,113	Terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	151434	2,30%
16	11,502	Linalol I	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	42757	0,65%
17	13,776	Iso-borneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	20885	0,32%
18	14,016	Terpinen-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	45737	0,69%
19	14,182	Não Determinado	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub>	58651	0,89%
20	14,438	(-) <i>alfa</i> -Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	155393	2,36%
21	19,973	<i>beta</i> -Bourboneno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	28949	0,44%
22	20,085	B- Elemeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	46493	0,71%
23	20,290	<i>Beta</i> – iso-comeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	68671	1,04%
24	20,732	Não Determinado	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	19585	0,30%
25	20,967	Transcariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	425495	6,46%
26	21,516	Guaiadiene (6,9)	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	40827	0,62%
27	21,931	<i>alfa</i> - Humulene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	89784	1,36%
28	22,044	epi-trans-Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	39878	0,61%
29	22,595	Germacreno-D	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	233574	3,55%
30	22,974	Biciclogemacreno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	621452	9,44%
31	23,114	<i>alfa</i> -Bulneseno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	44929	0,68%
32	23,506	<i>delta</i> -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	19529	0,30%
33	24,280	Não Determinado	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO	26726	0,41%
34	24,451	Não Determinado	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	24548	0,37%
35	24,615	Germacreno-B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	26467	0,40%
36	25,041	Espatuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	321564	4,89%
37	25,204	Óxido de cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	119365	1,81%
38	26,391	Iso- espatuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	44178	0,67%
39	26,580	Não Determinado	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	35244	0,54%
40	30,288	Não Determinado	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	19014	0,29%
					0,00%
				6582119	100,00%

Já os compostos identificados com menor percentual relativo de área foram: um composto não determinado (40) com 0,29%, delta-cadineno (32) e um composto não determinado (24) com 0,30%, outro composto não determinado (34) com 0,37% e iso-borneol (17) com 0,32%, e o germacreno-B (35) com 0,40%, respectivamente como apresentado na Tabela 1.1 Conforme essa tabela, os compostos (06), (19), (24), (33), (34), (39) e (40), com tempos de retenção de 8,699, 14,182, 20,732, 24,280, 24,451, 26,580 e 30,288, estão sendo relatados pela primeira vez no estudo dessa espécie. Percebe-se, contudo, que a espécie analisada apresenta uma variedade de espécies químicas que exige ainda mais estudos aprofundados sobre essa planta (Tabela 1.1).

Na análise do óleo essencial de *C. heliotropiifolius*, foi possível identificar 33 compostos, representando 96,77% do teor de voláteis e sete compostos não foram identificados. Esse óleo foi caracterizado pela predominância de monoterpenos hidrocarbonados (45,96%), sendo o  $\alpha$ -pineno (16,70%) o composto majoritário do óleo. O 1,8-cineol (13,81%), pertencente ao grupo dos monoterpenos oxigenados, é o segundo grupo de maior predominância dos constituintes voláteis do *C. heliotropiifolius* (Tabela 1.2).

**Tabela 4.2.** Composição percentual do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* em relação a classificação fitoquímica.

Constituintes	TR	IK*	IK**	Percentual relativo de área (%)
<b>Hidrocarbonetos Monoterpenos</b>				<b>45,96%</b>
<i>alfa</i> -Tujeno	6,565	931	930	0,81%
<i>alfa</i> -Pineno	6,773	939	938	16,70%
Sabineno	7,820	976	974	3,30%
<i>beta</i> -Pineno	7,976	980	980	1,45%
Mirceno	8,239	990	989	2,01%
<i>alfa</i> -Felandreno	8,764	1002	1007	3,84%
3-Careno	8,834	1011	1010	0,66%
<i>alfa</i> -Terpineno	9,072	1017	1018	0,43%
p-Cimeno	9,289	1024	1025	2,09%
Limoneno	9,433	1029	1030	5,89%
<i>beta</i> -Felandreno	9,491	1029	1032	5,75%
<i>gama</i> -Terpineno	10,289	1062	1060	0,73%
Terpinoleno	11,113	1088	1089	2,30%
<b>Monoterpenos Oxigenados</b>				<b>17,83%</b>
1,8-Cineol	9,535	991	1034	13,81%
Linalol	11,502	1096	1102	0,65%
iso-Borneol	13,776	1160	1182	0,32%
Terpinen-4-ol	14,016	1177	1190	0,69%
<i>alfa</i> -Terpineol	14,438	1188	1205	2,36%
<b>Hidrocarbonetos Sesquiterpenos</b>				<b>25,61%</b>

<i>beta</i> -Bourboneno	19,973	1388	1398	0,44%
B-Elemeno	20,085	1390	1402	0,71%
<i>beta</i> -iso-Comeno	20,290	1408	1409	1,04%
trans-Cariofileno	20,967	1419	1432	6,46%
Guaiadieno	21,516	1444	1451	0,62%
<i>alfa</i> -Humuleno	21,931	1438	1466	1,36%
epi-trans-Cariofileno	22,044	1466	1470	0,61%
Germacreno-D	22,595	1485	1489	3,55%
Biciclogemacreno	22,974	1500	1502	9,44%
<i>alfa</i> -Bulneseno	23,114	1509	1507	0,68%
<i>delta</i> -Cadineno	23,506	1523	1521	0,30%
Germacreno-B	24,615	1559	1559	0,40%
<b>Sesquiterpenos Oxigenados</b>				<b>7,37%</b>
Espatuleno	25,041	1578	1574	4,89%
óxido de Cariofileno	25,204	1583	1580	1,81%
iso-Espatuleno	26,391	1600	1621	0,67%
<b>TOTAL</b>				<b>96,77%</b>

TR – Tempo de retenção

IK\* – Índice de Kovats tabelado

IK \*\*- Índice de Kovats simulado pela regressão linear em coluna DB5-MS

A composição química da amostra do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* apresentou uma mistura significativa de hidrocarbonetos monoterpenos (45,96%), seguida de hidrocarbonetos sesquiterpenos (25,61%), monoterpenos oxigenados (17,83%) e sesquiterpenos oxigenados (7,37%). Esse óleo foi caracterizado pela predominância de monoterpenos hidrocarbonados, sendo o  $\alpha$ -pineno (16,70%) o composto majoritário do óleo. O 1,8-cineol (13,81%), pertencente ao grupo dos monoterpenos oxigenados, é o segundo grupo de maior predominância dos constituintes voláteis do *C. heliotropiifolius* (Tabela 1.2).

Dentre os diversos detectores presentes na cromatografia gasosa, destaca-se a captura de elétrons, o fotométrico de chama e a espectrometria de massas, que permitem a identificação de diferentes compostos químicos. Além disso, essa identificação acontece de forma rápida, que favorece a execução de análises químicas. Esse é o método mais empregado para determinação e quantificação de compostos voláteis ou volatilizáveis<sup>50</sup>. Essa abordagem de cromatografia pode vir acoplada ou não a um espectrômetro de massa (CG-EM), tornando mais acessível tanto a separação quanto a determinação dos compostos presentes em uma dada amostra. Nessa

abordagem também não há necessidade de uma amostra padrão, pois, produzindo-se um espectro de massa para cada um dos componentes encontrados, determina-se sua massa e seu local no cromatograma<sup>51</sup>.

Foi possível identificar a composição química e o rendimento dos óleos essenciais das espécies de *Croton* na presença similar dos compostos  $\alpha$ -pineno, cineol e biciclogemacreno, como compostos majoritários<sup>6</sup>. A composição química presente em plantas pode ser influenciada por diversos fatores, tais como a temperatura média do local onde a planta foi coletada, o local onde ocorreu a coleta, a disponibilidade hídrica, a radiação solar e a disponibilidade de nutrientes no solo<sup>6</sup>.

Em outro estudo semelhante, foram analisadas três espécies de *Croton* e foi constatado que a atividade metabólica dessas espécies possui um índice elevado em ambiente com temperaturas altas e com a presença de radiação solar. Além disso, o cariofileno se destacou como composto majoritário, além da presença de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados<sup>52</sup>, o que corrobora o estudo em questão. Destaca-se, ainda, que 11 dos compostos encontrados se apresentam de forma similar ao nosso estudo, fato que atesta ainda mais a importância da verificação de métodos analíticos para composição química em plantas e a seriedade da pesquisa.

Um estudo sobre a atividade antibacteriana e a composição química do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* de Amargosa - BA identificou, no óleo, a presença de sesquiterpênicos (77,14%), com predominância dos sesquiterpênicos de hidrocarbonetos (50,00%). Os compostos majoritários foram (*E*)-cariofileno ( $23,85 \pm 0,36\%$ ),  $\gamma$ -muuroleno ( $10,52 \pm 0,05\%$ ) e viridifloreno ( $8,08 \pm 0,11\%$ )<sup>15</sup>. Esse estudo também corrobora os dados encontrados nesta pesquisa.

Em estudo semelhante, que analisou a composição química do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* por meio, também, de CG/EM, foram determinados 25 compostos, dentre os quais 15 são caracterizados como monoterpênicos (52,62%) e oito como sesquiterpênicos (47,01%), com o biciclogemacreno como composto majoritário. Esse óleo essencial teve como componentes majoritários o biciclogemacreno (19,04%), o *E*-cariofileno (18,51%), o limoneno (15,65%) e o  $\alpha$ -pineno (13,24%)<sup>16,6</sup>. Verificamos aqui a presença de compostos similares aos encontrados nesta pesquisa, contribuindo assim para a comprovação das análises realizadas durante o trabalho.

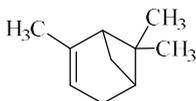
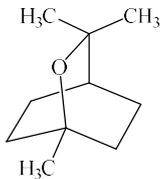
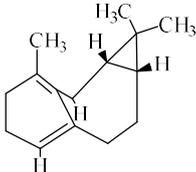
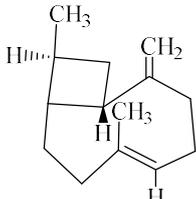
O óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* apresenta terpenos como compostos químicos, em especial, os monoterpênicos e os sesquiterpênicos<sup>20</sup>. Existem

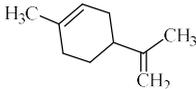
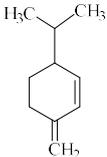
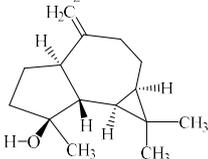
fatores desencadeantes de alterações nas reações de biossíntese, com consequente aumento na produção de compostos secundários, como, por exemplo, os elevados níveis de radiação<sup>53</sup>. É possível, ainda, estimar a quantidade de biomassa viável para a confecção de uma quantidade satisfatória de óleo essencial, através de estudo de rendimento.

As plantas apresentam mudanças qualitativas e quantitativas durante todo o decorrer do ano. Segundo este estudo, a temperatura, a pluviosidade, o vento, o solo, a latitude, a altitude e a época estacional, que são considerados fatores externos, interferem na constituição química das plantas estudadas<sup>53</sup>.

A Tabela 1.3 contém os compostos majoritários da espécie identificada por análise de CG-EM do óleo essencial produzido neste estudo:  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol e outros compostos que têm porcentagem próxima aos compostos considerados mais relevantes ao estudo. Além da fórmula estrutural, identificou-se o grupo fitoquímico e as atividades biológicas já comprovadas na literatura.

**Tabela 4.3.** Principais compostos majoritários e outros compostos que tem porcentagem próxima aos compostos considerados mais relevantes ao estudo, identificados por CG-EM do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*.

Nº	Compostos	Fórmula estrutural	Grupo fitoquímico	Atividade Biológica
1	<i>alfa</i> -pineno		Hidrocarbonetos Monoterpenos	Antinociceptiva <sup>54</sup> , anti-inflamatório, diurético, estimulante de apetite e anti-helmíntico <sup>55</sup>
2	1,8-cineol		Monoterpenos Oxigenados	O Cineol apresenta características anti-inflamatório <sup>56,57</sup> Antioxidante, protetor na inflamação pulmonar <sup>58</sup> e antimicrobiana <sup>59</sup>
3	Biciclogemacreno		Hidrocarbonetos Sesquiterpenos	Antifúngica e antimicrobiana <sup>60</sup> , antibacteriana <sup>61</sup>
4	Transcariofileno		Hidrocarbonetos Sesquiterpenos	Anti-espasmódica <sup>62</sup> , Antioxidante <sup>63,64</sup> , antibacteriana <sup>65</sup> , inflamatória <sup>66</sup> (anti-)

6	Limoneno		Hidrocarbonetos Monoterpenos	Antiinflamatório, diurético, estimulante de apetite e anti-helmíntico <sup>55</sup> . Além da atividade antimicrobiana <sup>67</sup>
6	Beta-felandreno		Hidrocarbonetos Monoterpenos	Antioxidante e anti-inflamatório <sup>68</sup>
7	Espatuleno I		Sesquiterpenos Oxigenados	Antioxidante, inflamatória, antiproliferativa e antimicrobacteriana <sup>69</sup>

### 4.1.3 Citogenotoxicidade do óleo essencial de *C. heliotropiifolius*

O índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao óleo essencial de *C. heliotropiifolius* indicou que o óleo foi citotóxico nas concentrações de 0,32; 1,6 e 200 mg/L, pois houve um aumento significativo do IM em relação ao controle negativo (CN) (Tabela 1.4). A proliferação celular observada está associada, principalmente, com o aumento significativo das prófases nas concentrações citadas, quando comparado com o CN. No entanto, a proliferação das prófases em 40 mg/L não foi suficiente para promover o efeito citotóxico. Além disso, as outras fases do ciclo celular de *A. cepa* não contribuíram para o aumento do IM, ou seja, na metáfase, não houve diferença estatística em nenhuma concentração, na anáfase somente a concentração de 0,32 mg/L mostrou redução significativa, enquanto na telófase foi evidenciada uma diminuição significativa nas concentrações de 1,6; 8; 40 e 1000 mg/L (Tabela 1.4).

**Tabela 4.4.** Percentual de fases da mitose, índice mitótico e alterações cromossômicas totais em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Croton heliotropiifolius* (OECH).

Tratamento (mg/L)	Fases da mitose (%)				Índice mitótico (%)	Alteração o cromossômica
	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
CN	25,81 ± 2,91	0,50 ± 0,20	0,43±0,33	1,00 ± 0,55	27,74 ± 2,84	1,08 ± 0,82
MMS I	14,23 ± 1,61*	0,52 ± 0,41	0,27±0,31	0,93 ± 0,43	15,95 ± 1,31*	8,26 ± 4,66**
OECH						
0.32	1,05± 10,97**	0,38 ± 0,17	0,13±0,19*	0,57 ± 0,35	52,13 ± 10,95**	2,84 ± 2,07
1.6	48,34 ± 8,03**	0,59 ± 0,62	0,22±0,27	0,46 ± 0,43*	49,61 ± 8,27**	3,27 ± 2,97
8	27,81 ± 3,99	0,41 ± 0,41	0,20±0,25	0,39 ± 0,48*	28,81 ± 4,06	4,04 ± 4,17
40	40,81 ± 8,49*	0,32 ± 0,36	0,41±0,37	0,42 ± 0,27*	41,96 ± 8,59	4,99 ± 4,62

200	49,03 ± 8,29**	0,76 ± 0,71	0,57±0,29	1,00 ± 0,78	51,36 ± 8,15**	6,20 ± 5,04*
1000	22,96 ± 4,09	0,10 ± 0,30	0,19±0,29	0,10±0,21***	23,34 ± 3,95	10,79 ± 6,74**

Os dados são medias:  $\pm$  SD (Desvio Padrão). CN: Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - 1% DMSO em água destilada). MMS I: 10 µg/mL de metilmetanossulfonato dissolvido em DMSO 1%. Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001) quando comparado ao NC. Os dados são para 5.000 células/tratamento. O DMSO 1% foi usado como controle negativo, mas como os resultados foram estatisticamente idênticos ao solvente (água destilada), os dados usando água foram omitidos. O controle positivo I (MMS solubilizado em DMSO 1%) e o controle positivo II (MMS solubilizado em água destilada) também foram estatisticamente idênticos, os dados do controle positivo II foram omitidos.

O sistema A. cepa é um dos métodos mais eficazes na identificação de alterações na divisão celular (citotoxicidade) e de danos cromossômicos (genotoxicidade e mutagenicidade)<sup>70</sup>. Além disso, o bioensaio é uma técnica de baixo custo e sensível, que apresenta uma boa correlação com outros modelos biológicos, como mamíferos e/ou *in vitro*, com a vantagem de excluir a necessidade de utilização e sacrifício de animais<sup>71</sup>.

A citotoxicidade presente em algumas concentrações do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* é atribuída, principalmente, à presença do componente majoritário  $\alpha$ -pipeno, encontrado no óleo, que pode atuar de forma sinérgica e/ou individual com outros fitoquímicos e desregular o ciclo celular. Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de substâncias lipofílicas e voláteis, com grande quantidade de terpenos, o que pode gerar citotoxicidade da maioria dos óleos essenciais<sup>72</sup>. Além disso, a citotoxicidade pode estar relacionada com a presença de diterpenoides, alcaloides e saponinas que, mesmo que estejam presentes em baixas concentrações, são substâncias naturalmente tóxicas<sup>59</sup>. As evidências da presença da classe de terpenos corroboram esta pesquisa e achados na literatura. Possivelmente, os fitoquímicos majoritários ( $\alpha$ -pipeno e 1,8-cineol) detectados no óleo essencial de *C. heliotropiifolius* atuaram de forma sinérgica e/ou individual e desregularam o ciclo celular nas concentrações citadas.

O cineol possui características fitotóxicas significativas em citações que ressaltam sua utilização como intermediária para a fabricação de herbicidas<sup>73</sup>, causando inibição no crescimento das plantas<sup>74</sup> e diminuição no índice mitótico, no crescimento radicular e nas taxas de germinação<sup>75</sup>.

Além disso o 1,8-cineol, monoterpeneo, encontrado em vários óleos essenciais de plantas, apresentou atividade antitumoral e de citotoxicidade contra células cancerígenas, em especial para linhagens celulares de leucemia humana e de câncer colorretal humano<sup>76</sup>. É válido ressaltar, também, que, na análise do óleo essencial das folhas de *Vitex agnus castus* L (Verbenaceae), apresentou-se como composto majoritário o componente químico 1,8- cineol, seguido pelo  $\beta$ - felandreno e cis-ocimeno. O sesquiterpeneo  $\beta$  farmesene apresentou efeitos tóxicos, citotóxica e genotóxica nas

concentrações de 0,05 e 0,025 mg/L, usando como biomarcador o sistema *A. cepa*<sup>77</sup> o que corrobora para o estudo em questão.

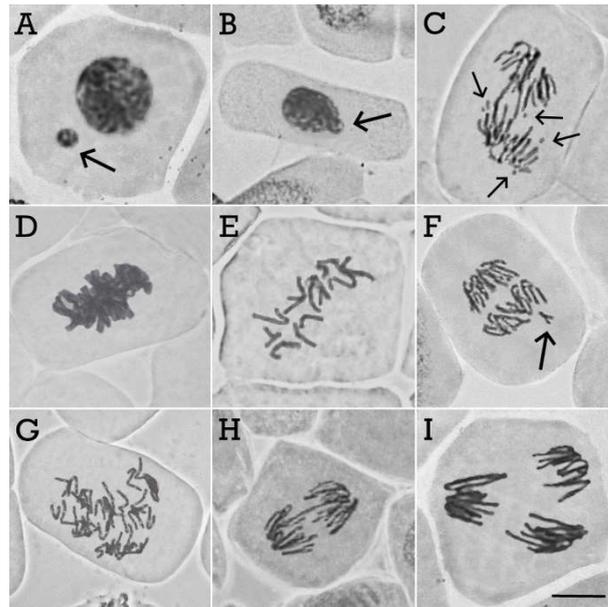
Percebemos, nas análises, que o óleo essencial de *C. heliotropiifolius* não foi genotóxico nas menores concentrações (0,32; 1,6; 8 e 40 mg/L) (Tabela 1.4), enquanto nas maiores concentrações (200 e 1000 mg/L) a genotoxicidade está relacionada com a presença significativa de MN. Ressalta-se que o aumento significativo de MN nas concentrações de 1,6 a 1000 mg/L também evidenciou o efeito mutagênico (presença de MN) do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* (Tabela 1.5, Figura 1.6A). Os MN são anormalidades resultantes de perda cromossômica, quebra e/ou brotos nucleares, que resultaram na formação de MN<sup>78,79,80</sup>. Por outro lado, provavelmente, os fitoquímicos majoritários do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* não interferiram no processo de condensação cromossômica, formação das fibras do fuso e/ou segregação cromossômica<sup>80,71</sup>, o que explicaria a presença de outras alterações cromossômicas individuais não significativas no presente estudo (Tabela 1.5, Figura 1.6 ABCDEFGHI).

Resultados similares quanto ao efeito proliferativo e/ou genotóxico nas células de *A. cepa*, também foram relatados no látex de *C. urucurana*<sup>81</sup>, *C. betaceus* e *C. lundianus* e no extrato etanólico das folhas de *C. heliotropiifolius*<sup>82</sup>. Portanto, uma possível ação tóxica, ao ser utilizada como planta medicinal, reforça ainda mais a necessidade de prevenção e cuidado na utilização de plantas medicinais, especialmente pelo grande risco de intoxicação<sup>21</sup>.

**Tabela 4.5.** Alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *Croton heliotropiifolius* (OECH).

Tratamento (mg/L)	Alterações cromossômicas										
	MN	BN	CB	BC	AC	Cm	CL	CP	CBr	AM	AMBr
<b>CN</b>	0,11±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,27±0,30	0,19±0,24	0,13±0,12	0,00±0,00	0,28±0,28	0,09±0,16	0,00±0,00
<b>MMS I OECH</b>	5,49±3,37***	1,25±1,67**	0,06±0,09	0,02±0,06	0,65±0,59	0,12±0,25	0,23±0,15	0,04±0,08	0,23±0,19	0,16±0,26	0,02±0,06
0,32	1,87±1,52	0,41±0,49	0,00±0,00	0,00±0,00	0,21±0,35	0,06±0,09	0,10±0,14	0,02±0,06	0,16±0,21	0,02±0,06	0,00±0,00
1,6	2,51±2,38*	0,51±0,59	0,00±0,00	0,00±0,00	0,11±0,17	0,02±0,06	0,04±0,08	0,02±0,06	0,06±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00
8	3,05±3,21*	0,65±0,72	0,02±0,06	0,00±0,00	0,11±0,16	0,00±0,00	0,04±0,08	0,00±0,00	0,18±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00
40	3,54±3,82*	1,04±1,15	0,00±0,00	0,00±0,00	0,23±0,29	0,08±0,20	0,04±0,08	0,00±0,00	0,06±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00
200	3,91±3,73**	1,44±1,65	0,02±0,05	0,00±0,00	0,19±0,22	0,24±0,51	0,18±0,21	0,07±0,13	0,11±0,16	0,04±0,08	0,00±0,00
1000	7,43±4,19***	3,03±3,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,19±0,36	0,02±0,06	0,00±0,00*	0,02±0,06	0,10±0,17	0,00±0,00	0,00±0,00

Os dados são médias ± SD (Desvio Padrão). **CN**: Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - 1% DMSO em água destilada). **MMS I**: 10 µg/mL de metilmetanossulfonato dissolvido em DMSO 1%. **MN**: Micronúcleo. **BN**: Broto Nuclear. **CB**: Quebra cromossômica. **BC**: Célula Binucleada. **AC**: Aderência Cromossômica. **Cm**: C-metáfase. **CL**: Perda Cromossômica. **CP**: Célula poliplóide. **CBr**: Ponte Cromossômica. **AM**: Anáfase Multipolar. **AMBr**: Anáfase Multipolar com ponte cromossômica. Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) quando comparado ao **NC**. Os dados são para 5.000 células/tratamento. O DMSO 1% foi usado como controle negativo, mas como os resultados foram estatisticamente idênticos ao solvente (água destilada), os dados usando água foram omitidos. O controle positivo I (MMS solubilizado em DMSO 1%) e o controle positivo II (MMS solubilizado em água destilada) também foram estatisticamente idênticos, os dados do controle positivo II foram omitidos.



**Fig. 4.4** Alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*. A) Micronúcleo. B) Broto nuclear. C) Anáfase com ponte cromossômica e quebras cromossômicas. D) Aderência cromossômica. E) C-metáfase. F) Perda cromossômica. G) Metáfase poliploide. H) Anáfase com ponte cromossômica e I) Anáfase multipolar (Barra: 10  $\mu$ m).

# Capítulo 5

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

*Nas observações feitas durante esta pesquisa foi observada a presença de compostos químicos da classe dos hidrocarbonetos monoterpenos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados com alguns potenciais terapêuticos já relatados na literatura para o óleo essencial de *C. heliotropiifolius*. Destacaram-se, como compostos majoritários, o  $\alpha$ -pineno (16,70%) e o 1,8-cineol (13,81%). Além disso, na pesquisa sobre a citogenotoxicidade, foi possível perceber que o óleo apresentou citotoxicidade e genotoxicidade em determinadas concentrações, enfatizando a busca por novas pesquisas para analisar de forma mais aprofundada as características do óleo essencial produzido neste trabalho.*

### 5.1 Conclusão

Através do cálculo de rendimento do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*, evidenciou-se um rendimento de 0,46%, resultado satisfatório em comparação com outros achados na literatura.

A análise fitoquímica evidenciou a presença de hidrocarbonetos monoterpenos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, destacando-se que alguns desses compostos apresentam potencial para uso terapêutico. Além disso, a investigação fitoquímica do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* revelou, no CG-EM, 40 picos, respectivamente, destacando-se, como compostos majoritários, o  $\alpha$ -pineno (16,70%) e o 1,8-cineol (13,81%).

Além disso, para o *C. heliotropiifolius*, sete compostos químicos não foram identificados pela literatura, o que sugere a continuidade de estudos, a fim de se buscar a determinação deles. Em relação à citogenotoxicidade, podemos destacar que o óleo essencial de *C. heliotropiifolius* foi citotóxico nas concentrações de 0,32; 1,6 e 200 mg/L e genotóxico nas maiores concentrações de 200 e 1000 mg/L, além de ter provocado danos mutagênicos nas concentrações de 1,6 a 1000 mg/L, o que evidenciou o seu efeito tóxico. Assim, torna-se necessária a implementação de mais estudos que busquem respostas a possíveis ações biológicas promovidas pelos componentes presentes nesse óleo essencial.

Os dados apresentados contribuem efetivamente para estudos posteriores sobre o uso dessa planta como possível fitoterápico, por meio da pesquisa de detalhes minuciosos que garantam a devida segurança na administração, além da pesquisa e da observação sobre os fatores reais que interferiram nas alterações fitoquímicas da planta, em especial, suas folhas.

O projeto contribui significativamente para a comprovação experimental dos compostos bioativos presentes no óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius* pelo método CG-EM e para pesquisas sobre seu uso terapêutico e fitoquímico. Portanto, favorece quantitativamente e qualitativamente a produção científica dos Programas de Pós-Graduação em Química da UESPI, bem como as áreas de Farmacologia, Biotecnologia e Neurociências, além de incentivar a busca por aprofundamentos científicos sobre essa planta.

# REFERÊNCIAS

---

---

1. VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.
2. ZHANG, X. Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**, Geneva, 1998.
3. MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**. v.2 n.03, 2006.
4. DE LIRA, E. C. *et al.* O Marmeleiro (*Croton sp.*) e os seus arredores: manejo e oportunidades de utilização na produção florestal. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 27147-27160, 2019.
5. JÚNIOR, G. do N. A. *et al.* Espécies da família Euphorbiaceae na alimentação animal. **PUBVET**, v. 12, p. 133, 2018.
6. TORRES, M. C. M. *et al.* Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.2, p. 15862-15872 feb., 2021.
7. TRINDADE, MJ de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental**-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2014.
8. LIMA, L. R. DE; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotrop.**, vol. 8, no. 2, Abr./Jun., 2008.
9. RIZSK, A.F. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 94: 293-326, 1987.
10. PAYO, H. A. *et al.* Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**. 35: 203-206, 2001.
11. NASCIMENTO, D. L. **Uso de plantas no tratamento de doenças respiratórias na comunidade Caiana dos Mares, Alagoa Grande, Paraíba**. 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB. 2014.
12. MACEDO, E.V; GEMAL, AL. A produção de Fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Ver. Bras. Farm.**, 90 (4): 290 – 297, 2009.

13. SOARES, N. P. *et al.* Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o Estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**. 13(24), 991, 2016.
14. ALENCAR FILHO, J. M. T. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 27, 440–444, 2017.
15. ARAÚJO, F. M. *et al.* Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 203-206, 2017.
16. LEITE, T. R. *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *Croton limae*. **PHARMACEUTICAL BIOLOGY**. VOL. 55, NO. 1, 2015–2019, 2017.
17. COSTA J.G *et al.* Chemical composition and evaluation of the antibacterial activity and toxicity of the essential oil of *Croton zehntneri* (variety estragol). **Rev Bras Farmacogn**.18:583–586, 2008.
18. SILVA, J. A. G. *et al.* Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.
19. MISHRA, G. *et al.* Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Moringa oleifera* Plant: An Overview. **Scholars Research Library**. 3(2), 141, 2011.
20. SILVA BRITO, S.S. da. *et al.* *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops & Products**. 113, 308–315, 2018.
21. FERNANDES, V. M. P. Potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de frações do extrato de *Cróton L.* (Euphorbiaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, e10411427142, 2022.
22. FÃO, F. *et al.* Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.1, p.91-98, jan./abr., 2012.
23. CÂNDIDO, A. C. S. *et al.* Atividade fitotóxica de *Croton doctoris* S. Moore. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.43, n.4, p.645-652, abr, 2013.
24. NEVES, K. A. S. OLIVEIRA, J. V. A. TEIXEIRA, A. Z. A. Uso de bioensaio com *Allium cepa* L. para avaliação de citotoxicidade de *Croton urucurana* Baill. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**. São Paulo, v. 6.n.12, dez. 2020.

25. CLARKE, J. H. R.; RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v. 19, p. 41-48, 2007.
26. SILVA, A. L. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antioxidante da espécie vegetal *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 307-315, 2016.
27. VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 1-7, 2006.
28. COSTA, A. L. P.; JÚNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Macapá**, v. 7, n. 2, p. 45-57, maio/ago, 2017.
29. BRASIL, **Ministério da Saúde**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.
30. PRADO, C.N.; NEVES, D.; SOUZA, H.D.; NAVARRO, F. O uso de fitoterápicos no tratamento da obesidade. **RBONE**, 4:14-21, 2010
31. VIEIRA, A.R.R., MEDEIROS, P. R. M.S. A utilização de fitoterápicos no tratamento da obesidade. **Rev Cient Esc Estadual Saúde Pública Goiás "Cândido Santiago"**. 5(1):44-57, 2019.
32. FILHO, S. A.; SILVA, C. G. N.; BIG, M. F. M. A. Bioprospecção e Biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**. v. 19, n. 38, p. 45-80, 2014.
33. FERNANDES, P. A. S. Chemical Constituents and Biological Activities of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Antibiotics**. 10, 1074, 2021.
34. JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Effect of processing on the volatile composition of the clarified Fuji apple juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.03, p.523-528, 2003.
35. TEDESCO, M. et al. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) osbeckon the *Allium cepa* L. test system. **Biosc. J.**, Uberlândia, vol. 31, n. 4, p.1213-1221, 2015.
36. FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **PesticBiochem Physiology**, n.88, p.252-259, 2007.
37. TEIXEIRA, R.O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. **Genet. Mol. Bio.**v.5. p.551-555, 2003.

38. TKALEC, M. *et al.* Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination, root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**. V. 672, n. 2, p. 76–81, 2009.
39. BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.
40. FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
41. WATERMAN, P. G. **The chemistry of volatile oils**. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. (Eds.). *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1993.
42. WASICKY, R.; AKISUE, G. Um aparelho aperfeiçoado para a extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.07, n.02, p.399-405, 1969.
43. DA SILVA, R. O. *et al.* Cytotoxicity Assessment of Siparuna cymosa Essential Oil in the Presence of Myeloid Leukemia Cells. **Rev. Virtual Quim.**12 (6), 1381-1388, 2020.
44. SILVA, P. T. *et al.* Composição Química do Óleo Essencial Extraído das Folhas dos Indivíduos Macho e Fêmea e Frutos de *Schinus terebenthifolius*. **Rev. Virtual Quim.** Vol 11, No. 1,180-189, 2019.
45. ROMIO, C. Influencia da composição química de óleos essenciais de folhas na seleção da dieta na dieta Bugios-ruivos (*Alouatta Guariba Clamitans*). **Revista da Graduação**, Vol. 5, No. 2, 9, 2012.
46. LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. **Mutation Research**. v. 650, p. 80-86, 2008.
47. DIAS, M.S. *et al.* Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *Allium cepa* L. **An Acad Bras Cienc**. 93: e20201772, 2021.
48. FERNANDES, T. C. C. *et al.* Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.
49. AYRES, M. *et al.* BioEstat 5.3 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: **Sociedade Civil Mamirauá**, 364p. ISBN: 85-85924-10-1, 2007.
50. PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 987-995, 2009.

51. PERES, T. B. **Noções básicas de cromatografia**. Biológico, São Paulo, vol. 64(2), p. 227-229, 2002.
52. DE SOUZA, G. S. *et al.* Chemical composition and yield of essential oil from three *Croton* species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47: 08, e20161054, 2017.
53. RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. *Iheringia*, **Série Botânica**. 73(1), 31–38. 30 de maio de 2018.
54. SILVIA, A.N. *et al.* Composição química e atividade antinociceptiva em modelo animal do óleo essencial de *Myrcia rostrata* DC. (Myrtaceae). **Quim. Nova**, vol. 41, No. 9, 982-988. 2018.
55. OLIVEIRA, T. B. *et al.* Caracterização de flavonoides por CLAE-UV-PDA em tintura de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen cultivada em Itaipava (RJ). **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, Supl, 1-126, 2017.
56. SUDHOFF *et al.* 1,8-Cineol Reduces Mucus-Production in a Novel Human Ex vivo Model of Late Rhinosinusitis. **PLOS ONE**. July 24, 2015.
57. ZHAO, C. *et al.* 1,8-Cineol Attenuates LPS-Induced Acute Pulmonary Inflammation in Mice. **Inflammation**, vol. 37, No. 2., 2014.
58. CIFTCI, O.; OZTANIR, M. N.; CETIN, A. Neuroprotective Effects of b-Myrcene Following Global Cerebral Ischemia/Reperfusion-Mediated Oxidative and Neuronal Damage in a C57BL/J6 Mouse. **Neurochem Res**. 39:1717–1723, 2014.
59. SILVA, J. A. G. *et al.* Atividade tóxica in vitro de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 1, p. 112-115., 2018.
60. DA SILVA, L. *et al.* Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(3): 361-367, Jul./Set., 2007.
61. DA COSTA, J. G. M. *et al.* Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana sp.* **Revista Brasileira de Farmacognosia**.19(3): 710-714, Jul./Set., 2009.
62. DA SILVA, L. P. **Ação antiespasmódica do transcariofileno e o bloqueio de canais para  $Ca^{2+}$  em músculo liso traqueal de rato**. 98p. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará – CCS – UECE. 2010.

63. ALMA M. H. *et al.* Screening of chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Origanum syriacum* L growing in Turkey. **Biol Pharm Bull.** 26: 1725-1729, 2003.
64. PEREIRA, C. A. M.; MAIA J.F. Study of antioxidant activity of the extract and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L) leaf. **Ciênc Tecnol Aliment.** vol.27, n.3, pp.624-632., 2007.
65. MICHIELIN E. M. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresour Technol.** v.100: ed. 24. 6615-6623, 2009.
66. BENTO A.F. *et al.* Beta-caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB<sub>2</sub> receptor activation and PPAR pathway. **Am J Pathol.** v.178. n.3: 1153-1166, 2011.
67. SANTOS R. P. *et al.* Composição química e atividade biológica das folhas e frutos de *Triphasia trifolia*. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 1, 53-58, 2008.
68. SCHERER, M. M. C. **Atividades antioxidante e anti-inflamatória in vitro dos monoterpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabineno.** Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Vila Velha, 2017.
69. NASCIMENTO, K. F. **Composição química e avaliação biológica de óleo essencial e composto isolado das folhas de *Psidium guineense* swartz (Myrtaceae).** Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados - Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção, 2017.
70. FELICIDADE. I. *et al.* Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Research.** 13 (4): 9986-9996, 2014.
71. SOUSA, H. G. *et al.* Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytogenotoxicity activities of *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A** 84.10, 399-417, 2021.
72. CAVALCANTI, D. F. G.; SILVEIRA, D. M.; SILVA, G. C. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 45931-45946, 2020.
73. GINDRI, D. M.; COELHO, C. M. M. Allelochemical metabolites of *Lantana camara* L.: potential for the development of bioherbicide – review. **Revista Técnico-Científica do CREA-PR** - ISSN 2358-5420 - 24<sup>a</sup> edição, 2020.

74. MISHRA A. Allelopathic properties of *Lantana camara*. **International Research Journal of Basic and Clinical Studies** Vol 3, p. 13-28, 2015.
75. ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic Effects of Volatile Cineoles on Two Weedy Plant Species. **Journal of Chemical Ecology**. Vol. 26, n. 1, p. 303–313, 2000.
76. CALDAS, G. F. R. *et al.* Propriedades farmacológicas e toxicologia do óleo essencial de *Hyptis martiusii* benth. (cidreira-brava) e de seu composto majoritário 1,8-cineol: uma revisão. **Revista interfaces**. v.8, n. 1/ISSN 2317-434X., 2020.
77. VASCONCELOS, E. F. *et al.* Óleo essencial de *Vitex agnus castus* L (Verbenaceae): composição química, avaliação citotóxica, genotóxica e atividade antibacteriana. **Boletim Informativo Geum**, v.5, n.4, p.68-75, out./dez, 2014.
78. ŽABKA, A. *et al.* Controle dependente de DNA topoisomerase II da progressão do ciclo celular em meristemas radiculares de *Allium cepa*. **Cell biologia internacional**. v. 38, n. 3, pág. 355-367, 2014.
79. BIANCHI, J., M. S.; MANTOVANI, AND M. A. MARIN-MORALES. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **J. Environ. Sci. (China)** 36:102–11, 2015.
80. ARAÚJO, J. R. da S. *et al.* Phytochemical prospecting, isolation, and protective effect of the ethanolic extract of the leaves of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 84, n. 18, p. 743–760, 2021.
81. MESQUITA, M. D., CIAPPINA, A. L., ALMEIDA, L. M. de. Avaliação do potencial tóxico do látex de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae). III Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG. **Inovação: Inclusão Social e Direitos**. 19 a 21 de outubro de 2016. Perinópolis – Goiás.
82. MORAIS, G. C. *et al.* Avaliação preliminar do potencial citogenotóxico e mutagênico do extrato etanólico da folha de *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Rev. Interd. Ciên. Saúde** – ISSN 2358-6966, 2017.