

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Análise fitoquímica, citogenotoxicidade e efeito
cicatrizante do óleo essencial das folhas e inflorescência
Croton blanchetianus Baill.**

Maria das Dores Barreto Sousa

Orientador (A): Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho

Co-Orientador (A): Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa

**Teresina – PI
2024**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Análise fitoquímica, citogenotoxicidade e efeito cicatrizante do óleo essencial das folhas e inflorescência *croton blanchetianus* Baill.

Maria das Dores Barreto Sousa

Dissertação 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: Química

Orientador (a): Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho

Co-Orientador (a): Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa.

Teresina – PI

2024

**Análise fitoquímica, citogenotoxicidade e efeito
cicatrizante do óleo essencial das folhas e inflorescência
Croton blanchetianus Baill.**

Maria das Dores Barreto Sousa

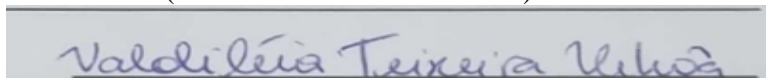
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Estadual do Piauí, como parte
dos requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Química – Área de
concentração: Química
Aprovado em 16 de Fevereiro de 2024

Membros da Banca:



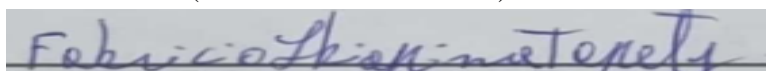
Prof(a). Dr(a).

(Presidente da Banca – UESPI)



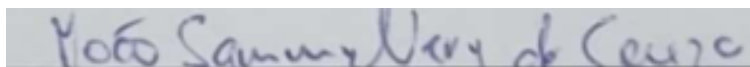
Prof(a). Dr(a).

(Membro Titular – UESPI)



Prof(a). Dr(a).

(Membro Titular – UESPI)



Prof(a). Dr(a).

(Membro Suplente – UFPI)

Teresina – PI

2024

Dedicatória

A Deus por ser minha base, fortaleza e socorro presente na tribulação, à minha mãe que mesmo sem saber ler entendeu desde cedo à importância da educação e não mediu esforços para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar, e por meio dessa educação formos não só transformados mais também nos tornamos transformadores de histórias.

AGRADECIMENTOS

❖ A Deus por até aqui ter me conduzido (EBENÉZER).

Ao meu Orientado Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho e a minha Co-orientadora Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa pelo compartilhamento de conhecimento competência profissional, pela contribuição científica extremamente valiosa e principalmente pela dedicação, apoio e paciência no decorrer do curso.

❖ Aos colegas de mestrado especialmente Rosemarie Marques, Wesley de Sousa, Neirigelson Ferreira, Illa Fernanda e alunos de graduação em especial Maria de Jesus, Brenda Caylla, Vitória Raquel, por contribuírem para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

❖ Aos professores do Mestrado em Química pelo compartilhamento de conhecimento e suporte científico que proporcionaram uma visão mais ampla do universo da pesquisa.

❖ Aos laboratórios e instituições onde o trabalho foi realizado: laboratório de Química do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), laboratório de Química da Universidade Estadual do Piauí – UESPI - Núcleo de Pesquisa, Biotecnologia e Diversidade – Núcleo (NPBio), laboratório de Química da UESPI (Campus Alexandre Alves Oliveira, Parnaíba-PI), laboratório de Biologia da Universidade Estadual do Piauí – UESPI, além Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias – GERATEC, que disponibilizou suporte laboratorial.

❖ A Universidade Estadual do Piauí por contribuir com o suporte financeiro e material e técnico para o desenvolvimento dessa dissertação.

❖ Aos meus irmãos pelo incentivo, torcida e apoio incondicional em todos os momentos.

❖ Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e realização desse trabalho.

RESUMO

O tratamento de diversas patologias por meio das plantas medicinais é milenar. Nos últimos anos essa prática tem crescido na população mundial, devido ao fácil acesso e efeito colaterais reduzido. *Croton blanchetianus* é uma das espécies do gênero *Croton* que se destaca por sua relevância terapêutica e farmacológica, é conhecida como marmeleiro preto a mesma é usada para tratamento de diversas enfermidades. O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil fitoquímico, aspecto citotóxico, genotóxico e o potencial efeito cicatrizante do óleo essencial de *C. blanchetianus*. O óleo essencial das folhas e inflorescência foi extraído por hidrodestilação e o perfil fitoquímico foi realizado por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC/MS). O resultado revelou que o óleo essencial de *C. blanchetianus* possui rendimento de 0,45%, 49 componentes químicos foram identificados, onde o biciclogermacreno (22,80%), cariofileno (10,90%) e eucaliptol (9,24%) se destacaram como majoritários. Houve predominância dos grupos monoterpenos e sesquiterpenos. Alguns desses metabólitos secundários são relatados na literatura com atividade biológica como anti-inflamatórios, antibacteriano, antifúngica, antidepressiva e cicatrizante. Na avaliação toxicogenética, as raízes de *A. cepa* foram expostas ao Dimetilsulfóxido - 1% DMSO em água destilada (Controle Negativo), MMS: 10 µg/mL de Metilmetanossulfonato dissolvido em DMSO 1% (Controle Positivo) e aos tratamentos com o óleo essencial de *C. blanchetianus* em 05 concentrações (1,6; 8; 40; 200 e 1000 µg/ml). O teste revelou citotoxicidade nas concentrações de 200 e 1000 µg/ml em resposta ao baixo índice mitótico, porém não apresentou genotoxicidade. Após 7º dia de pós-operatório (DPO) constatou-se que o controle negativo apresentou e células inflamatórias, quanto aos grupos 01 e 02 houve angiogênese e formação de fibroblastos. Após 14º DPO houve melhora na cicatrização do grupo 1 e após 21º DPO o grupo 2 tratado com OECEB apresentou acelerado processo de cicatrização com total restauração epitelial. Esse estudo preliminar do perfil fitoquímico, investigação toxicogenética e do potencial efeito cicatrizante do óleo essencial de *C. blanchetianus* servirão para subsidiar futuros estudos sobre a atividade biológica, farmacológica e possível aplicação terapêutica dos componentes químicos.

Palavras-chave: Terpenos, Fitoterápicos, Análise química, Citotoxicidade, *Allium cepa*, Ferida.

ABSTRACT

The treatment of various pathologies using medicinal plants is ancient. In recent years, this practice has grown among the world population, due to easy access and reduced side effects. *Croton blanchetianus* is one of the species of the genus *Croton* that stands out for its therapeutic and pharmacological relevance. It is known as black quince and is used to treat various illnesses. The objective of this study was to evaluate the phytochemical profile, cytotoxic and genotoxic aspects and the potential healing effect of *C. blanchetianus* essential oil. The essential oil from the leaves and inflorescence was extracted by hydrodistillation and the phytochemical profile was carried out using gas chromatography coupled to mass spectrum (GC/MS). The result revealed that the essential oil of *C. blanchetianus* has a yield of 0.45%, 49 chemical components were identified, including bicyclogermacrene (22.80%), caryophyllene (10.90%) and eucalyptol (9.24%) stood out as the majority. There was a predominance of monoterpenes and sesquiterpenes groups. Some of these secondary metabolites are reported in the literature with biological activity as anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antidepressant and healing. In the toxicogenic evaluation, *A. cepa* roots were exposed to Dimethylsulfoxide - 1% DMSO in distilled water (Negative Control), MMS: 10 µg/mL of Methylmethanesulfonate dissolved in 1% DMSO (Positive Control) and treatments with essential oil of *C. blanchetianus* in 05 concentrations (1.6; 8; 40; 200 and 1000 µg/ml). The test revealed cytotoxicity at concentrations of 200 and 1000 µg/ml in response to the low mitotic index, but did not present genotoxicity. After the 7th postoperative day (POD) it was found that the negative control presented inflammatory cells, while in groups 01 and 02 there was angiogenesis and formation of fibroblasts. After the 14th DPO there was an improvement in healing in group 1 and after the 21st DPO group 2 treated with OECB showed an accelerated healing process with total epithelial restoration. This preliminary study of the phytochemical profile, toxicogenetic investigation and the potential healing effect of *C. blanchetianus* essential oil will serve to support future studies on the biological, pharmacological activity and possible therapeutic application of the chemical components.

Keywords: Terpenes, Phytotherapeutics, Chemical analysis, Cytotoxicity, *Allium cepa*, Wound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Fotografias da planta <i>Croton blanchetianus</i>	18
Figura 2.2. Estruturas químicas de importância biológica.....	19
Figura 3.1. Folhas, inflorescência de <i>C. blanchetianus</i> sendo preparadas para hidrodestilação.....	22
Figura 3.2. Lesão cirúrgica dos períodos de avaliação 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório.....	25
Figura 4.1. Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> normais: (A) Prófase. (B) Metáfase. (C) Anáfase. (D) Telófase. Alterações cromossômicas. (E) Micronúcleo. (F) Broto nuclear. (G) Perda cromossômica. (H) Aderência cromossômica. (I) C-metáfase. (J) Anáfase com ponte. (L) Quebra cromossômica.....	39
Figura 4.2. A área da ferida operatória dos animais dos grupos controle negativo, AGE e pomada de OEGB 10% no 0, 7, 14 e 21 DPO.....	41
Figura 4.3. Microscopia mostrando a cicatrização das feridas no 7º DPO de tratamento do controle negativo, AGE, (G2) pomada de OEGB.....	44
Figura 4.4. Microscopia mostrando a cicatrização das feridas no 14º DPO de tratamento do controle negativo, AGE, pomada de OEGB a 10%. Hematoxilina Eosina 100x.....	46
Figura 4.5. Microscopia mostrando a cicatrização das feridas no 21º DPO de tratamento do controle negativo, AGE, pomada de OEGB a 10%.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição fitoquímica do óleo essencial das folhas e inflorescência de *C. blanchetianus* por análise GC-MS com seus respectivos (tempo de retenção, fórmula, área absoluta, porcentagem relativa de área %).30

Tabela 4.2. Composição percentual do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*. (NC) número do composto, (TR) tempo de retenção, porcentagem relativa de área %31

Tabela 4.3. Compostos majoritários e atividade biológica identificada por CG-MS do óleo essencial das folhas e inflorescência de *C. blanchetianus*.33

Tabela 4.4. Porcentagem das fases da mitose, índice mitótico e alterações cromossômicas totais em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *C. blanchetianus* (OECB).36

Tabela 4.5. Alterações Cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* (OECB).39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1. Análise da regressão cicatricial da pele após 07 dias de pós-operatório do controle negativo, tratamento com AGE e pomada de OECEB a 10%.....43

Gráfico 4.2. Análise da regressão cicatricial da pele após 14 dias de pós-operatório do controle negativo, tratamento com AGE e pomada de OECEB a 10%.44

Gráfico 4.3. Análise da regressão cicatricial da pele após 21 dias de pós operatório do controle negativo, tratamento com AGE e pomada de OECEB a 10%.44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C – *Croton*;

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa;

OEGB- Óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill;

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado;

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

UESPI – Universidade Estadual do Piauí;

OMS-Organização mundial de saúde;

ANVISA- Agência de vigilância sanitária;

PPGQ-Programa de Pós Graduação em Química;

BOD-Demanda bioquímica de oxigênio;

MN-Micronúcleo;

IM-Índice Mitótico;

CN - Controle Negativo;

BT- Broto Nuclear;

AC- *Allium cepa*;

MMS – Metilmetanosulfonato;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

HE – Hematoxilina-eosina;

AGE- Ácido graxo essencial;

MEC- Matrix extracelular;

DNA -Deoxyribonucleic acid;

DPO-Dia de Pós-Operatório;

CPA-Cyclophosphamide;

IL-1 β -Interleukin-1 β ;

IL-6-Interleukin-6;

IL-8- Interleukin-8;

TNF- α -Tumor necrosis factor alpha;

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
INTRODUÇÃO	12
1.1. Objetivo Geral	13
1.2. Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO 2	14
REFERENCIAL TEÓRICO	14
CAPÍTULO 3	22
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	22
3.1. Coleta do material	22
3.2. Extração do óleo essencial	22
3.3. Cálculo do rendimento de óleo essencial das folhas e inflorescências de <i>C. blanchetianus</i>	23
3.4. Cromatografia Gasosa Acoplada em Massa	23
3.5. Ensaio A. <i>Cepa</i>	23
3.6. Análise estatística	24
3.6. Indução da ferida e grupos experimentais de animais	24
3.6. Tratamento fitoterápico	26
3.7. Eutanásia e descarte dos animais	26
3.8. Análise macroscópica	26
3.9. Análise microscópica	27
CAPÍTULO 4	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Rendimento de óleo essencial das folhas e inflorescências de <i>C. blanchetianus</i>	28
4.1.2. Análise dos constituintes voláteis de <i>C. blanchetianus</i>	29
4.2. Ensaio <i>Allium Cepa</i>	35
4.3. Cicatrização de Feridas Induzidas em Ratos	40
4.3.1. Análise macroscópica	40
CAPÍTULO 5	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão que recobre toda superfície do corpo humano. Fornece proteção formando uma barreira física entre o corpo e o meio ambiente. Toda lesão que proporcione a rupturas da continuidade desse tecido cutâneo é chamado de ferida. A pós a lesão tecidual ocorre o processo de cicatrização que é constituído por numerosos, dinâmico e complexos eventos celulares envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos. A cicatrização perpassa desde o processo inflamatório, proliferativo e de remodelação ^{1,2}.

A escolha do tratamento eficaz para cicatrização vai depender da análise prévia do tipo de ferida³. Assim, apesar da comercialização dos mais variados tipos de tratamentos para cicatrização, a maioria delas possui alto valor aquisitivo o quê dificulta o acesso ao tratamento por parte da população ^{4,5,6}. Nesse contexto, investigadores ^{7,8} e profissionais de saúde ⁹ tem se empenhado na busca de novas estratégias terapêuticas para acelerar a cicatrização de feridas ^{8,10}. O uso de produtos naturais, tanto por profissionais de saúde quanto por pacientes, tornam-se uma alternativa viável, pois, são fáceis de manusear e apresentam resultados satisfatórios, uma vez que, aceleram o tempo de cicatrização restituindo a integridade e função do tecido lesionado ^{11,12}.

No processo de cicatrização de feridas, sua utilização não se difere, tendo em vista que as plantas medicinais são mencionadas desde a pré-história quando eram utilizadas na forma de extratos vegetais, cataplasmas, com o intuito de estancar hemorragias e favorecer o tratamento de lesões teciduais ¹³.

A espécie *Croton blanchetianus* conhecida popularmente como marmeleiro preto, pode ser encontrada na região Nordeste ¹⁴. Na medicina popular, as folhas, cascas, caule e raízes da espécie *C. blanchetianus* já são bastante utilizadas ^{15,16}.

Embora seja de origem natural, é de fundamental importância avaliar a segurança no uso dos óleos essenciais, uma vez que falta de informação associado ao uso indiscriminado das plantas medicinais podem representar o risco a exposição de agentes que sejam tóxicos e nocivos à saúde ^{17,18}.

Os feitos adversos da espécie *C. blanchetianus* são desconhecidos, porém como qualquer outra espécie de planta medicinal necessita de uma avaliação criteriosa quanto à

composição de seus metabólitos secundários e o efeito citotóxico e genotóxico, mutagênico, em virtude de evitar que eventuais danos possam ser causados ao organismo, especialmente os relacionados com o crescimento da taxa de mutação genética em níveis basais ^{19,18}.

1.1. Objetivo Geral

Analisar a composição química, a genotoxicidade bem como o efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill, no processo de reparo tecidual de lesões cutâneas cirurgicamente induzidas em ratos.

1.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar os metabólitos secundários do óleo essencial do *Croton blanchetianus* Baill;
- ✓ Verificar os componentes majoritários do óleo essencial do *Croton blanchetianus* Baill;
- ✓ Verificar citogenotoxicidade do óleo essencial do *Croton blanchetianus* Baill;
- ✓ Calcular o potencial de regressão da área das lesões cutâneas tratadas com óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill;
- ✓ Avaliar a evolução do reparo tecidual de forma quantitativa, das células inflamatórias, fibroblastos no processo de reparo das lesões cutâneas tratadas com óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill.

CAPÍTULO 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lesão tecidual e cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano ocupando cerca de 16 % da massa corporal ²⁰. Esse complexo órgão, possui funções de extrema importância para a fisiologia do organismo vivo, tais como, prevenir a perda hídrica, equilibrar a temperatura corporal e transportar informações sensoriais. Além de possuir um sistema imunológico extremamente especializado, que é de fundamental importância para manutenção da homeostase, defesa e reparo tecidual ²¹.

É constituída por duas camadas distintas: a epiderme e a derme. A primeira é a epiderme, situada na parte mais externa, está subdividida em estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso e estrato basal, é composta por células vivas que permanecem em constante divisão, sendo coberta por uma camada de células mortas, o estrato córneo. Os queratinócitos são células predominantes nesse tecido ^{4,22,23}.

A derme esta localizada abaixo da epiderme ficando na parte mais interna, possui duas subdivisões a derme reticular e papilar ²⁰. A derme reticular é mais espessa que a derme papilar devido à densa concentração de fibras colágenas, contém apêndices da pele, como folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas ². A derme papilar é rica em células como fibroblastos, miofibroblastos e células imunológicas, tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos. O fibroblasto principal célula da derme é responsável por sintetizar a matriz extracelular formada por colágeno, proteoglicanos e fibras elásticas que fornecem a integridade estrutural da derme ²¹.

Feridas são rupturas da continuidade do tecido cutâneo, ocorre após lesões físicas, químicas, térmicas, microbianas ou imunológicas aos tecidos do corpo ^{1,24,13}, levando a interrupção da conformidade celular, anatômica ou funcional de tecidos ou órgãos vivos. As feridas podem ser profundas ao ponto de comprometerem tecidos subcutâneos, causando danos nos tendões, músculos e vasos ²⁵.

A cicatrização ocorre por meio de uma série de complexos eventos celulares que interagem entre si para reestruturação tecidual ^{26,24,3}, acontece na lâmina basal e consiste de uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para a reconstituição

do tecido no qual envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que buscam restaurar a integridade física interna e/ou externa das estruturas corporais ^{27,28}, com o intuito de promover o restabelecimento da integridade e funções dos tecidos lesionados ². Está dividida em três fases que atuam simultaneamente para reestabelecer a integridade da pele, são elas: Coagulação ou inflamatória, proliferativa e remodelação ^{26,29,30}.

A fase inflamatória consiste numa série de eventos vasculares onde são liberados histaminas, serotoninas, bradicininas provocando o aumento do fluxo sanguíneo que por sua vez desencadeia os sinais cardinais da inflamação ¹, seguindo a ativação dos processos bioquímicos da cascata de coagulação e liberação de mediadores químicos da inflamação ³¹. Nesta fase ocorre à infiltração na lesão de células do sistema imunológico como neutrófilos, linfócitos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias TGF- β , IL-1, IL-8, TNF- α e IFN- γ que atuam propiciando a quimiotaxia celular e diferenciação de monócitos em macrófagos ³. Estes ao serem liberados fagocitam bactérias, desbridam corpos estranhos e direcionam o desenvolvimento de tecido de granulação ²¹. Este processo dura cerca de 24 a 48 horas, podendo persistir até 02 semanas ³².

A fase proliferativa é caracterizada pela reepitelização que ocorre precocemente, onde as células epiteliais da borda da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita. A proliferação de fibroblastos estimula a formação de colágeno sendo este principal responsável pela força de contração e angiogênese ^{31,23}. Esta fase inicia em até 03 dias e perdura por 03 semanas após o surgimento da ferida, ³¹.

Na remodelação acontece a deposição de novas células da matriz extracelular (MEC), assim, o tecido de granulação rico em colágeno tipo III e vasos sanguíneos vão progressivamente sendo substituídos pelo colágenos tipo I que predominam o tecido ileso, essas fibras são mais resistentes, diminuem a espessura da cicatriz e reduzem a deformidade da mesma ^{32,29}.

Dependendo da extensão, presença ou não de infecção as feridas podem cicatrizar de três formas distintas que são: primeira intenção, segunda intenção e terceira intenção.

Na cicatrização por primeira intenção ocorre perda mínima de tecido, ausência de infecção, a aproximação das bordas é feita por meio de sutura cirúrgica. Por segunda intenção a perda de tecido é considerável pode haver presença de infecção e a aproximação das bordas ocorre de forma fisiológica por meio de contração e reepitelização tecidual. Na de terceira intenção ocorre geralmente após uma deiscência

primária, apresenta grande perda tecidual, presença de infecção, sendo necessário o tratamento primário da infecção para posteriormente realizar a aproximação das bordas por sutura cirúrgica ¹.

2.2. Fitoterápicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os medicamentos fitoterápicos incluem ervas, materiais, preparações e produtos fitoterápicos acabados, que contêm como ingredientes ativos partes da planta, outros materiais vegetais, ou combinações. Desempenham um papel fundamental na saúde mundial há milhares de anos e na última década, seu uso se expandiu em todo o mundo e ganhou popularidade considerável ³³. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e pela constância de sua qualidade. Todos os fitoterápicos são regulamentados no Brasil como medicamento convencional, apresentando critérios de segurança e eficácia exigidos pela ANVISA ³⁴.

Assim, foi instituída no Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, e por meio da Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, regulamentado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criado o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que confere acesso seguro, uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos com eficácia e qualidade pela população, promovendo dentre outros resultados, melhorias na qualidade de vida ³⁵.

Nos últimos anos, houve um crescimento no uso de fitoterápicos com notável ação terapêutica para diversas patologias relacionada à lesão tecidual, como cortes, queimaduras e feridas ³⁶. No Brasil o uso de plantas com a finalidade terapêutica é considerada uma prática milenar de cunho cultural que tem ganhado cada vez mais adeptos, favorecida pela biodiversidade, uma vez que os vegetais das mais diferentes espécies são fonte rica de novas substâncias e de novos compostos bioativos. Fatores como o fácil acesso a essas plantas são de extrema relevância para o progresso no uso dos medicamentos fitoterápicos, conferindo um excelente custo benefício para tal prática ^{37,38,8}.

2.3. Família Euphorbiaceae

Dentre as plantas medicinais usadas para tratamento terapêutico temos as pertencentes à família Euphorbiaceae. Está compreende uma das maiores famílias de angiospermas, abrangendo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies, no Brasil possui aproximadamente 72 gêneros e uma média de 1300 espécies ³⁹. Entre as famílias de Euphorbiaceae com potencial uso farmacológico, destaca-se o gênero *Croton* ⁴⁰.

O gênero *Croton* engloba: árvores, ervas e arbustos com múltiplas características sendo esse último, o mais comum ⁴¹. As cascas e folhas desse gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional nas formas de infusões, chá, para tratar diversas enfermidades como, constipação, problemas gastrointestinais, diabetes inflamação, febre, hipertensão, endoparasitas, feridas, câncer e malária entre outros ^{42,41,43}. O gênero *Croton* possui diversas atividades biológicas registradas na literatura como antimalárica, a inibição da replicação do vírus Chikungunya, antifúngicas, antimicrobiana, gastroproteção, antinociceptiva e pró-cicatrizante ⁴³.

Dentre as espécies do gênero *Croton* que possui potencial terapêutico e farmacológico, destaca-se a espécie *Croton blanchetianus*, (figura 2.1) que é conhecida popularmente como marmeleiro preto, pode ser encontrada principalmente no semiárido nordestino distribuída nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe e Maranhão ¹⁴. É considerada colonizadora ambiental por apresentar alta capacidade de restauração de áreas degradadas além ser um vegetal pioneiro em ocupar nichos mais inóspitos para as demais espécies, oferecendo melhorias do solo, permitindo a continuidade de sucessão florestal ⁴⁴.

É predominantemente arbustiva podendo atingir 6 m de altura, forma populações densa ^{45,46}, possui folha caducifólia, com fisiologia adaptada pra suportar a baixa disponibilidade hídrica e elevadas temperaturas, exibe forte habilidade de aclimação às variações ambientais ⁴⁶, além de barreiras que possibilitam a retenção de água promovendo dessa forma a proteção dos tecidos foliares contra danos provenientes do excesso de radiação solar ^{47,48}. As flores são pequenas, esbranquiçadas em espigas terminais, aromáticas que lembram óleo de pinho são oriundas de estípulas grandes, sobretudo em ramos jovens ^{45,49}.



Figura 2.1: Fotografias da planta *Croton blanchetianus* Baill. (esquerda) e da inflorescência e folhas (direita). Fonte: Arquivo pessoal do professor Dr. Francisco Artur e Silva Filho, Campus Parnaíba/UESPI.

Na medicina popular, as folhas, cascas, caule e raízes da espécie *C. blanchetianus* já são bastante utilizadas na forma de infusões, chás, cataplasma para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, reumatismo, depurativo, indigestão, cefaleia, hemoptise e hemorragia uterina, tratamento de feridas entre outros ^{15,16}.

Estudos envolvendo tanto o óleo essencial quanto extratos de *C. blanchetianus* têm revelado a viabilidade terapêutica e farmacológica dessa espécie no que se refere à ação antibacteriano, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, ^{41,39,50}, Broncodilatador ⁵¹, antinoceptiva ^{52,18} gastroprotetora ⁵³ contra ação de ectoparasita em animais ⁵⁴, no controle de larvas de insetos em grãos ⁵⁵.

O óleo essencial de *C. blanchetianus* (OECB) é obtido principalmente de flores e inflorescência, podendo ser encontrado também nas cascas, raízes e sementes ⁵⁵ sendo formado por uma mistura de aproximadamente 17 a 60 componentes químicos que se encontram em diversas concentrações ⁵⁶. Dentre os principais metabólitos, temos os constituintes voláteis como, hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos, cetonas, álcoois, aldeídos, fenóis, ésteres, além de diterpenos e triterpenos ⁵⁷.

Terpenos são compostos voláteis derivados de óleos essenciais especializados em metabólitos secundários, que estão subdividido em dois grupos principais, os terpenos hidrocarbonetos e oxigenados ⁵⁸. São formados por moléculas de cadeias carbônicas que vão desde estruturas pequenas e simples como os hemiterpenos (C₅), monoterpenos

(C10), sesquiterpenos (C15) até as mais complexas e não voláteis como os diterpenos (C20), triterpenos (30). Os terpenos contidos em óleos essenciais têm se mostrado bastante efetivos no combate a bactérias, fungos, parasitas, vírus ⁵⁹. Os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos se destacam no grupo por apresentarem efeito ovicida, larvívica e repelente induzindo o controle de insetos ⁶⁰.

Dentre os terpenos com importância biológica registrados na literatura e que são comuns aos encontrados no presente estudo podemos citar o monoterpeno eucaliptol que possui atividade anti-inflamatória e anti-edematogênica 2.2a ⁶¹, o sesquiterpenóide α -cadinol que age como gastroprotetor 2.2b ⁵³. O α -pineno figura 2.2c e o linalol figura 2.2d que apresentaram em teste *in vivo* um eficiente efeito antiinflamatório e analgésico com inibição da COX-2 e redução da dor ⁶². O cariofileno demonstrou eficiente ação inseticida apresentando toxicidade por contato contra *T. castaneum* figura 2.2e ⁶³. O α -humuleno é usado para atenuar tendinites crônicas e dores miofaciais figura 2.2f ⁶¹.

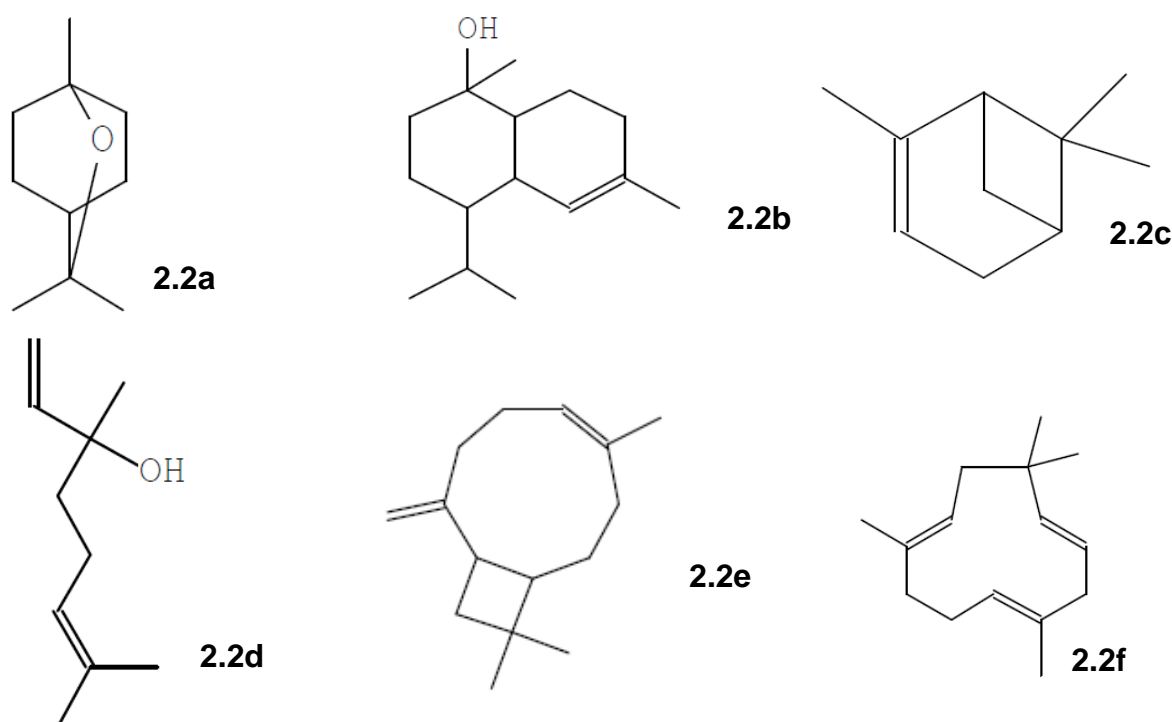


Figura 2.2. Estruturas químicas de importância biológicas.

No grupo dos terpenos podemos ainda encontrar compostos como hormônios (giberelinas e ácido abscísico), pigmentos carotenóides (carotenos e xantofilas), esteróis (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de esterol e látex. Alguns terpenos despertam interesse comercial tanto na indústria alimentícia devido ao uso como

aromatizante, fragrância em alimentos e cosméticos, bem como na indústria agrícola como inseticidas ⁶⁴.

No extrato etanólico das folhas, caule e raízes de *C. blanchetianus*, encontra-se flavonoides, isoflavanoides, alcaloides, taninos, ligninas e xantonas ⁶⁵ quinonas, saponinas, cumarinas, sendo que nos últimos anos, alguns desses componentes químicos são vislumbrado pela indústria farmacêutica como potenciais antioxidantes naturais ²³. Os alcaloides, por exemplo, possuem ação farmacológica, que afetam o sistema nervoso central. Em dose baixa, produzem alterações fisiológica e psicológica mediante a interações com neurotransmissores capazes de provocar efeitos como relaxamento muscular, tranquilizante e analgésico ²³.

Já no extrato metanólico foi possível identificar as saponinas, que são metabólitos encontrados em tecidos mais suscetíveis a agressão cometida por fungos, bactérias e insetos ²³. Elas atuam principalmente formando barreira química ou escudo no sistema de defesa das plantas ⁶⁶.

2.4. *Allium cepa*

Considerando a toxicidade o teste com *A. cepa* tem sido bastante utilizada na comunidade científica por ser bom biomarcador para identificação de características citotóxicas e genotóxicas em plantas medicinais. Através desse teste é possível identificar nas raízes da cebola, alterações cromossômicas como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, formação de micronúcleo, ou mesmo a destruição total do cromossomo, além de modificação no processo de divisão celular ⁶⁷.

Dentre as vantagens de utilizar o *A. cepa* no monitoramento de produtos naturais esta, o baixo custo, o fácil acesso, alta confiabilidade, alta sensibilidade e correlação com outros testes citogenético ⁶⁸, dispensando equipamento sofisticado para a execução⁶⁷, além disso, destaca-se entre outros vegetais por apresentar cromossomos maiores com sensibilidade em captar agentes químicos com efeito tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico ⁶⁹. Através do efeito tóxico pode ser avaliado o crescimento radicular. A citotoxicidade é determinada de acordo com o índice mitótico (IM). A genotoxicidade é avaliada segundo análise de células meristemáticas com alterações cromossômicas (AC). Tais alterações podem ser provocadas em respostas a efeitos aneugênicos (C-metáfase, metáfase com aderência cromossômica, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas, metáfases poliploides,

dentre outras) ou a efeito clastogênicos (fragmentos cromossômicos e pontes cromossômicas). A mutagenicidade é analisada segundo a avaliação de micronúcleos (MN) que podem ser gerados por meio de efeito aneugênicos ou clastogênicos.⁶⁹.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Coleta do material

As folhas e inflorescência de *C. blanchetianus* foram coletadas às 7h da manhã, na localidade Cachoeira da Serragem, cidade de Buriti do Lopes-Piauí em Fevereiro de 2022, na estação chuvosa, entre as coordenadas geográficas latitude 3°10'36.0"S e longitude 41°48'25.5'W. Um total de 05 amostra de exsicata da planta foram depositadas no Herbário do Delta do Parnaíba da Universidade Federal do Piauí, em Parnaíba-PI, (tombo 6727) registrado na plataforma SisGen (Sistema Nacional de Genética e *Knowledge Heritage Management Traditional Associate*) com o número: A49D763.

3.2. Extração do óleo essencial

A extração do óleo ocorreu por hidrodestilação em aparelho Clevenger ⁷⁰, acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L que foi aquecido por manta térmica. Foram pesados 800 g de folhas e inflorescência, adicionados 2 L de água destilada, que foi aquecida até 100 °C, sendo mantido em ebulição constante por 2 h, figura 3.1. O óleo foi separado da água e seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O óleo obtido foi armazenado em frasco âmbar em baixa temperatura ⁷¹.



Figura 3.1. Fotografias (esquerda) folhas inflorescência de *C. blanchetianus* sendo preparadas e (direita) hidrodestilação. Fonte: Arquivo pessoal.

3.3. Cálculo do rendimento de óleo essencial das folhas e inflorescências de *C. blanchetianus*

O rendimento do processo extrativo foi determinado em triplicata pela relação massa/massa de acordo com a fórmula abaixo. A massa do óleo essencial foi determinada em escala analítica e seu valor foi comparado com a respectiva massa das folhas utilizadas.

(%) de óleo essencial = massa de óleo essencial (g) X 100/ massa de folhas (g)
(Equação 1).

3.4. Cromatografia Gasosa Acoplada em Massa

A análise por cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM) foi realizada utilizando um cromatógrafo à gás Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas, modelo CG/EM-CGEM-QP2010CN Ultra, equipado com um injetor *split/splitless* (250°C), capilar coluna cromatográfica tipo DB-1 (*Agilent Technologies, Palo Alto, EUA*), com fase estacionária composta por 100% dimetilpolissiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme. A reação foi iniciada com propagação de temperatura a 50°C por 5 min, então aumentada para 250°C com uma taxa de crescimento de 5°C/min (por 35 min). A temperatura da câmara de ionização e da interface CG/EM foi de 200°C e 250°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão de 1,69 mL/min (100 kPa) e utilizou o modo *splitless*. Para injeção, preparou-se uma solução de 1 mg/mL de OECEB solubilizada em etanol em seguida, injetou-se 1 µL dessa solução no cromatógrafo. O espectrômetro de massa operou a 70 eV no modo SCAN (*Full Scan*), utilizando o método de ionização de elétrons (ionização por impacto de elétrons). Os compostos foram quantificados por normalização de área^{72,73}.

3.5. Ensaio *A. cepa*

As sementes de *A. cepa* da variedade comercial (cv. Vale Ouro IPA 11) foram colocadas pra germinar em placas de petri contendo água destilada, posteriormente foi armazenada em incubadora (BOD SL – 224®) com condições de iluminação e temperatura adequadas para a germinação. As sementes foram mantidas na incubadora por 04 dias, até que o sistema reticular atingisse aproximadamente 01 cm de comprimento⁷⁴.

Cerca de 30 sementes com suas raízes foram submetidas por 48h na BOD, ao controle negativo (CN) 1% dimetilsulfóxido 10 µg/mL (DMSO), controle positivo (CP) Metilmetanosulfonato (MMS) 10 µg/mL dissolvido em DMSO 1%, e ao tratamento (T) com OEGB dissolvido em DMSO 1%, nas concentrações 1,6 µg/mL (T1), 8 µg/mL (T2), 40 µg/mL (T3), 200 µg/mL (T4), 1000 µg/mL (T5) respectivamente ⁷⁴.

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 em HCl 1N a 60 °C por 10 min. Após a hidrólise, as raízes foram lavadas novamente em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o reativo de Schiff, onde permaneceram em local escuro, por 2 h. Em seguida, as raízes foram lavadas, até a total remoção do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético 2% e montadas com Entellan[®] ¹⁷.

Após a confecção, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss Primo Star com Axiocam 105 color câmera) com ampliação de 400x. Um total de 5.000 células meristemáticas (500 células/ lâminas, sendo 10 lâminas por tratamento). Nas lâminas foram analisadas as alterações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN), Broto nuclear (BN), além do índice mitótico (IM) em todos os estágios da mitose (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) ⁷⁵.

3.6. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student Newman-Keuls a posteriori ($p < 0,05$), no software BioEstat 5.3 ⁷⁶, para comparação entre as médias dos controles positivo e negativo e grupos tratados.

3.6. Indução da ferida e grupos experimentais de animais

O estudo foi realizado com 18 ratos machos *Ratus norvegicus*, variedade Wistar, estes foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 06 animais por grupo) como segue:

- Controle Negativo (CN) ferida não tratada;

- Grupo 1 (G1): Controle Positivo (ferida tratada com pomada de Ácidos Graxos Essenciais- AGE);
- Grupo 2 (G2): Pomada de *C. blanchetianus* 10% (ferida tratada OECEB a 10%).

Na indução anestésica, os animais receberam atropina por via cutânea, na dose de 0,04 mL/100g, após 20 minutos foi iniciado o procedimento anestésico onde os animais foram submetidos à anestesia dissociativa com cetamina/xilazina na proporção de 1:1 na dose de 0,1mL/100g.

Em seguida foi realizada a tricotomia na região dorsal com área de 24 cm², cada (6 cm de comprimento x 4 cm de largura).

Os ratos dos respectivos grupos (CN, (G1) AGE e (G2) OECEB) foram submetidos a 03 feridas cirúrgicas cada um, seguindo o período de avaliação 7°, 14° e 21° dias de pós-operatório (DPO) figura 3.2.

Na região dorsal, no centro da área tricotomizada, foram feitas 03 demarcações na pele de cada rato por rotação da borda cortante do demarcador (*punch*) metálico com 02 cm de diâmetro. Seccionou-se o segmento de pele circular, seguindo a demarcação do *punch*, até exposição da fáscia muscular dorsal.



Figura 3. 2. Lesão cirúrgica dos períodos de avaliação 7°, 14° e 21° dias de pós-operatório.

3.6. Tratamento fitoterápico

O controle negativo de 7º, 14º e 21º DPO, não recebeu tratamento algum, portanto a cicatrização ocorreu de forma fisiológica. O grupo 1, de 7º, 14º e 21º DPO, foi aplicado topicamente pomada de Ácidos Graxos Essenciais (AGE), diariamente. Já no grupo 2, de 7º, 14º e 21º DPO, foi aplicada diariamente formulação tópica de pomada base de OECB na concentração de 10%.

Após o tratamento prescrito para cada grupo, os animais foram fotografados e transferidos para as respectivas gaiolas. Em cada gaiola foram alojados 06 ratos e identificados quanto ao grupo pertencente demarcados nas caudas com caneta azul, em ordem de um a seis. Os tratamentos do G1 e G2 foram realizados diariamente, no mesmo turno e horário.

3.7. Eutanásia e descarte dos animais

Após o período de 21 dias de evolução os animais foram eutanasiados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) para a dissecação das amostras que foram submetidas à análise.

3.8. Análise macroscópica

Para análise da regressão da ferida, a lesão foi fotografada por câmera digital mantida em altura constante de 34 cm, imediatamente após a indução da ferida cirúrgica de 7º, 14º e 21º evolução respectivamente.

As imagens foram analisadas por meio do programa (Image J) que determinou a área da ferida. A área da ferida foi definida por meio do cálculo: $\text{área final (dia 7, dia 14 ou dia 21)} - \text{área inicial (dia 1)} / \text{área inicial} * 100\%$ que definiu o percentual de regressão (Equação 2).

A estatística da regressão da ferida foi realizada através da média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, considerando-se significativo os valores com intervalo de confiança igual a 95% e $p < 0,05$. As análises foram efetuadas utilizando o programa GraphPad Prisma 9.0.⁷⁷.

3.9. Análise microscópica

As feridas foram sendo removidas com o passar do 7º, 14º e 21º DPO respectivamente com margem de pele íntegra onde foram fixadas em solução tamponada de formalina a 10% por 24 h. As amostras transversais centradas na ferida foram submetidas ao processamento histológico e incluídos em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 5 µm de espessura, que foram corados pela hematoxilina-eosina. (H.E.) e Picrossirius Red (PSR). As amostras histológicas foram analisadas em microscópio óptico trinocular, equipado com câmera digital acoplada a um microcomputador com documentação fotográfica, para efeitos comparativos.

Nas observações de microscopia óptica, foram avaliadas as diferenças histológicas quanto à proliferação fibroblástica e reepitalização.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento de óleo essencial das folhas e inflorescências de *C. blanchetianus*

Para cada 800 g de massa de folhas e inflorescência da espécie *C. blanchetianus*, obteve-se um rendimento de 3,6 g ou 3,8 mL correspondendo 0,45% em relação à massa do vegetal resultando numa densidade de 0,947 g/mL de óleo essencial.

O rendimento do OEGB no presente estudo foi semelhante aos $0,50\% \pm 0,03\%$ ⁷⁸, $0,49\%$ ⁷⁹ e superior aos $0,22\%$ ⁸⁰ já descritos na literatura, revelando que a porcentagem de óleo essencial encontrado no presente estudo foi satisfatória.

Avaliando o rendimento conforme a sazonalidade e o ciclo circadiano de 03 espécies do gênero *Croton* dentre elas *C. blanchetianus*, nas estações seca e chuvosa, sendo as coletas realizadas nos horários de 8, 12, e 20 h nessa ordem, pode-se constatar a diferença dos rendimentos considerando o horário da coleta⁸¹. A espécie *C. blanchetianus* obteve maior rendimento na coleta realizada na estação seca e no horário de 12 h onde são elevados os níveis de radiação solar⁵¹, não apresentando diferença significativa quando coletada 08 e 20 h respectivamente, o estudo apresentou ainda alteração quanto à composição química e porcentagem de componentes majoritários, corroborando a literatura⁸².

O rendimento do óleo é um fator importante uma vez que fornece subsídios necessários para nortear uma possível produção em larga escala. A comparação entre os dados demonstraram que as plantas medicinais apresentam alterações na produção, qualidade e quantidade de seus metabólitos secundários diante de fatores ambientais, como fatores genéticos, estação do ano, incidência solar, época da colheita, horário de coletas, tipo de solo, clima, índice pluviométrico, tipo de extração^{83,84} que atuam modificando as vias biossintéticas de substâncias biologicamente ativas o que interfere diretamente tanto no rendimento como na composição do óleo e na porcentagem dos componentes químicos⁸⁵.

4.1.2. Análise dos constituintes voláteis de *C. blanchetianus*

A análise do OEGB feito por meio da técnica CG-EM, constatou a presença de (62) compostos químicos, dos quais (49) foram identificados, representando (79,03 %) de constituintes voláteis. Dentre os compostos detectados no presente estudo, predominaram compostos orgânicos das classes dos hidrocarbonetos com 32 substâncias e álcoois com 13, em menor incidência, os éteres com 02, ésteres com 01 e cetonas com 01 constituinte.

Os componentes majoritários de acordo com a % de área foram: biciclogermacreno (43) com (22,80 %), cariofileno (33) com (10,90 %), eucaliptol (16) com (09,24 %), pseudolimoneno (15) com (08,96 %), α -pineno (5) com (07,82 %), germacreno-D (41) com (06,68 %), espatulenol (50) com (3,30 %), α -humuleno (38) com (2,05 %). Os componentes de menor % de área foram: ácido cético-5-metil-2-hexil-éster (17), 1-Diepi-10-cubenol (55) ambos com (0,12 %) e 5-metil-2-hexanol (3), cis-4-tujanol (20), criptono (25), γ -selineno (47) todos respectivamente com (0,13 %) como expostos na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição fitoquímica do óleo essencial das folhas e inflorescência de *C. blanchetianus* por análise GC-MS com seus respectivos (tempo de retenção, fórmula, área absoluta, porcentagem relativa de área %).

Nº	TR(min)	Composto	Fórmula molecular	Área absoluta	Per. rel de área (%)
1	6.682	(Z)-3-hexen-1-ol	C ₆ H ₁₂ O	1068966	0.23
2	7.979	Não identificado	C ₇ H ₁₄	685762	0.14
3	8.299	5-metil-2-hexanol	C ₇ H ₁₆ O	598415	0.13
4	9.290	α-turjano	C ₁₀ H ₁₆	3630484	0.77
5	9.537	α-pineno	C ₁₀ H ₁₆	3702789	7.82
6	10.095	Não identificado	C ₇ H ₁₂ O	1008773	0.21
7	10.997	sabineno	C ₁₀ H ₁₆	7803447	1.65
8	11.096	(-)-β-pineno	C ₁₀ H ₁₆	3515208	0.74
9	11.643	β-mirceno	C ₁₀ H ₁₆	6197575	1.31
10	12.086	α-Turjene	C ₁₀ H ₁₆	4401273	0.93
11	12.220	Não identificado	C ₇ H ₁₂	833506	0.18
12	12.302	3-careno	C ₁₀ H ₁₆	2561940	0.54
13	12.528	(+)-4-careno	C ₁₀ H ₁₆	834394	0.18
14	12.803	o-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	2344438	0.50
15	12.972	pseudolimoneno	C ₁₀ H ₁₆	4243435	8.96
16	13.052	eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	4373854	9.24
17	13.442	ácido acético-5-metil-hex-2-il-éster	C ₉ H ₁₈ O ₂	574511	0.12
18	13.643	β-cis-ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	1230479	0.26
19	14.001	γ-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	1538021	0.32
20	14.280	cis-4-tujanol	C ₁₀ H ₁₈ O	626260	0.13
21	15.001	2-careno	C ₁₀ H ₁₆	2367919	0.50
22	15.365	linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	1876421	0.40
23	17.531	Não identificado	C ₁₀ H ₁₈ O	654161	0.14
24	17.868	(-)-4-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	2925161	0.62
25	18.141	criptono	C ₉ H ₁₄ O	629418	0.13
26	18.276	α-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	6707626	1.42
27	18.467	mirtanol	C ₁₀ H ₁₆ O	967162	0.20
28	23.373	(+)-ciclosatieno	C ₁₅ H ₂₄	1604998	0.34
29	23.626	α-copaeno	C ₁₅ H ₂₄	2120559	0.45
30	23.884	(-)-β-bourboneno	C ₁₅ H ₂₄	1280095	0.27
31	24.032	(-)-cis-β-elemeneno	C ₁₅ H ₂₄	5419263	1.14
32	24.113	Não identificado	C ₁₅ H ₂₄	784737	0.17
33	24.833	cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	5161125	10.90
34	25.043	cis-β-copaeno	C ₁₅ H ₂₄	3027678	0.64
35	25.313	aromandendreno	C ₁₅ H ₂₄	5427211	1.15
36	25.380	guaia-6,9-dieno	C ₁₅ H ₂₄	1356312	0.29
37	25.600	Não identificado	C ₁₅ H ₂₄	750373	0.16
38	25.687	humuleno	C ₁₅ H ₂₄	9720256	2.05
39	25.876	aloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	5349505	1.13
40	26.232	γ-muroleno	C ₁₅ H ₂₄	3503408	0.74
41	26.385	germacreno-D	C ₁₅ H ₂₄	3162664	6.68
42	26.519	β-Selineno	C ₁₅ H ₂₄	3471617	0.73
43	26.808	biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	1079168	22.80
44	26.991	(-)-cis-β-elemeneno	C ₁₅ H ₂₄	5026819	1.06
45	27.198	cubebol	C ₁₅ H ₂₆ O	4548683	0.96
46	27.369	(+)-δ-cadineno	C ₁₅ H ₂₄	5112879	1.08
47	27.735	γ-selineno	C ₁₅ H ₂₄	636049	0.13
48	28.252	germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	1474013	0.31
49	28.500	(-)-globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	793922	0.17
50	28.733	espatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	1563200	3.30
51	28.884	óxido-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	7040574	1.49
52	29.118	Não identificado	C ₁₅ H ₂₄ O	2512468	0.53
53	29.350	ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	2785268	0.59

54	29.485	Não identificado	C ₁₅ H ₂₄ O	846625	0.18
55	29.876	di-epi-1,10-cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	555696	0.12
56	30.104	Não identificado	C ₁₅ H ₂₄ O	5524606	1.17
57	30.269	α -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	1520259	0.32
58	30.472	tau-Murolol	C ₁₅ H ₂₆ O	2077512	0.44
59	32.296	Não identificado	C ₁₅ H ₂₆ O	1189123	0.25
60	32.493	Não identificado	C ₁₅ H ₂₄ O	625909	0.13
61	32.787	Não identificado	C ₃₃ H ₅₄ O ₄	765945	0.16
62	33.342	Não identificado	C ₂₇ H ₄₄ BO	990116	0.21
Total				474310813	100.00

Na tabela 4.2 é possível observar que as classes dos constituintes químicos do OEBC estão distribuídas em hemiterpenóides (8,16 %), monoterpenos e monoterpenóides (38,77 %), sesquiterpenos e sesquiterpenóides (53,06 %). Os monoterpenos e sesquiterpenos mostraram-se predominantes somando (91,83 %) do total de compostos.

Tabela 4.2. Composição percentual do óleo essencial das folhas e inflorescência de *C. blanchetianus*. (NC) número do composto, (TR) tempo de retenção, porcentagem relativa de área %.

Nome do composto	TR	ÁREA (%)
HEMITERPENÓIDES 8.16%		
(Z)-3-hexen-1-ol	6.682	0.23
5-metil-2-hexanol	8.299	0.13
ácido acético-5-metilhex-2-il-éster	13.442	0.12
criptono	18.141	0.13
MONOTERPENOS 26.53%		
α -pineno	9.537	7.82
α -turjano	12.086	0.93
sabineno	10.997	1.65
(-)- β -pineno	11.096	0.74
β -mirceno	11.643	1.31
α -turjano	9.290	0.77
3-careno	12.302	0.54
(+)-4-careno	12.528	0.18
ocimeno	12.803	0.50
pseudolimoneno	12.972	8.96
β -cis-ocimeno	13.643	0.26
γ -terpineno	14.001	0.32
2-carene	15.001	0.50
MONOTERPENÓIDES 12.24%		
eucaliptol	13.052	9,24
cis-4-tujanol	14.280	0.13
linalol	15.365	0.40
(-)-4-terpineol	17.868	0.62
α -terpineol	18.276	1.42
mirtenol	18.467	0.20
SESQUITERPENOS 36.73%		
(+)-ciclosativeno	23.373	0.34
α -copaeno	23.626	0.45
(-)- β -bourboneno	23.884	0.27
(-)-cis- β -elemeno	24.032	1.14
cariofileno	24.833	10.90
cis- β -copaeno	25.043	0.64
aromandendreno	25.313	1.15

guaia-6,9-dieno	25.380	0.29
humuleno	25.687	2.05
β - aloaromadendreno	25.876	1.13
γ -muroleno	26.232	0.74
germacreno D	26.385	6.68
β - selineno	26.519	0.73
biciclogermacreno	26.808	22.80
(-)-cis- β -elemeno	26.991	1.06
(+)- δ -cadineno	27.369	1.08
γ -selineno	27.735	0.13
germacreno B	28.252	0.31
SESQUITERPENÓIDES 16.33%		
cubebol	27.198	0.96
(-)-globulol	28.500	0.17
espatulenol	28.733	3.30
óxido cariofileno	28.884	1.49
ledol	29.350	0.59
di-epi-1,10-cubenol	29.876	0.12
α -cadinol	30.269	0.32
tau-murolol	30.472	0.44

Considerando a composição química presente no OEGB, estudos mostram uma variação na quantidade de componentes identificados para mesma espécie, uma vez que registros apontam a determinação de 12 a 34 constituintes químicos^{15,79,80,86}, confirmando a análise do presente estudo para mesma espécie.

Com relação à distribuição por classe, os monos e sesquiterpenos se mostram predominantes, onde somados podem atingir um percentual de 94,05 %⁸⁰ dos constituintes presentes na composição químicas do OEGB. Para outras espécies do mesmo gênero como, por exemplo, a *C. argyrophyllloide* a prevalência se mantém com monoterpenos (38,3 a 42 %) e sesquiterpenos (52,5 a 57,2 %) dos componentes voláteis⁸⁴ sendo os valores semelhantes aos encontrados para o OEGB.

Os terpenos presentes no OEGB apresentaram ação contra o efeito das bactérias *Streptococcus mutans* e *Streptococcus parasanguinis*, ambas pertencentes à cárie dentária oriundas da microbiota humana, tais constituintes revelaram uma ação antimicrobiana efetiva contra leveduras, bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de ação contra antibiofilme e biofilmes pré-formados, onde o resultado apresentado foi bastante promissor uma vez, que houve uma redução significativa na biomassa de biofilmes apresentando alta capacidade de blindar a formação de biofilmes orais^{87,43}. Os componentes voláteis apresentaram ainda efeito bactericida e bacteriostático contra as bactérias *Weissella viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides*, que são degradantes de produtos cárneos¹⁵.

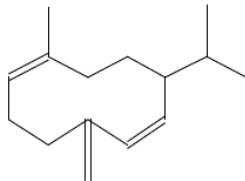
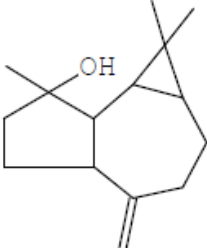
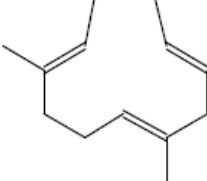
A atuação dos terpenos justifica-se pelo mecanismo de ação peculiar junto à membrana plasmática uma vez que essa é composta por uma bicamada lipídica onde

estes atuam como espaçadores, promovendo um acréscimo na mobilidade de seus componentes. Dessa forma ao introduzir terpenos na bicamada lipídica, promove-se um acréscimo na fluidez da membrana⁵⁹. Apresentam ainda, efeito citotóxico promovendo a interrupção do ciclo celular e perda da função desencadeando a apoptose celular. Atuam contra a ação de insetos, protozoários, fungos, bactérias, células tumorais entre outros⁸⁸.

Na caracterização do OECD, mostraram-se prevalentes a classe dos sesquiterpenos com biciclogermacreno (22,80 %), cariofileno (10,90 %), germacreno-D (6,68 %), espatulenol (3,3 %), humuleno (2,05 %) seguido da classe dos monoterpenos com pseudolimoneno (8,96 %), eucaliptol (9,24 %), α -pineno (7,82 %) como respectivos compostos majoritários de importância biológica evidenciado na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Compostos majoritários e atividade biológica identificada por CG-MS do óleo essencial das folhas e inflorescência de *C. blanchetianus*.

Nº	Estrutura	Grupo	Atividade Biológica
1	Biciclogermacreno	Sesquiterpenos	Leishmanicida, antioxidante ^{56,89}
2	Cariofileno	Sesquiterpenos	Anti-inflamatória, neuroprotetor, antitumoral, anticonvulsivante, antinocepcivo ⁹⁰
3	Eucaliptol	Monoterpenóide	antibacterianos, antissépticas, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas ⁹¹
4	Pseudolimoneno	Monoterpeno	Antioxidante ⁹²
5	α -Pineno	Monoterpeno	antimicrobiano e antioxidante, antifúngica ⁹³

6	Germacreno D		Sesquiterpenos	antibacteriano e antifúngica ⁹⁴
7	Espatulanol,		Sesquiterpenóide	antibacteriano, antisséptica, antioxidante, anti-inflamatória ⁹¹
8	Humuleno		Sesquiterpenos	Antiinflamatória ⁹⁵

O biciclogermacreno, cariofileno e eucaliptol foram os componentes que apresentaram maior percentagem de área na caracterização do OEGB.

Investigações com vista em avaliar a composição química do OEGB confirmou o biciclogermacreno como prevalente com percentual de área variando entre 10,22% a 33,5%^{79,51,52}, este manteve sua predominância também entre outras espécies do gênero *Croton* como *C. argyrophylloides*, (28,09 %), *C. jacobinensis* (25,2 %), *C. sincorensis* (23,86 %) ⁸⁴. Para o eucaliptol a predominância ficou entre 4,16%, a 16,9% já para o cariofileno entre 6,9 % a 15,9 % ^{81,51,52} considerando o OEGB. O composto cariofileno, mostrou-se dominante ainda nas espécies *C. adenocalyx* (15,64 ± 0,62 %) e *C. heliotropiifolius* (20,82 ± 0,38 %) ⁷⁸. Embora menos frequentes compostos como germacreno D, espatulanol, e cadineno, apresentaram-se como majoritário para o OEGB 40,78

Em se tratando de atividade biológica dos componentes majoritários apresentados no OEGB, o biciclogermacreno é um sesquiterpeno que apresenta atividade antifúngica, antimicrobiana, ⁹⁶ antileishmania ⁵⁶. O cariofileno é metabólito secundário presente no óleo essencial de diversas plantas sendo obtido de todas as partes do vegetal, possui abundante atividade farmacológica como analgésica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetor, ansiolítico, antidepressivo ⁹⁷ antileishmania, se mostra ainda, eficiente em inflação aguda ⁵⁶. O estudo inclui ainda a relevante propriedade terapêutica cardioprotetora, antiapoptótico,

anticâncer, antirreumático, além do mais, mostrou-se promissor no tratamento da doença de Alzheimer e Parkinson, provocando redução de convulsões ⁹⁸.

Monoterpeno de baixo peso molecular encontrado em óleos essenciais de diversas espécies de planta gênero *Croton*, o eucaliptol é amplamente utilizado como agente antimicrobiano e antifúngico, possui alta absorção gastrointestinal, baixa toxicidade renal em humanos, apresenta amplo espectro antimicrobiano relacionado às varias patologias humanas, sobretudo as relacionada à cavidade oral ⁹⁹. Em experimento usando baixas concentrações em animais não apresentou efeito mutagênico, toxicidade, carcinogênico, hepatotóxico ou nefrotóxico, exibe ainda propriedades antinoceptivas com potencial efeito calmante e depressor do sistema nervoso central, atividade anti-inflamatória para asma brônquica, sinusite e doença pulmonar obstrutiva crônica, também em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, vasodilatação e também broncodilatação ¹⁰⁰. Em estudo *in silico*, apresenta resultados favoráveis como antiviral¹⁰¹.

4.2. Ensaio *Allium cepa*

Considerando o teste do OEBC em células meristemática de *A. cepa*, é possível observar a baixa divisão celular na prófase ($13,84 \pm 5,94^{**}$) T5 e ($17,25 \pm 5,43^{*}$) T4 respectivamente além de uma redução da mitose na anáfase ($0,13 \pm 0,20^{**}$) T5. As células apresentaram ainda redução do índice mitótico ($14,79 \pm 7,12^{**}$) T5 e ($20,55 \pm 6,25^{*}$) T4 conforme a tabela 4.4.

Com relação à citogenicidade como mostra os dados representados na tabela 4.4 verifica-se uma redução na divisão celular predominante na prófase nos tratamentos (T4 e T5), e na anáfase no tratamento T5, suficiente para reduzir o IM resultando na citotoxicidade do OEBC nas maiores concentrações. Contudo os demais tratamentos não modificaram as fases do ciclo celular, mantendo o IM adequado nas menores concentrações comparado ao CN. Além disso, as demais fases do ciclo celular de *A. cepa* (metáfase e telófase), não provocaram alteração no IM em nenhum dos tratamentos testados, corroborando com achados que também apresentou o efeito citotóxico em virtude da redução significativa do IM nas maiores concentrações relacionadas à redução da prófase ¹⁰².

Tabela 4. 4. Porcentagem das fases da mitose, índice mitótico e alterações cromossômicas totais em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de óleo essencial de *C. blanchetianus* (OECB).

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Fases da Mitose (%)				Índice Mitótico (%)	MN	Alteração cromossômica
	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase			
CN	30,87 \pm 10,75	0,69 \pm 0,45	0,70 \pm 0,28	2,48 \pm 1,49	34,74 \pm 12,16	5,57 \pm 3,05	6,23 \pm 3,55
MMS I (OECB)	9,58 \pm 3,72***	0,86 \pm 0,58	0,45 \pm 0,21	1,11 \pm 0,79	12,00 \pm 4,22***	40,47 \pm 13,65*	52,42 \pm 19,19*
1,6 $\mu\text{g/mL}$ + 10 $\mu\text{g/mL}$ (T1)	25,95 \pm 9,11	0,65 \pm 0,73	0,38 \pm 0,27	2,55 \pm 1,63	29,53 \pm 11,01	2,17 \pm 2,58*	2,81 \pm 2,74
8 $\mu\text{g/mL}$ + 10 $\mu\text{g/mL}$ (T2)	19,61 \pm 11,11	0,63 \pm 0,61	0,41 \pm 0,40	1,86 \pm 1,82	22,52 \pm 12,91	1,01 \pm 1,73**	1,37 \pm 2,13**
40 $\mu\text{g/mL}$ + 10 $\mu\text{g/mL}$ (T3)	30,93 \pm 11,68	0,95 \pm 0,59	0,52 \pm 0,37	1,97 \pm 1,21	33,99 \pm 12,91	3,63 \pm 3,65	4,57 \pm 3,61
200 $\mu\text{g/mL}$ + 10 $\mu\text{g/mL}$ (T4)	17,25 \pm 5,43*	0,84 \pm 0,47	0,55 \pm 0,42	1,91 \pm 0,96	20,55 \pm 6,25*	3,12 \pm 2,46	3,86 \pm 2,57
1000 $\mu\text{g/mL}$ + 10 $\mu\text{g/mL}$ (T5)	13,84 \pm 5,94**	0,75 \pm 0,68	0,13 \pm 0,20**	1,22 \pm 1,43	14,79 \pm 7,12**	1,03 \pm 1,57**	1,87 \pm 1,78*

Os dados são médias \pm SD (desvio padrão). CN: Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - 1% DMSO em água destilada). MMS: 10 $\mu\text{g/mL}$ de Metilmetanossulfonato dissolvido em DMSO 1%. Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com teste a posteriori de Student-Newman-Keuls (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) quando comparado ao CN. Os dados são para 5.000 células/tratamento. O DMSO 1% foi utilizado como controle negativo. O controle positivo (MMS solubilizado em DMSO 1%).

Com relação os danos provocados nos cromossomos, houve redução significativa na formação de MN em ($2,17 \pm 2,58^*$) T1, ($1,01 \pm 1,73^*$) T2 e ($1,03 \pm 1,57^{**}$) T5. Verificou-se redução das alterações cromossômicas em ($1,37 \pm 2,13^{**}$) T2 e ($1,87 \pm 1,78^*$) T5, Como mostra a tabela 4.5. Além dos micronúcleos formados observou-se a presença discreta de outras alterações cromossômicas como broto nuclear, perdas cromossômicas, C-metáfase, aderência cromossômica, ponte em anáfase, conforme a figura 4.1.

A análise de MN em células meristemáticas de *A. cepa* revelou redução significativa nos tratamentos T2 e T5 do OEGB uma vez que gerou um acúmulo de MN inferior ao produzido pelo CN. Dessa forma o OEGB demonstrou que não possui efeito genotóxico, pois foi possível confirmar pela diminuição expressiva de MN nas alterações cromossômicas, tabela 4.5.

O OEGB foi incapaz de estimular a produção de MN e efeito genotóxico quando testado em camundongos, nas concentrações de 1.000 e 2.000 mg/kg¹⁸. Essa observação se confirma ao analisar o extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* em que a administração oral não provocou danos genéticos a nível celular nos animais¹⁰³

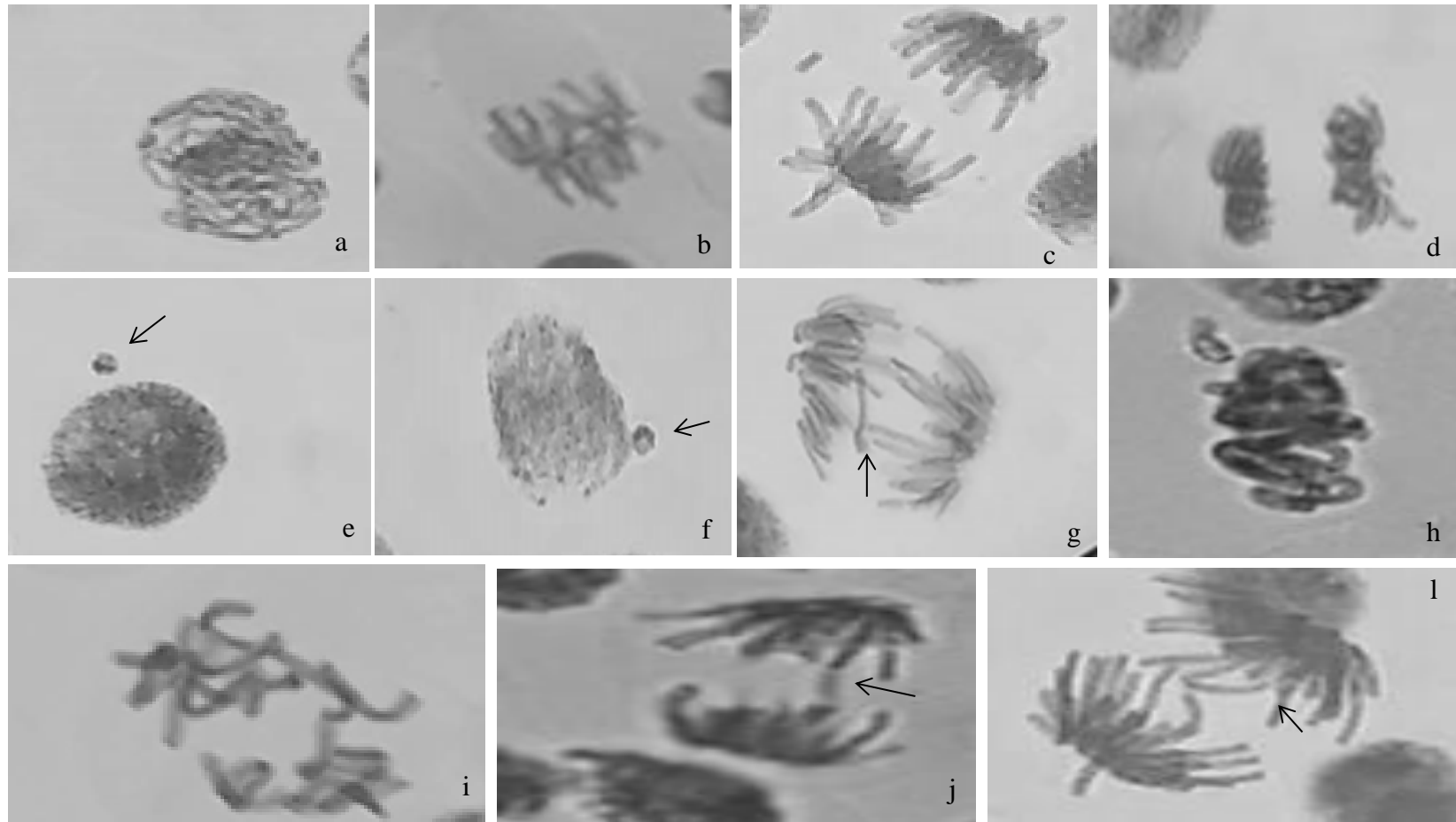
O MN é uma resposta a danos não reparados ou com reparo inadequado nas células que é repassado pra geração seguinte¹⁰⁴. Diversos mecanismos relacionados à quebra cromossômica (clastogênico), rompimento das fibras do fuso mitótico (aneugênico) como a perdas cromossômicas estão intimamente vinculada à produção de micronúcleos, por meio da formação de um “pequeno núcleo” envolvido por membrana completamente destacado do núcleo principal⁶⁸. Além do mais o MN pode ser formado por meio dos brotos nucleares (BT), mediante a exclusão de material genético em excesso no núcleo principal da célula, ou em virtude da junção de um cromossomo atrasado pelo envelope nuclear, antes de ser completamente reintegrado ao núcleo principal¹⁰².

Tabela 4.5. Alterações Cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* (OECB).

Tratamento	Cm	PC	BN	MN	PT	AC	QC
CN	0,00±0,00	0,28±0,62	0,09±0,29	5,57±3,05	0,19±0,39	0,10±0,31	0,00±0,00
MMS	0,10±0,31	0,45±0,87	9,20±6,09***	40,47±13,65*	0,49±0,51	0,75±1,00	0,96±0,187
1,6 µg/mL + 10 µg/mL (T1)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,17±2,58*	0,09±0,28	0,37±0,63	0,00±0,00
8 µg/mL + 10 µg/mL (T2)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,01±1,73*	0,00±0,00	0,27±0,84	0,00±0,00
40 µg/mL + 10 µg/mL (T3)	0,19±0,41	0,00±0,00	0,00±0,00	3,63±3,65	0,00±0,00	0,47±1,04	0,00±0,00
200 µg/mL + 10 µg/mL (T4)	0,09±0,29	0,10±0,30	0,00±0,00	3,12±2,46	0,18±0,38	0,37±0,66	0,00±0,00
1000 µg/mL + 10 µg/mL (T5)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,46±0,49	1,03±1,57**	0,00±0,00	0,38±0,92	0,00±0,00

Os dados são médias ± SD (desvio padrão). CN: Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - 1% DMSO em água destilada). CP: Controle Positivo (MMS: 10 µg/mL de Metilmetanossulfonato dissolvido em DMSO 1%). CM: C-metáfase; PC: Perda cromossômica; BN: broto nuclear; MN: Micronúcleo; PT: ponte cromossômica; AC: Aderência cromossômica; Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com teste a posteriori de Student-Newman-Keuls ($p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$) quando comparado ao CN. Os dados são para 5.000 células/tratamento. O DMSO 1% foi utilizado como controle negativo, o controle positivo (MMS solubilizado em DMSO 1%).

Figura 4.1. Células meristemáticas de a. cepa normais: (A) Prófase. (B) Metáfase. (C) Anáfase. (D) Telófase. Alterações cromossômicas. (E) Micronúcleo. (F) Broto nuclear. (G) Perda cromossômica. (H) Aderência cromossômica. (I) C-metáfase. (J) Anáfase com ponte. (L) Quebra cromossômica.



Fonte: Autor

A citotoxicidade presente nas maiores concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* pode estar relacionada a alguns componentes químicos como α -pineno e eucaliptol que agem de forma individual ou sinergicamente alterando as fases do ciclo celular ⁷⁴. O OECEB revelou que os componentes majoritários α -pineno, β -pineno, espatulenol, eucaliptol, α -copaeno, linalol, cariofileno apresentaram efeito fitotóxico além de serem responsáveis por um potencial alelopático inibitório do crescimento de outros vegetais ⁸⁴. O monoterpenóide eucaliptol é um dos componentes usado como fonte intermediária na composição de herbicida devido ao seu efeito fitotóxico ¹⁰⁵.

Evidências revelam a alta eficiência do extrato de folhas e caule de *C. blanchetianus* quando usadas no combate de parasitas em animais como ácaros, piolho, pulgas, carrapatos em humanos e endoparasitas como amebas e vermes, esses benefícios estão relacionados à variedade de metabólitos secundários inerentes a espécie incluindo alcaloides, taninos e terpenos, entre outros ⁵⁴. A eficiência da *C. blanchetianus* no combate ao ácaro e a outros parasitas têm sido atribuída mais diretamente ao efeito tóxico e repelente dos metabólitos eucaliptol e o α -pineno ¹⁰⁶. O OECEB mostrou ainda, alta eficiência na letalidade de insetos presentes em feijão onde as maiores concentrações apresentaram maior toxicidade provocando não só a mortalidade dos insetos mais reduzindo a oviposição dos mesmos ⁵⁵. Os óleos essenciais interferem na manifestação e crescimento populacional de insetos em produtos estocados ¹⁰⁷.

Os óleos essenciais em virtude de sua composição química tem uma forma peculiar de produzir um efeito repelente, através da inibição da acetilcolinesterase que provoca uma hiperatividade nervosa e falha do sistema nervoso, dessa maneira descontrola os músculos gerando contrações involuntárias até o enrijecimento dessa musculatura que por sua vez, produz falência respiratória levando a morte dos insetos ⁶⁰.

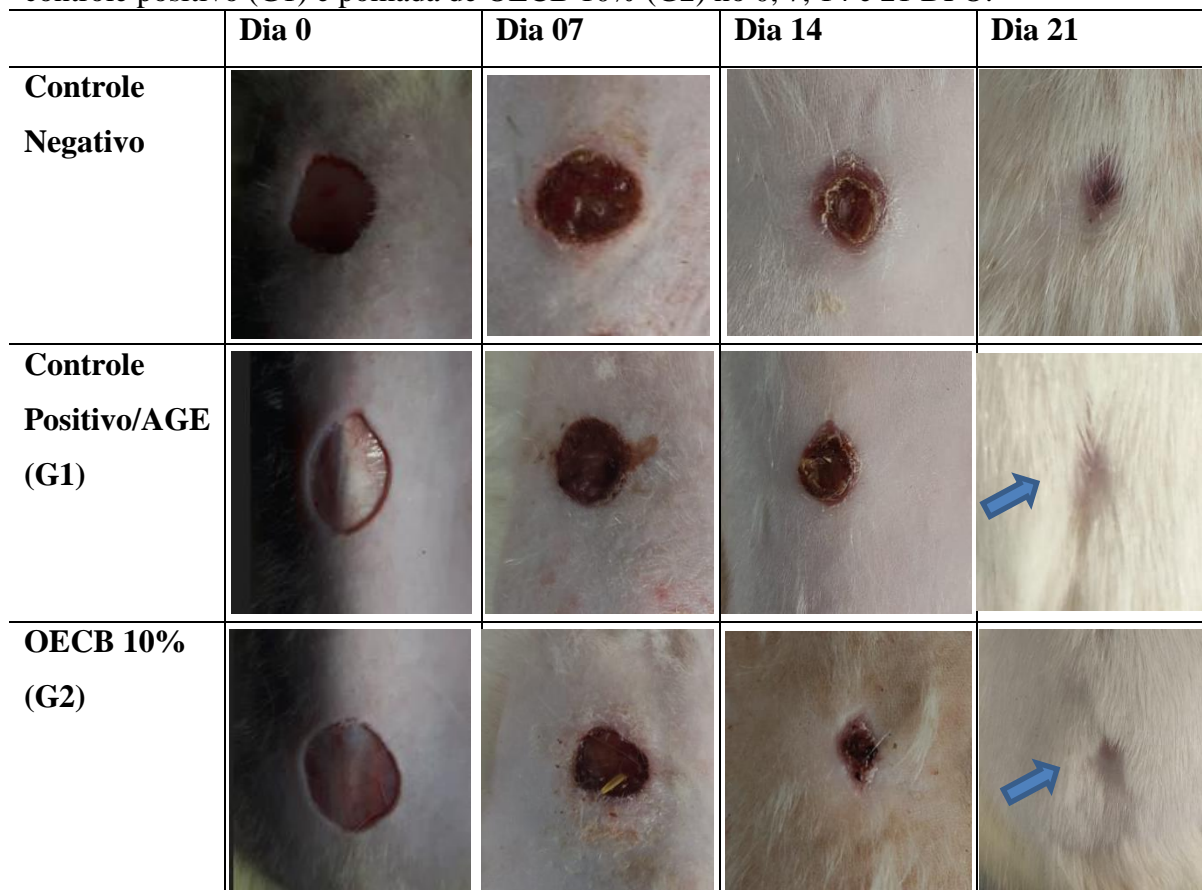
4.3. Cicatrização de Feridas Induzidas em Ratos

4.3.1. Análise macroscópica

Na evolução da ferida cutânea tanto nos grupos controles como no grupo tratado com pomada do OECEB houve formação de exsudato plasmático de aspecto serosanguinolento com formação de crosta superficial até o 7º DPO. A partir daí houve espaçamento da crosta após o 14º dia de tratamento. A crosta se destacou evoluído para o tecido de granulação e epitelização completa no 21º DPO com o surgimento de novos pelos ao redor da lesão. Não foi observado durante o tratamento qualquer tipo de

infecção ou agente externo que interferisse no processo de cicatrização sendo perceptível a redução da área ferida figura 4.2.

Figura 4.2. A área da ferida operatória dos animais dos grupos controle negativo, controle positivo (G1) e pomada de OECB 10% (G2) no 0, 7, 14 e 21 DPO.



Fonte: Autor

Para o percentual de regressão da ferida após 7º DPO observou-se que no controle negativo houve menor percentual de regressão da ferida comparada ao G1 e G2, no entanto G1 e G2 não apresentam diferença significativa entre si nessa primeira fase do tratamento, gráfico 4.1. Após 14º DPO é perceptível uma diferença percentual considerável entre o controle negativo e grupos que receberam tratamento. Quanto ao G1 e G2 apresentaram percentual de regressão semelhante entre si, como mostra o gráfico 4.2. Na avaliação do 21º DPO, constatou-se um percentual de regressão superior a 80% para os grupos de tratamentos G1 e G2, gráfico 4.3. Os grupos de tratamentos G1 e G2 que receberam tratamento com AGE e pomada de OECB respectivamente, apresentaram semelhança estatística no final do 21º de pós-operatório.

Gráfico 4.1: Análise da regressão cicatricial da pele após 07 dias de pós-operatório do controle negativo, tratamento com AGE (G1) e pomada de OECB a 10% (G2).

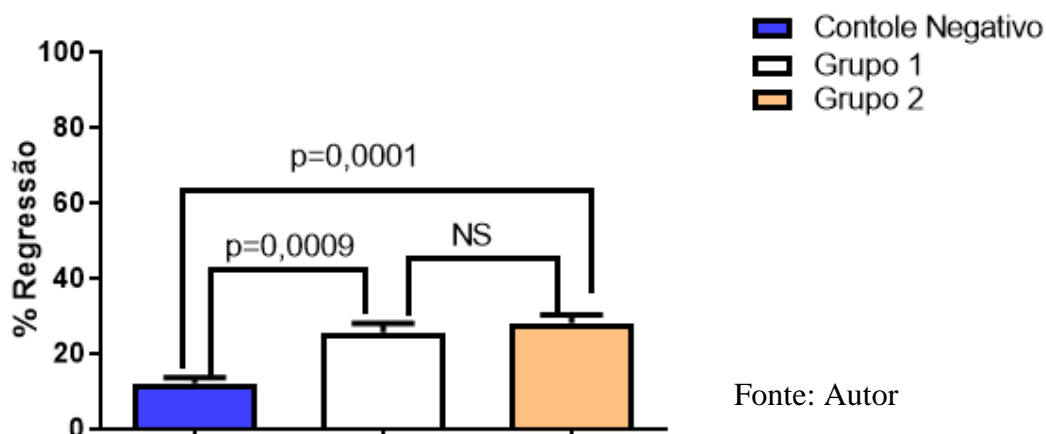


Gráfico 4.2: Análise da regressão cicatricial da pele após 14 dias de pós-operatório do controle negativo, tratamento com AGE (G1) e pomada de OECB a 10% (G2).

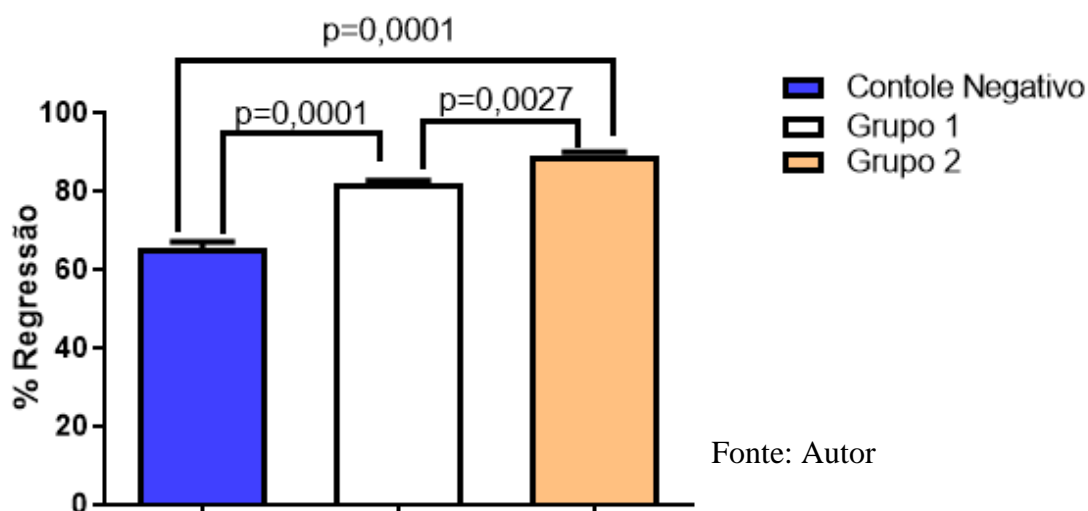
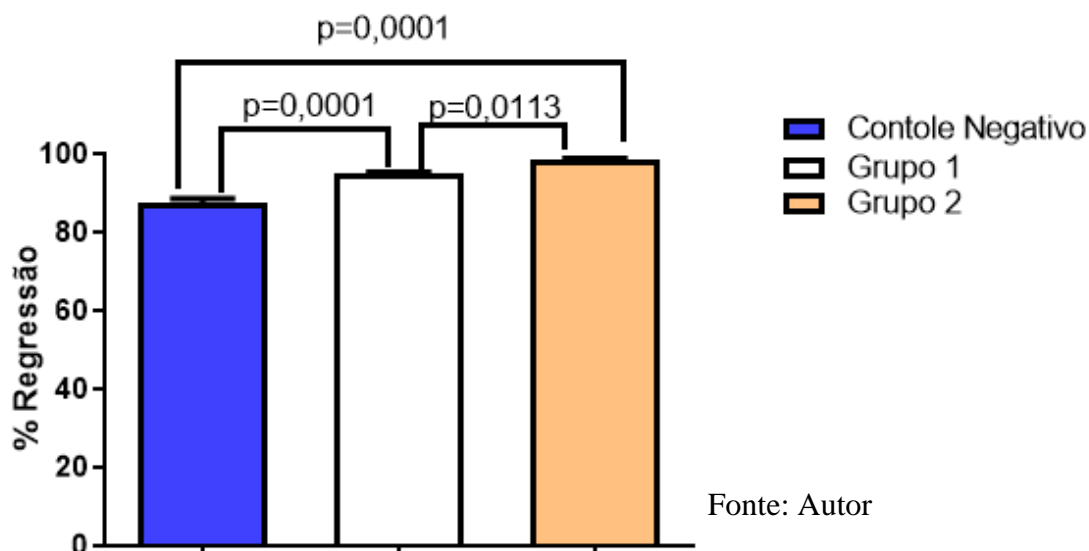


Gráfico 4.3: Análise da regressão cicatricial da pele após 21 dias de pós-operatório do controle negativo, tratamento com AGE (G1) e pomada de OECB a 10% (G2).

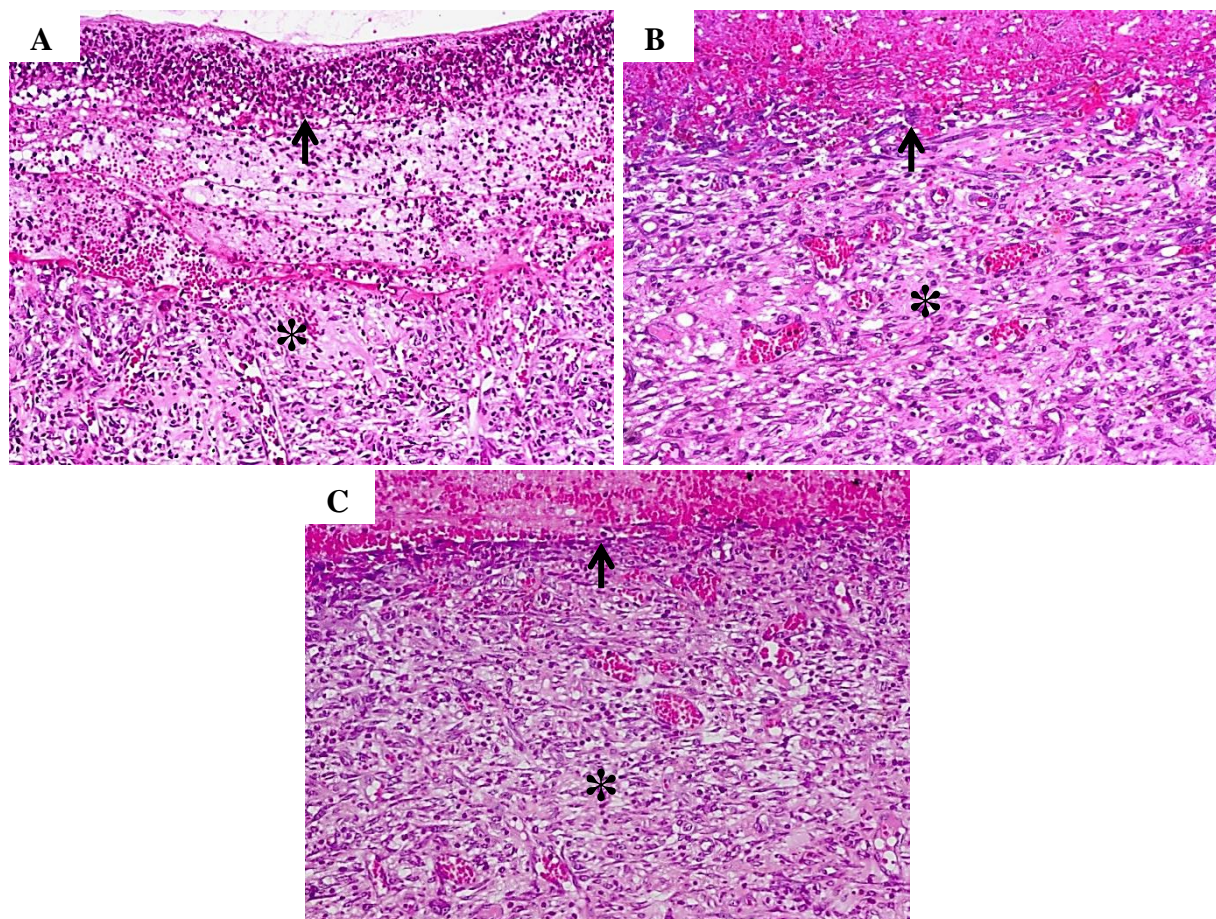


O processo de cicatrização tecidual se inicia logo após a lesão, embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico e dinâmico, onde o organismo se encarrega por meio de mediadores químicos da inflamação coordenados por uma série de eventos celulares e bioquímicos de promover a restauração do tecido lesionado, é necessário estimulação por meio de terapias alternativas como fitoterápicos para viabilizar e favorecer esse processo fisiológico^{24,108,7}. Os metabólitos secundários das plantas medicinais atuam nas várias etapas desse processo de cicatrização acelerando de forma promissora o reparo tecidual³⁰. Dentre os efeitos biológicos produzidos pelas plantas medicinais esta o de estimulação de proliferação e migração de fibroblastos para leito da ferida o que gera uma força de contração resultando no fechamento da lesão².

No 7º DPO em todos os grupos a reepitelização limitou-se às áreas periféricas das feridas, cujos centros estavam recobertos por crosta de espessura variável formada por material fibrinoneutrofílico ou hemorrágico. No leito das lesões, observou-se tecido de granulação jovem, caracterizado por uma matriz extracelular (MEC) frouxa, contendo capilares sanguíneos neoformados e intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e macrófagos. No CN, a MEC se mostrou mais edemaciada e com menor número de fibroblastos e de capilares, segundo a figura 4.3.

Os aspectos histológicos qualitativos e descritivos, revelaram que após 7º DPO, houve uma aparente diminuição da atividade inflamatória e um aumento de fibroblastos nos animais dos Grupos 1 e 2, quando comparados aos animais do controle negativo. No processo inflamatório ocorre a exsudação onde células leucocitárias fagocitam e destroem agentes lesivos, restos tissulares e tecido necrótico, o que torna a fase inflamatória, que acontece logo após a lesão, necessária para uma reparação tecidual efetiva⁷⁷. No decorrer dessa sucessão de eventos, verifica-se no leito da lesão a proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos além de modulação da angiogênese, epitelização, biossíntese da matriz extracelular (MEC) e perfusão da ferida

Figura 4.3. Microscopia mostrando a cicatrização das feridas no 7º DPO de tratamento do controle negativo (A) (G1) AGE (B), (G2) pomada de OECEB a 10% (C). Hematoxilina Eosina 100x.



Legenda: 7º DPO. Material fibrinoneutrofílico e hemorrágico (setas) depositado na superfície das feridas. No leito das feridas, nota-se tecido de granulação (asteriscos) com matriz extracelular frouxa (MEC) contendo numerosas células inflamatórias e capilares sanguíneos neoformados. Em A, a MEC é mais edemaciada e contém menor número de fibroblastos e capilares. **A:** controle negativo; **B:** Grupo 1; **C:** Grupo 2. H.E., 100x.

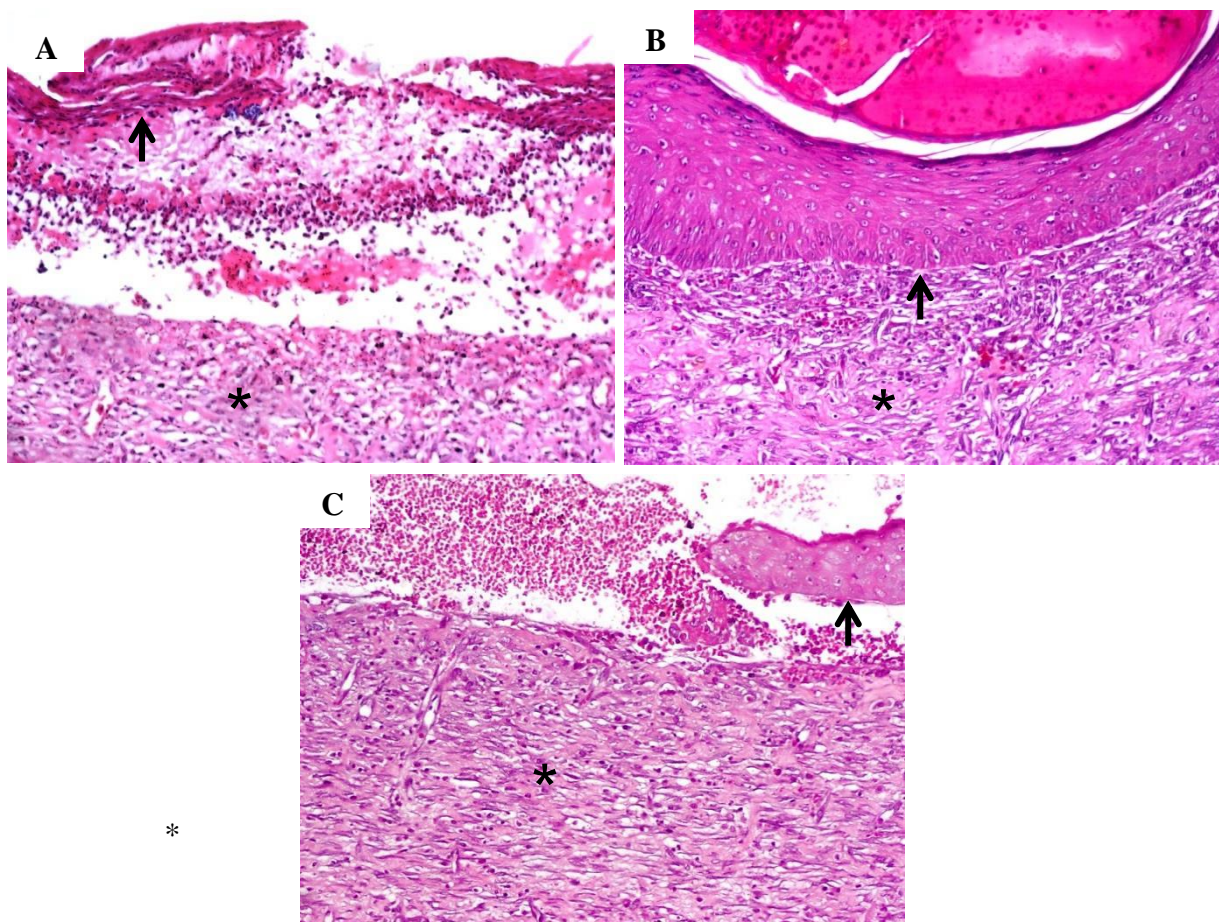
No 14º DPO a regeneração epidérmica e a redução da atividade inflamatória mostraram algumas diferenças entre os grupos. No CN, a reepitelização se caracterizou por delgadas faixas de epiderme imatura próxima ao centro da ferida. O exsudato fibrinoneutrófilico ainda estava presente e o tecido de granulação se mostrou edemaciado. No G1, a epiderme neoformada era espessa e madura, recobrando a área central da ferida. No G2, a reepitelização ainda se mostrou incompleta. Nesses dois grupos, a MEC estava densa, exibindo células inflamatórias escassas e numerosos fibroblastos dispostos em feixes paralelos à superfície epidérmica conforme a figura 4.4.

Após 14º DPO, os animais do controle negativo ainda revelaram atividade inflamatória acentuada e reepitelização incompleta. Nos animais do G1 e G2 houve redução da atividade inflamatória e aumento concomitante do número de fibroblastos. A reepitelização completa das feridas foi observada apenas nos animais do G1.

A reepitelização é um processo no qual ocorre à reconstrução da permeabilidade da epiderme após a lesão, com a finalidade de reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão como proteção mecânica, regulação da temperatura local, defesa contra microorganismos e barreira hídrica, tal processo é desenvolvido mediante os vários mecanismos como formação de queratinócitos, neo-epitélio e reestruturação de membrana ^{32,20}. Nesta fase ocorre ainda o acúmulo de fibroblastos no local da lesão que preenche as lacunas na formação da matriz extracelular, estimulando a formação de queratinócitos e proteínas para a angiogênese ⁷.

O ácido graxo essencial (AGE) utilizado no G1 é uma mistura de dois ou mais ácidos graxos essenciais dentre eles o mais comum são os ácidos linoléico e linolênico além do óleo de girassol, que possui as vitaminas A e E. Estudos mostram que essa composição age no decorrer de todo processo inflamatório promovendo, contração vascular, diapedese, quimiotaxia, angiogênese, aceleram o processo de granulação tecidual, favorece os fatores de crescimento, promovem mitose e proliferação celular, atuam sobre a membrana celular aumentando sua permeabilidade, auxiliam no desbrindamento autolítico, além disso, possui ação bactericida, auxiliando na prevenção de contaminação da lesão ^{109,31}.

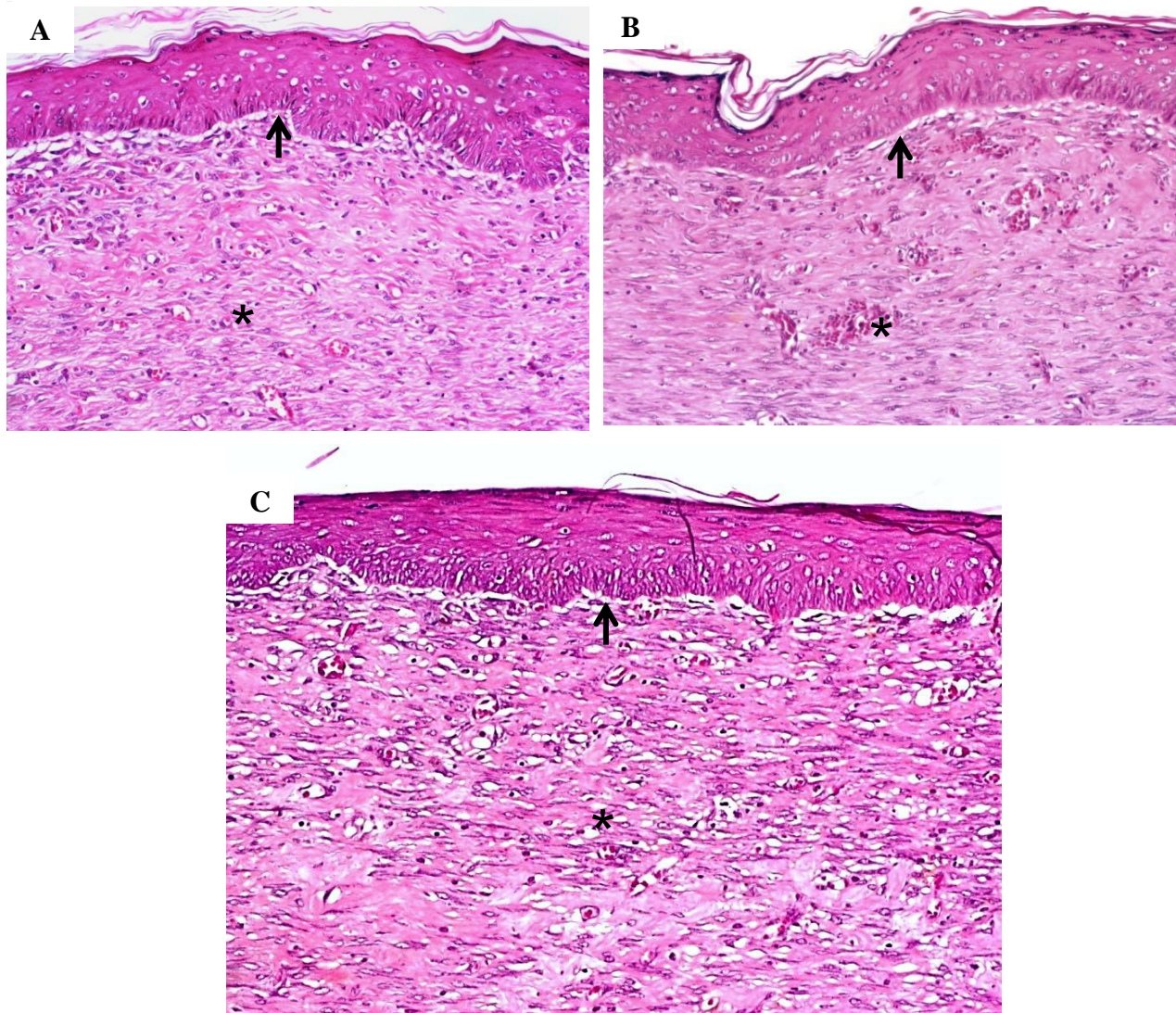
Figura 4.4. Microscopia mostrando a cicatrização das feridas no 14º DPO de tratamento do controle negativo (A), (G1) AGE (B), (G2) Creme de OECEB a 10% (C). Hematoxilina Eosina 100x.



Legenda: 14º DPO. Em A, apresenta uma delgada camada de epiderme neoformada (seta) próximas ao centro da ferida. Ainda se notam exsudato fibrinoneutrófilico e tecido de granulação frouxo (asterisco). Em B, a epiderme neoformada (seta) recobre a área central da ferida e em C, a reepitelização (seta) ainda é incompleta. O tecido de granulação (asterisco) em B e C é denso, com células inflamatórias escassas e fibroblastos dispostos em feixes paralelos à superfície epidérmica. **A:** controle negativo; **B:** grupo 1; **C:** grupo 2. H.E., 100x.

No 21º DPO, a reepitelização se mostrou completa e madura em todos os grupos, sendo a epiderme neoformada espessa, incluindo camadas granulosa e córnea. As células inflamatórias e os vasos sanguíneos eram escassos e os fibroblastos apareceram em feixes paralelos à superfície epidérmica, intercalados por material hialino (colágeno), figura 4.5.

Figura 4.5. Microscopia mostrando a cicatrização das feridas no 21º DPO de tratamento do controle negativo (A), (G1) AGE (B), (G2) Creme de OECB a 10% (B). Hematoxilina Eosina 100x.



Legenda: 21º DPO. Reepitelização completa e madura (setas) em todos os grupos, com a epiderme neoformada incluindo camadas granulosa e córnea. Na derme (asteriscos), as células inflamatórias e os vasos sanguíneos são escassos e os fibroblastos tendem a formar feixes paralelos à superfície epidérmica, separados por material hialino. A: controle negativo; B: grupo 1; C: grupo 2. 100x.

Após 21 dias, os três grupos exibiram resultados semelhantes no que se refere à reepitelização, organização dos fibroblastos e ausência de atividade inflamatória.

O G2 tratado com pomada de OECB mostrou ao final do tratamento uma redução da área da ferida com a formação do tecido de granulação saudável livre de infecção com o completo fechamento da parte lesionada.

Os óleos essenciais isolados tanto da espécie *C. blanchetianus* como de outras espécies de plantas medicinais apresentam como componentes majoritários os

terpenóides, monoterpenos e sesquiterpenos,^{18,110} esses compostos englobam componentes químicos que são farmacologicamente ativos com propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, antifúngicas, antimicrobianas, anticonceptivas que contribuem favorecendo o processo de cicatrização, pois promovem o aumento o processo de reepitalização, a regeneração epitelial, retração da ferida e mecanismos de remodelação^{10,30}.

A capacidade do OEGB em acelerar o processo de regeneração do tecido cutâneo se deve à presença de monoterpenos e sesquiterpenos em sua composição, estes compostos agem de forma isolada ou em cooperação favorecendo as várias etapas do processo de cicatrização. Dentre os componentes químicos identificados no presente estudo com ação farmacológica comprovada temos o α -pineno que tem se destacado pela eficácia como potencial anti-inflamatório agindo contra as vias inflamatórias e catabólicas estimuladas pela IL-1 β , já o biciclogermagreno atua na redução de um dos sinais cardinais da inflamação que é a dor¹⁸. O terpineol é responsável por potencializar a produção de mediadores químicos da inflamação. Os monoterpenos induzem a reprodução e migração de fibroblastos, preserva os macrófagos contra danos oxidativos celulares produzido durante a lesão e inibem a proliferação de citocinas pró-inflamatórias². Estudos *in vivo* e *in vitro* com α -humuleno e seu isômero, α -cariofileno revelaram um potencial efeito cicatrizante com melhora significativa na reepitelização e proliferação celular. α -humuleno apresentou ainda atividade anti-inflamatória associada à ativação ou inibição de distintos mediadores como bradicinina e histamina, que agem como vasodiladores, provocando aumento da permeabilidade vascular promovendo ação de fatores como interleucina IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF α), citocinas capazes de promover adesão leucocitária, quimiotaxia e alterações sistêmicas potencializando os componentes anti-inflamatórios¹¹¹.

Tomados em conjunto, esses achados histológicos sugerem que, neste modelo experimental, o uso da pomada de OEGB apresentou resultados no mínimo equivalentes aos dos AGE no que se refere à modulação da resposta inflamatória, à proliferação fibroblástica e à reepitelização, sobretudo nas duas primeiras semanas de evolução. Embora os resultados da presente investigação sejam promissores, fica evidente que há necessidade de realização de outros ensaios para comprovar o possível efeito benéfico da pomada de OEGB no de tratamento de feridas.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise fitoquímica das folhas e inflorescência de *C. blanchetianus* demonstrou um rendimento de 0,45 %. Através do GC-MS, foram identificados 49 componentes químicos corroborando com a literatura. Houve predominância das classes dos monoterpenos e sesquiterpenos sendo o biciclogermacreno (22,80%), cariofileno (10,90%) e eucaliptol (09,24%) os componentes majoritários. Tais metabólitos secundários apresentam na literatura considerável importância farmacológica. Em se tratando da citogenotoxicidade, o OEGB apresentou citotoxicidade nas maiores concentrações, contudo, foi incapaz de provocar alterações cromossômicas importantes resultando no efeito genoprotetor da espécie testada. Com relação ao efeito cicatrizante no 7º DPO de tratamento realizado com OEGB apresentou significativa redução da ferida com formação de fibroblastos e tecido de granulação com redução do processo inflamatório, no 14º DPO foi observado o processo de cicatrização mais avançado no tratamento realizado com AGE, no 21º DPO não houve diferença quanto à evolução da cicatrização entre os tratamentos realizados com OEGB e com AGE, na finalização de ambos os tratamentos houve formação de tecido de reepitelização, angiogênese, proliferação de fibroblastos com acelerado processo de cicatrização. Dessa forma o OEGB pode ser uma alternativa viável no tratamento de feridas. Contudo, faz-se necessário um estudo mais criterioso no intuito de elucidar mecanismos de interação entre componentes químicos e biológicos, analisando diversos níveis de possíveis atividades farmacológicas do vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Tazima, M. F. G. S.; Andrade, V. Y. A. M. V. Moriya T. biologia da ferida e cicatrização. **Medicina Ribeirao Preto Online**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.
2. De Christo Scherer, M. M. et al. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. **Journal of Tissue Viability**, v. 28, n. 2, p. 94–99, 2019.
3. Colares, C. M. P. et al. Cicatrização e tratamento de feridas: a interface do conhecimento à prática do enfermeiro. **Enfermagem em Foco**, v. 10, n. 3, 2019.
4. Andrade, C. C. D. et al. Costs of topical treatment of pressure ulcer patients. **Rev da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 2, p. 295–301, 2016.
5. Silva, D. R. A. et al. Pressure ulcer dressings in critical patients: a cost analysis. **Rev da Escola de Enfermagem da USP**, v. 51, 2017.
6. Donoso, M. T. V. et al. Análise de custos do tratamento de lesão por pressão em pacientes internados. **Rev de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, v. 9, 2019.
7. Valachova, K. et al. Skin wound healing with composite biomembranes loaded by tiopronin or captopril. **Journal of Biotechnology**, v. 310, p. 49–53, 2020.
8. Luciano, L. L et al. Utilização de óleo de moringa na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, 2021.
9. Moura, W. P. F. et al. Efeito do gel a base de Moringa oleifera lam. Como fitoterapia na cicatrização de feridas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.
10. Leite, V. V. et al. Cicatrização de feridas crônicas tratadas com oleorresina de copaíba. **Rev de Enfermagem Referência**, p. 1–10, 2023.
11. Borges, E. L.; Ribeiro, M. S.; Donoso, M. T. V. Revisão. **Estima–Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, v. 9, n. 4, 2011.
12. Yücel, A. et al. Effect of St.John’s wort (*Hypericum perforatum*) oily extract for the care and treatment of pressure sores; a case report. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, p. 236-241, 2017.
13. Ramalho, M. P. et al. plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: revisão de literatura. **Rev Expressão Católica Saúde**, n. 2, p. 64, 2018.
14. Silva, J. S. et al. Sinopse das espécies de Croton L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 441–453, 2010.

15. Vasconcelos, E. C. et al. Ação antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill. **Research, Society and Development**, n. 1, 2022.
16. Cartaxo, S. L.; de Almeida, S. M. M.; de Albuquerque, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.
17. Mateus, F. V. et al. Potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de frações do extrato de *Cróton* L. (Euphorbiaceae). **Research, Society and Development**, n. 4, 2022.
18. Matheus, W. K. C. et al. Essential oil from leaves of *Croton blanchetianus* Baill does not present acute oral toxicity, has antigenotoxic action and reduces neurogenic and inflammatory nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 318, p. 116908, 2023.
19. Verri, A. M.; Moura, A. A.; Moura, V. M. Testes Citogenéticos na Avaliação da Genotoxicidade de Produtos Naturais Provindos de Plantas Medicinais, **Uningá Review**, v. 30, n. 1, 2017.
20. Isaac, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev de Medicina**, v. 89, n. 3, p. 125-131, 2010.
21. Nguyen, A. V.; Soulika, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 8, p. 11-18, 2019.
22. Ruela, A. L. M. et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 527–544, 2016.
23. Silva, A. I. et al. fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do *croton blanchetianus*. **Rev Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, p. 1, 2021.
24. Pistore, M. et al. avaliação do uso tópico do óleo essencial de *ruta graveolens* L. (Arruda) na cicatrização de feridas em ratos. **Rev Perspectiva**, v. 38, n. 38, p. 57-68, 2014.
25. Avazia, D. O. et al. Evaluation of levels of interleukin-6, interleukin-8 and some haematologic parameters of dogs with cutaneous wounds. **Cytokine**, v. 113, p. 128–138, 2019.
26. Mandelbaum, S. H.; Di Santis E. P.; Mandelbaum, M. H. S. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393–408, 2003.
27. Suriyamoorthy, S. et al. Evaluation of wound healing activity of *Acacia leucophloea* bark in rats. **Rev Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1338-1343, 2012.

28. De Mais, J. E. C. D. et al. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 5, p. 21–512, 2016.
29. Capella, S. O. et al. Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104–112, 2016.
30. Labib, R. M. et al. Appraisal on the wound healing potential of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil-loaded chitosan topical preparations, **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0219561, 2019.
31. De Bortoli, I.; Prato, A. L.; Kroth, A. A efetividade do laser associado a diferentes tipos de curativos na cicatrização de úlceras de pressão. **Evidência**, v. 16, n. 1, p. 45-58, 2016.
32. Laureano A, Rodrigues AM. cicatrização de feridas. *Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology*, v. 69, n. 3, p. 355, 2011.
33. Zhang, J. et al. Synthesis and properties of polyurethane elastomers based on renewable castor oil polyols. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 14, p. 47309, 2019.
34. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2018. Brasília: Ministério da Saúde; 2018; 218p. [cited 2019 Mar 6]. Available from: <http://conitec.gov.br/images>.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos [citado 02 jul. 2021]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf.
36. Kazemi, M. et al. Deep skin wound healing potential of lavender essential oil and licorice extract in a nanoemulsion form: Biochemical, histopathological and gene expression evidences. **Journal of Tissue Viability**, v. 29, n. 2, p. 116–124, 2020.
37. Bezerra, C. M. et al. avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de malva-santa (*Plectranthus barbatus* - lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Rev Eletrônica de Farmácia**, n. 4, p. 220, 2016.
38. Esteves, C. O. et al. Medicamentos fitoterápicos: prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários. **Rev de Medicina**, v. 99, n. 5, p. 72–463, 2020.
39. Oliveira, I. M. M. et al. Vibrational spectra and DFT calculations of sonderianin diterpene. **Journal of Molecular Structure**, v. 1099, p. 226-231, 2015.
40. Rodrigues, O. G.; Falcão, B. R. M.; Barbosa, B. C. In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **J App Biol Biotech**, v. 7, n. 2, p. 55-58, 2019.

41. Melo, G. F. A et al.. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1189-1194, 2013.
42. Albuquerque, U. P.; Oliveira, R. F de. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 156-170, 2007.
43. Firmino, N. C. S. et al. Antimicrobial Activity of 3,4-seco-Diterpenes Isolated from *Croton blanchetianus* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus parasanguinis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2018.
44. Santana, J. A.D. S.et al. Estrutura e distribuição espacial da vegetação da Caatinga na Estação Ecológica do Seridó, RN. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 88, p. 355-361, 2016.
45. Lorenzi, Harri et al. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo. 544p. 2013.
46. Mendes, K. R. et al. *Croton blanchetianus* modulates its morphophysiological responses to tolerate drought in a tropical dry forest. **Functional Plant Biology**, v. 44, n. 10, p. 1039-1051, 2017.
47. Sandquist, D. R.; Ehleringer, J. R. Intraspecific variation of leaf pubescence and drought response in *Encelia farinosa* associated with contrasting desert environments. **The New Phytologist**, v. 135, n. 4, p. 635-644, 1997.
48. Mendes, K. R. et al. Leaf plasticity across wet and dry seasons in *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) at a tropical dry forest. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 954, 2022.
49. Barros, I. O.; Soares, A. A. Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga brasileira. **Rev Ciência Agronômica**, v. 44, p. 192-198, 2013.
50. De Vasconcelos, E. C. et al. Potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano do extrato aquoso do processo de extração do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* Baill. **Scientia Plena**, v. 17, n. 12, 2021.
51. Pinho-da-Silva, L. et al. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 721-725, 2010.
52. Santos, F. A. et al. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005.
53. Dantas, T. S. et al. Therapeutic potential of *croton blanchetianus* for the treatment of gastric ulcers: A brief review. **Biointerf. Res. Appl. Chem**, v. 12, p. 8219-8230, 2022.
54. Silva, F. S et al. An ethnopharmacological assessment of the use of plants against parasitic diseases in humans and animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1332-1341, 2014.

55. Silva, A. B. et al. Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 450-455, 2020.
56. Cascaes, M. M. et al. Essential Oils from Annonaceae Species from Brazil: A Systematic Review of Their Phytochemistry, and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12140, 2021.
57. Aguiar, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, p. 50-55, 2014.
58. Kortbeek, R. W. J.; Van der Gragt, M.; Bleeker, P. M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, p. 67-90, 2019.
59. Pereira, K. L. G et al. Ethanolic extract of *Croton blanchetianus* Ball induces mitochondrial defects in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.
60. Brito, S. S. S. et al. Bioatividade de óleos essenciais sobre *Zabrotes subfasciatus* Boh.(Coleoptera: Chrysomelidae) em feijão-comum armazenado. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Rev Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 2, p. 243-248, 2015.
61. Martins, A. O. B. P. B. et al. Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1, 8-cineole (eucalyptol). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 384-395, 2017.
62. Li, X. J. et al. α -Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. **Journal of ethnopharmacology**, v. 179, p. 22-26, 2016.
63. Ribeiro, A. I. T. et al. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. **Crop protection**, v. 129, p. 105043, 2020.
64. García, A. A.; Carril, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.
66. Wina, E.; Muetzel, Stefan.; Becker, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005.
67. Lessa, L. R.; Da Silva, M. C. C.; Cariello, F. D. M. R. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. **Rev Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 3, 2017.

68. Verri, A. M.; De Almeida, A.; Moura, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Directory of open access Journals**, v. 30, n. 1, 2017.
69. De Almeida, P. M. et al. Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 93-100, 2015.
70. Gottlieb, O. R.; Magalhães, M. T. Eucaliptol no óleo essencial do rizoma do lírio do brejo. **Bol.Inst.Agric**, v. 60, p. 21-22, 1960.
71. Lima, F. J. A. et al. Caracterização do crescimento e produção de óleo essencial da erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e5810716204-e5810716204, 2021.
72. Bezerra, S. S. M. et al. Identification of bioactive Compounds in the ethanolic and hexanic Extracts of moringa oleifera Lam. leaves. **Rev Virtual de Química**, v. 13, n. 6. p. 1303-1318, 2021.
73. Mourão, P. S et al. *Cecropia pachystachya* Trécul: identification, isolation of secondary metabolites, in silico study of toxicological evaluation and interaction with the enzymes 5-LOX and α -1-antitrypsin. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 20, p. 827-849, 2022.
74. Lopes, K. S. et al. Identification of bioactive compounds and cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 85, n. 24, p. 1002-1018, 2022.
75. 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**, v. 84, n. 10, p. 399-417, 2021.
76. Ayres, M. et al. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. **Ong Mamiraua**, p. 364, 2007.
77. Bezerra, N. K. M. S. et al. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Rev Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 875-880, 2015.
78. Da Camara, C. A. G. et al. New sources of botanical acaricides from species of *Croton* with potential use in the integrated management of *Tetranychus urticae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 20, n. 3, p. 244-259, 2021.
79. Cavalcante, Y. P. et al. Bioprospecção dos constituintes voláteis de espécies do gênero *Croton* l. do Delta do Parnaíba. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e3011729639-e3011729639, 2022.
80. Nunes, A. K. A. et al. Chemical Composition Determination and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae)

against Clinically Relevant Bacteria. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. e202200777, 2023.

81. Ribeiro, S. M. et al. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2018.

82. Pereira, B. D. P. Estudo dos constituintes químicos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* presentes no Povoado Olho D'Água no Município de Parnaíba - PI. **Ifpiedubr**, 2017.

83. Bertini, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.

84. Souza, G. S. et al. Chemical composition and yield of essential oil from three *Croton* species. **Ciência Rural**, v. 47, n. 8p. e20161054, 2017.

85. Taiz, L.; Zeiger E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed, p. 719, 2009.

86. Santos, P. J. C. et al. Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. **Rev Interdisciplina**, v. 14, n. 1, p. 3, 2021.

87. Firmino, N. S. C. et al. Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. **Industrial Crops and Products**, 131, p. 371-377, 2019.

88. Sharifi-Rad, J. et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

89. Andrade, M. A. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 384-397, 2013.

90. Francomano, F. et al. β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5420, 2019.

91. Salehi, B. et al. Insights into *Eucalyptus* genus chemical constituents, biological activities and health-promoting effects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 609-624, 2019.

92. Dong, W. et al. Antioxidant compound screening and chemical composition of sweet ginger (*Alpinia coriandriodora* D. Fang) essential oil and the mechanism of scavenging radicals. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. e13293, 2020.

93. Šarac, Z. et al. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes—Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. **Computers in Biology and Medicine**, v. 54, p. 72-78, 2014.

94. Braca, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v. 79, n. 2, p. 123-125, 2008.

95. Fernandes, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.
96. Silva, L. et al. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Rev Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 361-367, 2007.
97. Youssef, D. A.; El-Fayoumi, H. M.; Mahmoud, M. F. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 145-154, 2019.
98. Sharma, C. M. et al. Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical design**, v. 22, n. 21, p. 3237-3264, 2016.
99. Martínez-Pabón, M. C.; Ortega-Cuadros, M. Thymol, menthol and eucalyptol as agents for microbiological control in the oral cavity: A scoping review. **Rev Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 1, p. 44-69, 2020.
100. Bhowal. M.; Gopal, M. Eucalyptol: Safety and Pharmacological Profile. **J. Pharm. Sci**, v. 5, p. 125-131, 2015.
101. Marinho, T. O. et al. Atividade antiviral do monoterpeno 1,8-cineol: estudo in silico. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e31011427363-e31011427363, 2022.
102. Dias, M. S. et al. Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20201772, 2021.
103. Freitas, A. F. S. et al. Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 30-39, 2020.
104. Leme, D. M. et al. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
105. Gindri, D. M.; Coelho, C. M. M. metabolitos aleloquímicos de lantana camara L.: potencial para o desenvolvimento de bioherbicida – revisão. **Rev Técnico-Científica**. n. 24, 2020.
106. Xavier, M. V. A. et al. Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-mansão. **Rev Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 790-797, 2015.
107. Santos, P. E. M. et al. Contact toxicity of essential oil of *Croton pulegioidorus* Baill on *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Rev Caatinga**, v. 32, p. 329-335, 2019.

108. Campos, A. C. L.; Borges-Branco, A.; Groth, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, p. 51-58, 2007.
109. Lacerda, L. G. M. et al. Pharmacological and toxicological activities of α -humulene and its isomers: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 255-274, 2021.
110. Ferreira, A. M. et al. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, p. 752-760, 2012.
111. Mori, H. M. et al. Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, p. 1-11, 2016.