

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

LUCIANA GOMES ARRAIS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
FARMACOLÓGICA DE *Croton pulegioides* Baill.(EUPHORBIACEAE)

RECIFE
2012

LUCIANA GOMES ARRAIS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E FARMACOLÓGICA DE *Croton pulegioides* Baill.(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do título de
mestrado em Biotecnologia
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José
de Melo

Co-Orientador: Prof. Dr. Haroudo
Sátiro Xavier

**RECIFE
2012**

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

A773e Arrais, Luciana Gomes

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana e farmacológica de *Croton pulegioides* Baill. (Euphorbiaceae) / Luciana Gomes Arrais. – Recife: O Autor, 2012.

109 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo

Coorientador: Haroudo Sátiro Xavier

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia industrial, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Farmacologia 2. Toxicologia 3. Euforbiácea I. Melo, Sebastião José de II. Xavier, Haroudo Sátiro III. Título.

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-172

LUCIANA GOMES ARRAIS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E FARMACOLÓGICA DE *Croton pulegioides* Baill.(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

PRESIDENTE: Professor Dr. Sebastião José de Melo **(Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)**

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Professora Dr^a Janete Magali de Araújo **(Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)**

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Professora Dr^a Jane Sheila Higino **(Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco)**

Assinatura: _____

Recife, 18 de maio de 2012

LUCIANA GOMES ARRAIS

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **MARCOS JOSÉ ARRAIS** e

MARILENE GOMES DA SILVA ARRAIS

Ao meu irmão, **MARCOS JOSÉ ARRAIS FILHO**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem me feito conquistar e por estar sempre comigo. Obrigada!

Aos meus pais e irmão, pelo apoio e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Sebastião José de Melo (orientador) e ao professor Haroudo Sátiro Xavier (co-orientador), pela oportunidade e orientação prestadas.

As professoras que cederam seus laboratórios para realização deste trabalho (Prof^a Magali, Prof^a Teresinha, Prof^a Nely) e seus alunos (Janaína, Tati, Danilo e Felipe).

Aos meus colegas de laboratório

Ao meu namorado André, pela paciência durante o mestrado, pela ajuda em tantos trabalhos e por me proporcionar momentos tão agradáveis... OS MELHORES

Aos meus pequeninos Rex, Dolly e Argus. Alegria da minha casa!

A Ingrid Campos que durante esses dois anos se estressou, gritou, chorou... Mas que também brincou, compartilhou e riu comigo TODOS os dias. É como a gente diz Faia: “Os problemas estão aí e nós estamos rindo muito de todos eles”. Não me esquecerei de momento algum. O dia da inscrição, da prova, do resultado... Com certeza, tudo foi mais fácil e divertido por você estar comigo. Obrigada!

Aos grandes amigos farmacêuticos: Diego Menelau (Lalau), Karla Santana, Luma Gomes (Fia) e Renato Lino (Natinho), pela amizade que só cresce e se fortalece, pela confiança e companheirismo mesmo após o fim da graduação.

Aos meus amigos Alan Lucena, Alex Lucena, Evanilson Alves e Rafaela Damasceno por todas as conversas e momentos de descontração no laboratório de Farmacognosia. Foi bom estar sempre com vocês durante estes dois anos. Obrigada pelas alegrias e até pelos problemas compartilhados. Vocês são demais!

Aos colegas de sala, em especial: Gabriel, Carol e Bruno

Ao meu novo amigo Jonatan Nunes Vianna, CRO-PE _ _ _ _ , pelas mensagens e conversas que nestes últimos meses me fizeram esquecer, por muitas vezes, os problemas do dia. Obrigada por me mostrar que “tudo na vida passa, ate uva passa”!

"Hakuna Matata, what a wonderful phrase..."

Elton John & Tim Rice

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Plantas medicinais.....	22
3.2 A Família Euphorbiaceae.....	27
3.3 O gênero <i>Croton</i>	28
3.4 Metabólitos secundários.....	29
3.4.1 Definição.....	29
3.4.2 Funções e importância dos metabólitos secundários.....	30
3.4.3 Metabolismo Vegetal Secundário.....	30
3.4.4 Metabólitos secundários do <i>C. pulegioides</i>	31
3.4.4.1 Alcalóides.....	31
3.4.4.2 Flavonóides.....	32
3.4.4.3 Taninos.....	32
3.4.4.4 Terpenos.....	33
3.5 Bactérias e Resistência bacteriana.....	33
3.6 Agentes antimicrobianos.....	35
3.7 Toxicologia.....	36
3.8 Inflamação.....	38
3.9 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	43
3.9.1 Procedimento Experimental.....	44
3.9.2 Tratamento do Câncer e Agentes antineoplásicos.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Screening Fitoquímico de <i>C. pulegioides</i>	47
4.1.1 Coleta do material.....	47
4.1.2 Obtenção do extrato bruto.....	47

4.1.3 Purificação e tentativa de elucidação estrutural de uma substância isolada.....	49
4.1.4 Obtenção dos óleos essenciais das folhas da espécie <i>C. pulegioides</i>	49
4.2 Experimento <i>in vivo</i>	49
4.3 Animais	50
4.4 Avaliação da Toxicidade Aguda	50
4.4.1 Procedimento experimental.....	50
4.5 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	50
4.5.1 Peritonite induzida por carragenina.....	50
4.5.2 Edema de pata induzido por carragenina	51
4.6 Análise Estatística	51
4.7 Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	51
4.7.1 Células.....	51
4.7.2 Amostras.....	52
4.7.3 Análise Estatística.....	52
4.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	52
4.8.1 Técnica de Poços – Difusão em Agar.....	52
4.8.2 Lista das Cepas usadas	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Screening Fitoquímico de <i>C. pulegioides</i>	54
5.2 Tentativa de Isolamento de Moléculas	59
5.3 Análise dos óleos essenciais das folhas da espécie <i>C. pulegioides</i>	59
5.4 Toxicidade Aguda	66
5.5 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória	68
5.5.1 Peritonite induzida por carragenina.....	68
5.5.2 Edema de Pata induzida por carragenina.....	70
5.6 Avaliação da Atividade Citotóxica	71
5.7 Avaliação da Atividade Microbiológica	72
5.7.1 Atividade para o extrato da raiz de <i>C. pulegioides</i>	75
5.7.2 Atividade para o extrato do caule de <i>C. pulegioides</i>	77
5.7.3 Atividade para o extrato das folhas de <i>C. pulegioides</i>	78
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
7 Referências	82

ANEXO A – Cópia do trabalho enviado para publicação.....	97
ANEXO B – Cópia do recebimento do envio do trabalho para publicação.....	110
ANEXO C – Ofício 415/12 – Aprovação da Comissão de ética em Experimentação Animal da UFPE.....	111
ANEXO D – Cromatograma da análise dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie <i>C. pulegioides</i>.....	112

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Via de síntese dos metabolitos vegetais secundários

FIGURA 2: Reação de redução do MTT em um precipitado de formazan

FIGURA 3: Classificação de agentes antineoplásicos

FIGURA 4: Perfil cromatográfico para alcalóides

FIGURA 5: Perfil cromatográfico para flavonóides

FIGURA 6: Perfil cromatográfico para mono e sesquiterpenos

FIGURA 7: Perfil cromatográfico para triterpenos

FIGURA 8: cromatograma do óleo essencial

FIGURA 9: Estrutura do linalool

FIGURA 10: Fragmentos observados no espectro de massas para a estrutura da figura 9

FIGURA 11: Estrutura do pinocarveol

FIGURA 12: Fragmentos observados no espectro de massas para a estrutura da figura 11

FIGURA 13: Estrutura do α -terpineol

FIGURA 14: Fragmentos observados no espectro de massas para a estrutura da figura 13

FIGURA 15: Estrutura do Acetato de sabinyol

FIGURA 16: Estrutura do Cis-sabinol

FIGURA 17: Fragmentos observados no espectro de massas para a estrutura da figura 15 e 16

FIGURA 18: Estrutura do Epóxido felandreno

FIGURA 19: Toxicidade aguda do extrato metanólico seco da raiz de a *C. pulegioides*

FIGURA 20: Toxicidade aguda do extrato metanólico seco da raiz de *C. pulegioides*

FIGURA 21: Toxicidade aguda do extrato metanólico seco da raiz de *C. pulegioides*

FIGURA 22: Efeito do extrato da raiz de *C. pulegioides* na migração leucocitária dos grupos testados

FIGURA 23: Atividade anti-inflamatória do extrato da raiz de *C. pulegioides* da pata submetida a inflamação pela carragenina

FIGURA 24: Atividade anti-inflamatória do extrato da raiz de *C. pulegioides* para a determinação da concentração de MPO no tecido plantar da pata submetida a inflamação pela carragenina

FIGURA 25: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *S. aureus*

FIGURA 26: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *S. epidermidis*

FIGURA 27: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *S. saprophyticus*

FIGURA 28: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *E. faecalis*

FIGURA 29: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *P. aeruginosa*

FIGURA 30: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *E. coli*

FIGURA 31: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *C. albicans*

FIGURA 32: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *C. tropicalis*

FIGURA 33: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *K. pneumoniae*

FIGURA 34: Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides* - *B. subtilis*

FIGURA 35: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *S. aureus*

FIGURA 36: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *S. epidermidis*

FIGURA 37: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *S. saprophyticus*

FIGURA 38: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *E. faecalis*

FIGURA 39: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *P. aeruginosa*

FIGURA 40: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *E. coli*

FIGURA 41: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *C. albicans*

FIGURA 42: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *C. tropicalis*

FIGURA 43: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *K. pneumoniae*

FIGURA 44: Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides* - *B. subtilis*

FIGURA 45: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *S. aureus*

FIGURA 45: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *S. epidermidis*

FIGURA 47: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *S. saprophyticus*

FIGURA 48: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *E. faecalis*

FIGURA 49: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *P. aeruginosa*

FIGURA 50: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *E. coli*

FIGURA 51: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *C. albicans*

FIGURA 52: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *C. tropicalis*

FIGURA 53: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *K. pneumoniae*

FIGURA 54: Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides* - *B. subtilis*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prospecção fitoquímica de *C. pulegioides*

Tabela 2: Prospecção Fitoquímica de *C. pulegioides*

Tabela 3: Número de leucócitos e percentual de inibição da migração célula

Tabela 4: Percentual de inibição celular – Atividade Citotóxica

Tabela 5: Atividade antimicrobiana

Resumo

O gênero *Croton* pertencente a família Euphorbiaceae é encontrado em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, os representantes deste gênero, são utilizados por possuírem atividades biológicas conhecidas. De acordo com a literatura, a espécie estudada no presente trabalho, *Croton pulegioides*, conhecido popularmente como Zabelê, não possui estudos fitoquímicos nem biológicos anteriores. Portanto, este trabalho contribui para a elucidação dos grupos de metabólitos presentes na planta, bem como para o conhecimento sobre as atividades biológicas testadas. No trabalho foi feito um estudo fitoquímico, onde foram investigados e identificados os grupos de metabólitos secundários dos extratos da raiz, do caule e das folhas da planta, através de cromatografia em camada delgada. Foram evidenciada a presença de alcalóides, flavonóides, monoterpênos, sesquiterpênos, triterpênos, esteróides e proantocianidinas, já citadas na literatura para outras espécies do mesmo gênero. Na análise do óleo essencial, foram identificadas 6 possíveis moléculas, sendo algumas delas, já relatadas para outras espécies de *Croton*. A atividade antimicrobiana, já relatada para outras espécies do mesmo gênero, foi confirmada para o *C. pulegioides* através de testes com os três extratos já mencionados para as cepas de *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus epidermidis* AM 235, *Staphylococcus saprophyticus* AM 245, *Enterococcus faecalis* AM 1056, *Pseudomonas aeruginosa* AM 206, *Escherichia coli* AM 1050, *Klebsiella pneumoniae* AM 410, *Bacillus subtilis* AM 04, *Candida krusei* AM 1168, *Candida tropicalis* AM 1181, *Candida albicans* AM 1140, utilizando-se a técnica de diluição em poços. O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando-se 3 linhagens específicas de células tumorais: HT29 (carcinoma de cólon - humano), HEp-2 (carcinoma de laringe - humano) e NCI H-292 (câncer de pulmão- humano). Os três extratos, bruto e seco da raiz, caule e folhas, testados obtiveram percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras nas 3 linhagens tumorais testadas. Para as atividades farmacológicas, foi testado extrato bruto seco da raiz da planta. Para cada teste foram utilizadas 3 doses em diferentes concentrações. Foi realizado o teste de toxicidade aguda. Nenhuma dose apresentou toxicidade nos animais. Após essa avaliação, foram feitos testes anti-inflamatórios - edema de pata e peritonite, os quais obtiveram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: *Croton pulegioides*; atividade antimicrobiana; Atividade farmacológica; Citotoxicidade *in vitro*

ABSTRACT

The genus *Croton* belonging to Euphorbiaceae family is found in tropical and subtropical areas worldwide. In Brazil, the representatives of this genus are used because they have known biological activities. According to the literature, the species studied in this work, *Croton pulegioides*, popularly known as Zabelê, has no previous biological or phytochemical studies. Therefore, this work contributes to the elucidation of groups of metabolites present in the plant, as well as knowledge about the biological activities tested. In this work was done in a phytochemical study, which were investigated and identified groups of secondary metabolites from extracts of the root, stem and leaves of the plant, by thin layer chromatography. Were identified alkaloids, flavonoids, monoterpenes, sesquiterpenes, triterpenes, steroids and proanthocyanidins, already cited in the literature for other species of the genus. The antimicrobial activity, as reported for other species of the genus, has been confirmed for *C. pulegioides* through tests with the three extracts mentioned above for the strains of *Staphylococcus aureus* AM 103, AM 235 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* AM 245, AM 1056 *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* AM 206, *Escherichia coli* AM 1050, *Klebsiella pneumoniae* 410 AM, *Bacillus subtilis* AM 04, *Candida krusei* AM 1168, *Candida tropicalis* AM 1181, *Candida albicans* AM 1140, using the technique of dilution wells. The cytotoxicity assay was carried out using 3 strains peculiar to tumor cells: HT29 (colon carcinoma - human), HEP-2 (laryngeal carcinoma - human) and H NCI-292 (human lung cancer. The three extracts tested had a percentage of inhibition of cell growth (IC%) of the samples in three tumor cell lines tested. For pharmacological activity was tested root extract of the plant. For each test three doses were used in different concentrations. test was performed toxicity acute. No dose showed toxicity in animals. Following this assessment, tests were given anti-inflammatories - paw edema and peritonitis, which they obtained satisfactory results.

KEY-WORDS: *Croton pulegioides*; antimicrobial activity; farmacologic activity

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é feito desde épocas remotas e o conhecimento sobre as propriedades terapêuticas destas plantas vem sendo acumulado durante séculos, representando, muitas vezes, o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. As observações populares contribuem para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, pelos efeitos medicinais que produzem; apesar de, geralmente, não terem seus constituintes químicos conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas ao longo dos anos (MACIEL et al., 2002).

Antes do século XIX, a maioria dos recursos terapêuticos existentes era constituída por plantas e extratos, sendo estes a parte qualitativamente mais importante da terapêutica na época (SCHENKEL et al., 2001). Com o aumento progressivo do setor industrial após a Segunda Guerra Mundial, os “remédios vegetais” foram gradativamente substituídos nas farmácias por medicamentos com substâncias ativas extraídas ou derivadas sinteticamente de plantas (LAPA et al., 2001). Segundo Calixto e Rates, 2001, cerca de 50% dos medicamentos utilizados eram de origem sintética e 25% eram de origem vegetal, isolados diretamente ou sintetizados a partir de um precursor vegetal.

Apesar do considerável aumento do número de medicamentos sintéticos, nas ultimas décadas, de acordo com BAGATINI; SILVA; TEDESCO (2007) o aumento no interesse popular no uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido muito significativo. Este fato se deve a alguns fatores como o interesse sobre estudos da biodiversidade, bem como o difícil acesso da população, principalmente dos países subdesenvolvidos, aos medicamentos sintéticos (FILHO E YUNES, 1998; CALIXTO, 2000; TAYLOR E SATDEN, 2001).

Segundo Suffredini et al. (2004), cerca de 20% das plantas encontradas no mundo estão sendo submetidas a testes biológicos e/ou farmacológicos. De acordo com a OMS, entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças. Portanto, a observação do uso tradicional e o estudo etnofarmacológico são necessários

para o desenvolvimento de fitoterápicos, a partir de plantas com propriedades terapêuticas (SCOPEL, 2005).

Apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado, pois apenas recentemente estas se tornaram objeto de estudo científico (BARROS, 2008). O conhecimento a respeito das propriedades terapêuticas das plantas é um requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Sendo assim, pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas. Logo, a ampliação da produção científica referente a plantas medicinais é de grande importância, pois desta forma poderá ser criada uma base científica para a prescrição de drogas vegetais em que a eficácia e toxicidade possam ser previstas e posteriormente avaliadas, além da implantação de avaliações farmacológicas e metodologias para o controle de qualidade (CALIXTO, 2000).

O Brasil, como já é conhecido e amplamente divulgado, é detentor da maior biodiversidade do planeta, possuindo numerosas espécies produtoras de substâncias bioativas, pertencentes aos diferentes Reinos. Além da diversidade biológica, no território brasileiro também se destaca a diversidade de biomas e ecossistemas a eles associados, o que implica em enorme variedade de táxons a serem estudados pelos diversos segmentos da ciência. Da mata atlântica do estado de Pernambuco são mencionadas numerosas espécies de plantas que produzem substâncias curativas. Até o momento, essas plantas são apenas parcialmente estudadas do ponto de vista taxonômico, químico, fisiológico e poder bioativo de suas moléculas.

Estudos etnobotânicos efetuados em diferentes países e continentes têm demonstrado a predominância do grupo de plantas medicinais dentre as demais categorias de uso. Considerando a grande diversidade de espécies no território brasileiro, acima apontada, pode-se facilmente deduzir o potencial de produtos bioativos provenientes dos vegetais.

Diante dos relatos da literatura, diversas espécies do gênero *Croton* apresentam atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Este trabalho deu ênfase na pesquisa ao estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana

e antiinflamatória de *Croton pulegioides*, encontrada no agreste do Estado de Pernambuco, sobre a qual não se encontra ainda relatos de pesquisa na literatura (GONÇALVES DE LIMA, 1963; CRAVEIRO et al 1981; ASTHANA et al., 1989; LEMOS et al., 1992; MCCHESENEY et al., 1991)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir para o conhecimento fitoquímico e biológico de *Croton pulegioides* Baill.(*Euphorbiaceae*)

2.2 Específicos

- Desenvolvimento do perfil fitoquímico do extrato seco da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides*;
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos da planta;
- Avaliação das características farmacológicas dos extratos do *Croton pulegioides*, através de experimentos de toxicidade aguda e experimentos antiinflamatórios como o edema de pata e a peritonite;
- Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto seco de *Croton pulegioides*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas medicinais:

O homem, durante o processo de evolução, utilizou os recursos oferecidos pela natureza de diversas maneiras, com a finalidade de buscar condições para sua sobrevivência e melhor adaptação no meio em que vive. O desenvolvimento do conhecimento humano veio da necessidade de compreensão da relação homem/natureza e domínio do universo para o uso em seu próprio benefício (DI STASI, 1996).

Intuitivamente, o homem primitivo buscou soluções para suas necessidades básicas como nutrição, reprodução e proteção. Através de suas experiências e observações, sofreu um processo biológico evolutivo, descobrindo nas plantas tratamento de injúrias ou doenças. Além das plantas benéficas, foram descobertas as nocivas capazes de matar e produzir alucinações. Poderes sobrenaturais foram atribuídos aos primitivos que detinham esses conhecimentos, passando a serem considerados mágicos, curandeiros ou feiticeiros (TEIXERA, 1994).

O processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, de erros e acertos (MORS, 1982). Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal, o reconhecimento do habitat e a época da colheita (LÉVI-STRAUSS, 1989).

Todas as plantas produzem compostos químicos como parte de suas atividades metabólicas normais. Esses compostos são divididos em metabólitos primários, como açúcar e lipídios, encontrados em todas as plantas, e em metabólitos secundários, encontrados apenas em algumas plantas, sendo compostos não essenciais ao seu funcionamento básico, mas que melhoram suas chances de reprodução e/ou sobrevivência contra predadores. Acidentalmente, alguns desses metabólitos secundários, ao mesmo tempo em que são tóxicos aos predadores da planta, por exemplo, têm

efeitos benéficos quando usados para tratar doenças humanas. Tais compostos são bastante variáveis em estrutura, sendo a maioria, substâncias aromáticas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é *“todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”*. Fitofármacos são medicamentos a base de plantas que contêm o princípio ativo isolado, ou seja, uma substância medicamentosa isolada a partir de extratos de plantas (ou uma mistura de substâncias ativas isoladas de origem vegetal). Enquanto que fitoterápico, segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995, é *“todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente”*

A história do uso de plantas medicinais tem mostrado que elas fazem parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos. As antigas civilizações têm suas próprias referências históricas acerca das plantas medicinais e, muito antes de aparecer qualquer forma de escrita, o homem já utilizava as plantas e, entre estas, algumas como alimento e outras como remédio.

Em registros histórico, o estudo de plantas medicinais remonta desde 2.600 a.C. com os sumerianos e babilônios. A “Taubinha Sumeriana”, uma coleção de textos médicos em tabletes de argila, contém registros dos primeiros sintomas de doenças e a prescrição para cada enfermidade, sendo considerado o mais antigo tratado de medicina (PARKY, 1966, TEIXERA, 1994).

A cultura chinesa, desde a dinastia Xia (2.100 a.C. a 1.600 a.C), devido ao trabalho do lendário imperador Shennong, considerado o fundador e patrono da farmácia chinesa e cujo nome significa “divino fazendeiro”, produziu a primeira farmacopéia chinesa, com 365 plantas medicinais e seus usos, citando plantas como ginseng, cinamomo, ruibarbo pedofilo e efedra (PARKY, 1966).

Os egípcios (1.500 a.C.) relatavam a utilização de azeite, figo, cebola, alho, funcho, açafrão, ópio, hortelã e pimenta. O "Papyrus Ebers", coleção egípcia contendo 811 prescrições, menciona 700 drogas vegetais, minerais e animais, incluindo salgueiro, acácia e sedativos extraídos de *Ephedra* (TAVARES, 1996).

Apesar do desconhecimento sobre o verdadeiro poder das plantas, ou seja, a ação dos princípios ativos, alguns cientistas representaram etapas marcantes no desenvolvimento da ciência, desmistificando que a cura das doenças era responsabilidade dos deuses (YAMADA, 1998).

Theophratus (370 - 280 a.C.), contemporâneo de Aristóteles, foi o primeiro a compilar informações sobre plantas medicinais oriundas de manuscritos egípcios, assírios e babilônicos, entre outros, e cunhar uma terminologia descritiva em seus trabalhos *Historia Plantarum* e *Causae Plantarum*. Cerca de dois séculos depois, Dioscorides escreve *De Materia Medica*, que pode ser considerado a primeira "farmacopéia" ocidental, persistindo através da Idade Média até a Renascença como peremptória autoridade no tema. Ao longo dos séculos subsequentes, trabalhos como os de Fuchs, Cesalpinius, Clusius, Lobelius e Ray estabeleceram os fundamentos que influenciaram Linnaeus e deram corpo à ciência botânica como conhecemos hoje (MORTON, 1981)

Durante a Idade Média (séculos V-XII), os conhecimentos sobre plantas medicinais ficaram em poder da igreja sendo copiados, traduzidos e preservados nas bibliotecas de mosteiros. Durante esse período, o desenvolvimento da medicina natural restringiu-se aos persas e árabes que mantiveram as idéias de Hipócrates e Galeno (PARKY, 1966).

No período da Renascença, houve grande estímulo ao pensamento científico, sendo Paracelso um dos responsáveis pela revolução de conceitos na área de medicina e farmácia, introduzindo as formas farmacêuticas das tinturas herbáticas e a associação de mineral ao guaiaco e a salsaparilha para o combate a sífilis (TEIXERA, 1994).

A partir do século XVII houve um grande desenvolvimento teórico e tecnológico proporcionando o advento da química e da farmacologia a partir do século XVIII (após os trabalhos de Lavoisier), culminando no isolamento de princípios ativos dos fitoterápicos, como a morfina por Sertürner em 1806 (SCHULTES & HOFFMANN, 2000). As plantas permaneceram como principais fontes de recursos para tratamentos dos mais diversos males até o século XX, quando foram fundadas algumas das atuais grandes indústrias farmacêuticas e o uso de drogas sintéticas passou a fazer parte do cotidiano das práticas médicas ocidentais (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2005). Nessa época, houve uma revolução na terapêutica que induziu o desenvolvimento de pesquisas, na indústria químico-farmacêutica, com o objetivo de sintetizar novas substâncias ativas com baixa toxicidade (TAVARES, 1996).

No entanto, mesmo com o advento de drogas sintéticas, o estudo de plantas medicinais continuou sendo de grande importância para a população, principalmente nos países em desenvolvimento, nos quais o acesso à medicina alopática ainda é muito restrito (CORDELL, 1993). Nesses casos é comum que o conhecimento sobre plantas medicinais simbolize o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, 80% da população de reduzido poder aquisitivo não tem acesso à medicina moderna e medicamentos essenciais, recorrendo aos produtos de origem natural como única fonte terapêutica. O consumo de medicamentos de origem vegetal decorre, basicamente, do fato desses produtos representarem terapias de menor custo em relação às aquelas normalmente oferecidas pela indústria farmacêutica. Além de sua importância na medicina tradicional, as plantas podem fornecer para a indústria farmacêutica, direta ou indiretamente, os princípios ativos que serão comercializados como remédios (DI STASI, 1996).

Vários são os princípios químicos obtidos, exclusivamente, de matéria-prima vegetal que representam não apenas um novo grupo de substâncias, mas a descoberta de uma nova intervenção terapêutica (SIMÕES *et al.*, 1999).

Atualmente estima-se que substâncias derivadas de plantas (isoladas diretamente ou produzidas por síntese partindo-se de um precursor vegetal) constituem aproximadamente 25% do receituário médico nos países industrializados, sendo que 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e os 25% restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais (minerais, microbiológicos, entre outros) (CALIXTO, 2000)

No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos (HOSTETTMANN, QUEIROZ, VIEIRA, 2003; NODARI e GUERRA, 1999).

As plantas popularmente utilizadas como medicinais requerem investigações científicas efetivas, pois embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos farmacológicos, portanto, é essencial a colaboração interdisciplinar de botânicos, farmacologistas, farmacognostas e agrônomos, para se obter extratos semi-puros, frações e finalmente, compostos puros (FILHO e YUNES, 1998).

Existem na Terra aproximadamente 450.000 espécies de plantas, mas grande parte das plantas ainda não tem estudos químicos, analíticos e farmacológicos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na

maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (CRAGG e NEWMAN, 1999; HAMBURGUER, MARSTON, HOSTETMANN, 1991).

Cientistas em países em desenvolvimento, como o Brasil, estão entrando numa era em que as plantas provavelmente ocuparão uma proeminente posição na lista de prioridades nacionais. Este tipo de pesquisa medicinal pode levar a um desenvolvimento industrial no país em que descobertas são feitas. A fonte de materiais prontos para pesquisa é normalmente abundante e prontamente disponível já que na maioria dos países em desenvolvimento a flora continua virtualmente inexplorada.

O Brasil, com uma área territorial de 8,5 milhões de quilômetros quadrados e vários biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga), apresenta uma grande diversidade de solos e climas que favorece a riqueza e variedade de tipos de vegetação e espécies de flora distribuída nos diversos ecossistemas brasileiros (DIAS, 1995). O estudo das plantas medicinais permitirá o aumento do conhecimento científico a respeito destas espécies, e conseqüentemente a validação de seu uso medicinal e emprego no sistema público de saúde, através de medicamentos de baixo custo para a população.

3.2 A família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é uma das mais diversificadas e complexas entre as Angiospermas (LIMA, 2006), com cerca de 320 gêneros e 8700 espécies (STEINMANN, 2002). Sua distribuição é cosmopolita, embora alguns gêneros sejam predominantemente tropicais, pode haver alguns de clima temperado. Possuem diversas formas, onde se incluem árvores, arbustos, ervas e trepadeiras, às vezes suculentas e freqüentemente com representantes latescentes (LEME, 1994).

O conhecimento sobre esta família é de extrema importância, visto que muitos dos seus membros possuem uso economicamente viáveis como a *Euphorbia milii* Des Moul.- coroa-de-cristo, usada como planta

ornamental(SOUZA & LORENZI, 2008); a *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. – seringueira, muito utilizada na indústria; e tantas outras de uso medicinal, como o *Croton*, por exemplo (LORENZI E MATOS, 2008).

A maioria dos seus representantes ocorre nas Américas. Na América do Sul, o Brasil é o país que congrega o maior número de espécies (BERRY et al. 2005), com cerca de 1100 espécies distribuídas em 72 gêneros difundidas em todos os tipos de vegetação (BARROSO, 1984). A literatura relata que o Nordeste do Brasil conta com mais de 80 espécies, sendo que mais de um terço ocorre em Pernambuco, desde o sertão ao litoral. Algumas destas espécies estudadas tendo sido abordados aspectos botânicos, farmacológicos, fitoquímicos e antimicrobianos.

3.3 O gênero *Croton*

Croton é o segundo maior representante da família Euphorbiaceae com aproximadamente 750 a 800 espécies (JUDD et al., 1999). É um gênero representado por árvores, arbustos e ervas, difundidos em zonas tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia (GOVAERTS, 2000). O Brasil, com aproximadamente 300 espécies é um dos principais centros de diversidade do gênero, sendo o país melhor representado da América do Sul. (BERRY et al. 2005).

A química do gênero *Croton* é consideravelmente diversa, fato que qualifica o grupo como altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias naturais farmacologicamente ativas, sendo, por este motivo, alvo de pesquisas tanto em estudos fitoquímicos como para testes de suas atividades biológicas (RANDAU, 2004).

A composição química das espécies *Croton* é rica em metabólitos secundários, como os alcalóides, flavonóides e terpenóides (PAYO et al., 2001). Além destes metabólitos, muitas das espécies de *Croton* produzem óleos essenciais ricos em mono- e sesquiterpenóides, além de fenilpropanóides (PALMEIRA-Junior et al., 2006).

Devido à grande quantidade de substâncias bioativas presentes em sua composição, as quais conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies,

as espécies do *Croton* são utilizadas na preparação de chás e infusões, para o alívio de dores (ABREU, 2001), tratamento de distúrbios digestivos como: constipações e diarreias; usadas também como antiinflamatórios e antiulcerogênicos, analgésicos, antidiabéticos e antimaláricos. Além disso, segundo MORAIS, 2006, três espécies do Ceará (*C. zenhtneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophylloides*) foram recentemente confirmadas como antioxidantes devido à atuação de sete diferentes constituintes de seus óleos essenciais.

O gênero *Croton*, por apresentar elevada produção de óleos essenciais e diversos metabolitos secundários tem sido utilizado na medicina popular, possuindo algumas espécies, propriedades terapêuticas comprovadas. Apesar disto, estudos sobre este gênero ainda são escassos. O presente trabalho buscou a ampliação do conhecimento sobre uma espécie ainda não estudada, visto que as outras espécies do gênero apresentam uma expressiva importância econômica (ALVES, 1993; LUCENA, 1996).

Outras espécies de *Croton*, também já tiveram suas atividades avaliadas e confirmadas através de estudos. Como exemplo temos o *C. lechleri*, para o qual foi descoberta atividade antioxidante, antimicrobiana e antiviral (GUPTA, Et. al., 2008).

3.4 Metabólitos secundários

3.4.1 Definição

Metabolitos são moléculas formadas ou transformadas a partir de reações que acontecem nas células.

O metabolismo primário compreende várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas em unidades constitutivas essenciais das células. Já o metabolismo secundário não se relaciona diretamente à manutenção de vida do organismo produtor. Vegetais e alguns microorganismos apresentam esse metabolismo diferenciado, em que os produtos formados, apesar de não ser essencial ao organismo produtor,

garante vantagens para perpetuação e sobrevivência da espécie – são os metabolitos secundários.

3.4.2 Funções e importância dos metabólitos secundários

Os vegetais sempre foram utilizados por suas propriedades terapêuticas observadas através das gerações. Atualmente, sabe-se que essas propriedades são devidas aos metabolitos secundários existentes nas plantas. Porém, esta não é a única função destas substâncias. Através de pesquisas, já foram confirmadas muitas outras funções dos metabolitos originados de vegetais. Como por exemplo: proteção contra raios UV, defesa contra pragas entre outras que permitem a adequação do produtor ao meio.

A grande utilidade e diversidade de metabolitos secundários despertam o interesse de pesquisadores da atualidade que visam os vegetais como fonte promissora de novas moléculas úteis ao homem. As indústrias agronômicas, alimentícias e farmacêuticas tem grande interesse na descoberta dessas moléculas, pois estas, devido a suas propriedades, possuem uma elevada importância comercial.

3.4.3 Metabolismo Vegetal Secundário

A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato como mostra a figura 2.

Apesar do precursor em comum, alguns desses metabolitos não derivam apenas de um desses intermediários, sendo estes resultantes da combinação de unidades de ácido chiquímico com unidades do acetato. Além disso, os derivados do acetato variam de acordo com a via que dá origem ao acetato precursor. Logo, os metabolitos se diferenciam seguindo a via metabólica em: derivados do acetato via ciclo do ácido cítrico; derivados do acetato via mevalonato e produtos da condensação do acetato. Expandindo ainda mais a variedade dos metabolitos secundários, estes podem estar ligados a moléculas de açúcar – heterosídeos; ou não – agliconas.

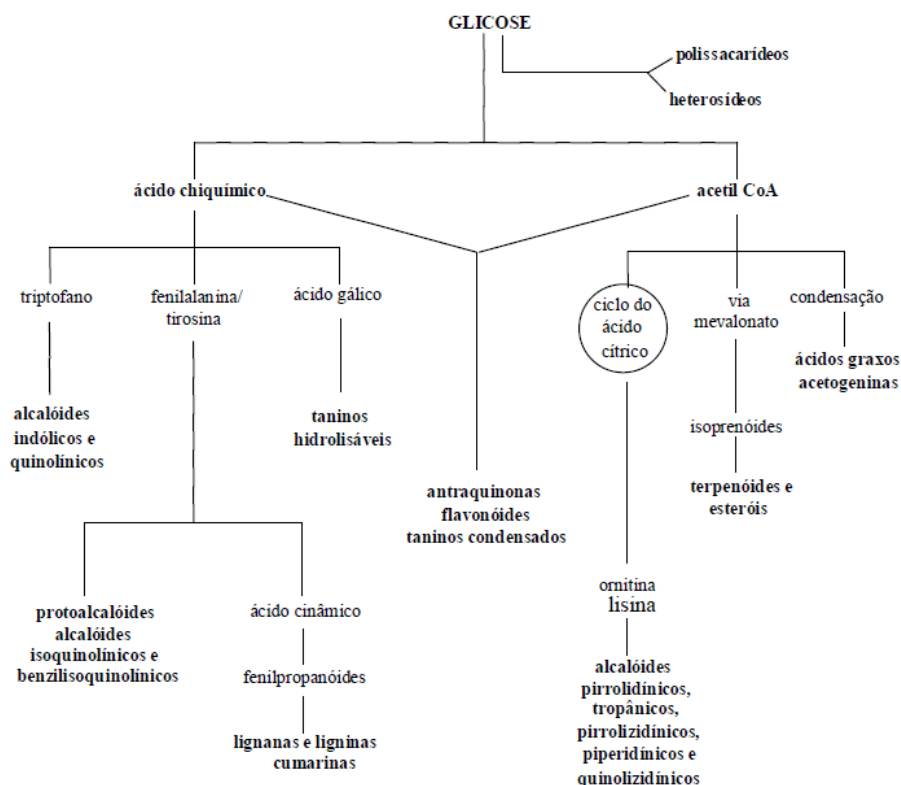


Figura 1: Via de síntese dos metabolitos vegetais secundários (Simões, et. al., 2002)

3.4.4 Metabólitos secundários do *C. pulegioides*

3.4.4.1 Alcalóides

O termo alcalóide (do árabe *alkali*) foi proposto por W. Meissener para designar substâncias de origem vegetal que reagem como bases. São substâncias de natureza alcalina que possuem um nitrogênio heterocíclico em sua composição.

São encontrados em representantes de todos os grupos vegetais, sendo sua maior ocorrência em Angiospermas.

Os alcalóides possuem diversas funções. Acredita-se que nos vegetais eles atuem como defesas contra microorganismos e predadores – teoria ainda não confirmada; e como protetores contra raios UV. No setor industrial, são reproduzidos a partir de moléculas pré-descobertas, como repelentes para herbívoros, devido a seu gosto amargo; como anticolinérgicos (escopolamina),

diuréticos (teofilina), antitumorais (vincristina), antitussígenos (codeína), entre outros.

3.4.4.2 Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de metabolitos secundários mais numerosos e amplamente distribuídos entre as plantas, principalmente entre as Angiospermas. A maioria dos representantes dessa classe de compostos apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental. Apresentam-se, geralmente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (SIMÕES, 2002).

Dentre as diversas funções dos flavonóides nos vegetais, podemos citar: efeito fotoprotetor, controle de hormônios vegetais, proteção contra insetos dentre outras (RICE-EVANS et. al. 1996). Estes compostos também possuem grande importância farmacológica como: Atividade antioxidante, amplamente estudada, uma vez que se pode atribuir uma terapêutica baseada na ingestão de vegetais nos quais são abundantes (MARÍN, et. al., 2002). Atividade anticancerígena, também tem sido alvo de estudo dos flavonóides (HOLLMAN, et. al. 1996). Atividades antiinflamatórias, antialérgicas, antiulcerogênicas e antivirais também são atribuídas aos flavonóides (SIMÕES, 2002)

3.4.4.3 Taninos

São substância fenólicas que apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas. Uma definição mais precisa e muito empregada atualmente para taninos foi dada por Haslam (1989), segundo qual o termo designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas, taninos vegetais, que foram classificados em dois grupos: as proantocianidinas, que são os taninos condensados, responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência, precipitação de proteínas etc., e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glucose.

Os taninos se distribuem no reino vegetal seguindo diferentes padrões, sendo as proantocianidinas, encontradas no *C. pulegioides*.

Devido as suas propriedades, os taninos possuem diversas funções. As três características comuns, tanto a taninos hidrolisáveis quanto a taninos condensados que são responsáveis pelas propriedades dessas substancias são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e complexação com macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos.

Portanto, nas plantas, agem na defesa química da planta como proteção contra herbívoros e microorganismos patogênicos. Além disso, possuem atividade bactericida, fungicida e antiviral (MARSTON e HOSTELTMANN, 1985; SCALBERT, 1991; OKUDA et. al., 1993). Também podem ser usados como antissépticos, adstringentes e antidiarreicos. Os taninos também auxiliam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações.

3.4.4.4 Terpenos

São substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (BRUNETON, 1995). Os esqueletos dos terpenóides são formados pela condensação de um numero variável de unidades isoprênicas. Logo, unidades isoprênicas podem dar origem a mono e sesquiterpenos, formados por duas e três unidades de isopreno, respectivamente. Diterpenos, originados da junção de quatro cadeias isoprênicas. E os triterpenos que são derivados de um composto alifático de 30 carbonos, o esqualeno, que dá origem aos diferentes grupos desses compostos, tais como a β -amirina e o β -sitosterol, triterpenos que foram encontrados no *C. pulegioides*.(PETIT & DIAS, 1969).

Nas plantas, os triterpenos possuem conhecida atividade inseticida (CHAMPAGNE et. al., 1992). Do ponto de vista farmacológico, os triterpenos possuem função hepatoprotetora, antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, hemolítica e analgésica (MAHATO, et. al., 1988; LIU, 1995).

3.5 Bactérias e Resistência bacteriana

Desde os tempos mais remotos, o homem tenta aliviar o sofrimento causado pelas doenças através da ingestão de misturas ou partes vegetais,

cujas propriedades terapêuticas são conhecidas pela medicina popular (BLACK, 2002).

A utilização de antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos (MONTELLI; SADATSUNE, 2001). No entanto, o uso indiscriminado destes agentes aumentou consideravelmente o fenômeno da resistência bacteriana (GOMES, 2001).

De acordo com Trabulsi e Toledo (1989), a resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, faz parte da herança genética do microorganismo e não apresenta riscos a terapêutica; já a resistência adquirida traz sérios problemas para a terapêutica, visto que ocorre quando uma bactéria que anteriormente era sensível a uma certa droga torna-se resistente a mesma, sendo necessário a busca por um novo agente terapêutico (HAWKEY, 1998).

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes, as bactérias que crescem "in vitro", nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral. São sensíveis as que não crescem nestas concentrações.

Quatro processos contribuem para o desenvolvimento e acúmulo da resistência bacteriana: espécies com resistência intrínsecas favorecem o desenvolvimento; mutantes resistentes pré-sensibilizadas são selecionadas, genes de resistência são transferidos; e propagação das linhagens resistentes (LUIZ, 2006).

Muitos são os mecanismos fisiológicos através dos quais as bactérias se tornam resistentes: produção de enzimas que inativam as drogas, mudança na conformação do receptor da droga, impermeabilidade da membrana a droga, sistemas de bombeamento que retiram a droga de forma ativa de dentro das células, impedindo sua ação. Devido a estes fatores ocorrem complicações no tratamento do paciente como a ineficácia terapêutica e até mesmo a morte do paciente (MARQUES; ZUCCHI, 2006)

3.6 Agentes Antimicrobianos

Substâncias antimicrobianas são agentes terapêuticos utilizados no tratamento de patologias causadas por fungos e bactérias que contribuem para a eliminação ou diminuição das taxas de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas causadas por esses microorganismos (COWAN, 1999; SILVA, 2007).

Os antimicrobianos diferem de acordo com seu mecanismo de ação, sendo classificados de acordo com seu local de atuação. Logo existem antimicrobianos que atuam: na parede celular, na síntese de DNA, na síntese protéica celular e os que afetam a atividade enzimática intracelular (MOREIRA, 2004).

Apesar dos diferentes mecanismos de ação, todos os antimicrobianos devem possuir as seguintes propriedades comuns: possuir amplo espectro de ação, apresentar toxicidade seletiva e possuir mecanismo de ação específico, atuando de forma diferente nas células-alvo (MURRAY, et. al., 2002).

Portanto, para que um antibiótico seja considerado ideal, ele deve possuir atividade letal contra um amplo espectro de microorganismos sem causar efeitos colaterais ou resistência bacteriana. Logo, a busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas é de suma importância, sendo os produtos de origem natural uma rica fonte de pesquisa (SCHENKEL et. al., 2001).

As propriedades antimicrobianas de metabólitos secundários de plantas tem sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente (JANSEN, SCHEFFER, BAERHEIM, 1987).

Tendo em vista a resistência das bactérias a múltiplos antimicrobianos, o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas e a busca por substâncias derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos (COELHO ET. AL., 2004). O interesse pelas plantas é devido a grande variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabolitos secundários, tais como alcalóides,

flavonóides, terpenóides e compostos fenólicos, os quais, muitos deles, já possuem potente atividade antimicrobiana demonstradas por pesquisas (NASCIMENTO, 2000).

Vários métodos são utilizados para se avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais. Atualmente, o mais utilizado é o método da microdiluição. Neste ensaio, desenvolvido por Eloff em 1998, pode-se fazer a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a concentração mínima que um extrato ativo de planta pode ter para inibir a proliferação de microorganismos. Algumas variáveis referentes à determinação da CIM podem ser atribuídas a fatores como: origem da planta e época da sua coleta, condições da planta para a preparação do extrato, microorganismo utilizado no ensaio, entre outras. Por este motivo, não há um padrão que expresse os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL, et. al., 2004).

Vários extratos de diversas partes de diferentes plantas são usados na medicina tradicional e vários produtos medicinais derivados de espécies de *Croton* são comercializados em escala internacional (DESMACHELIER, 1999).

O gênero *Croton* possui muitas espécies com atividades antimicrobianas. Como exemplo, podemos citar uma substância que foi isolada do caule de *C. jacobinensis* Baill, com ação sobre cepas de *Neisseria*, *Nocardia* e *Brucella* (LIMA, et. al., 1973). Mais recentemente, estudos com o latex da casca do *C. stellulifer* Hutch, mostrou atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, além de mostrar atividade frente a fungos e leveduras (MARTINS et. al., 2000)

3.7 Toxicologia

Estudos sobre a toxicidade de plantas medicinais podem esclarecer aspectos farmacológicos de seus princípios ativos, permitindo a utilização das mesmas, com fins terapêuticos de forma segura (RABÊLO, 2010).

A toxicidade é definida como a capacidade de uma substância, ou seus metabólitos, produzir um efeito tóxico, num organismo vivo, ocasionando desde alterações bioquímicas, prejuízo de funções biológicas até sua morte, sob

certas condições de exposição, de concentração e de saúde do indivíduo exposto (OGA, 2003).

Estudos de toxicidade são testes imprescindíveis a serem realizados com novos produtos. Esses ensaios avaliam os efeitos tóxicos que ocorrem em períodos curtos, após administração em dose única ou doses repetidas dentro de 24 h – toxicidade aguda; períodos de média duração com exposições repetidas – toxicidade subcrônica; e períodos longos, para avaliação de doses cumulativas e avaliação do potencial carcinogênico da substância em teste - toxicidade crônica.

Os ensaios de toxicidade aguda são, geralmente, realizados em ratos e camundongos de ambos os sexos. A dose é determinada pelo peso dos animais e a via de administração mais comum é a via oral. Durante o teste podem ser observados mortalidade, letargia, alterações comportamentais, perda de peso e alteração no consumo de água e alimento (GAZDA, 2004).

Além de avaliar os efeitos adversos de uma substância em um indivíduo em um período de 24h, o teste de toxicidade aguda avalia também a relação dose-efeito letal da mesma substância. Esta relação, também denominada de DL50, foi desenvolvida em 1927 por Trevan e corresponde à dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste (RANG, 2003). O valor da DL50 é usado como índice para a classificação toxicológica, pois fornece subsídios para estudos de avaliação de risco da exposição humana (SCHLEDE et. al. 2005).

Estudos toxicológicos com extratos de plantas são importantes, pois apesar da crença popular, de que produtos naturais são seguros e não possuem ação tóxica, sabe-se que a utilização destes produtos na forma de chás e infusões não possuem tal segurança (DIMECH, 2003; SILVA, 2007). Estudos científicos mostram que plantas, rotineiramente utilizadas, quando usadas de forma indiscriminada, podem ter efeito tóxico. Como exemplo podemos citar: ginkgo (*Ginkgo biloba* L.; Ginkgoaceae), boldo do chile (*Peumus boldus* Molina, Momimiaceae), arnica (*Arnica montana* L., Asteraceae), entre outras (OLIVEIRA, 2006).

3.8 Inflamação

Todos os organismos vivos, desde os procariontes até o Homem, possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático. Nos vertebrados, esta resposta inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas coletivamente denominadas inflamação (VOLTARELLI, 1994).

A inflamação (do latim *inflammatio*, atear fogo) é uma resposta fisiológica desencadeada por lesão tecidual ou estímulos antigênicos e que muitas vezes pode ser prejudicial ao organismo. É um processo biológico intensamente estudado desde o início do século XIX (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; RAO et al., 2007).

Inflamação não é sinônimo de infecção. Mesmo em casos em que a inflamação é causada por uma infecção, os dois não são sinônimos: infecção é causada por um patógeno exógeno, enquanto que inflamação é uma das respostas do organismo ao patógeno.

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com consequente movimentação de elementos intravasculares como fluídos, células e moléculas, para o espaço extravascular. A agressão tecidual é o agente desencadeador da resposta inflamatória, e este pode ser de origem química, física (mecânica, térmica e radiação) e biológica (microorganismos) (SIQUEIRA E DANTAS, 2000).

Clinicamente, a inflamação é caracterizada por apresentar cinco sinais cardinais: eritema (rubor), edema (inchaço), calor, dor e perda da função (HEIDLAND et al., 2006). Porém, esse processo pode ser definido como uma cascata inflamatória, pelo qual ocorre a ativação de mediadores e células que têm como objetivo o reparo do tecido lesado (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

De uma forma didática, o processo inflamatório pode ser dividido em três diferentes fases. Inicialmente, ocorre uma fase aguda, de duração variável e que é caracterizada pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. Esta etapa do processo inflamatório é seguida de uma fase subaguda

caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocitárias. Por fim, ocorre a fase de resolução da inflamação, quando acontece a regeneração tecidual e fibrose (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

A vasodilatação, característica da fase aguda, ocorre devido a liberação local de diferentes mediadores químicos, tais como óxido nítrico (NO), cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, fração C5a do sistema complemento, prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF₂α) e substâncias liberadas das terminações nervosas, como as taquicinas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre muitos outros (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

A fase subaguda é acompanhada pela migração de leucócitos e de outras células fagocitárias para o sítio de inflamação, mediada por um processo denominado de quimiotaxia. A quimiotaxia de leucócitos e o processo no qual há liberação de moléculas solúveis que atraem essas células, os chamados fatores quimiotáticos, entre os quais a IL-2, IL-5, IL-8 e RANTES. Essas moléculas não servem apenas para direcionar o fluxo de células, como também recrutam os leucócitos específicos para o tecido inflamado, como os neutrófilos em resposta a uma inflamação bacteriana aguda e os eosinófilos em caso de alergia (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; KELLY; HWANG; KUBES, 2007; SEGERER; SCHLONDORFF, 2007).

A etapa seguinte de rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos para o sítio de inflamação é um processo mediado por diferentes famílias de moléculas de adesão, tais como: 1) Selectinas (P-selectina, expressa em plaquetas, L-selectina, expressa em leucócitos e E-selectina, expressa nas células endoteliais); 2) Integrinas, expressas em linfócitos (LFA-1 – leukocyte function associated antigen) e em macrófagos (Mac-1 – macrophage-1 antigen); 3) Superfamília das imunoglobulinas: molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1) (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; KELLY; HWANG; KUBES, 2007). Ao chegar ao local da inflamação, os leucócitos ativados liberam oxidantes, proteases e citocinas promovendo a fagocitose e a destruição do agente lesivo.

Todos estes fatores atuam em conjunto, levando aos eventos celulares e vasculares da inflamação. Vasodilatação resulta em um aumento do calibre de capilares responsáveis pela irrigação sanguínea local, produzindo mais hiperemia (eritema) e aumento da temperatura local (calor). O edema ou inchaço ocorre a partir do aumento da permeabilidade vascular aos componentes do sangue, o que leva ao extravasamento do líquido intravascular para o espaço intersticial extra-celular. A dor, outro sintoma característico da inflamação, é causada primariamente pela estimulação das terminações nervosas por algumas destas substâncias liberadas durante o processo inflamatório, por hiperalgesia (aumento da sensibilidade dolorosa) promovida pelas prostaglandinas e pela bradicinina, mas também em parte por compressão relacionada ao edema.

Acredita-se atualmente que a inflamação é parte de uma resposta imune não-específica que ocorre como reação a qualquer tipo de dano tecidual e que os sinais cardeais da inflamação podem ser explicados pelo aumento de fluxo sanguíneo, elevado metabolismo celular, vasodilatação, liberação de mediadores solúveis, extravasamento de fluidos celulares. E em algumas desordens, o processo inflamatório, que sob condições normais é auto-limitante, torna-se contínuo e doenças inflamatórias crônicas desenvolvem-se subsequentemente.

A inflamação aguda pode ser determinada em minutos até dias, sendo confirmada pela presença de neutrófilos e fluidos protéicos (exsudato). Este processo é finalizado quando o estímulo que causou a injúria é removido e todos os mediadores são inibidos (ZHANG, 2008). Desta maneira, a sua intensidade mostra-se diretamente proporcional ao tamanho do trauma sofrido. É considerado um interessante aporte de defesa, uma vez que tem como objetivos: localizar a região agredida, eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a área lesada para reparação. Assim, envolve uma série de eventos celulares e vasculares dinâmicos, bem coordenados que dependem da chegada de leucócitos inflamatórios para o local da lesão. Há uma complexa variedade de células (neutrófilos, macrófagos e células mononucleares), e diversas moléculas inflamatórias, tais como

prostaglandinas (PGs), o óxido nítrico (NO), citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ), e quimiocinas. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o foco inflamado (MIYAZAKI et al., 2000; KEY et al., 1982; ADAMS e HAMILTON., 1984).

Entretanto, têm sido confirmados diversos casos em que a resposta inflamatória escapa aos mecanismos de controle, desencadeando desordens inflamatórias. O evento passa a ganhar características sistêmicas, podendo se autoperpetuar e provocar a disfunção de diversos órgãos e sistemas (inflamação crônica). A reação inflamatória crônica é caracterizada por migração leucocitária, com predominância de monócitos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, além de sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva. Dentro de todo este contexto, a resposta imune adquirida específica mostra-se atuante, melhorando acentuadamente a eficácia das respostas inatas não imunológicas, pois é uma resposta mais complexa. Esta resposta envolve principalmente linfócitos, que podem ser divididos em três principais grupos: as células B, responsáveis pela produção de anticorpos; as células T, importantes na fase de inibição da resposta imune e as células Natural Killer, ativas durante a resposta inata não imunológica (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2005).

Na ausência da inflamação, feridas e infecções nunca se curariam e a destruição progressiva do tecido iria comprometer a sobrevivência do organismo. Em algumas doenças, porém, o sistema de defesa do corpo (sistema imune) ativa inapropriadamente uma resposta inflamatória quando não há substâncias externas contra quais lutar. Nessas doenças, chamadas de doenças auto-imunes, o sistema imune protetor do corpo causa dano aos próprios tecidos. Além do mais, inflamações crônicas podem levar a uma série de doenças, como febre do feno, arteriosclerose e artrite reumatóide (SANTOS, 2009).

Existem drogas ou medicamentos capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo de modo a minimizar o dano (por parte dos próprios tecidos frente ao agente agressor) e dar maior conforto ao paciente.

Estes medicamentos são denominados antiinflamatórios, podendo estes ser de natureza hormonal ou não hormonal.

Antiinflamatórios ditos hormonais (esteroidais), também conhecidos como glicocorticoides, corticóides ou corticosteróides, são agentes inibidores da produção de prostaglandinas e leucotrienos pela ação inibitória sobre a enzima fosfolipase A2, por meio da liberação de lipocortina-1 (mediador protéico antiinflamatório). Estes agentes exercem papéis importantes na regulação de diversos processos fisiológicos, assim como metabolismo, proliferação celular, diferenciação, inflamação e resposta imune. Através da utilização destes agentes ficou estabelecido um tratamento um tanto quanto especial para as doenças inflamatórias – asma, artrite reumatóide, artrite psoriática, lúpus eritematoso, doença de Crohn, esclerose múltipla e vasculite sistêmica (GAYATHRI et al., 2007). O resultado final da ação destes antiinflamatórios é a parcial ou total redução da liberação dos prostaglandinas e também dos leucotrienos.

Os agentes antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo inteiro. Estes fármacos apresentam três tipos principais de efeitos: antiinflamatório, analgésico e antipirético. De uma maneira geral todos estes efeitos resultam da inibição da enzima ciclooxigenase, e conseqüente inibição das prostaglandinas e tromboxanos, mediadores lipídicos sintetizados por muitas células, em detrimento de algum estímulo químico ou mecânico. Não interferem com a geração de leucotrienos, mantendo parte do processo inflamatório inalterado e ativo. Seu principal uso é na redução dos sintomas da inflamação como a dor e o edema (SANTOS, 2009).

Diversos modelos animais de inflamação são utilizados para avaliar a eficácia de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias ou mesmo estudar o mecanismo de ação de medicamentos já utilizados na clínica, mas que não tem o mecanismo de ação farmacológica ainda totalmente esclarecido. Isto se deve ao fato que, apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, a etiologia e as manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de

modelos específicos que reproduzam as características básicas. Desta forma é fácil compreender também porque o tratamento de doenças inflamatórias é bastante diversificado (VIGIL, 2006).

Esforços são realizados no sentido de se identificar modelos experimentais apropriados para cada tipo de reação inflamatória, como edema de pata, artrite reumatóide e colite ulcerativa, entre muitos outros. Protocolos experimentais onde o processo inflamatório é induzido agudamente são utilizados para estudos desta reação abordando, entre outros, a participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares, além de possibilitar a triagem de fármacos com potencial ação antiinflamatória (VIGIL, 2006).

Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de compostos com atividade antiinflamatória. Dentre os parâmetros normalmente avaliados, estão edema, alteração da permeabilidade vascular, migração leucocitária, febre e dor. Apesar de, na maioria das vezes, não se chegar a um mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato da planta testado, esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novos compostos capazes de interferir com o custo da inflamação (LAPA et al., 2003).

3.9 Citotoxicidade *in vitro*

O câncer é consequência de uma mudança patológica na informação contida no DNA que pode ocorrer em qualquer o tipo de tecido do organismo. Devido a essas alterações as células cancerígenas se proliferam sobre as normais, adquirindo características peculiares de: desdiferenciação e perda da função, proliferação descontrolada, poder de invasão sobre tecidos adjacentes e metástases (LEMKE, 2008).

Alguns fatores externos desempenham papel nas alterações genéticas causadoras de câncer. Estima-se que 80% dos cânceres se desenvolvem por estimulação destes fatores. Dentre esses fatores temos: dieta, exposição a agentes químicos, radiação ionizante, e ate alguns vírus, como o papiloma vírus humano (KLUG e CUMMINGS, 2002).

Células cancerosas sobrevivem de forma independente em cultura de células (*in vitro*). Da mesma forma que acontece em um organismo vivo, em uma cultura, as células cancerosas tendem a crescer de forma desorganizada, crescendo uma sobre a outra, sem apresentar qualquer inibição por contato. A maioria das células cancerosas não apresenta o processo de morte celular programada – a apoptose. Por este motivo, estas células se tornam resistentes a quimioterapia e à radiação ionizante (DECH, 2002).

3.9.1 Procedimento Experimental

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

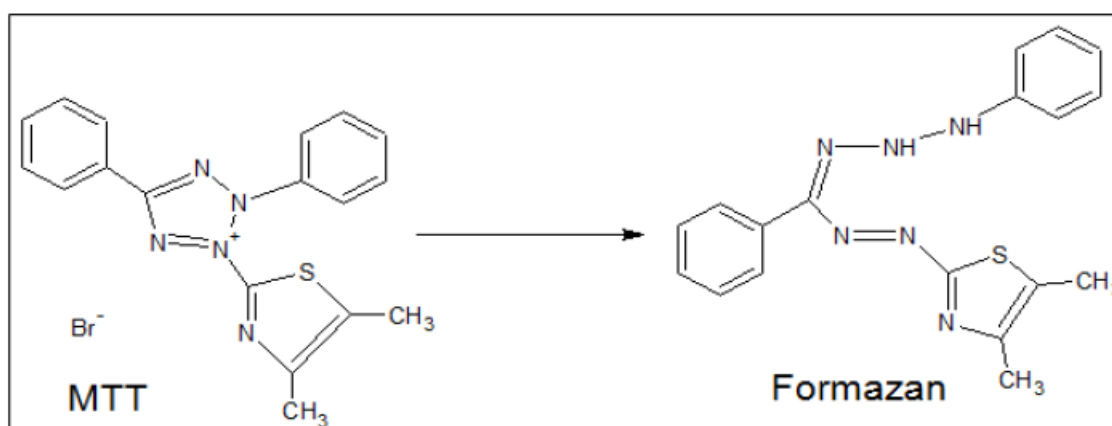


Figura 2: Reação de redução do MTT em um precipitado de formazan

3.9.2 Tratamento do Câncer e Agentes antineoplásicos

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. A técnica cirúrgica pode ser importante para

casos em que não haja metástases. Porém, na maioria dos casos, faz-se necessário o uso de terapias combinadas, como incremento na eficiência do tratamento (FOYE, 1996; MURAD; KATZ, 1996).

Vários são os agentes utilizados para o combate as células cancerosas. Um resumo dos tipos de agentes e seus mecanismos de ação são é representado na figura 3.

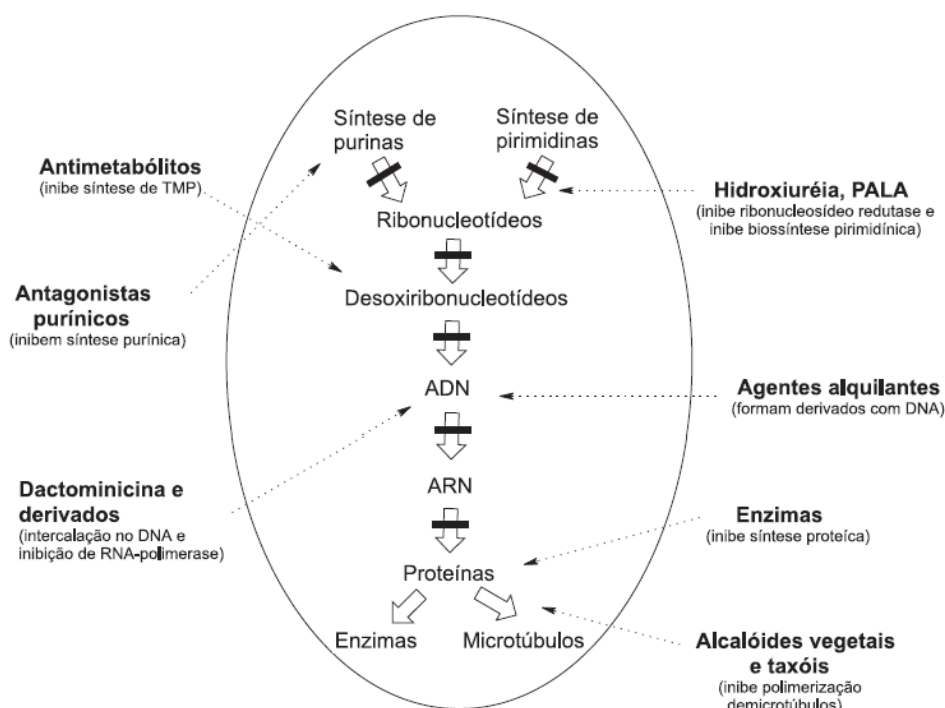


FIGURA 3: Classificação de agentes antineoplásicos de Calabresi e Chabner 1995

O câncer de pulmão é o mais comum, apresentando um aumento por ano de 2% na sua incidência mundial. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 14.715 óbitos em 2000, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas (INCA, 2012).

Em 85% dos casos o fumo é a causa da neoplasia, e o risco é associado à duração do hábito de fumar, ao número e tipo de cigarro fumado por dia. Alguns fatores elevam o risco do desenvolvimento de câncer no pulmão: o tabaco, fumo passivo, exposição ocupacional e a predisposição genética (UEHARA; JAMNIK; SANTORO, 1998).

O câncer de laringe representa cerca de 25% dos tumores que atingem a região da cabeça e pescoço. Ocorre predominantemente em homens e foi em 2009 a causa do óbito de 3.081 homens e 409 mulheres. Aproximadamente dois terços dos tumores surgem na corda vocal verdadeira, localizada no glote e um terço acomete a laringe supraglótica (acima das cordas vocais). O tipo histológico mais prevalente, em mais de 90% dos pacientes é o carcinoma epidermóide (INCA, 2012).

No Brasil, em 2009, o câncer de cólon foi a causa de 12.471 óbitos, sendo 5.847 homens e 6.624 mulheres. Este tipo de câncer abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. É tratável e, na maioria dos casos, curável, ao ser detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos.

A atividade farmacológica do vegetais também é testada na área oncológica. O NCI - National Cancer Institute (EUA), durante a década de 60, realizou pesquisas com extratos de diversas plantas e mensurou a atividade antitumoral de cada uma delas (MONKS, 2002). Foi através destes estudos que se conseguiu o isolamento do Taxol, uma das drogas mais importantes no tratamento do câncer de mama. Este foi o resultado obtido de pesquisas feitas com o extrato das cascas de *Taxus brevifolia*. Para os modelos *in vivo* utilizados pelo NCI, o extrato não se mostrou muito ativo; Por outro lado foi observada interessante atividade *in vitro* (OBERLIES, 2004; VIEGAS JR, 2006).

Muitas das drogas utilizadas para o tratamento do câncer provêm de um produto de origem natural. Além do Taxol podemos citar a vincristina e a vimblastina, alcalóides oriundos da *Vinca*. A busca por novas moléculas que tratem, ou até que curem determinados tipos de câncer vem aumentando, dado a grande quantidade de novos tipos e casos de tumores. Logo, neste estudo, avaliou-se o potencial de ação citotóxica de *C. pulegioides* contra três linhagens de células tumorais humanas: carcinoma de cólon, de laringe e de pulmão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Screening Fitoquímico de *C. pulegioides*

4.1.1 Coleta do material

O material vegetal utilizado, folhas, caule e raiz de *C. pulegioides*, foi coletado no município de Gravatá - PE, a cerca de 80 km do Recife, no período de novembro de 2010 a setembro de 2011. O material coletado foi devidamente acondicionado e armazenado até a extração realizada.

4.1.2 Obtenção do extrato bruto

Para a obtenção do extrato foram usados 20g da raiz, 50g da folha e 70g do caule. O material vegetal, seco e moído, foi submetido a uma extração por percolação, sendo o metanol usado com solvente. As soluções extraídas foram evaporadas em rotaevaporador rotativo até secura. Os rendimentos dos extratos foram os seguintes: 16% para extrato metanólico da raiz, 9% para extrato metanólico do caule e 16% para o extrato metanólico das folhas.

Aproximadamente 2 g de cada parte do vegetal (folhas, caule e raiz) foram submetidas à decocção metanólica sob agitação durante 30 minutos. Posteriormente, os extratos obtidos foram filtrados em papel e analisados por cromatografia em camada delgada, empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados (WAGNER, 1996).

A caracterização dos grupos de metabólitos foi efetuada empregando diversos reativos cromogênicos como mostra a tabela 1:

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica de *C. pulegioides*

METABÓLITOS	FASE MÓVEL	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27)	Dragendorff	WAGNER, 1996

Mono, Sesqui e Diterpenóides	benzeno-AcOEt (97:3 v/v)	Vanilina sulfúrica	WAGNER, 1996
Triterpenóides e Esteróides	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:0,5:0,5:0,5)	Lieberman/ Burchard	HARBONE, 1998
Iridóides	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27)	Vanilina sulfúrica	WAGNER, 1996
Saponinas	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27)	Anisaldeído	WAGNER, 1996
Fenilpropanoglicosídeos	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27)	NEU	WAGNER, 1996
Cumarinas	Éter-Tolueno- AcOH 10% (50:50:50)	U.V.	WAGNER, 1996
Flavonóides	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27)	NEU	XAVIER, 1988
Proantocianidinas	AcOEt-AF- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27)	Vanilina clorídrica	ROBERTSON, 1957

Outros ensaios foram efetuados para comprovação da presença de alcalóides - usando provas em vidro de relógio com reagentes gerais de precipitação (Mayer, Bouchardat, Bertrand); e para prova da presença de saponosídeos - ensaios de afrogenicidade.

4.1.3 Purificação e tentativa de elucidação estrutural de uma substância isolada

Nos trabalhos de isolamento e purificação de componentes fixos, foram utilizadas: técnicas cromatográficas de monitoramento (CCD), cromatografia em coluna a pressão normal (CC) e HPLC.

A substância isolada após purificação por HPLC foi submetida à caracterização espectrométrica (UV e RMN ^1H).

4.1.4 Obtenção dos óleos essenciais das folhas da espécie *C. pulegioides*

Os óleos essenciais foram obtidos por meio de minidestilador, modelo D1 linax, no qual utilizou-se o método de arraste a vapor (hidrodestilação). As folhas foram colocadas no destilador durante 3 horas. Os óleos após serem retirados pelo vapor da água do destilador e tratados com éter etílico foram analisados por cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas.

4.2 Experimento *in vivo*

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, com número de processo 23076.052300/2011-57.

4.3 Animais

Nos testes de toxicidade aguda foram utilizados grupos de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas e machos adultos, pesando entre 25 a 30 g. Para o teste de peritonite foram utilizados grupos de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos adultos, pesando entre 25 a 30 g. Para o teste de Edema de pata foram utilizados ratos machos adultos, pesando entre 150 e 200g. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22 ± 3 °C, alimentados com ração industrial adequada (labina) e água *ad libitum*.

4.4 Avaliação da Toxicidade Aguda

O teste para avaliação da toxicidade aguda de extratos de *C.pulegioides* em dose única foi realizado de acordo com o protocolo descrito na ANVISA, 1996, que preconiza a utilização de grupos compostos por no máximo 10 animais com pesos similares, preferencialmente fêmeas e com idade entre 8 e 12 semanas.

4.4.1 Procedimento experimental

Os camundongos foram divididos quatro grupos de 10 animais. Um grupo controle, que recebeu a salina e três grupos que receberam o extrato aquoso de *Croton pulegioides* nas doses de 2000, 3000 e 4000mg/kg. Os animais ficaram em um jejum de 4h antes do experimento. As doses foram administradas por via oral e os animais foram observados durante a primeira hora quanto a sinais de toxicidade e nas primeiras 24 horas para o registro de óbitos. Em seguida, os animais foram observado por um período de 14 dias, tendo peso e ingestão de ração e água monitorados.

4.5 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

4.5.1 Peritonite induzida por carragenina

O teste foi realizado com grupos de 8 animais cada. Os ratos dos grupos tratados receberam o extrato nas doses de 200, 300 e 400 mg/kg (v.o), o grupo controle recebeu solução salina e o grupo padrão recebeu indometacina 10 mg/kg (v.o). Uma hora após a administração dos tratamentos, a inflamação foi induzida através da administração de 1 ml de de uma solução de carragenina (1%; p/v). Quatro horas após a indução da inflamação os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, em seguida foi injetado na cavidade peritoneal 2 mL de PBS contendo EDTA. O peritônio dos animais foi levemente massageado e o volume do líquido da cavidade peritoneal foi coletado. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico micros 60 (GUERRA, 2011).

4.5.2 Edema de pata induzido por carragenina

Neste ensaio, a inflamação foi induzida pela administração do agente flogístico, carragenina no tecido subcutâneo da região plantar dos animais. Os animais foram divididos em 4 grupos, um controle e três tratados com o extrato aquoso de *C. pulegioides* nas doses de 200 e 400mg/kg. O volume da pata foi medido imediatamente após a administração da carragenina (tempo zero) e nos intervalos de 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, através do deslocamento de água registrado em pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile Co., Varese, Italy). A avaliação do edema foi feita através da diferença do volume de líquido deslocado, após a imersão da pata do animal no líquido do pletismômetro. O aumento do volume da pata foi calculado pela diferença entre o volume inicial da pata e o volume a cada hora durante um período de 5 horas.

Após as 5 horas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e tiveram a planta da pata, a qual foi submetida ao experimento, retirada para posterior análise de MPO.

4.6 Análise Estatística

Os valores foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da análise de variância (ANOVA – one way), seguido pelo pós teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises foram feitas com auxílio do programa *GraphPad Prism 5*.

4.7 Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

4.7.1 Células

As linhagens tumorais utilizadas, HT29 (carcinoma de cólon - humano), NCI H-292 (câncer de pulmão – humano), HL60 (leucemia promielocítica) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.7.2 Amostras

As amostras foram diluídas em DMSO e testadas na concentração de 0,3 até 25 µg/mL para substâncias puras. A doxorubicina foi usada como controle positivo. As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio DMEN para obtenção das concentrações finais (50 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100µL/ poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram reincubadas por 3h. Após a dissolução dos cristais com DMSO, a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm.

4.7.3 Análise Estatística

Os valores foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da análise de variância (ANOVA – one way), seguido pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises foram feitas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.

4.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.8.1 Técnica de Poços – Difusão em Agar

A atividade antimicrobiana do extrato seco metanólico de *C. pulegioides* foi determinada pela metodologia de Técnica de Poços – Difusão em Agar. No teste, as culturas foram preparadas a partir de colônias isoladas das cepas reativadas suspendidas em 1mL de solução salina. A turvação da suspensão microbiana foi padronizada comparando com a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL). Em seguida, alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana foi semeada na superfície das placas com Agar Mueller Hinton para bactérias e Agar Sabouraud para fungos, com o auxílio de um swab estéril, realizando com um perfurador cinco orifícios de 6-7 mm por placa, três dos quais foi adicionado o extrato diluído em DMSO 20% nas seguintes concentrações: 10.000 µg/poço, 5.000 µg/poço e 2.500 µg/poço (volume de um

poço = 100µL); num quarto poço foi adicionado o antibiótico padrão (Gentamicina 10µg/poço para bactérias e Cetoconazol 30µg/poço para fungos) e num quinto poço, o controle do solvente, DMSO 20%. Nas placas de bactérias, o antibiótico padrão Gentamicina foi adicionado na concentração de 10 µg/poço; nas placas de fungos, o antibiótico padrão Cetoconazol foi adicionado na concentração de 30 µg/poço. As placas foram incubadas por 18 horas à 37°C ± 1°, medindo-se os halos de inibição produzidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8.2 Relação das Cepas usadas

1. *Staphylococcus aureus* AM 103
2. *Staphylococcus epidermidis* AM 235
3. *Staphylococcus saprophyticus* AM 245
4. *Enterococcus faecalis* AM 1056
5. *Pseudomonas aeruginosa* AM 206
6. *Escherichia coli* AM 1050
7. *Klebsiella pneumoniae* AM 410
8. *Bacillus subtilis* AM 04
9. *Candida krusei* AM 1168
10. *Candida tropicalis* AM 1181
11. *Candida albicans* AM 1140

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Screening Fitoquímico de *C. pulegioides*

A tabela 2 mostra os resultados obtidos após os ensaios efetuados a partir dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas do *C. pulegioides*.

Tabela 2 – Prospecção Fitoquímica de *C. pulegioides*

METABÓLITO	RAIZ	CAULE	FOLHAS
Alcalóides	+++	++	-
Cumarinas	-	-	-
Flavonóides	+	-	++
Mono e Sesquiterpenos	++	+	++
Triterpenos e esteroides	-	++	++
Proantocianidinas	-	++	-
Saponinas	-	-	-

Tabela 2. Expressão dos resultados: (+++) = fortemente positivo, (++) = fracamente positivo, (+) = positivo, (-) = negativo.

As figuras abaixo mostram as cromatografias realizadas para o screening fitoquímico dos extratos da raiz, caule e folhas do *C. pulegioides*.

Para os alcalóides, a espécie *Croton pulegioides* evidenciou a presença de uma banda referente a esses metabólitos no extrato da raiz e uma banda no extrato do caule, sendo os R_fs dessas bandas e do padrão mostrados na Figura 4.



Figura 4. Perfil cromatográfico para alcalóides dos extratos metanólicos da folha, caule e raiz de *C. pulegioides*. Legenda: F=extrato da folha; C=extrato do caule; R= extrato da raiz; P= padrão – Pilocarpina

A figura 5 mostra a análise das cromatografias do extrato da raiz, do caule e da folha de *Croton pulegioides* pra identificação de flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos, através de raios UV, observou-se a visualização de duas bandas laranja no extrato da folha, que acredita-se serem flavonóides, quando comparados com o padrão. Foi possível também a visualização de um ponto azul no extrato de raiz, indicando a provável presença de um derivado cinâmico. Não foi possível visualizar pontos verdes, o que confirmaria presença de fenilpropanoglicosídeos.

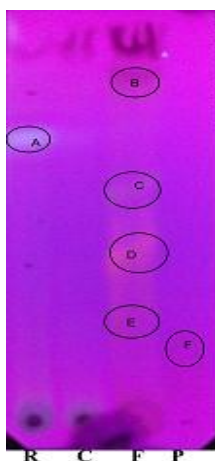


Figura 5. Perfil cromatográfico para flavonóides dos extratos metanólico da folha, caule e raiz de *C. pulegioides*. Legenda: F=extrato da folha; C=extrato do caule; R= extrato da raiz; P= padrão – Rutina

A análise de monoterpenos e sesquiterpenos na figura 6, foram visualizadas seis bandas referentes à migração da alíquota do extrato de raiz e seis bandas referentes à migração da alíquota do extrato de folha, e ainda

quatro bandas referente à migração da alíquota do extrato de caule, confirmando assim a presença destes metabólitos nas três partes do vegetal.



Figura 6. Perfil cromatográfico para mono e sesquiterpenos dos extratos metanólicos da folha, caule e raiz de *C. pulegioides*. Legenda: F=extrato da folha; C=extrato do caule; R= extrato da raiz; P= padrão – Timol

Na análise de triterpenos e esteróides, foram visualizadas duas bandas no extrato da raiz e no extrato do caule com Rfs iguais aos do padrão, evidenciando-se assim a provável presença de β -amirina e β -sitosterol na raiz e no caule. Na folha foram separadas três bandas com Rfs iguais aos das três bandas do padrão, sendo provável, assim, a presença de ácido ursólico, β -amirina e β -sitosterol; além de outro triterpenóide ou esteróide não identificado, observados na figura 7.

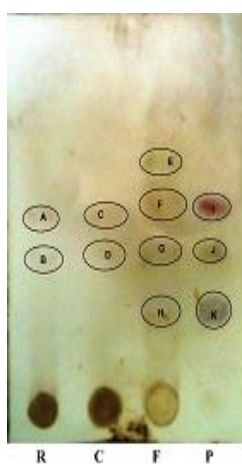


Figura 7. Perfil cromatográfico para triterpenos dos extratos metanólicos da folha, caule e raiz de *C. pulegioides*. Legenda: F=extrato da folha; C=extrato do caule; R= extrato da raiz; P= padrão – β -amirina, β -sitosterol e ácido ursólico.

Segundo Salatino, 2007, a química do gênero *Croton* abrange os terpenos, principalmente os diterpenos, óleos voláteis, alcalóides e flavonóides.

A análise fitoquímica do extrato metanólico do *C. pulegioides* das folhas raízes e caule revelou a presença de vários metabólitos secundários, como os alcalóides, flavonóides, terpenos e proantocianidinas. Os padrões e a fase móvel estão mostrados na tabela 1. Os resultados que indicam a presença dos metabólitos secundários estão listados na tabela 2.

Através da cromatografia, observou-se uma ligeira predominância da presença de alcalóides e flavonóides, o que coincide com a literatura relatada por Randau, 2004 e Silva et. al 2010.

Os alcalóides podem ser definidos como compostos orgânicos nitrogenados de baixo peso molecular, geralmente com uma estrutura heterocíclica, derivados de aminoácidos e com distribuição limitada entre plantas, fungos e animais (MEMELINK et. al., 2001; HESSE, 2002).

Várias são as funções dos alcalóides nas plantas, principalmente na proteção contra estresses ambientais (JANSEN et. al., 1998). Sua função farmacológica é bastante variada, sendo usados como analgésicos, antitussígenos, antioxidantes, vasorrelaxantes e antitumorais, o que causou um aumento no interesse por potenciais fontes desses compostos (RÍOS et. al., 2000; CUI et. al., 2006).

A classe de alcalóides não é muito comum no gênero *Croton*, mas já foi relatada em vários estudos como o de Lima & Pirani, 2007, por exemplo. A maioria da classe dos alcalóides, presentes no gênero *Croton* pertence a classe dos benzilisoquinolínicos (PUEBLA, 2005).

No presente trabalho, o alcalóide, mostrou-se presente, principalmente, na raiz do *Croton pulegioides*; observou-se, também, a presença do alcalóide, em menor quantidade, no caule e a ausência do mesmo nas folhas.

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias que possuem uma série de propriedades farmacológicas (PETERSON & DWYER, 1998). São compostos fenólicos que possuem em sua estrutura 15 átomos de carbono (YOKOZAWA et al, 1997). Entre os flavonóides, os mais comuns são as flavonas e os flavonóis. São estruturas compostas de três anéis, dois derivados do ácido chiquímico e um da via do acetato malonato (VICKERY & VICKERY, 1981).

A propriedade farmacológica dos flavonóides é bastante ampla. Segundo Marín et. al., 2002, a atividade antioxidante atribuída aos flavonóides desperta interesse crescente devido a presença desses metabólitos nos alimentos vegetais, o que possibilitaria o uso de dietas ricas no metabolito, com fins terapêuticos ou preventivos.

Essa atividade antioxidante está relacionado com a disposição das hidroxilas nos anéis presentes na sua estrutura (RICE-EVANS et. al., 1996; MARÍN et. al., 2002).

Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: atividade anticancerígena, atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti - hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (LIN et al. 1997).

Flavonóides, são geralmente citados na literatura como componente de diversas espécies de *Croton*. São descritos para o gênero *Croton* as agliconas de flavonas ou flavonóis metoxilados (MACIEL et. al., 2000; BARBOSA et. al., 2004) e alguns glicosídeos de agliconas (CAPASSO et. al., 2000; LAGNIKA et.al., 2009).

Os flavonóides estavam presentes tanto no extrato da raiz quanto no extrato das folhas, estando neste último em maior quantidade.

Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida (HARBORNE, 1993). A principal característica dos terpenos é a presença da unidade isopreno, formada por cinco carbonos. Dessa forma, os terpenos são classificados em função do número de unidades de isopreno encontradas na molécula: duas unidades (C10) - monoterpenos, três unidades (C15) - sesquiterpenos, quatro unidades (C20) – diterpenos.

Os triterpenos são derivados de um composto alifático de trinta carbonos, o esqualeno, dando origem aos diferentes subgrupos desses compostos, como o oleanano (β -amirina), lupeol, estigmasterol e sitosterol (PETTIT & DIAS, 1969).

Os terpenos foram encontrados tanto no caule, quanto na folhas. Foram achados o β -sitosterol e a β -amirina nas duas amostras. Estes já foram encontrados e citados em estudos anteriores de *Crotons* da espécie *C.*

ramnifolius e *C. ramnifolioides* (RANDAU, 2004), também sendo identificados em trabalhos realizados por Hernandez e Delgado em 1992.

C. pulegioides apresentou apenas no caule, tanto as proantocianidinas condensadas. De acordo com Randau, 2004, as proantocianidinas também são componentes de *C. ramnifolius* e *ramnifolioides*.

A presença acentuada de alcalóides na raiz foi decisiva para escolha do material para o procedimento de extração e etapas subsequentes.

5.2 Tentativa de Isolamento de Moléculas

Na tentativa de isolamento de moléculas da raiz de *C. pulegioides*, foi utilizada uma coluna preenchida com a Resina Duolite S861, e os solventes utilizados para a separação foram água e acetona em crescentes concentrações. Foram obtidas diversas frações da coluna. O conteúdo das frações foi observado através de cromatografias em camada delgada. Através das cromatografias, foi observado que a fração 4% acetona-água, possuía possíveis moléculas de interesse para a pesquisa. As frações foram reunidas em um único compartimento e seu conteúdo foi submetido ao UV. Embora as absorções no U.V. (253 e 317 nm) estejam compatíveis com aquelas esperadas para uma substância de natureza flavonoídica, a quantidade isolada não permitiu a obtenção de espectro de RMN (^1H e ^{13}C) que possibilitasse a confirmação.

5.3 Análise dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *C. pulegioides*

O cromatograma do óleo essencial apresentado na Figura 8, mostra o efeito dos compostos contidos no óleo essencial extraído das folhas de *C. pulegioides*.

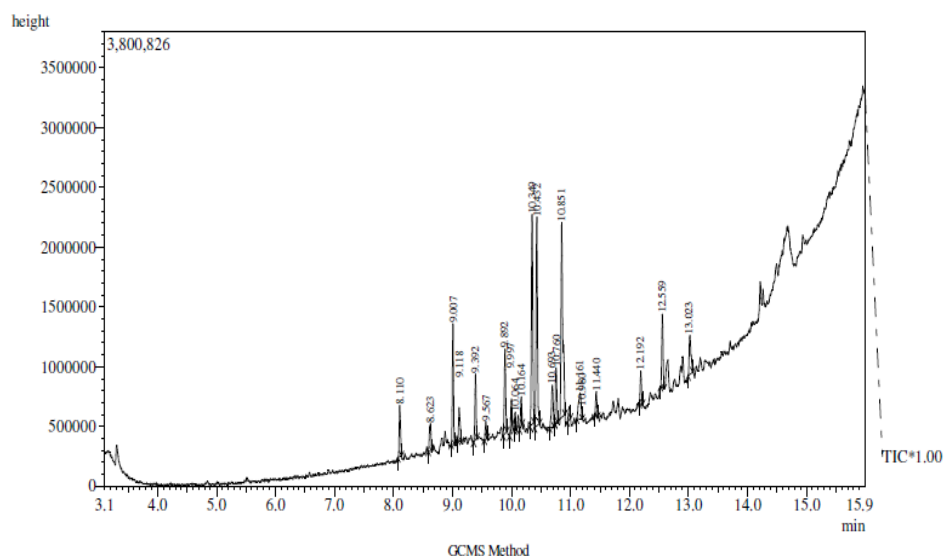


Figura 8: Cromatograma do óleo essencial das folhas do *Croton pulegioides*

Os espectros de massas obtidos foram comparados com o banco de dados WILEY229 que retornou, com índice de similaridade, cinco possibilidades de compostos para cada substância. O espectro de massa completo está anexado a este trabalho (ANEXO C). Foram considerados apenas aqueles que apresentam índice de similaridade igual ou superior a 90, conforme descritos a seguir:

O pico cromatográfico com tempo de retenção 8,11 minutos, com área normalizada (%A) de 2,69, foi apresentado pelo banco de dados da WILEY229 com cinco possibilidades correspondendo ao linalool (Figura 9), com índice de similaridade 95 e 94. Os dados apresentados pelo CG/MS são compatíveis com o espectro de massas do linalool encontrado na literatura (TELES, 2009).

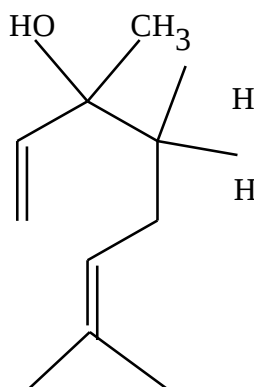


Figura 9: Estrutura do linalool

Os principais fragmentos observados no espectro de massas da Figura 10, resultantes da substância indicada pelo Banco de dados da WILEY229 como possivelmente sendo linalool, são discutidos e apresentados no esquema abaixo.

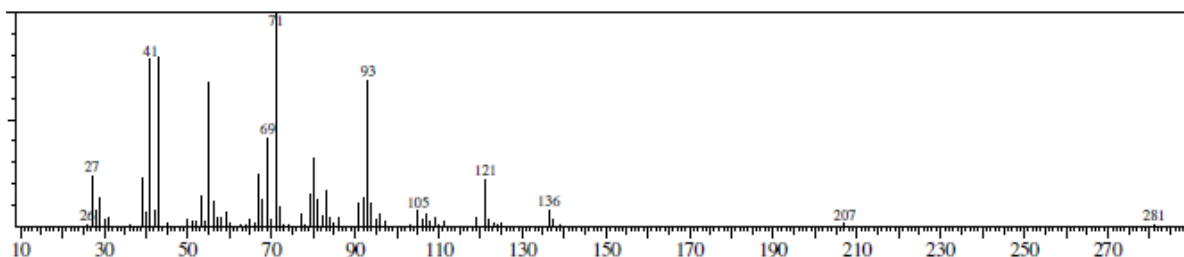
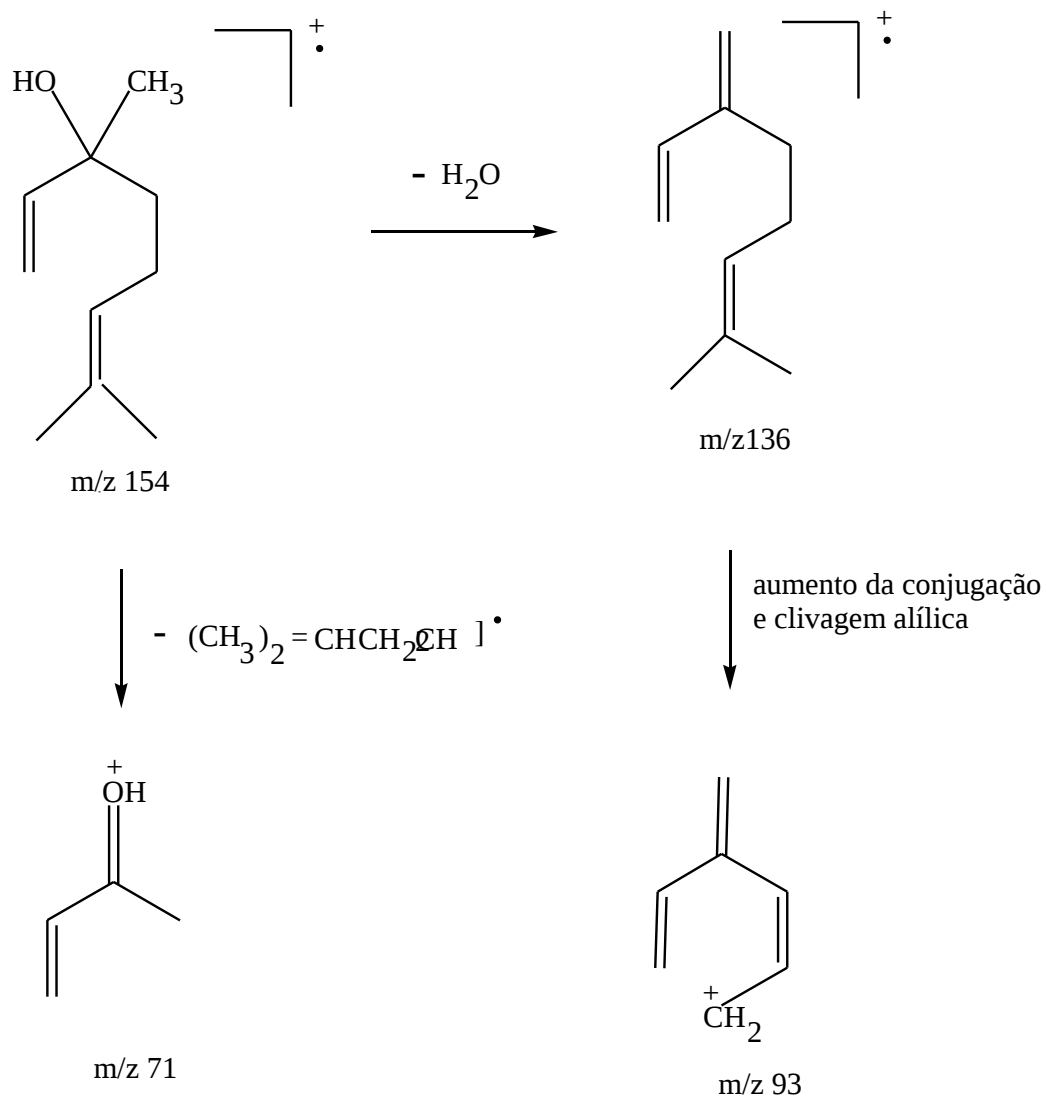


Figura 10: Fragmentos observados no espectro de massas para o tempo de retenção = 8,11 min no cromatograma apresentado na fig. 8

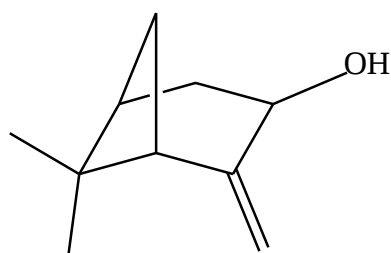
O íon molecular do linalool não é observado por este ser um álcool terciário. De acordo com a literatura, para os alcoóis terciários normalmente os íons moleculares são de difícil visualização (SILVERSEIN,1994). No entanto, foi observado o sinal em (M – 18) correspondendo a perda de uma molécula de água, que no caso seria o sinal em m/z 136.

O pico base $\text{CH}_2 = \text{CH-CO}^+\text{H-CH}_3$ (m/z 71), pode resultar da ruptura homolítica da ligação entre os carbonos C-3 e C-4, vizinha ao átomo de oxigênio. Enquanto o pico m/z 121 [M – 17 – 15] é formado a partir do íon molecular por perdas sucessivas de água e de grupo metila. O pico em m/z 93 pode ser proveniente do m/z 136, que após isomerização, sofreria clivagem alílica (SILVERSTEIN, 1994).



Esquema 1. Fragmentação do Linalool

Para o composto com tempo de retenção 8,62 minutos, com área normalizada (%A) de 1,79, três possibilidades foram apresentadas pelo banco de dados da WILEY229, com índice de similaridade maior ou superior a 90, indicando que o composto pode ser pinocarveol Figura 11.

**Figura 11:** Estrutura do pinocarveol

Os principais fragmentos observados no espectro de massa da Figura 12, resultantes da substância indicada pelo Banco de dados da WILEY229 como possivelmente sendo pinocarveol são discutidos a abaixo.

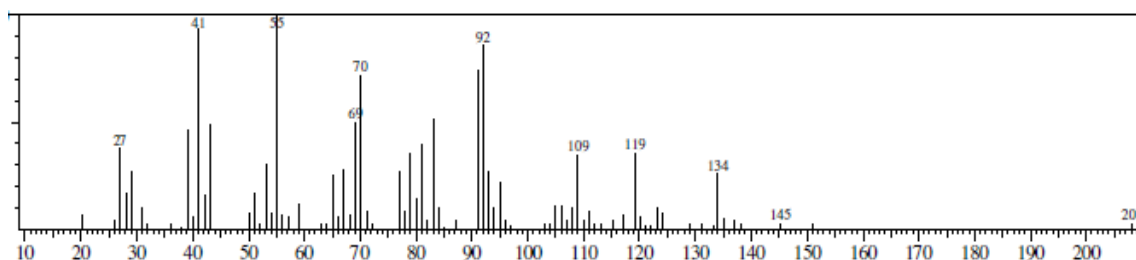


FIGURA 12: Fragmentos observados no espectro de massas para o tempo de retenção = 8,62 min no cromatograma apresentada na Fig. 8.

O pico base é m/z 55, possivelmente de estrutura $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}^+\text{H}$. A possibilidade do composto ser pinocarveol é apoiada também pelos fragmentos observados no espectro de massas serem compatíveis com aqueles do pinocarveol referidos na literatura (TELLES, 2009). O pico $M - 18$ também é observado, que no caso seria um sinal em m/z 134.

Para o composto com tempo de retenção 9,00 minutos, com área normalizada (%A) de 6,69, cinco possibilidades foram apresentadas pelo banco de dados da WILEY229, com índice de similaridade maior ou superior a 90. Quatro delas indicam que o composto pode ser α -terpineol FIGURA 13.

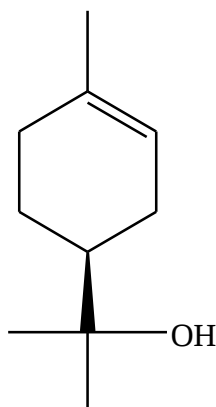


FIGURA 13: Estrutura do α -terpineol

Os principais fragmentos observados no espectro de massa da Figura 14, resultantes da substância indicada pelo Banco de dados da WILEY229 como possivelmente sendo α -terpinol, são discutidos a abaixo.

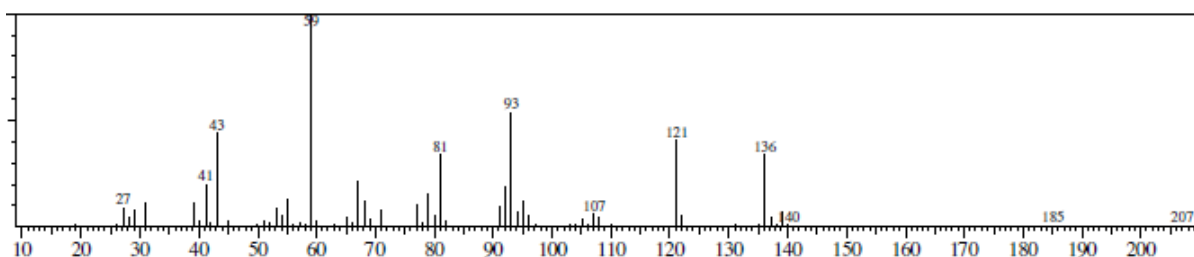


FIGURA 14: Fragmentos observados no espectro de massas para o tempo de retenção = 9,00 min no cromatograma apresentada na Fig. 8.

O pico base se apresenta em m/z 59. A possibilidade do composto se tratar do α -terpineol é apoiada também pelos fragmentos observados no espectro de massas serem compatíveis com aqueles do α -terpineol referidos na literatura. (TELES, 2009).

O processo de fragmentação do composto em questão pode ser discutido como a seguir: O íon molecular do α -terpineol não é observado no espectro, o que está de acordo com fato de que o pico do íon molecular de alcoóis terciários é de observação muito difícil (SILVERSEIN, 1994).

O pico m/z 136 pode ser formado do α -terpineol por perda de uma molécula de água. Em seguida por perda de grupo metila, este pico poderá formar o de m/z 121 [$M - 18 - 15$]. Enquanto que o pico m/z = 93 pode ser resultante da perda de uma molecular de água, um grupo metila e de uma molécula de eteno [$M - 18 - 15 - 28$].

Os compostos que apresentam t_r iguais a 9,12 e 9,39 minutos apresentam espectros de massas semelhantes, o que nos leva a propor que sejam isômeros. De acordo com o índice de similaridade com o banco de dados Willey229, existe a possibilidade de ser o acetato de sabinyl (Fig.15), cis-sabinol Fig. 16), ou epóxido de felandreno (Fig. 17).

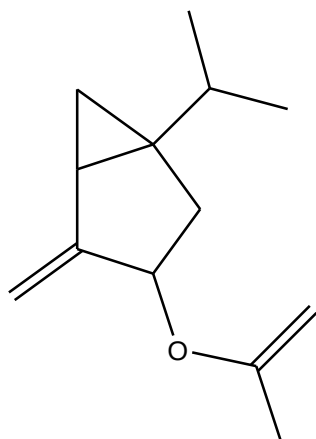


FIGURA 15: Estrutura do Acetato de sabinyl

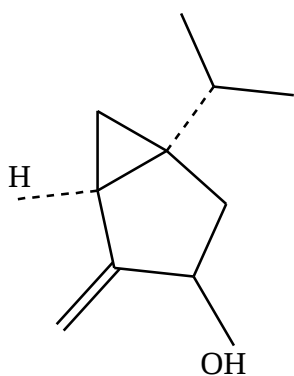


FIGURA 16: Estrutura do Cis-sabinol

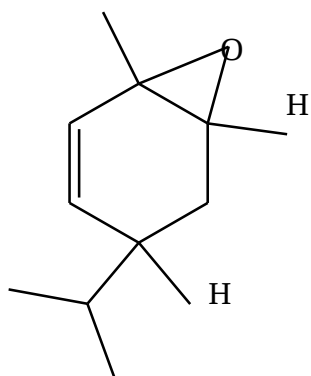


FIGURA 17: Estrutura do Epóxido felandreno

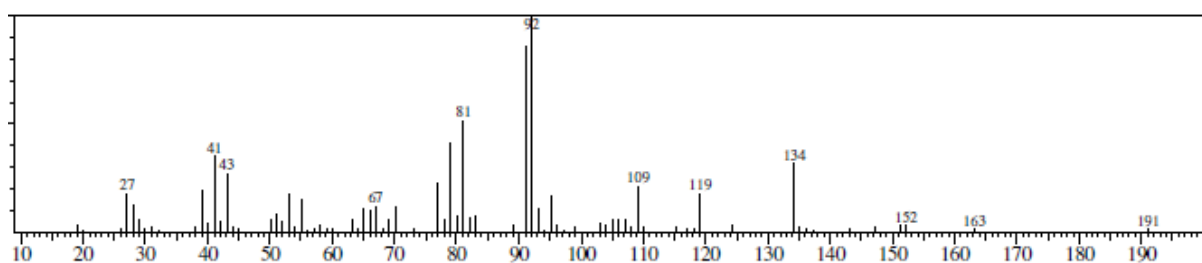


FIGURA 18: Fragmentos observados no espectro de massas para o tempo de retenção = 9,12 min no cromatograma apresentada na Fig. 8.

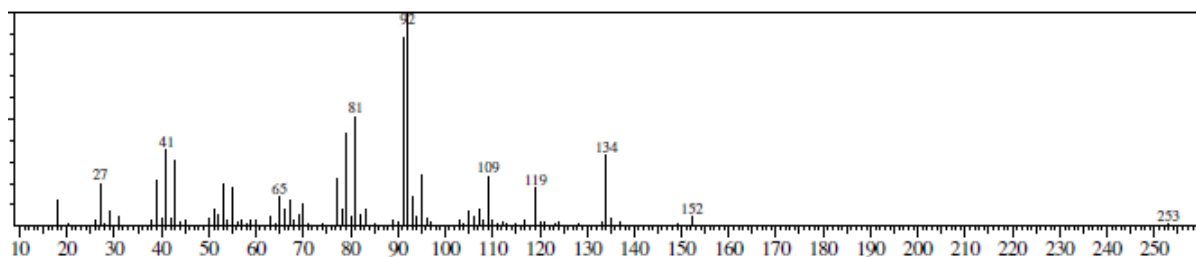


FIGURA 19: Fragmentos observados no espectro de massas para o tempo de retenção = 9,39 min no cromatograma apresentada na Fig. 8.

5.4 Toxicidade Aguda

O teste agudo em camundongos com extrato seco da raiz de *Croton pulegioides* não produziu nenhuma mortalidade durante os 14 dias de tratamento, mesmo após o tratamento com doses elevadas, recomendadas pela literatura. Dessa forma, não foi possível determinar a DL₅₀.

Logo após a administração do extrato, os animais apresentaram alguns sinais que estão listados, por cada grupo, na tabela 3.

A administração do extrato da raiz de *C. pulegioides* causou uma pequena alteração, nos três grupos submetidos ao extrato, no consumo de água e ração, apenas nos dois primeiros dias após a sua administração. Porém durante os dias seguintes de observação, não foi verificada nenhuma interferência do extrato administrado no desenvolvimento geral dos mesmos, em relação ao consumo de água e ração, à eliminação de urina, fezes e alterações comportamentais. O controle do peso dos animais, o consumo de ração e água são mostrados nas figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

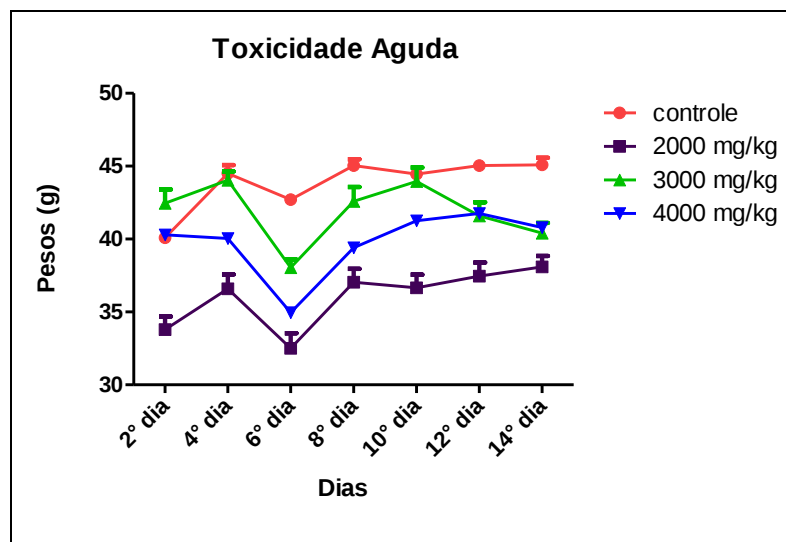


FIGURA 19: Toxicidade aguda do extrato metanólico seco da raiz de *C. pulegioides*

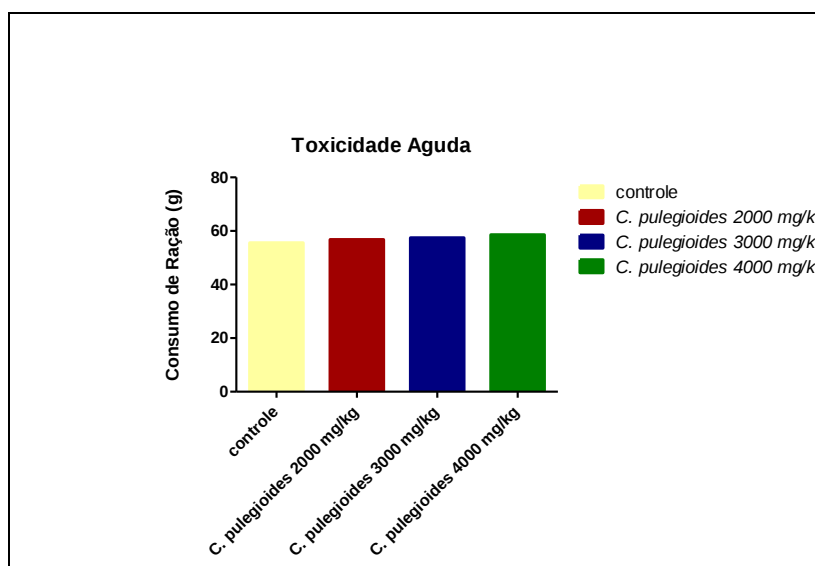


FIGURA 20: Toxicidade aguda do extrato metanólico seco da raiz de *C. pulegioides*

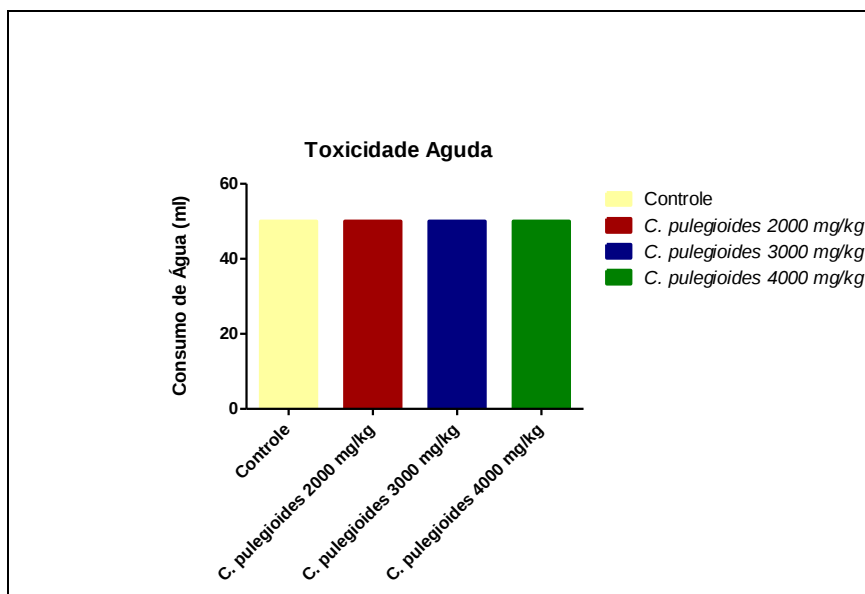


FIGURA 21: Toxicidade aguda do extrato metanólico seco da raiz de *C. pulegioides*

5.5 Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória

5.5.1 Peritonite induzida por carragenina

O modelo do teste da peritonite induzida por carragenina é um método bastante utilizado para a avaliação do processo inflamatório agudo. Os resultados a seguir, foram obtidos 4 horas após a aplicação do elemento flogístico, e o parâmetro avaliado foi a migração leucocitária. A inibição inflamatória, apresentada na Tabela 3 e figura 22, estabelece como padrão comparativo o grupo controle e a partir dos resultados, pode-se observar que os testes realizados com o extrato da raiz de *C. pulegioides* nas doses de 200, 300 e 400 mg/Kg revelam atividade anti-inflamatória significativa em relação ao grupo controle.

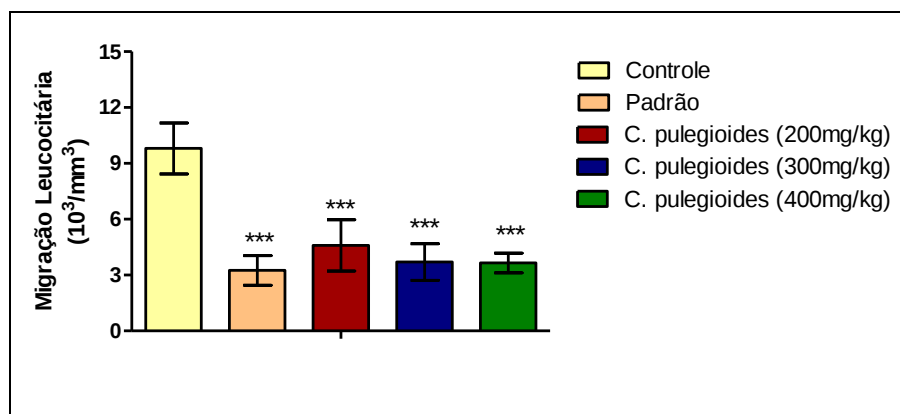


FIGURA 22: Efeito do extrato da raiz de *C. pulegioides* na migração leucocitária dos grupos testados

Tabela 3 – Número de leucócitos e percentual de inibição da migração celular

Grupos	Dose (mg/Kg)	Contagem de leucócitos (103/mm ³)	Inibição Inflamatória (%)
Controle	-	9,5 ± 1,4	-
Padrão – Indometacina	10	3,25 ± 0,8***	66,8
<i>C. pulegioides</i> 200	200	4,6 ± 1,4***	79,7
<i>C. pulegioides</i> 300	300	3,7 ± 1,0***	62,2
<i>C. pulegioides</i> 400	400	3,65 ± 0,5***	62,8

*** Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A atividade biológica das plantas medicinais está estreitamente relacionada aos seus constituintes químicos. A presença de substâncias, como taninos, flavonoides, cumarinas e terpenos tem sido relacionada às atividades anti-inflamatória e antioxidante de diversas plantas (HAJHASHEMI et al., 2003; ISHIKAWA et al., 2003; MELO et al., 2003; CHOI & HWANG, 2004; PEANA et al., 2004; CHAO et al., 2005; GUERRA et al., 2005; WANIKIAT et al., 2008).

Estudos anteriores mostram que flavonóides podem inibir tanto a via da ciclooxigenase quanto da 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato podendo contribuir para propriedades anti-inflamatórias. Além disso, outros estudos têm mostrado que flavonóides aumentam a permeabilidade capilar e exercem um efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos (LANDOLFI; MOWER & STEINER, 1984).

Triterpenoides também apresentam atividade anti-inflamatória, dependente da inibição de citocinas pré-inflamatórias (BREMNER & HEINRICH, 2002).

Os resultados deste ensaio indicam a presença de atividade anti-inflamatória no extrato da raiz de *C. pulegioides*, contribuindo para estudos posteriores que visem avaliar de forma mais aprofundada o potencial desta atividade e os mecanismos de ação envolvidos.

5.5.2 Edema de Pata induzida por carragenina

O teste de edema de pata induzido por carragenina é um outro modelo bastante utilizado para se avaliar a inflamação em seu estado agudo. Os resultados a seguir, foram obtidos desde o tempo zero até a 5ª hora, mostrando que houve redução do edema e da concentração de MPO no tecido da pata. A resposta anti-inflamatória apresentada nas figuras 23 e 24 estabelece como padrão comparativo o grupo controle e a partir dos resultados, pode-se observar que os testes realizados com os extrato da raiz do *C. pulegioides* nas doses de 200 e 400mg/kg mostraram atividade anti-inflamatória promissora a partir da quarta hora.

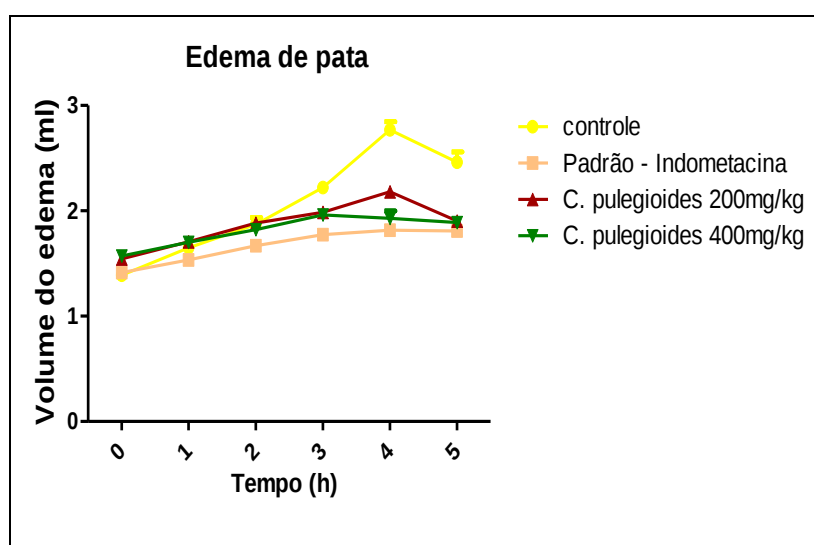


FIGURA 23: Atividade anti-inflamatória do extrato da raiz de *C. pulegioides* da pata submetida a inflamação pela carragenina.

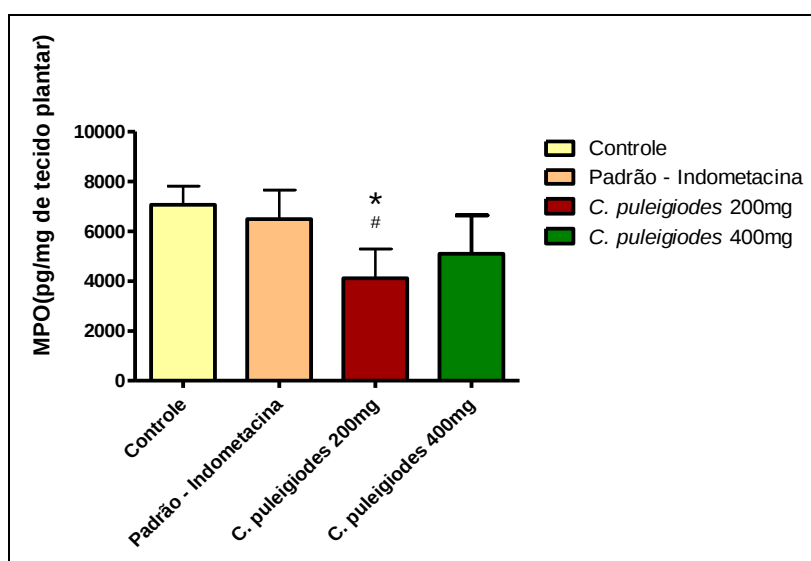


FIGURA 24: Atividade anti-inflamatória do extrato da raiz de *C. pulegioides* para a determinação da concentração de MPO no tecido plantar da pata submetida à inflamação pela carragenina.

Neste ensaio, observou-se, novamente, a atividade antiinflamatória do extrato da raiz do *C. pulegioides*. Tanto a dose de 200mg quanto a de 400mg, mostraram atividade compatíveis com a do grupo padrão. Sendo que, apenas a dose de 200mg teve diferença estaticamente significativa.

Os resultados deste ensaio corroboram para o estudo de peritonite realizado neste mesmo trabalho. Visto que nos dois a atividade antiinflamatória do extrato testado foi confirmada.

5.6 Avaliação da Atividade Citotóxica

A tabela 4 mostra o percentual de inibição celular em três linhagens de células tumorais:

Tabela 4: Percentual de inibição celular em três linhagens de células tumorais dos extratos de raiz, caule e folhas de *C. pulegioides*

	HT- 29		HEP		NCI	
Amostras	%IC	Erro	%IC	Erro	%IC	Erro
Extrato metanólico da raiz	53,2	5,2	89,48	0,31	77,8	2,4

Extrato metanólico da folha	11,9	1,1	65,1	1,43	77,0	14,4
Extrato met do caule	45,0	3,5	85,8	1,43	85,1	3,0

A citotoxicidade provavelmente se deve aos metabólitos secundários presentes nos extratos. Estudos comprovam a citotoxicidade de compostos fenólicos e terpênicos, presentes nos extratos.

De acordo com a tabela 4, observou-se que os extratos apresentaram, em sua maioria, uma alta atividade citotóxica, tendo em vista a inibição de mais de 70% do crescimento celular. As células da linhagem HT-29, foram as menos sensíveis a atividade citotóxica dos extratos, sendo o mesmo, até inativo no caso do extrato das folhas, onde a inibição foi de apenas 11,9%.

5.7 Avaliação da Atividade Microbiológica

O uso de extratos como agentes antimicrobianos apresenta um baixo risco de aumento da resistência microbiana a sua ação porque são misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade microbiana (DAFERERA *et al.* 2003).

A química do gênero *Croton* tem sido explorada e os estudos fitoquímicos efetuados têm conduzido ao isolamento de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e uma grande variedade estrutural de diterpenóides, os quais podem estar relacionados com essa atividade antimicrobiana contra diversos microorganismos (FARNSWORTH; SOEJARTO, 1991).

Através da prospecção fitoquímica dos extratos, é possível identificar a presença de diversas classes de metabólitos secundários que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas como antimicrobiana (DJIPA *et al.* 2000, ESQUENAZI *et al.* 2002), antioxidante (BARREIROS *et al.* 2006) e antitumoral (OKUDA *et al.* 1989).

A tabela 5 mostra o efeito antibacteriano dos extratos metanólicos testados contra as 11 cepas utilizadas no teste.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de *C. pulegioides*

	Concentração	Extrato Metanólico da raiz	Extrato Metanólico do caule	Extrato Metanólico das folhas
<i>E. faecalis</i> AM* 1056	100 µg/poço	0	0	0
	50 µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>E. coli</i> AM 1050	100 µg/poço	0	0	0
	50 µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AM 206	100 µg/poço	0	0	0
	50 µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>B. subtilis</i> AM 04	100 µg/poço	11	13	13
	50 µg/poço	10	12	11
	25 µg/poço	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> AM 410	100 µg/poço	0	0	0
	50 µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i> AM 245	100 µg/poço	0	15	0
	50 µg/poço	0	13	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>S. aureus</i> AM 103	100 µg/poço	14	0	0
	50 µg/poço	11	16	0

	25 µg/poço	0	12	0
<i>S. epidermidis</i> AM 235	100 µg/poço	0	15	0
	50 µg/poço	0	11	0
	25 µg/poço	0	0	0
		0		
<i>C. tropicalis</i> AM 1181	100 µg/poço	23	22	14
	50 µg/poço	19	17	12
	25 µg/poço	13	13	0
		16		
<i>C. krusei</i> AM 1168	100 µg/poço	0	0	12
	50 µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>C. albicans</i> AM 1140	100 µg/poço	23	20	13
	50 µg/poço	17	15	0
	25 µg/poço	12	12	0
		14		

*AM Código a Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas do Depto. de Farmácia da UFPE

* *Halos expressos em mm

Média dos halos do controle: Gentamicina 24 mm; Cetoconazol 23mm

Estudos anteriores relatam que o extrato do *Croton sonderianus* possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, e atividade fungicida contra *Candida albicans* (MCCHESENEY, CLARK E SILVEIRA, 1991). *C. urucurana* também já teve sua atividade antimicrobiana relatada para *diversas cepas bacterianas* (OLIVEIRA *et. al.*, 2008)

As propriedades antimicrobianas observadas podem ser devido a presença de compostos com reconhecida atividade antibacteriana presentes nos extratos do *C. pulegioides*. Os flavonóides possuem ação contra infecção

microbiana e são eficazes contra uma ampla variedade de microrganismos. (DIXON *et al.* 1983; TSUCHIYA *et al.* 1996). Terpenos e taninos também possuem comprovada ação contra fungos e bactérias (AHAMD *et al.* 1993; HO *et al.* 2001).

A maior atividade dos extratos foi contra cepas de fungos. Este resultado pode ser observado nas figuras abaixo:

5.7.1 Atividade para o extrato da raiz de *C. pulegioides*

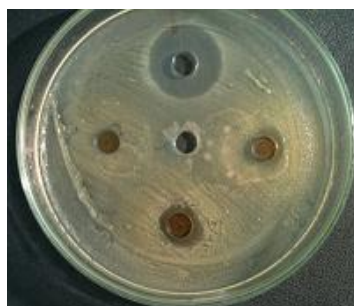
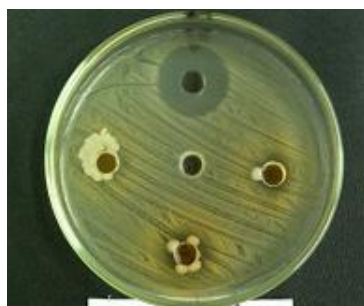
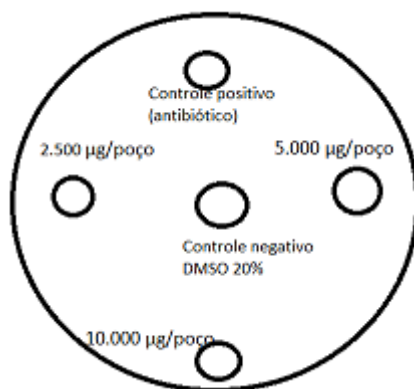


FIGURA 25: *S. aureus* **FIGURA 26:** *S. epidermidis* **FIGURA 27:** *S. saprophyticus*

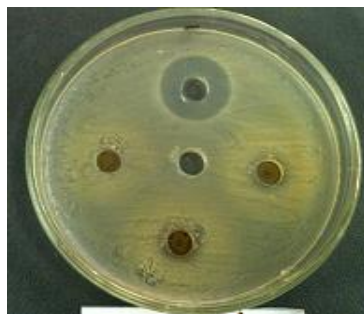


FIGURA 28: *E. faecalis*



FIGURA 29: *P. aeruginosa*

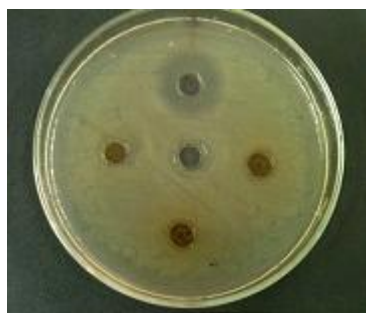


FIGURA 30: *E. coli*



FIGURA 31: *C. albicans*



FIGURA 32: *C. tropicalis*

FIGURA 33: *K. pneumoniae*

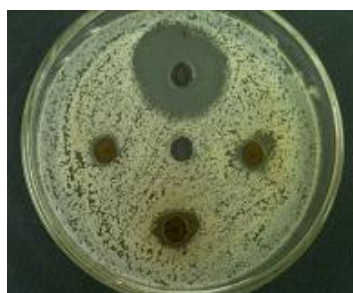


FIGURA 34: *B. subtilis*

5.7.2 Atividade para o extrato do caule de *C. pulegioides*

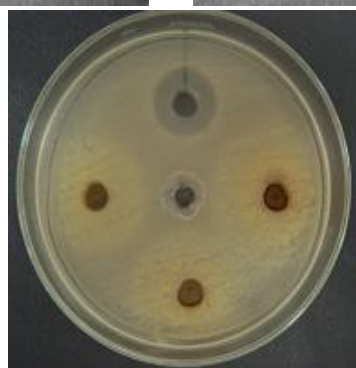
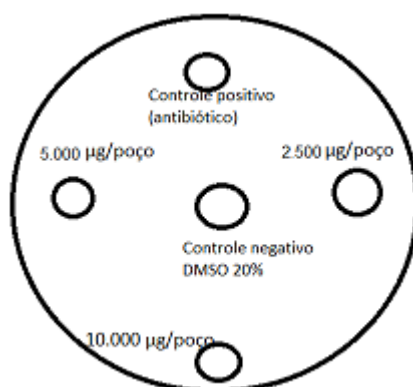


FIGURA 35: *S. aureus* **FIGURA 36: *S. epidermidis*** **FIGURA 37: *S. saprophyticus***

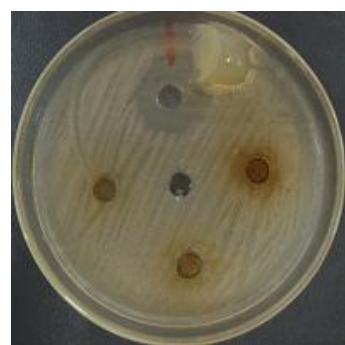
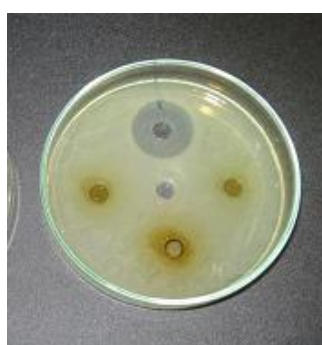
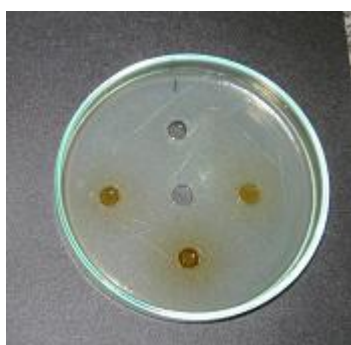


FIGURA 38: *E. faecalis* **FIGURA 39: *P. aeruginosa*** **FIGURA 40: *E. coli***

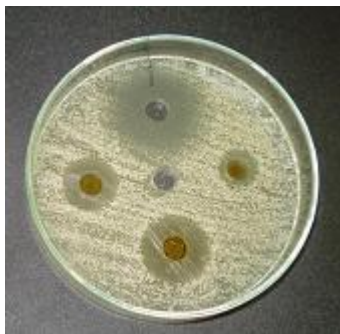


FIGURA 41: *C. albicans*

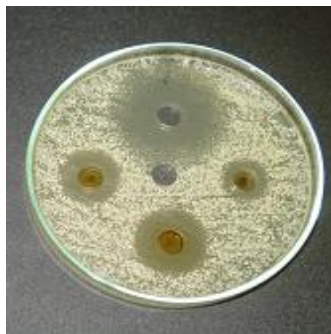


FIGURA 42: *C. tropicalis*



FIGURA 43: *K. pneumoniae*



FIGURA 44: *B. subtilis*

5.7.3 Atividade para o extrato das folhas de *C. pulegioides*

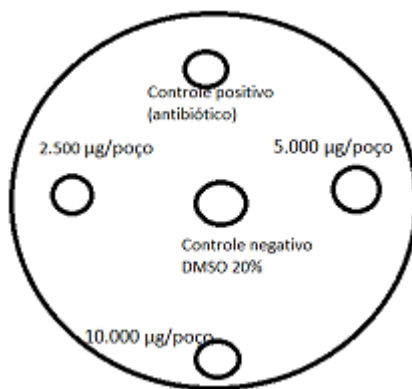


FIGURA 45: *S. aureus*

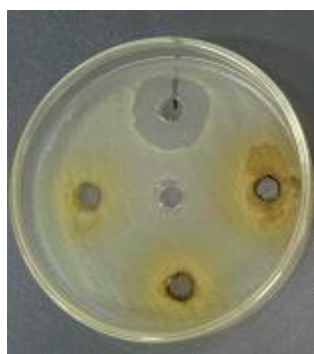


FIGURA 46: *S. epidermidis*

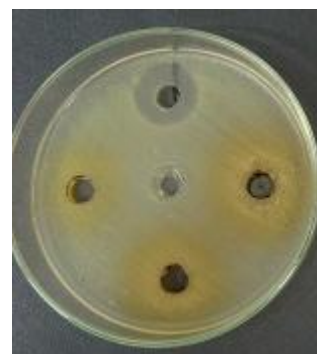


FIGURA 47: *S. saprophyticus*



FIGURA 48: *E. faecalis*

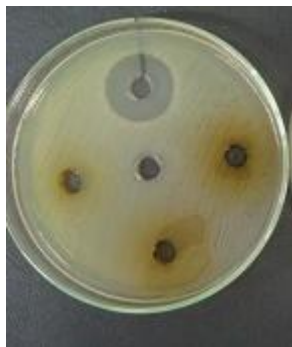


FIGURA 49: *P. aeruginosa*

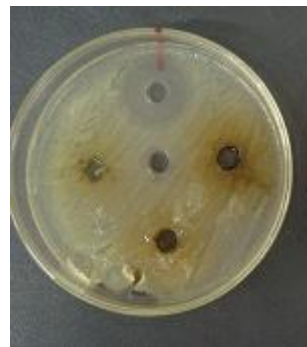


FIGURA 50: *E. coli*



FIGURA 51: *C. albicans*



FIGURA 52: *C. tropicalis*

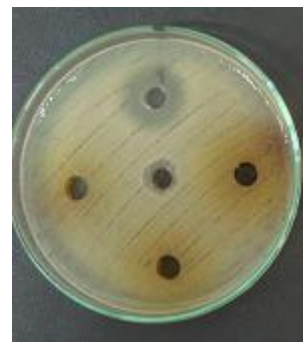


FIGURA 53: *K. pneumoniae*



FIGURA 54: *B. subtilis*

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Croton pulegioides é uma planta pouco explorada, tanto do ponto de vista químico quanto biológico, tendo apenas alguns estudos anteriores sobre sua caracterização botânica. Portanto, os estudos de fitoquímica e das atividades biológicas desta espécie são importantes e contribuem para o conhecimento de uma espécie ainda inexplorada, auxiliando na busca de novos agentes que, futuramente, possam contribuir com a terapêutica.

Nesta pesquisa, observou-se a variedade de metabólitos secundários encontrados no *Croton pulegioides*. Os componentes majoritários foram os compostos terpenóides, alcalóides e flavonóides. Em menor concentração, no caule da planta, foram encontradas proantocianidinas. Os testes foram negativos para cumarinas e saponosídeos. Os resultados para os metabólitos condizem a composição da maioria dos representantes do gênero.

A análise química do óleo essencial das folhas do *C. pulegioides* proporcionou com índice de similaridade superior ou igual a 90 com a possibilidade de se terem linalool, pinocarveol, α -terpineol, cis-sabinol, acetato de sabinyl e epóxido de felandreno, como constituintes do óleo essencial.

Foi observada ausência de toxicidade nas doses de 2000, 3000 e 4000 mg/Kg para os três extratos testados, raiz, caule e folhas, oferecendo uma grande margem de segurança para os ensaios posteriores.

A atividade anti-inflamatória, testada apenas com o extrato da raiz, mostrou significativa inibição da migração celular, no teste de peritonite; e redução do volume do edema da pata com significativa diminuição do MPO dosado, no teste de edema de pata. Também, foi observada citotoxicidade

frente as três linhagens de câncer. Sendo uma alta atividade para os extratos da raiz e do caule e atividade moderada com o extrato das folhas.

A atividade antimicrobiana dos três extratos foi confirmada para alguns dos microorganismos testados. Os resultados mais significantes foram contra as cepas de fungos do gênero *Candida*.

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, torna-se possível concluir que *Croton pulegioides* possui interessante perfil fitoquímico e biológico. Portanto, pesquisas futuras serão importantes para contribuir com o isolamento e a elucidação estrutural dos metabólitos secundários que compõem esta planta. A realização de testes biológicos com frações enriquecidas ou compostos isolados, poderá identificar quais são o grupo de metabólitos ou as moléculas responsáveis por cada atividade investigada neste trabalho, auxiliando na elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H. & GUILHON, G. M. S. P..Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var Glabrior (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica UFPA**, v.1, n.2, p. 1-9. 2001.
- ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review Immunology**. 2, 283–318. 1984.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/6_95.htm. Acessado em 20 de setembro de 2011.
- AHAMD, A.A., MAHMOUD, A.A., WILLIAMS, H.J., SCOTT, A.I., REI-BEBSPIES, J.H. & MABRY, T.J.. New sesquiterpene a-methylene lactones from the Egyptian plants *Jasonia candicans*. **Journal of Natural Products**, 56: 1276–80. 1993.
- ALVES, M. 1993. Notas sobre o gênero *Pera* Mutis (Euphorbiaceae). **Anales Jardim Botânico de Madrid** 5(1): 151-153
- ASTHANA, A., MALL, H. V. , DIXIT, K. e GUPTA S. Fungitoxic Properties of Latex of Plants with Special Reference to that of *Croton bonplandianum* Baill. **Pharmaceutical Biology**, Vol. 27, No. 1 : Pages 25-28. Gorakhpur - Índia, 1989.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17:: 444-447. 2007.
- BARBOSA, P. R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F. Benzoil-methylpolyols from *Croton* species (Euphorbiaceae). **Arkivoc** 2004:95-102. 2004.
- BARREIROS, A.L.B.S. & DAVID, J.M.. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, 29: 113-123. 2006
- BARROS, F. M. C. Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown. 162p. **Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2008.
- BARROSO, G. M.; **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol. 2.UFV. Imprensa Universitária: Viçosa, 1984, 377p.

BERRIDGE, M. V. *et al.* The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19. 1996.

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

BLACK, J. G. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 13, p. 316-347. 2002.

BLOCK S., BACCELLI C., TINANT B., VAN MEERVELT L., ROZENBERG R., HABIB JIWAN J., LLABRE`SE G, DE PAUW-GILLET M. & QUETIN-LECLERCQ J.. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry** 65: 1165-1171. 2004.

BREMNER, P.; HEINRICH, M. Natural products as modulators of the NF- κ B pathway. **Journal of Pharmacy Pharmacology**. 54: 453–472. 2002.

BRUNETON, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris: Lavoisier. 1995.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**. 33:179-189, 2000

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pubmed** 87:1:5, 2000

CALIXTO, J. B.. YUNES, R. A. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1 ed. Chapecó-SC, Argus, 523 p. 2001.

CAPASSO, A.; PIACENTE, S.; DE TOMMASI, N.; RAGUCCI, M.; PIZZA, C. Constituents of *Croton menthodor* and their effect on electrically induced contractions of the guinea-pig isolated ileum. **Phytoteraphy research** 21:78-80. 2000.

CAREY, F.A. SUNDBERG, R. J. – Advance organic Chemistry – Part B: Reactins and synthesis. **Plenum Press**, New York 1990.

CHAMPAGNE, D., KOUL O., ISMAN M. B., SCUDDER G.G. E. Towers GHN. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry** 31: 377-394.1992.

CHAO, L.K. *et al.* Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloem*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7274-8, 2005.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Antiinflammatory analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. **Fitoterapia**, v.75, p.557-65, 2004.

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

CORDELL, G. A., BEECHER, C. W. W., PEZZUTO, J. M. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p.117-33, 1991.

CORDELL, G. A.. **Pharmacognosy** - new roots for an old science. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry, V.13. Elsevier Science Publishers B.V, 1993.

COWAN, M. M.. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review.**, 2 (4), 564-82. 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, vol.17, n. 2, p. 153-163. 1999.

CRAVEIRO, A. A.; RODRIGUES, A. S.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de; MACHADO, M. I. L. Volatile Constituents of Brazilian Euphorbiaceae genus *Croton*. **Journal of nactural products** 44:602-608. 1981

CUI, W.; IWASSA, K.; TOKUDA, H.; KASHIRA, A.; MITANI, Y.; HASEGAWA, T.; NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; NISHINO, H.; HANAOKA, M.; MIKAI, C.; TAKEDA, K. Potencial cancer chempreventive activity of simple isoquinolines, 1 benziylisoquinolines, and protoberberines. **Phytochemistry** 67:70-79. 2006.

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

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N. & POLISSIOU, M.G.. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, vol. 22: 39-44. 2003.

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

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais, arte e ciência**: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DIAS, T. A. Medicinal plants in Brazil. In: **Newsletter-G Gene Banks for Medicinal & Aromatic Plants** n.7/8, pg. 4, 1995.

DIMECH, G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto de *Menta crispa*. **Dissertação de Mestrado em Fisiologia** – Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de compostos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

DIXON, R.A., DEY, P.M. & LAMB, C.J.. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. **Pubmed**. 55: 1–69. 1983

DJIPA, C.D., DELMEE, M. & QUENTIN-LECLERCQ, J. 2000. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 71: 307-313.

DORTA E. J. Introdução. In: **Escala Rural**: especial de plantas medicinais. 1(4):1-62. São Paulo: Escala Ltda; 1998.

ESQUENAZI, D. WIGG, M.D., MIRANDA, M.M.F.S, RODRIGUES, H.M., TOSTES, J.B.F., ROZENTAL, S., DA SILVA A.J. & ALVIANO, C.S. 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, 53: 647-652.

FARNSWORTH N. R., SOEJARTO, D. D. Global Importance of Medicinal Plants. In: Akerele, O, Heywood V, Syngé H, editors. **Conservation of medicinal plants**. Cambridge, UK: Cambridge University Press;. p. 25-51. 1991

FENNEL CW, LINDSEY KL, MC GAW LJ, SPARG SG, STAFFORD GI, ELGORASHI EE, GRACE OM, VAN STADEN J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacology** 94: 205-217. 2004

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Disponível: <http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf>. 2001. Acesso em 20 set. 2011.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** 21 (1): 99-104, 1998.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**. 6ed. Editora: Williams & Wilkins: Baltimore. Philadelphia, US. p. 822-845. 1996.

GAZDA, V. E. Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiococca Alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae). 164 f. **Dissertação de Mestrado Em Ciências Farmacêuticas** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004

GAYATHRI, B., MANJULA, N., VINAYKUMAR, K.S., LAKSHMI, B.S., BALAKRISHNAN, A. Pure compound from *Boswellia serrata* extract exhibits antiinflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF α , IL-1 β , NO and MAP kinases. **Int. Immunopharmacology**. 7, 473–482. 2007.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ª ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949

GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Uma abordagem em Farmácia hospitalar**. São Paulo: Atheneu, 2001.

GONÇALVES DE LIMA, COMIN J, O, GRANT H N, JACKMAN L N, KELLER-SCHIERLEIN W. Prelog V. **Helvetica Chimica Acta**, 46, 409. 1963.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G. & RADCLIFFE-SMITH, A. World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae.) v.2. Euphorbiaceae: Croton to Excoecariopsis. Royal Botanic Gardens Kew, London. 2: 417-536. 2000.

GUERRA, N.B.; MELO, E.A.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum sativum*) etheric extract. **Journal of food composition and analysis: an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems**, v.18, p.193-9, 2005.

GUERRA, A. S. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. 16 ago. 2011. PMID: 21855654.

GUPTA, D.; BLEKLEY, B.; GUPTA, R.K.. Dragons blood: botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of ethnopharmacology** 115:361-80. 2008.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesis properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.67-71, 2003.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETMANN, K. Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**, 20, p.167-169.1991.

HARBORNE, J. B.; Mann, J.; Davidson, R. S.; Hobbs, J. B.; Banthorpe, D. V.. **Natural Products: their chemistry and biological significance**. Editora: Longman Scientific & Technical, Harlow, UK. 1993, 327.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**. 3ªed. London: Chapman & Hall, 1998.

HASLAM, E. **Plant polyphenols**. 1 ed. Press syndicate of the University, of Cambridge 1989. 230 p

HAWKEY, P.M.The origins and molecular basics of antibiotic resistance. **BMJ**. 1998

317: 657-659.

HEIDLAND, A.; KLASSEN, A.; RUTKOWSKI, P.; BAHNER, U.. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**. v. 19, n. 10, p. S102-109, 2006.

HESSE, M. **Alkaloids: nature's curse or blessing?**. Zurich: Verlag Helvetica himica Acta. 2002.

HO, K.Y., TSAI, C.C., HUANG, J.S., CHEN, C.P., LIN, T.C. & LIN, C.C. 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 53: 187–91.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAMC, M. B. Analisis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 57:43-46. 1996

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química- IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003, 152 p.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012**. Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde: Rio de Janeiro, 2011.

ISHIKAWA, T.; KONDO, K.; KITAJIMA, J. Water-soluble constituents of coriander. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.91, p.32-9, 2003.

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

JANSEN, M. A. K.; GABA, V.; GREENBERG, B. M.. Higher p'lants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends Plant Sci.**, 3: 131-135. 1998.

JUDD, W.S. et al. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES. P.. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KEY, M.E., HOYER, L., BUCANA, C., HANNA, M.G. Mechanisms of macrophagemediated tumor cytolysis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 146, 265–310. 1982.

KLASSEN, et. al. Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons, 5 ed. New York: McGraw Hill, 1996.

KLUG, W. S. E CUMMINGS, M. R.. Essentials of genetics. **Prentice Hall**, 4^aed., New Jersey. 2002

LAGNIKA, L.; WENIGER, B.; VONTHRON-SENECHEAU, C.; SANNI, A. Antiprotozoal compounds isolated from *Croton lobatus* L. **Africa Journal Of Infectious Diseases** 3:1-5. 2009.

LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. **Biochemical Pharmacology** v.33, p.1525-1530, 1984.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M.de; **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões, Cláudia M. O (org) et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. cap.

LAPA AJ, SOUCCAR C., LIMA-LANDMAN M.T.R, CASTRO M.S.A, LIMA T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre. 2003.

LEME. C.L.D. **Anatomia comparada do lenho do caule, raiz e ramo de algumas espécies de Euphorbiaceae da Mata Atlântica**. São Paulo, 73p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 1994.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6. ed. Philadelphia (EUA): Lippincot Williams & Wilkins, 2008. P. 924-928.

LEMO, T. L. G, MONTE, F.J.Q., MATOS, F. J. A, ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., BARBOSA, R.C.S.B., LIMA, E.O.. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia** 63: 266-268. 1992.

LÉVI-STRAUSS, C. A ciência do concreto. In: **O pensamento selvagem**. Campinas: Papirus. P. 15-50, 1989.

LIMA, L.R. 2006. **Estudos taxonômicos em Croton seção Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax. (Euphorbiaceae)**. (Tese de doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

LIMA L.R. & PIRANI J.R.. Revisão taxonômica de *Croton* sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotrop.** 8(2):177-231. 2007.

LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.S. In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal Natural Products**, vol. 60 884-8. 1997.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology** 49:57-68. 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUCENA, M.F.A. Levantamento taxonômico da família Euphorbiaceae Juss. nos brejos de altitude de Pernambuco. Recife, 114p. **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996.

LUIZ, S. O. Caracterização da resistência de amostras de *Ainetobacter baumannii* isoladas no Hospital das Clinicas de Curitiba, 2006. **Dissertação (Mestrado em Micologia)**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C., PAMPLONA; S. G. S. R., VANDERLINDE; F. A.; LAPA, A. J.; CÓLUS, I. M. S.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; FARIAS, R. A. F.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. N.; Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal Ethnopharmacology** Vol. 70, pages 41-55. 2000.

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

MARÍN, F. R.; FRUTOS, M. J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; MARTINEZ-SANCHES, F.; DEL RÍO, J.A. Flavonoids as nutraceuticals related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed) Studies in natural products Chemistry V26. **Elsevier Science BV**. 2002

MARQUES, D. C; ZUCCHI, P. **Comissões farmacoterapêuticas no Brasil: aquém das diretrizes internacionais**. 2006. Disponível em: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102049892006000100014&lng=pt. Acesso em: 22/10/2011

MARTINS, A. P.; SLAGUEIRO, L. R. GONÇALVES, M. J., VILA, R.TOMI, F.; ADZET, T.; CUNHA, A. P.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of bark oil of *Croton Stellulifer*, an edemic species from S. Tomé e Príncipe. **Planta Medica** 66:647-650. 2000.

MAHATO, S.B., SARKAR, S.K., PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry** 27:3037–3067. 1988.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant Molluscides. Review. **Phytochemistry**, v.24, p. 639-652, 1985

MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial Diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-Secotrachylobanoic Acids. **Journal Natural. Products**, 1991, 54 (6), pp 1625–1633. Fortaleza - CE, 1991.

MELO, E.A. et al. Antioxidant activity of coriander extracts (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.195-9, 2003.

MEMELINK, J.; VERPOORTE, R.; KIJNE, J. W.; **Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism**. Trends plant sci., 6:212-219. 2001.

MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, 1999. 116p.

MIYAZAKI, S., MATSUKAWA, A., OHKAWARA, S., TAKAGI, K., YOSHINAGA, M. **Neutrophil infiltration as a crucial step for monocyte chemoattractant protein (MCP- 1) to attract monocytes in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits**. Inflamm Res 49:673–678. 2000.

MONTELLI. A. C.; SADATSUNE, T. Antibioticoterapia para o clínico. Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 2001. p. 7-53.

MORAIS S. M., CATUNDA-Jr F. E. A., SILVA A. R. A., MARTINS-NETO J. S., RONDINA D., CARDOSO J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química. Nova**. 29(5): 907-910. 2006

MOREIRA L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Rev AMRIGS** 48: 118-120. 2004

MORS, W. Plantas medicinais. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 51-54, 1982.

MORTON, A.G. 1981. **History of botanical science**: an account of the development of botany from ancient times to present day. London: Academic Press.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods** 16, 55-63.

MURAD, A.M.; KATZ, A.; *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; 1996. **Guanabara Koogan**; Rio de Janeiro, p. 41.

MURRAY, Patrick R.; PFALLER, Michael A.; KOBAYASHI, George S.; OSETHAL, Ken S. **Microbiologia médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762p.

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

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Biodiversidade**: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos, Apud: O. M. C. Simões, R. P. Schenkel, G. Gosmann, P. C. J. Mello, A. L. Mentz, P. R. Petrovick, Farmacognosia da

planta medicamento. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, 2004, 67 (2), pp 129–135

OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2.ed, São Paulo: **Atheneu**, 2003.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A.; Conhecimentos sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 36 – 41, 2006.

OLIVEIRA, I. S, LIMA; J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(4): Out./Dez. 2008

OKUDA, T., YOSHIBA, T. & HATANO, T. 1989. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Medica**, 55: 117-122.

OKUDA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v. 27, p. 124-129, 1993.

OKUDA,T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, p 507-521, 1993.

PALMEIRA-Junior, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONVERSA, L. M.; LEMOS, R. P. L.. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n.3, p.397-402. 2006

PARKY, C. M. O., Great moments in pharmacy. **Detroit: Northwood Institute Press**, 1966. 238p.

PATITUCCI, M. L., VEIGA, V.F., PINTO, A. C.; ZOGHBI, M. das G.B., SILVA, J. R. de A. , **Química Nova** 18 262 (1995).

PAUMGARTTEN et. al. Q. Comparasion of Five methods the determination of lethal dose in agude toxicity studies. **Braz. J. med. Boil. Res.**, v. 22, p. 987-991, 1989.

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

PEANA, A.T. et al. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E₂. **European Journal of Pharmacology**, v.497, n.3, p.279-84, 2004.

PETERSON, J & DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, 18(12):1995-2018. 1998.

PETTIT, R.; DIAS, R. Conversion of tetracyclic triterpenes to steroids. **Canadian Journal of Chemistry** 47: 1091-1092, 1969.

PHILIPSON, J. D. New Drugs from Nature - It could be Yew. **Phytotherapy Research** 3:2-9, 1999.

PUEBLA, P.; CORREA, S. X.; GUERRERO, M. CARRON, R.; SAN FELICANO, A. New cis-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53:328-329. 2005

RABELO, W. F. Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*). 2010. 79f. **Dissertação de Mestrado em Química** – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2010.

RANDAU K.P., FLORÊNCIO D.C., FERREIRA C.P. & XAVIER H.S.. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** 4(2): 89-96. 2004.

RANG, H. P. DALA M. M.; RITTER J. M.; MOORE P. K.. Farmacologia, 5. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2003.

RAO, R.M.; YANG, L.; GARCIA-CARDENA, G.; LUSCINSKAS, F.W.. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. **Circulation Research**. v. 101, n. 3, p. 234-247, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** 39:603-613, 2001

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIZSK, A. F... The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 94: 293-326. 1987

RÍOS, J. L.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; **Biological activity of aporphinoid alkaloids**. In: CORDELL, G. A. (Ed.) *The alkaloids*. V. 53. San Diego: Academic Press. 2000.

ROBERTSON, E.H.; CARTWRIGHT, R.A.; WOOD, D.J. J. Natural products of woody plants. **Science of Food and Agriculture**, v. 07, p. 637-640, 1957.

SALATINO A., SALATINO M.L.F. & NEGRI G.. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** 18(1): 11-33. 2007.

SANDERS, J.K.M., HUNTER, B.K. **Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists** (2nd ed) Oxford University Press, Oxford (1993).

SANTOS, I.B.V. **Síntese e atividades antiinflamatória e antinociceptiva de novas tiazolidinadionas**. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2009

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: Simões, Cláudia M. O (org) et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. cap. 15.

SCHMID-SCHNBEIN, G.W.. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v. 8, p. 93 – 151, 2006.

SCHULTES, R. E.; HOFMANN, A.; RALSCH, C.; Plantas de Los Dioses: Las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas, Fondo de Cultura Económica: San Pedro de Los Pinos, 2000.

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

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer: drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n.13, p. 1107-1112. 1990.

SEGERER, S.; SCHLÖNDORFF, D.. Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney. **Seminars in Nephrology**. v. 27, n. 3, p. 260-274, 2007.

SEELY, A.J.E.; PASCUAL, J.L.; CHRISTOU, N.V.. **Science review**: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care*. v. 7, p. 291-307, 2003.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHLEDE, E.; GENSCHOW, E.; SPIELMANN, H.; STROPP, G.; KAYSER, D. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD50 test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 15-23, 2005.

SILVA, E. C. B. Avaliação da *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae – Caesalpinioideae) Uso e Riscos, 2007. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Universidade Federal de Pernambuco.

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

SILVA, S. L. C., CARVALHO, M. G., GUALBERTO S. A., TORRES D. S. C., VASCONCELOS K. C. F., OLIVEIRA N. F.. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *croton linearifolius* mull. arg. euphorbiaceae) sobre *cochliomyia macellaria* diptera:calliphoridae). **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.4, p.252-258, 2010

SILVERSTEIN, R. M.; BASSIER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 4ª edição.; Wiley: New York, 1981; 120-121.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 1999, 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002

SIQUEIRA, J. F.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. In: *Inflamação aguda: mediadores químicos*. Ed MEDSI Ltda., São Paulo: 83-105, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.. **Botânica sistemática**. (2.Ed.) Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STEINMANN, V. W.. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae em Mexico. **Ata Botanica Mexicana. Pátzcuaro**. 61:61-93. 2002.

SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D.; YONES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological. Research**, 37, 379-84, 2004.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p.3-13.

TAYLOR, J.L.S.; STADEN, J.V. COX-1 inhibitory activity in extracts from *Eucomis Lherit*. Species. **Journal of Ethnopharmacology**, 75:257-265, 2001.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H., TUCKOVA, L., STEPANKOVA, R., HUDCOVIC, T., PALOVA- JELINKOVA, L., H., ROSSMANN, P., SANCHEZ D., CINOVA, J., HRNCU, T., KVERKA, M., FROLOVA, L., UHLIZ, H., POWRIE, F., BLAND, P. **Involvement of innate immunity in the development diseases.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 1051: 787-798. 2005.

TEXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach.** São José do Rio Preto: São José, 1994. 33p.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. Resistência Bacteriana a Droga. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. cap. 13, p. 86-89.

TSUCHIYA, H., SATO, M., MIYAZAKI, T., FUJIWARA, S., TANIGAKI, S., OHYAMA, M., TANAKA, T. & JINUMA, M. 1996. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, 50: 27–34.

UEHARA C.; JAMNIK, S.; SANTORO, I. L. Cancer de Pulmao. Simpósio: DOENÇAS PULMONARES 31: 266-276, abr./jun. 1998 Capítulo IX. Medicina, Ribeirão Preto, SP

VEIGAS, JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova** 28(3): 519-528.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. Secondary plants metabolites. London: The MacMillan press Ltd. 1981.

VIEGAS, JR. C., REZENDE A., SILVA D.H.S., CASTRO-GAMBÔA I., BOLZANI V.S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Quim Nova** 2006; 29(6):1279-86.

VIGIL, S. V. G. **Estudo do Tacrolimus sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos.** Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2006

VOLTARELLI, Júlio C. **Febre e inflamação.** Medicina, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas. 2ªed.** Berlim: Springer-Verlag, 1996.

WANIKIAT, P. et al. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.234-44, 2008.

XAVIER, H.S. **Lavandula stoechas L. (Lamiaceae): Estude Botanique, Chimique et Pharmacodynamique.** Tese de Doutorado, Université de Montpellier I (FR), 250 p., 1988

ZHANG C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Res Cardiol.** 103 (5): 398-406, 2008.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, v.43, p.50-1, 1998.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W. & SHIMIZU, M.. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytotherapy Research.** Vol.11:446-450. 1997.

ANEXO A - Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Bail. (Zabelê)

Arrais LG¹; Lyra HFS¹; Batista DCA³; Coutinho FN³; Saraiva AM³; Pisciotano MNC³; Xavier HS²; Melo SJ^{1*}

¹ Laboratório de Síntese e Química de Produtos Naturais, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Av. Prof Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária 54740-521 - Recife - PE, Brasil

² Laboratório de Farmacognosia do Depto. de Ciência Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Av. Prof Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária 54740-521 - Recife - PE, Brasil

³ Laboratório de Análises Microbiológicas do Depto. De Ciências Farmacêuticas da Universidade de Pernambuco (UFPE) - Av. Prof Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária 54740-521 - Recife - PE, Brasil

* Corresponding author: melosebastiao@yahoo.com.br

RESUMO

O uso popular de plantas medicinais continua sendo de grande importância para a população, principalmente em países em desenvolvimento, nos quais o acesso à medicina alopática ainda é muito restrito. Assim, além de sua importância na medicina tradicional, o conhecimento das plantas pode fornecer para a indústria farmacêutica, direta ou indiretamente, princípios ativos

de interesse farmacêutico. No presente trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos de *Croton pulegioides* nas concentrações de 100, 50 e 25µg/mL frente a cepas de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, utilizando a técnica de difusão em Agar, pelo qual evidenciou-se halos de inibição para: *Bacillus subtilis* AM 04, *Staphylococcus epidermidis* AM 235 *Staphylococcus saprophyticus* AM 245, *Candida tropicalis* AM 1181, *Candida albicans* AM 1140.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas medicinais, *Croton pulegioides*, Antimicrobiano

ABSTRACT

The popular use of medicinal plants is still of great importance for the population, especially in developing countries, where access to allopathic medicine is still very restricted. Thus, besides its importance in traditional medicine, the knowledge of plants can provide for the pharmaceutical industry, directly or indirectly, active pharmaceutical interest. The present study evaluated the antimicrobial activity of extracts from *Croton pulegioides* at concentrations of 100, 50 and 25µg/mL against strains of Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria and fungi using the agar diffusion technique, which evidenced inhibition zones for: 04 AM *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* AM 235 AM 245, AM 1181 *Candida tropicalis*, *Candida albicans* AM 1140.

KEYWORDS: Medicinal plants, *Croton pulegioides*, Antimicrobial

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é feito desde a antiguidade e o conhecimento sobre as suas propriedades representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. As observações populares contribuem para a divulgação destes vegetais, pelos efeitos medicinais que produzem; apesar de, geralmente, não terem seus constituintes químicos conhecidos, mas tornando válidas informações que são acumuladas ao longo dos anos Maciel et al. (2002).

Apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado. Sendo assim, pesquisa com plantas medicinais tem sido considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas. Logo, a ampliação da produção científica referente a plantas medicinais é de grande importância, para comprovação de suas atividade farmacológicas, bem como para o conhecimento de suas propriedades toxicológicas Calixto (2000); Barros (2008).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, possuindo numerosas espécies produtoras de substâncias bioativas. Com uma área territorial de 8,5 milhões de quilômetros quadrados e vários biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga), apresenta uma grande diversidade de solos e climas que favorece a riqueza e variedade de tipos de vegetação e espécies de flora distribuída nos diversos ecossistemas brasileiros Dias (1995). Da mata atlântica do estado de Pernambuco são mencionadas numerosas espécies de plantas que produzem substâncias curativas. Até o momento, essas plantas são apenas parcialmente estudadas do ponto de vista taxonômico, químico, fisiológico e poder bioativo de suas moléculas.

Croton pulegioides, pertence à família Euphorbiaceae, que compreende cerca de 320 gêneros e 8700 espécies Steinmann (2002), sendo conhecido popularmente como Zabelê. Não há registros na literatura sobre estudos fitoquímicos ou biológicos desta espécie. O gênero *Croton* é representado por árvores, arbustos e ervas, difundidos em zonas tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia Govaerts (2000).

A química do gênero *Croton* é diversa, fato que qualifica o grupo como altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias naturais farmacologicamente ativas, sendo, por este motivo, alvo de pesquisas tanto em estudos fitoquímicos como para testes de suas atividades biológicas Randau (2004). A composição química das espécies *Croton* é rica em metabólitos secundários, como os alcalóides, flavonóides e terpenóides Rizsck(1987); Payo et al. (2001). Além destes metabólitos, muitas das espécies de *Croton* produzem óleos essenciais ricos em mono e sesquiterpenóides, além de fenilpropanóides Palmeira et al. (2006).

No uso popular, as espécies do *Croton* são utilizadas na preparação de chás e infusões, para o alívio de dores Abreu (2001), tratamento de distúrbios digestivos como: constipações e diarreias; usadas também como antiinflamatórios e antiulcerogênicos, analgésicos, antidiabéticos e antimaláricos. Além disso, segundo Moraes, 2006, três espécies originárias do Ceará (*C. zenhtneri*, *C. nepetaefoliuse* *C. argyrophylloides*) foram recentemente confirmadas como antioxidantes devido à atuação de sete diferentes constituintes de seus óleos essenciais. Outras espécies de *Croton*, também já tiveram suas atividades avaliadas e confirmadas através de estudos, como por exemplo temos o *C. lechleri*, para o qual foi descoberta atividade antioxidante,

antimicrobiana e antiviral Gupta, et. al. (2008). O gênero *Croton* possui muitas espécies com atividades antimicrobianas. Como exemplo, podemos citar uma substância que foi isolada do caule de *C. jacobinensis Baill*, com ação sobre cepas de *Neisseria*, *Nocardia* e *Brucella* Lima, et. al. (2001).

Não obstante o que antecede, estudos sobre este gênero ainda são escassos, o presente trabalho buscou a ampliação do conhecimento sobre uma espécie ainda não estudada, visto que as outras espécies do gênero apresentam uma expressiva importância terapêutica e econômica.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

O *Croton pulegioides* foi coletado no município de Gravatá, PE, Brasil, num período compreendido entre novembro de 2010 e setembro de 2011. O material botânico foi identificado pela Prof^a Dr^a. Rita de Cássia Araújo Pereira – curadora do Herbário – IPA.

Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados a partir da raiz, caule e folhas do *C. pulegioides*, usando respectivamente 20g , 70g e 50g do vegetal seco. O material vegetal, seco e moído, foi submetido a uma extração por percolação, usando metanol como solvente. Após a primeira extração, o solvente foi filtrado e o procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes. A solução obtida foi destilada à pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se como rendimento 16% para o extrato bruto seco extrato da raiz, 9% para o

extrato bruto seco extrato das folhas e 10% para o extrato bruto seco extrato do caule.

Microorganismos

Na determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas pertencentes a Coleção de Cultura do Laboratório de Análises Microbiológicas/ Depto. de Ciências Farmacêuticas, das quais 8 bactérias: *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus epidermidis* AM 235, *Staphylococcus saprophyticus* AM 245, *Enterococcus faecalis* AM 1056, *Pseudomonas aeruginosa* AM 206, *Escherichia coli* AM 1050, *Klebsiella pneumoniae* AM 410, *Bacillus subtilis* AM 04 e três cepas de fungos: *Candida krusei* AM 1168, *Candida tropicalis* AM 1181, *Candida albicans* AM 1140.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato seco metanólico de *C. pulegioides* foi determinada pela metodologia de Técnica de Poços – Difusão em Agar. No teste, as culturas foram preparadas a partir de colônias isoladas das cepas reativadas suspensas em 1mL de solução salina. A turvação da suspensão microbiana foi padronizada comparando com a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL). Após, alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana foi semeada na superfície das placas com Agar Mueller Hinton para bactérias e Agar Sabouraud para fungos, com o auxílio de um swab estéril, realizando com um perfurador cinco orifícios de 6-7 mm por placa, três dos quais foi adicionado o extrato diluído em DMSO 20% nas seguintes concentrações: 10.000 µg/poço, 5.000 µg/poço e 2.500 µg/poço (volume de um poço = 100 µL); num quarto

poço foi agregado o antibiótico padrão (Gentamicina 10 µg/poço para bactérias e Cetoconazol 30 µg/poço para fungos) e num quinto poço, o controle do solvente, DMSO 20%. Nas placas de bactérias, o antibiótico padrão Gentamicina foi adicionado na concentração de 10 µg/poço; nas placas de fungos, o antibiótico padrão Cetoconazol foi adicionado na concentração de 30 µg/poço. As placas foram incubadas por 18 horas à 37°C ± 1°, medindo-se os halos de inibição produzidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobianas de alguns metabólitos secundários de plantas tem sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente Jansen, et. al (1987).

Tendo em vista o problema da resistência das bactérias a múltiplos antimicrobianos, é de interesse o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas e a busca por substâncias derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos Coelho et. al. (2004). O interesse pelas plantas é devido em parte a grande variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabolitos secundários, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides e compostos fenólicos, os quais, muitos deles, possuem potente atividade antimicrobiana já demonstradas por pesquisas Nascimento (2000).

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *C.pulegioides* são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de *C.pulegioides*

Microorganismos	Concentração	Extrato seco Metanólico da raiz	Extrato seco Metanólico do caule	Extrato seco Metanólico das folhas
<i>E. faecalis</i> AM* 1056	100µg/poço	0**	0	0
	50µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>E. coli</i> AM 1050	100µg/poço	0	0	0
	50µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AM 206	100µg/poço	0	0	0
	50µg/poço	0	0	0
	25µg/poço	0	0	0
<i>B. subtilis</i> AM 04	100µg/poço	11	13	13
	50µg/poço	10	12	11
	25 µg/poço	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> AM 410	100 µg/poço	0	0	0
	50µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i> AM 245	100 µg/poço	0	15	0
	50µg/poço	0	13	0
	25µg/poço	0	0	0
<i>S. aureus</i> AM	100µg/poço	14	0	0

103	50µg/poço	11	16	0
	25µg/poço		12	0
<i>S. epidermidis</i> AM 235	100µg/poço	0	15	0
	50µg/poço	0	11	0
	25µg/poço	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> AM 1181	100µg/poço	23	22	14
	50µg/poço	19	17	12
	25µg/poço	16	13	0
<i>C. krusei</i> AM 1168	100µg/poço	0	0	12
	50µg/poço	0	0	0
	25 µg/poço	0	0	0
<i>C. albicans</i> AM 1140	100 µg/poço	23	20	13
	50µg/poço	17	15	0
	25µg/poço	14	12	0

*AM Código a Coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas do Depto. de Farmácia da UFPE

* *Halos expressos em mm

A média dos halos de inibição para o Antibiótico padrão Gentamicina foi 24mm; para o Cetoconazol foi 23mm

O estudo fitoquímico indica que o gênero *Croton* apresenta em sua composição alcalóides, flavonóides, triterpenóides e uma grande variedade estrutural de diterpenóides, os quais podem estar relacionados com essa

atividade antimicrobiana contra diversos microorganismos Farnsworth & Soejarto (1991).

Estudos anteriores relatam que o extrato do *Croton sonderianus* possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e atividade fungicida contra *Candida albicans* Mcchesney, et. al(1991). *C. urucurana* também já teve sua atividade antimicrobiana relatada para diversas cepas bacterianas Oliveira et. al. (2008).

As propriedades antimicrobianas observadas podem ser devido assim a presença de compostos com reconhecida atividade antimicrobiana presentes nos extratos do *C. pulegioides*. Os flavonóides possuem ação contra infecção microbiana e são eficazes contra uma ampla variedade de microorganismos Dixon et al. (1983); Tsuchiya et al. (1996). Terpenos e taninos também possuem comprovada ação contra fungos e bactérias Ahamd et al. (1993); Ho et al. (2001).

Conclusão

A determinação da atividade antimicrobiana da espécie *C.pulegioides* indicou que os maiores halos de inibição foram frente aos fungos e às bactérias Gram-positivas. Esta diferença de atividade antimicrobiana pode estar relacionada não só a atividade biológica dos produtos testados, como também devido à presença da estrutura da membrana externa das bactérias Gram-negativas, que pode impedir a passagem de moléculas França et al.(2009), além de particularidades relacionadas aos diferentes mecanismos de resistência das linhagens em estudo.

Os resultados obtidos pelo presente trabalho sugerem que a espécie *C. pulegioides* apresenta resultados promissores em relação ao potencial antimicrobiano. Este estudo fornece os primeiros relatos de resultados que demonstram uma ação antimicrobiana do extrato metanólico seco de *C. pulegioides*. Entretanto, são necessários outros estudos com o intuito de corroborar e assegurar os resultados aqui encontrados, assim como para melhorar e caracterizar as atividades biológicas desta espécie.

Referências

- Abreu, A. S.; Barbosa, P. S.; Müller, A. H. & Guilhon, G. M. S. P. 2001. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica UFPA**, v.1, n.2, p. 1-9.
- Ahamd, A.A., Mahmoud, A.A., Williams, H.J., Scott, A.I., Reibebspies, J.H. & Mabry, T.J. 1993. New sesquiterpene α -methylene lactones from the Egyptian plants *Jasoniacandicans*. **Journal of Natural Products**, 56: 1276–80.
- NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada - M2-A8. 8. ed. USA: NCCLS, 2003. 58 p.
- Barros, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de Lippia Alba (MILL.) N. E. Brown.** 2008. 162p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**. 33:179-189, 2000

Coelho, G. S.; Haas, A. P. S.; Von, G. P. L.; Schapoval, E.E.S.; Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**,v. 90:: 135-143. 2004.

Dias, T. A. Medicinal plants in Brazil. *In: Newsletter-G Gene Banks for Medicinal & Aromatic Plants*n.7/8, pg. 4, 1995.

Dixon, R.A., Dey, P.M. & Lamb, C.J. 1983.Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, 55: 1–69.

Farnsworth, N. R. & Soejarto, D.D. Global Importance of Medicinal Plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds). **Conservation of medicinal plants**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 25-51, 1991.

França, H.S. et al. Atividade antibacteriana de floroglucinóis e de extrato hexânico de *Hypericumbrasiliense* Choysi. **Química Nova**, v.32, p.1103-6, 2009.

Govaerts, R.; Frodin, D.G. & Radcliffe-smith, A. 2000.*Croton*. In: World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae.) Royal Botanic Gradens Kew, Lodon. 2: 417-536.

Gupta, D.; Blekley, B.; Gupta, R.K. 2008.Dragons blood: botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of ethnopharmacology**115:361-80.

Ho, K.Y., Tsai, C.C., Huang, J.S., Chen, C.P., Lin, T.C. & Lin, C.C. 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 53: 187–91.

Jansen A.M., Scheffer J.J.C., Baerheim S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie**.v 45:: 70. 1987.

Lima, E. O., 2001. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). *Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna*. Chapecó: ARGOS, 483-501.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A.C.; Veiga J., V.F.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25:: 429-438. 2002.

Mcchesney, J. D.; Clark, A. M.; Silveira, E. R. Antimicrobial Diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-Secotrachylobanoic Acids. **Journal Natural Products**, 1991, 54 (6), pp 1625–1633. Fortaleza -CE, 1991.

Morais S. M., Catunda-Jr F. E. A., Silva A. R. A., Martins-Neto J. S., RondinaD., Cardoso J. H. L. (2006) Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química. Nova**. 29(5): 907-910.

Nascimento, G. G. F.; Locatelli, J.; Freitas, P. C.; Silva, G. L. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31:: 247-256. 2000.

Oliveira, I. S, Lima; J. C. S.; Silva, R. M.; Martins, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(4): Out./Dez. 2008.

Palmeira, Jr., S. F.; Alves, F. S. M.; Vieira, L. F. A.; Conversa, L. M.; Lemos, R. P. L. 2006. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v. 16, n.3, p.397-402

Payo, H. A.; Dominicis, M. E.; Mayor, J.; Oquendo, M. & Sarduy, R.. 2001. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**. 35: 203-206.

Randau K.P., Florêncio D.C., Ferreira C.P. & Xavier H.S.. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 4(2): 89-96. 2004.

Rizsk, A. F.. 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 94: 293-326.

Steinmann, V. W..Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae em Mexico. **Ata Botanica Mexicana. Pátzcuaro**. 61:61-93. 2002.

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. & Jinuma, M. 1996.Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, 50: 27–34.



ISSN 1516-0572
ISSN on line 1983-084X

REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Brazilian Journal of Medicinal Plants

Fundação do Instituto de Biociências - FUNDIBIO

Homepage: <http://www.ibb.unesp.br/rbpm>

Campinas, 07 de maio de 2012

Ilm^oSr.

Sebastião José de Melo

Prezado Senhor,

Temos a grata satisfação de acusar o recebimento, em 07/05/2012, do artigo **Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê)** de autoria Arrais LG¹; Lyra HFS¹; Batista DCA³; Coutinho FN³; Saraiva AM³; Pisciotano MNC³; Xavier HS²; Melo SJ¹.

O qual recebeu o protocolo nº 12/033. Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães

Editor Chefe

Revista Brasileira de Plantas Medicinais

Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais

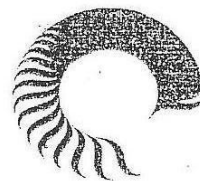
rbpm.sbp@gmail.com



Scientific Electronic Library Online

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 08 de março de 2012

Ofício 415/12

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Sebastião José de Melo**
Departamento de Antibióticos - UFPE
Processo nº 23076.052300/2011-57

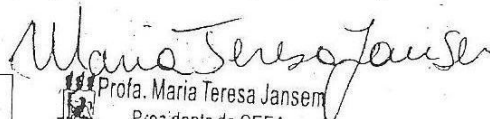
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: "*Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica e antimicrobiana de Croton pulegioides Baill (euphorbiaceae).*"

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

Observação: Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos (aquisição e manutenção) - UFPE; Animais: Camundongos, Linhagem: Camundongos Albinos Swiss (Mus musculus); Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: 60 dias; Peso: 30g; Nº de Animais previsto no projeto: 24 animais.

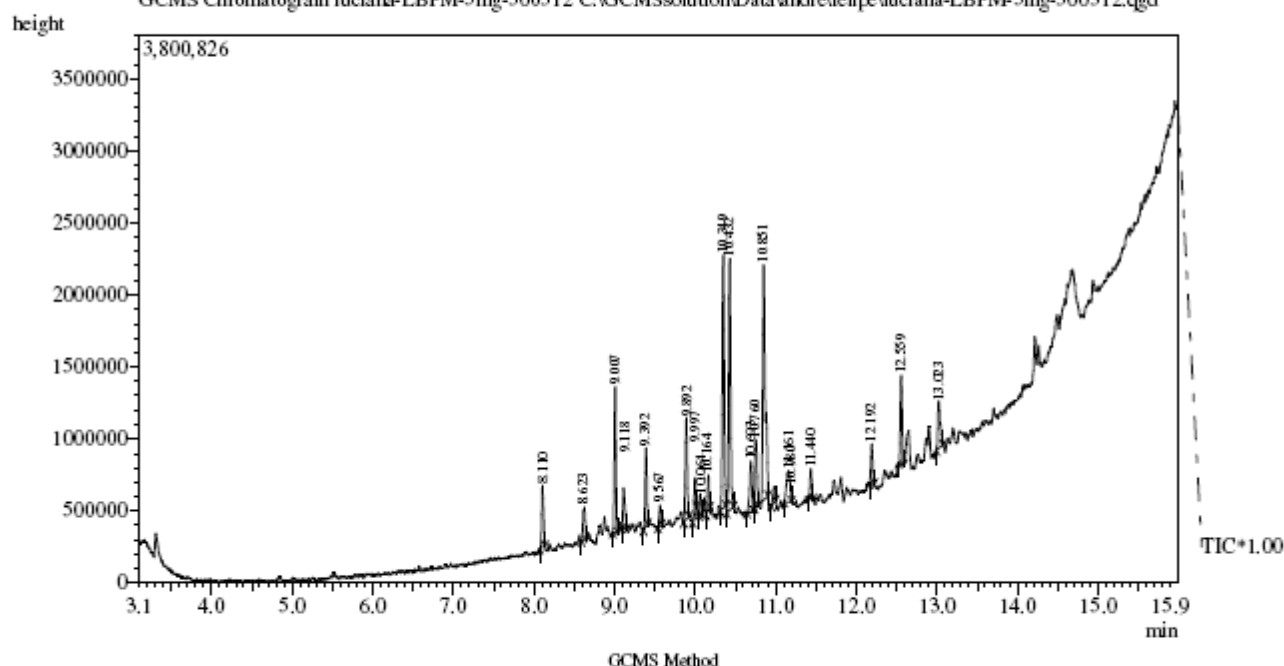


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
LABORATÓRIO DE CG/EM - GRUPO DE BIOINORGÂNICA
SISTEMA GC/MS - SHIMADZU QP2010

GCMS Sample Information

Sample Name : luciana-LBPM-5mg-300312
Operator : Admin
Acquisition Date : 30/3/2012 09:37:27
Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project\andreestereis271010.qgm
Tuning File : C:\GCMSsolution\System1\Tuning\HPA-2-280312.qgt
Modified : 30/3/2012 09:53:27

GCMS Chromatogram luciana-LBPM-5mg-300312 C:\GCMSsolution\Data\andre\felipe\luciana-LBPM-5mg-300312.qgd



Column Information: OV-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film)
Inj. Initial Temp.: 25.00 °C Interface Temp.: 230.00 °C Control Mode: Split Column Inlet Pressure: 100.0 kPa
Column Flow: 1.7 mL/min Linear Velocity: 47.4 cm/sec Split Ratio: 27 Total Flow: 50.0 mL/min Equilibrium Time: 1.00 min
Oven Temp. Program: Rate Temperature(°C) Keep Time(min)
- 50.0 0.00

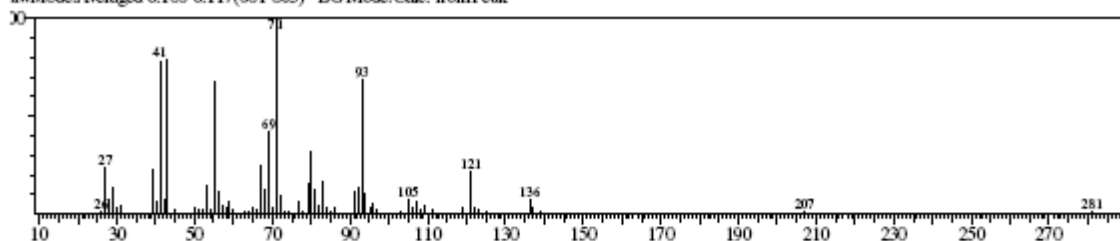
GCMS Peak Report TIC

Peak#	R.Time	LTime	Area	Height	A/H	Mark	Name	Base m/z	Area%	Int%
1	8.110	8.075	563427	426585	1.31	MI		71.05	2.69	3.66
2	8.623	8.592	374181	234272	1.59	MI		55.10	1.79	2.01
3	9.007	8.975	1402141	1010968	1.38	MI		59.10	6.69	8.67
4	9.118	9.092	408357	278833	1.47	MI		92.10	1.95	2.39
5	9.392	9.358	820950	550759	1.48	MI		92.05	3.92	4.72
6	9.567	9.542	214655	147167	1.44	MI		67.10	1.02	1.26
7	9.892	9.858	1165407	704571	1.64	MI		43.10	5.56	6.04
8	9.997	9.967	362669	239766	1.49	MI		43.10	1.73	2.06
9	10.064	10.042	203734	146356	1.39	MI		43.10	0.97	1.25
10	10.164	10.133	359912	242646	1.47	MI		70.05	1.72	2.08
11	10.349	10.308	2990883	1752515	1.70	MI		43.05	14.27	5.03
12	10.432	10.392	2970467	1743285	1.70	MI		43.10	14.17	4.95
13	10.693	10.642	746493	351544	2.12	MI		71.10	3.56	3.01
14	10.760	10.733	801697	461944	1.73	MI		71.10	2.96	1.85
15	10.851	10.733	4360953	1629147	2.67	MI		98.05	20.81	3.97
16	10.980	10.950	167815	111547	1.49	MI		98.05	0.80	0.96
17	11.161	11.108	620445	215630	2.88	MI		41.10	2.96	1.85
18	11.440	11.417	302513	199801	1.52	MI		93.10	1.44	1.71
19	12.192	12.167	405808	272123	1.49	MI		59.05	1.94	2.33
20	12.559	12.525	971886	617493	1.57	MI		43.10	4.64	5.29
21	13.023	12.992	742852	325351	2.27	MI		43.05	3.54	2.79
			20957245	11662303					100.00	100.00

GCMS Library

< Target >>

ine#1 R.Time: 8.108(Scan#:602) MassPeaks:78 BasePeak:71.05(40032)
 awlMode:Averaged 8.100-8.117(601-603) BG Mode:Calc. from Peak



it#1 Entry:31713 Library:WILEY229.LIB

f95 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 cmpName:LINALOL\$\$

it#2 Entry:31232 Library:WILEY229.LIB

f95 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 cmpName:Linalcol \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (CAS) Linalol \$.beta.-Linalcol \$\$ Linahyl alcohol \$\$ 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol \$\$

it#3 Entry:31233 Library:WILEY229.LIB

f94 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 cmpName:Linalcol \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (CAS) Linalol \$.beta.-Linalcol \$\$ Linahyl alcohol \$\$ 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol \$\$

it#4 Entry:31656 Library:WILEY229.LIB

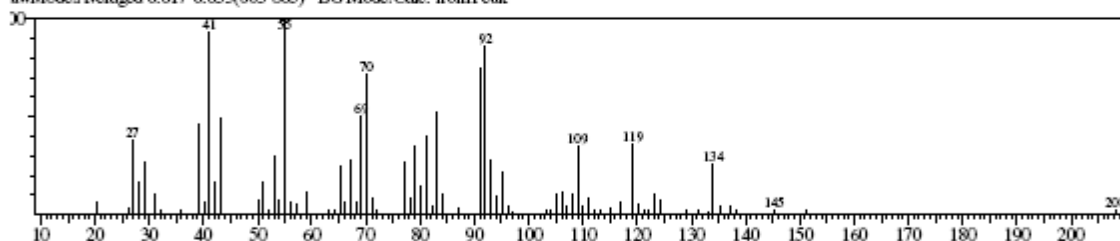
f94 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 cmpName:L-LINALOL\$\$

it#5 Entry:31234 Library:WILEY229.LIB

f94 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 cmpName:Linalcol \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (CAS) Linalol \$.beta.-Linalcol \$\$ Linahyl alcohol \$\$ 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol \$\$

< Target >>

ine#2 R.Time: 8.625(Scan#:664) MassPeaks:81 BasePeak:55.10(15418)
 awlMode:Averaged 8.617-8.633(663-665) BG Mode:Calc. from Peak



it#1 Entry:29949 Library:WILEY229.LIB

f92 Formula:C10 H16 O CAS:547-61-5 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:trans-Pinocarveol \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)]- (CAS) l-Pinocarveol \$\$ l-trans-Pinoc

it#2 Entry:29950 Library:WILEY229.LIB

f91 Formula:C10 H16 O CAS:547-61-5 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:trans-Pinocarveol \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)]- (CAS) l-Pinocarveol \$\$ l-trans-Pinoc

it#3 Entry:29947 Library:WILEY229.LIB

f90 Formula:C10 H16 O CAS:1820-09-3 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:trans-Verbenol \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)- (CAS) 2-Pinen-4-ol, trans- \$\$

it#4 Entry:29951 Library:WILEY229.LIB

f90 Formula:C10 H16 O CAS:547-61-5 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:trans-Pinocarveol \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)]- (CAS) l-Pinocarveol \$\$ l-trans-Pinoc

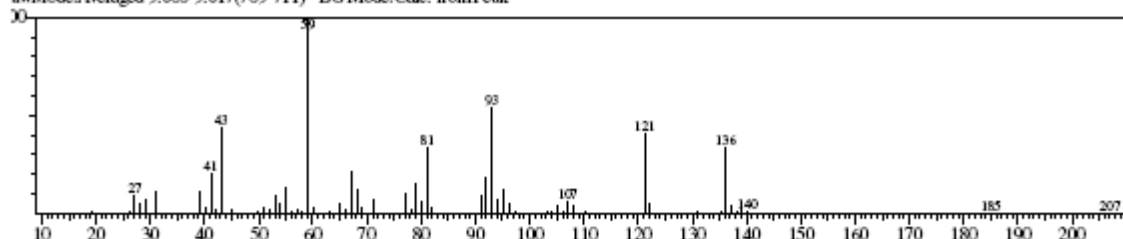
it#5 Entry:29954 Library:WILEY229.LIB

f87 Formula:C10 H16 O CAS:5947-36-4 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene- (CAS) 2(10)-Pinen-3-ol \$\$ Pinocarveol \$\$ 10-Pinen-3-ol \$\$

< Target >>

In# 3 R.Time:9.008(Scan#:710) MassPeaks:84 BasePeak:59.10(132084)

AcqMode:Averaged 9.003-9.017(709-711) BG Mode:Calc. from Peak



In# 1 Entry:31345 Library:WILEY229.LIB

E96 Formula:C10 H18 O CAS:98-55-5 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-, (CAS) CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(2-PROPANOL-2-YL)- \$\$ 4-(1-HYDROXY-1-M

In# 2 Entry:76231 Library:WILEY229.LIB

E96 Formula:C13 H22 O2 CAS:144-39-8 MolWeight:210 RetIndex:0

cmpName:Linalyl propionate \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, propionate (CAS) linalyl propionate \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, propionate \$\$

In# 3 Entry:31354 Library:WILEY229.LIB

E95 Formula:C10 H18 O CAS:10482-56-1 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:1-.alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-, (S)- (CAS) (-)-.alpha.-Terpineol \$\$.alpha.-Terpineol, (-)- \$\$ p-Ment

In# 4 Entry:31714 Library:WILEY229.LIB

E94 Formula:C10 H18 O CAS:98-55-5 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:.alpha.-TERPINEOL \$\$

In# 5 Entry:31357 Library:WILEY229.LIB

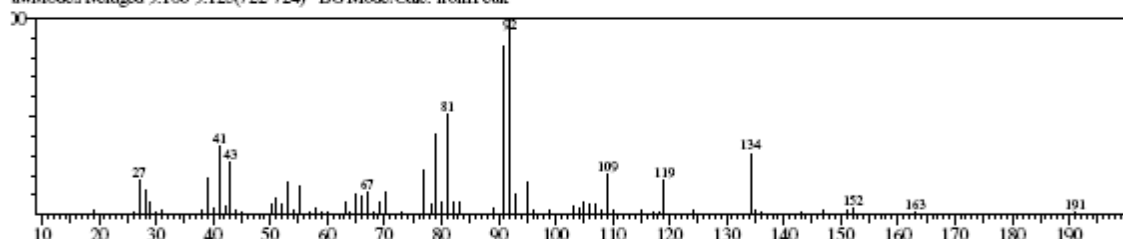
E93 Formula:C10 H18 O CAS:10482-56-1 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:1-.alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-, (S)- (CAS) (-)-.alpha.-Terpineol \$\$.alpha.-Terpineol, (-)- \$\$ p-Ment

< Target >>

In# 4 R.Time:9.117(Scan#:723) MassPeaks:79 BasePeak:92.10(31123)

AcqMode:Averaged 9.108-9.125(722-724) BG Mode:Calc. from Peak



In# 1 Entry:62046 Library:WILEY229.LIB

E91 Formula:C12 H18 O2 CAS:3536-54-7 MolWeight:194 RetIndex:0

cmpName:Sabinyl acetate \$\$ Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, acetate (CAS) 4(10)-Thujen-3-ol, acetate \$\$

In# 2 Entry:29806 Library:WILEY229.LIB

E90 Formula:C10 H16 O CAS:3310-02-9 MolWeight:152 RetIndex:0

cmpName:CIS-SABINOL \$\$ Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)- (CAS) (-)-cis-Sabinol \$\$ 4(10)-Thujen-3-

In# 3 Entry:29887 Library:WILEY229.LIB

E88 Formula:C10 H16 O CAS:72138-69-3 MolWeight:152 RetIndex:0

cmpName:A-PHELLANDRENE EPOXIDE \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, monooxepoxide (CAS) 5-ISOPROPYL-2-METHYL-1,3-CYC

In# 4 Entry:29807 Library:WILEY229.LIB

E86 Formula:C10 H16 O CAS:471-16-9 MolWeight:152 RetIndex:0

cmpName:Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3.beta.,5.alpha.)]- (CAS) Sabinol \$\$ cis-Sabinol \$\$ Sabinol, (+) \$\$ 4(10)-

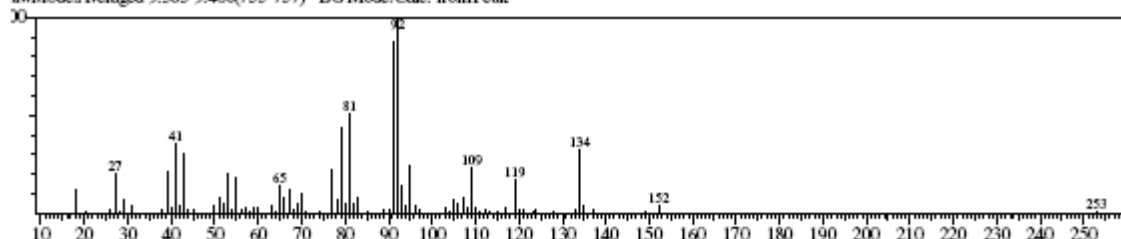
In# 5 Entry:29808 Library:WILEY229.LIB

E81 Formula:C10 H16 O CAS:471-16-9 MolWeight:152 RetIndex:0

cmpName:Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3.beta.,5.alpha.)]- (CAS) Sabinol \$\$ cis-Sabinol \$\$ Sabinol, (+) \$\$ 4(10)-

< Target >>

ine# 5 R.Time:9.392(Scan#:756) MassPeaks:87 BasePeak:92.05(57178)
 awMode:Averaged 9.383-9.400(755-757) BG Mode:Calc. from Peak



it# 1 Entry:29806 Library:WILEY229.LIB
 f92 Formula:C10 H16 O CAS:3310-02-9 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:CIS-SABINOL \$\$ Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)- (CAS) (-)-cis-Sabinol \$\$ 4(10)-Thujen-3-

it# 2 Entry:62046 Library:WILEY229.LIB
 f92 Formula:C12 H18 O2 CAS:3536-54-7 MolWeight:194 RetIndex:0
 cmpName:Sabinyl acetate \$\$ Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, acetate (CAS) 4(10)-Thujen-3-ol, acetate \$\$

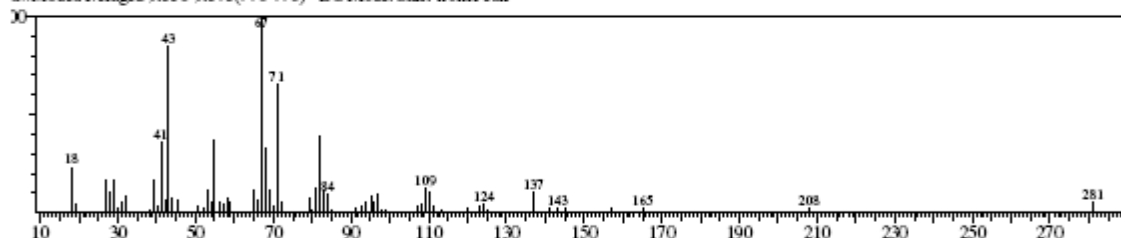
it# 3 Entry:29887 Library:WILEY229.LIB
 f90 Formula:C10 H16 O CAS:72138-69-3 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:A-PHELLANDRENE EPOXIDE \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, monooxide (CAS) 5-ISOPROPYL-2-METHYL-1,3-CYC

it# 4 Entry:29807 Library:WILEY229.LIB
 f86 Formula:C10 H16 O CAS:471-16-9 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3.beta.,5.alpha.)]- (CAS) Sabinol \$\$ cis-Sabinol \$\$ Sabinol, (+) \$\$ 4(10)-

it# 5 Entry:29808 Library:WILEY229.LIB
 f83 Formula:C10 H16 O CAS:471-16-9 MolWeight:152 RetIndex:0
 cmpName:Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3.beta.,5.alpha.)]- (CAS) Sabinol \$\$ cis-Sabinol \$\$ Sabinol, (+) \$\$ 4(10)-

< Target >>

ine# 6 R.Time:9.567(Scan#:777) MassPeaks:71 BasePeak:67.10(16344)
 awMode:Averaged 9.558-9.575(776-778) BG Mode:Calc. from Peak



it# 1 Entry:43605 Library:WILEY229.LIB
 f88 Formula:C10 H18 O2 CAS:0-00-0 MolWeight:170 RetIndex:0
 cmpName:3,7-Dimethyl-octa-1,7-dien-3,6-diol \$\$

it# 2 Entry:43405 Library:WILEY229.LIB
 f82 Formula:C10 H18 O2 CAS:51276-33-6 MolWeight:170 RetIndex:0
 cmpName:3,7-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol \$\$ 1E8PHENUOL II \$\$ 1,7-Octadiene-3,6-diol, 2,6-dimethyl- \$\$ 2,6-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol \$\$

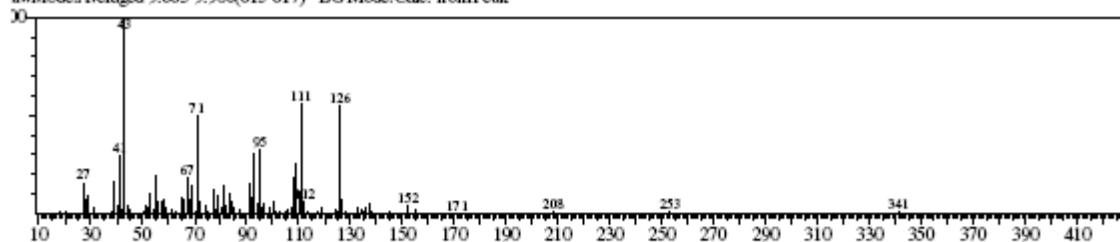
it# 3 Entry:62510 Library:WILEY229.LIB
 f81 Formula:C14 H26 CAS:60212-32-0 MolWeight:194 RetIndex:0
 cmpName:3-Tetradecyne (CAS)

it# 4 Entry:86887 Library:WILEY229.LIB
 f81 Formula:C16 H30 CAS:61886-62-2 MolWeight:222 RetIndex:0
 cmpName:3-Hexadecyne (CAS)

it# 5 Entry:112569 Library:WILEY229.LIB
 f80 Formula:C16 H30 O2 CAS:20711-10-8 MolWeight:254 RetIndex:0
 cmpName:11-Tetradecen-1-ol, acetate, (Z)- (CAS) cis-11-Tetradecenyl acetate \$\$ (Z)-11-Tetradecenyl acetate \$\$ cis-11-Tetradecen-1-ol acetate \$\$ (Z)-11-Tetr

< Target >>

ine# 7 R.Time:9.892(Scan#:816) MassPeaks:101 BasePeak:43.10(76932)
 awbMode:Averaged 9.883-9.900(815-817) BG Mode:Calc. from Peak



it# 1 Entry:31719 Library:WILEY229.LIB
 E79 Formula:C10 H18 O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 compName:1,8-CINEOLE \$\$ EUCALYPTOL \$\$

it# 2 Entry:14104 Library:WILEY229.LIB
 E79 Formula:C8 H14 O CAS:0-00-0 MolWeight:126 RetIndex:0
 compName:7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1,5-dimethyl- \$\$

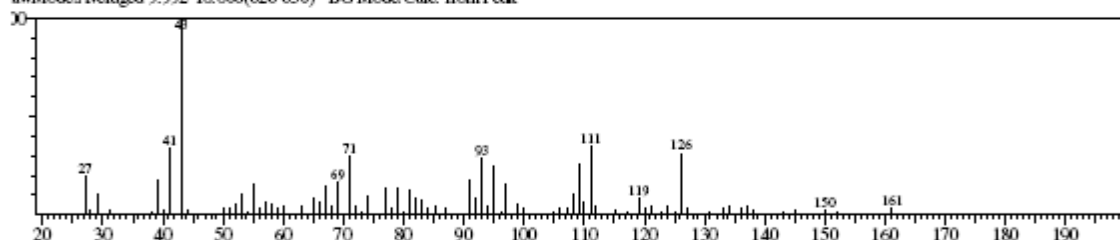
it# 3 Entry:31553 Library:WILEY229.LIB
 E78 Formula:C10 H18 O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:0
 compName:1,8-Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- (CAS) Terpen \$\$ Zineol \$\$ Eucapur \$\$ p-Cineole \$\$ Cajepulol \$\$ Eucalyptol \$\$ Cucaly

it# 4 Entry:13992 Library:WILEY229.LIB
 E78 Formula:C8 H14 O CAS:110-93-0 MolWeight:126 RetIndex:0
 compName:6-Methyl-5-hepten-2-one \$\$ 5-Hepten-2-one, 6-methyl- (CAS) 6-Methyl-5-heptene-2-one \$\$ 6-METHYLHEPT-5-EN-2-ONE \$\$ (6-methyl)-E-5-he

it# 5 Entry:31502 Library:WILEY229.LIB
 E78 Formula:C10 H18 O CAS:470-67-7 MolWeight:154 RetIndex:0
 compName:Isocineole \$\$ 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-methyl-4-(1-methylthyl)- (CAS) 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-isopropyl-4-methyl- \$\$ 1,4-Cineole \$

< Target >>

ine# 8 R.Time:10.000(Scan#:829) MassPeaks:84 BasePeak:43.10(28753)
 awbMode:Averaged 9.992-10.008(828-830) BG Mode:Calc. from Peak



it# 1 Entry:64043 Library:WILEY229.LIB
 E78 Formula:C12 H20 O2 CAS:125-12-2 MolWeight:196 RetIndex:0
 compName:ISOBORNYL ACETATE \$\$

it# 2 Entry:64042 Library:WILEY229.LIB
 E77 Formula:C12 H20 O2 CAS:76-49-3 MolWeight:196 RetIndex:0
 compName:BORNYL ACETATE \$\$

it# 3 Entry:142600 Library:WILEY229.LIB
 E77 Formula:C17 H28 O4 CAS:0-00-0 MolWeight:296 RetIndex:0
 compName:NEROLIDOL-EPOXYACETATE \$\$

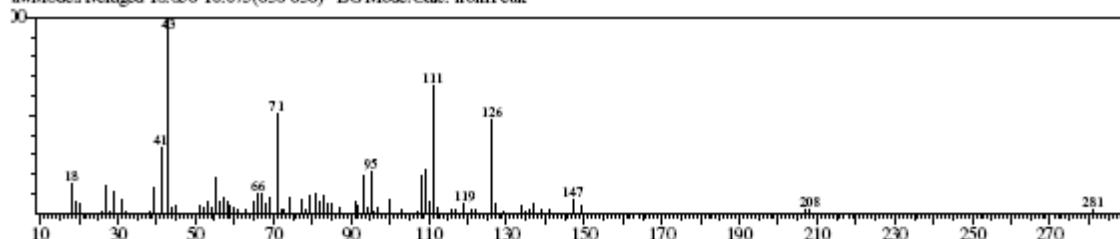
it# 4 Entry:62339 Library:WILEY229.LIB
 E77 Formula:C13 H22 O CAS:0-00-0 MolWeight:194 RetIndex:0
 compName:dihydroionone \$\$

it# 5 Entry:31475 Library:WILEY229.LIB
 E77 Formula:C10 H18 O CAS:17699-16-0 MolWeight:154 RetIndex:0
 compName:trans-sabinene hydrate \$\$ TRANS-THUJAN-4-OL \$\$

< Target >>

In# 9 R.Time: 10.067(Scan# 837) MassPeaks: 83 BasePeak: 43.10(17791)

AcqMode: Averaged 10.058-10.075(836-838) BG Mode: Calc. from Peak



it# 1 Entry: 31502 Library: WILEY229.LIB

f75 Formula: C10 H18 O CAS: 470-67-7 MolWeight: 154 RetIndex: 0

cmpName: Isocineole \$\$ 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane, 1-isopropyl-4-methyl- \$\$ 1,4-Cineole \$

it# 2 Entry: 31719 Library: WILEY229.LIB

f75 Formula: C10 H18 O CAS: 470-82-6 MolWeight: 154 RetIndex: 0

cmpName: 1,8-CINEOLE \$\$ EUCALYPTOL \$\$

it# 3 Entry: 31553 Library: WILEY229.LIB

f75 Formula: C10 H18 O CAS: 470-82-6 MolWeight: 154 RetIndex: 0

cmpName: 1,8-Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- (CAS) Terpen \$\$ Zineol \$\$ Eucapur \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Eucalyptol \$\$ Cucaly

it# 4 Entry: 31545 Library: WILEY229.LIB

f74 Formula: C10 H18 O CAS: 470-82-6 MolWeight: 154 RetIndex: 0

cmpName: 1,8-Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- (CAS) Terpen \$\$ Zineol \$\$ Eucapur \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Eucalyptol \$\$ Cucaly

it# 5 Entry: 13989 Library: WILEY229.LIB

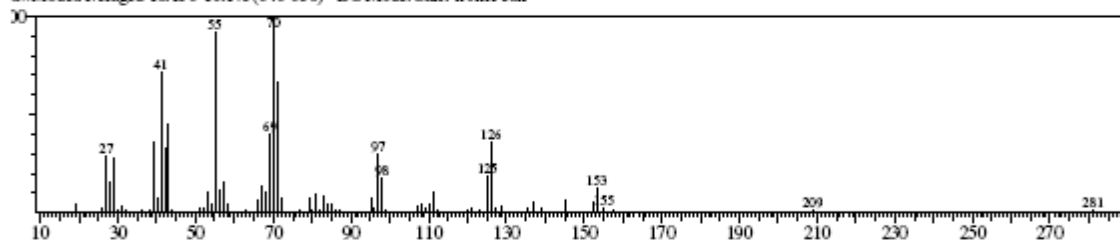
f74 Formula: C8 H14 O CAS: 110-93-0 MolWeight: 126 RetIndex: 0

cmpName: 6-Methyl-3-hepten-2-one \$\$ 3-Hepten-2-one, 6-methyl- (CAS) 6-Methyl-3-heptene-2-one \$\$ 6-METHYLHEPT-3-EN-2-ONE \$\$ (6-methyl)-E-3-he

< Target >>

In# 10 R.Time: 10.167(Scan# 849) MassPeaks: 74 BasePeak: 70.05(22544)

AcqMode: Averaged 10.158-10.175(848-850) BG Mode: Calc. from Peak



it# 1 Entry: 14295 Library: WILEY229.LIB

f85 Formula: C9 H18 CAS: 1678-97-3 MolWeight: 126 RetIndex: 0

cmpName: Cyclohexane, 1,2,3-trimethyl- (CAS) 1,2,3-TRIMETHYLCYCLOHEXANE, (CIS PLUS TRANS) \$\$ 1,2,3-Trimethylcyclohexane \$\$

it# 2 Entry: 41769 Library: WILEY229.LIB

f84 Formula: C10 H16 O2 CAS: 35178-55-3 MolWeight: 168 RetIndex: 0

cmpName: PIPERITONE OXIDE \$\$

it# 3 Entry: 31948 Library: WILEY229.LIB

f83 Formula: C11 H22 CAS: 62338-50-5 MolWeight: 154 RetIndex: 0

cmpName: 4-Decene, 8-methyl-, (E)- (CAS)

it# 4 Entry: 53085 Library: WILEY229.LIB

f82 Formula: C13 H26 CAS: 62338-52-7 MolWeight: 182 RetIndex: 0

cmpName: Cyclobutane, 3-hexyl-1,1,2-trimethyl- (CAS)

it# 5 Entry: 14199 Library: WILEY229.LIB

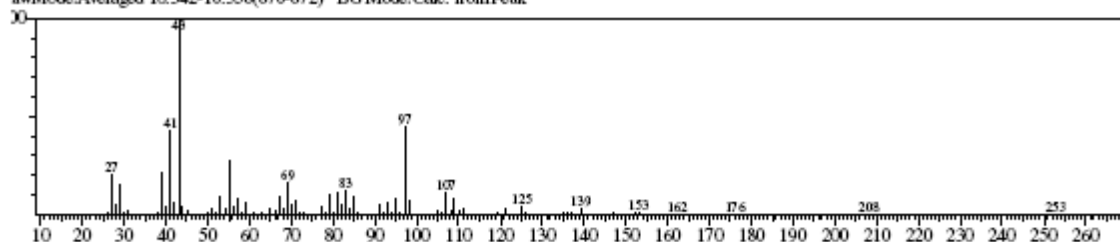
f82 Formula: C9 H18 CAS: 0-00-0 MolWeight: 126 RetIndex: 0

cmpName: TRANS NUNEN-3 \$\$

< Target >>

In# 11 R-Time: 10.350 (Scan#: 871) MassPeaks: 109 BasePeak: 43.05 (289273)

AcqMode: Averaged 10.342-10.358 (870-872) BG Mode: Calc. from Peak



In# 1 Entry: 41681 Library: WILEY229.LIB

E87 Formula: C10 H16 O2 CAS: 512-85-6 MolWeight: 168 RetIndex: 0

CompName: Ascaridole \$\$ 2,3-Dioxabicyclo[2.2.2]oct-5-ene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) Askaridol \$\$ Ascaridol \$\$ Ascaricum \$\$ Ascarisin \$\$ Ascaridi

In# 2 Entry: 204611 Library: WILEY229.LIB

E84 Formula: C25 H42 O6 CAS: 55320-03-1 MolWeight: 438 RetIndex: 0

CompName: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester (CAS) 2-LINOLEYL-1,3-DIACETIN \$\$

In# 3 Entry: 41613 Library: WILEY229.LIB

E83 Formula: C10 H16 O2 CAS: 26942-62-1 MolWeight: 168 RetIndex: 0

CompName: CYCLOHEXANONE, 2-(1-ACETYLETHYL)- \$\$ 2-(3-BUTANONE)-1-CYCLOHEXANONE \$\$ Cyclohexanone, 2-(3-oxobutyl)- \$\$ 2-(3-Oxobutyl)

In# 4 Entry: 204166 Library: WILEY229.LIB

E83 Formula: C25 H40 O6 CAS: 55320-02-0 MolWeight: 436 RetIndex: 0

CompName: 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester, (Z,Z,Z)- (CAS) 1-LINOLENYL-2,3-DIACETIN \$\$

In# 5 Entry: 41744 Library: WILEY229.LIB

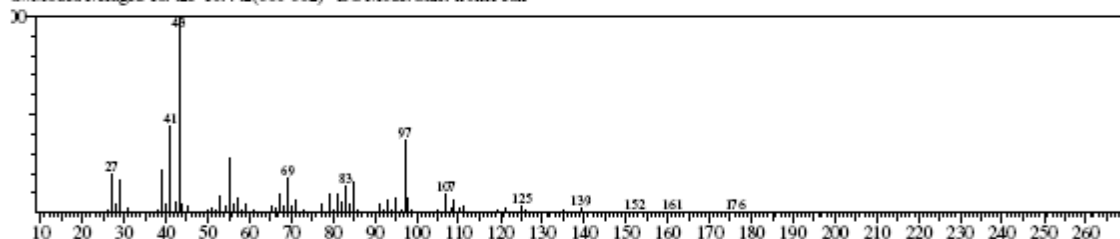
E83 Formula: C10 H16 O2 CAS: 0-00-0 MolWeight: 168 RetIndex: 0

CompName: 4-methyl-7-methylethyl-3,8-dioxatricyclo[5.1.0(2-4)]octane \$\$ isoscaridole \$\$

< Target >>

In# 12 R-Time: 10.433 (Scan#: 881) MassPeaks: 106 BasePeak: 43.10 (285688)

AcqMode: Averaged 10.425-10.442 (880-882) BG Mode: Calc. from Peak



In# 1 Entry: 41681 Library: WILEY229.LIB

E87 Formula: C10 H16 O2 CAS: 512-85-6 MolWeight: 168 RetIndex: 0

CompName: Ascaridole \$\$ 2,3-Dioxabicyclo[2.2.2]oct-5-ene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) Askaridol \$\$ Ascaridol \$\$ Ascaricum \$\$ Ascarisin \$\$ Ascaridi

In# 2 Entry: 204611 Library: WILEY229.LIB

E83 Formula: C25 H42 O6 CAS: 55320-03-1 MolWeight: 438 RetIndex: 0

CompName: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester (CAS) 2-LINOLEYL-1,3-DIACETIN \$\$

In# 3 Entry: 41744 Library: WILEY229.LIB

E83 Formula: C10 H16 O2 CAS: 0-00-0 MolWeight: 168 RetIndex: 0

CompName: 4-methyl-7-methylethyl-3,8-dioxatricyclo[5.1.0(2-4)]octane \$\$ isoscaridole \$\$

In# 4 Entry: 204166 Library: WILEY229.LIB

E82 Formula: C25 H40 O6 CAS: 55320-02-0 MolWeight: 436 RetIndex: 0

CompName: 9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester, (Z,Z,Z)- (CAS) 1-LINOLENYL-2,3-DIACETIN \$\$

In# 5 Entry: 41613 Library: WILEY229.LIB

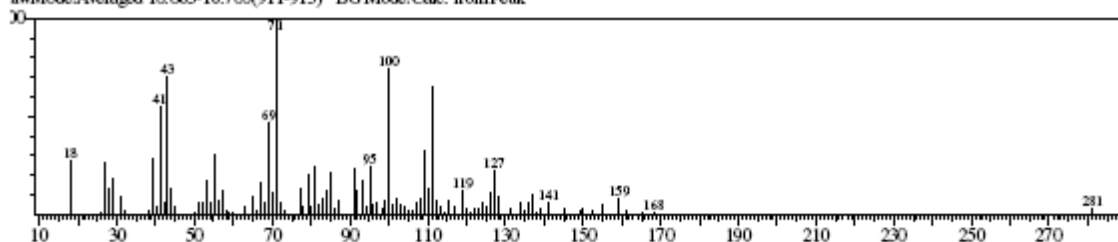
E82 Formula: C10 H16 O2 CAS: 26942-62-1 MolWeight: 168 RetIndex: 0

CompName: CYCLOHEXANONE, 2-(1-ACETYLETHYL)- \$\$ 2-(3-BUTANONE)-1-CYCLOHEXANONE \$\$ Cyclohexanone, 2-(3-oxobutyl)- \$\$ 2-(3-Oxobutyl)

< Target >>

In# 13 R.Time:10.692(Scan#:912) MassPeaks:102 BasePeak:71.10(26935)

AcqMode:Averaged 10.683-10.700(911-913) BG Mode:Calc. from Peak



In# 1 Entry:31330 Library:WILEY229.LIB

E71 Formula:C10 H18 O CAS:562-74-3 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- (CAS) 4-Terpineol \$\$ TERPINENE-4-OL \$\$ 1-Terpinen-4-ol \$\$ 4-Carvomenthanol \$\$ p-Menth-1-

In# 2 Entry:31715 Library:WILEY229.LIB

E71 Formula:C10 H18 O CAS:562-74-3 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:TERPINEOL-4 \$\$

In# 3 Entry:41678 Library:WILEY229.LIB

E70 Formula:C10 H16 O2 CAS:59169-18-5 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:endo-2-Hydroxy-5-ketobornane \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 5-hydroxy-4,7,7-trimethyl-, endo- (CAS) 5-Ketoborneol \$\$ ENDO-KETOBORNEOL

In# 4 Entry:31234 Library:WILEY229.LIB

E69 Formula:C10 H18 O CAS:78-70-6 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (CAS) Linalol \$\$ beta-Linalool \$\$ Linalyl alcohol \$\$ 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol \$\$

In# 5 Entry:41677 Library:WILEY229.LIB

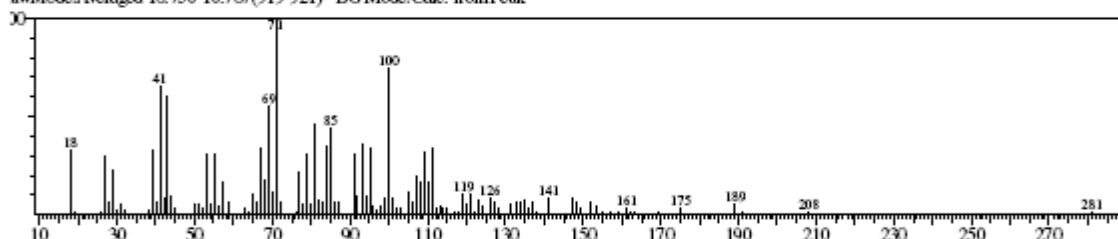
E69 Formula:C10 H16 O2 CAS:79465-66-0 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:exo-2-Hydroxy-5-ketobornane \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 2-hydroxy-4,7,7-trimethyl-, exo- (CAS)

< Target >>

In# 14 R.Time:10.758(Scan#:920) MassPeaks:112 BasePeak:71.10(29155)

AcqMode:Averaged 10.750-10.767(919-921) BG Mode:Calc. from Peak



In# 1 Entry:86604 Library:WILEY229.LIB

E75 Formula:C15 H26 O CAS:577-27-5 MolWeight:222 RetIndex:0

cmpName:1H-Cycloprop[1]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (CAS) Ledol \$\$ d-Ledol

In# 2 Entry:31721 Library:WILEY229.LIB

E74 Formula:C10 H18 O CAS:21290-09-5 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:NEOISOPULGOL \$\$

In# 3 Entry:31228 Library:WILEY229.LIB

E73 Formula:C10 H18 O CAS:5944-20-7 MolWeight:154 RetIndex:0

cmpName:Isogeraniol \$\$ 3,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)- (CAS)

In# 4 Entry:86606 Library:WILEY229.LIB

E75 Formula:C15 H26 O CAS:577-27-5 MolWeight:222 RetIndex:0

cmpName:1H-Cycloprop[1]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (CAS) Ledol \$\$ d-Ledol

In# 5 Entry:43405 Library:WILEY229.LIB

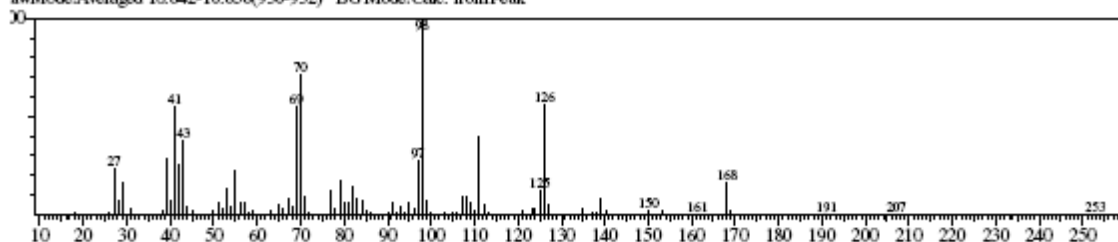
E73 Formula:C10 H18 O2 CAS:51276-33-6 MolWeight:170 RetIndex:0

cmpName:3,7-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol \$\$ TERPINDIOL II \$\$ 1,7-Octadiene-3,6-diol, 2,6-dimethyl-, 2,6-Dimethyl-1,7-octadiene-3,6-diol \$\$

< Target >>

In# 15 R.Time:10.850(Scan#:931) MassPeaks:116 BasePeak:98.05(159035)

AcqMode:Averaged 10.842-10.858(930-932) BG Mode:Calc. from Peak



In# 1 Entry:41596 Library:WILEY229.LIB

E81 Formula:C10 H16 O2 CAS:490-03-9 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:2-Cyclohexen-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-6-(1-methylethyl)- (CAS) Diosphenol \$\$ DIOSPHEENOL II \$\$ Buccocamphor \$\$ Buchu camphor \$\$ Barc

In# 2 Entry:52879 Library:WILEY229.LIB

E80 Formula:C12 H22 O CAS:0-00-0 MolWeight:182 RetIndex:0

cmpName:3,4,8-TRIMETHYL-2-NONENAL \$\$

In# 3 Entry:41599 Library:WILEY229.LIB

E80 Formula:C10 H16 O2 CAS:78391-96-5 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:5-Hydroxy-p-menth-6-ene-2-one \$\$ 2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)- (CAS) p-Menth-6-en-2-one, 5-hydroxy- \$\$ 5-Hyd

In# 4 Entry:41769 Library:WILEY229.LIB

E79 Formula:C10 H16 O2 CAS:35178-55-3 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:PIPERITONE OXIDE \$\$

In# 5 Entry:41597 Library:WILEY229.LIB

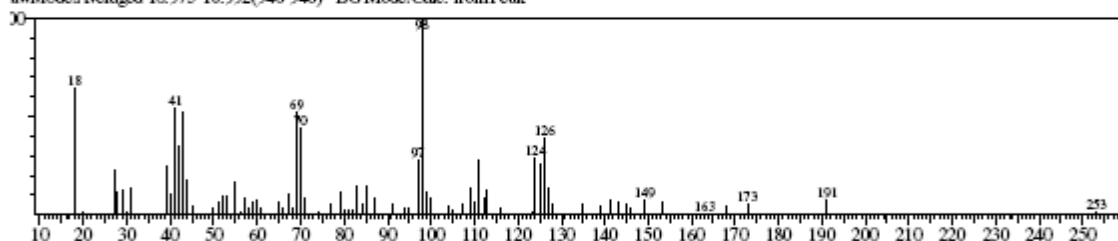
E79 Formula:C10 H16 O2 CAS:490-03-9 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:2-Cyclohexen-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-6-(1-methylethyl)- (CAS) Diosphenol \$\$ DIOSPHEENOL II \$\$ Buccocamphor \$\$ Buchu camphor \$\$ Barc

< Target >>

In# 16 R.Time:10.983(Scan#:947) MassPeaks:80 BasePeak:98.05(9929)

AcqMode:Averaged 10.975-10.992(946-948) BG Mode:Calc. from Peak



In# 1 Entry:42044 Library:WILEY229.LIB

E73 Formula:C11 H20 O CAS:20144-44-9 MolWeight:168 RetIndex:0

cmpName:Cyclohexanone, 2-isopropyl-2,5-dimethyl- (CAS)

In# 2 Entry:14298 Library:WILEY229.LIB

E70 Formula:C9 H18 CAS:2234-75-5 MolWeight:126 RetIndex:0

cmpName:Cyclohexane, 1,2,4-trimethyl- (CAS) 1,2,4-TRIMETHYLCYCLOHEXANE, (CIS PLUS TRANS) \$\$ 1,2,4-Trimethylcyclohexane \$\$

In# 3 Entry:89324 Library:WILEY229.LIB

E70 Formula:C9 H16 B2 O5 CAS:64780-34-3 MolWeight:226 RetIndex:0

cmpName:alpha-D-Ribopyranose, cyclic 1,2:3,4-bis(ethylboronate) (CAS) ALPHA-D-RIBOPYRANOSE, 1,2:3,4-DI-O-(ETHYLBORANDIYL)- \$\$

In# 4 Entry:52879 Library:WILEY229.LIB

E70 Formula:C12 H22 O CAS:0-00-0 MolWeight:182 RetIndex:0

cmpName:3,4,8-TRIMETHYL-2-NONENAL \$\$

In# 5 Entry:101081 Library:WILEY229.LIB

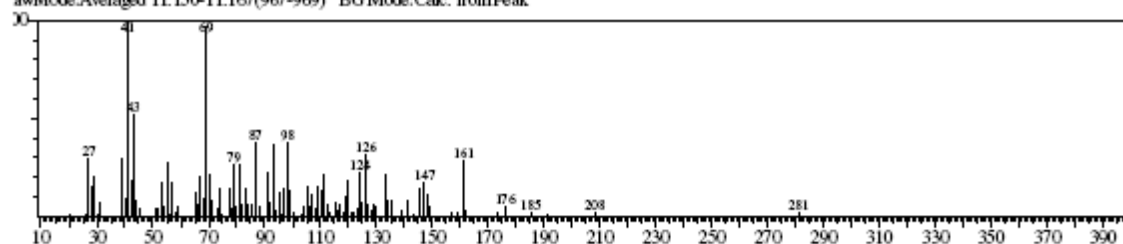
E70 Formula:C11 H22 B2 O4 CAS:74810-64-3 MolWeight:240 RetIndex:0

cmpName:1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-(1,3-propanediyl)bis(2-ethyl- (CAS) 1,2,6,7-HEPTANETRIOL, 1,2:6,7-DI-O-(ETHYLBORANDIYL)- \$\$

< Target >>

in# 17 R.Time: 11.158 (Scan#: 968) MassPeaks: 104 BasePeak: 41.10 (16714)

acqMode: Averaged 11.150-11.167 (967-969) BG Mode: Calc. from Peak



it# 1 Entry: 86454 Library: WILEY229.LIB

E75 Formula: C15 H26 O CAS: 4602-84-0 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: Farnesol \$\$ 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl- (CAS) Farnesyl alcohol \$\$

it# 2 Entry: 193365 Library: WILEY229.LIB

E74 Formula: C28 H46 O CAS: 7199-92-0 MolWeight: 398 RetIndex: 0

cmpName: Cholesta-8,24-dien-3-ol, 4-methyl-, (3.beta.,4.alpha.)- (CAS) 4.ALPHA.-METHYL-.DELTA.-8,24-CHOLESTERADIENOL \$\$

it# 3 Entry: 70838 Library: WILEY229.LIB

E72 Formula: C15 H24 CAS: 87-44-5 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [(1R)-(1R*,4E,9S*)]- (CAS) 1-Caryophyllene \$\$ (-)-Caryophyllene

it# 4 Entry: 86446 Library: WILEY229.LIB

E72 Formula: C15 H26 O CAS: 7212-44-4 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl- (CAS) 3,7,11-Trimethyldeca-1,6,10-trien-3-ol \$\$ 3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatriene-2

it# 5 Entry: 70732 Library: WILEY229.LIB

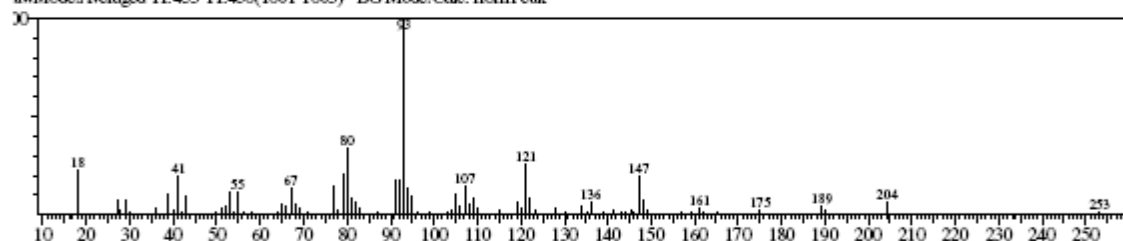
E72 Formula: C15 H24 CAS: 18794-84-8 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: beta-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)- (CAS) 7,11-DIMETHYL-3-METHYLEN-1,6,10-DODECATRIENE \$\$

< Target >>

in# 18 R.Time: 11.442 (Scan#: 1002) MassPeaks: 94 BasePeak: 93.10 (30462)

acqMode: Averaged 11.433-11.450 (1001-1003) BG Mode: Calc. from Peak



it# 1 Entry: 70790 Library: WILEY229.LIB

E91 Formula: C15 H24 CAS: 6753-98-6 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: alpha-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,10-CYCLOUNDECATRIENE, 1,1,4,8-TETRAMETHYL-,

it# 2 Entry: 70794 Library: WILEY229.LIB

E91 Formula: C15 H24 CAS: 6753-98-6 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: alpha-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,10-CYCLOUNDECATRIENE, 1,1,4,8-TETRAMETHYL-,

it# 3 Entry: 71180 Library: WILEY229.LIB

E90 Formula: C15 H24 CAS: 6753-98-6 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: ALPHA-HUMULENE \$\$ ALPHA-HUMULENE \$\$

it# 4 Entry: 70789 Library: WILEY229.LIB

E90 Formula: C15 H24 CAS: 6753-98-6 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: alpha-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,10-CYCLOUNDECATRIENE, 1,1,4,8-TETRAMETHYL-,

it# 5 Entry: 70787 Library: WILEY229.LIB

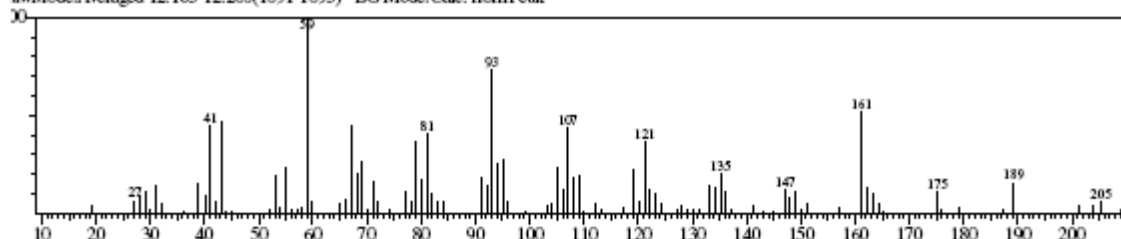
E89 Formula: C15 H24 CAS: 6753-98-6 MolWeight: 204 RetIndex: 0

cmpName: alpha-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,10-CYCLOUNDECATRIENE, 1,1,4,8-TETRAMETHYL-,

< Target >>

in# 19 R.Time: 12.192(Scan#:1092) MassPeaks:99 BasePeak:59.05(19310)

awMode:Averaged 12.183-12.200(1091-1093) BG Mode:Calc. from Peak



it# 1 Entry: 86478 Library: WILEY229.LIB

E92 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 639-99-6 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: Elemol \$\$ Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl-, alpha, alpha, 4-trimethyl-3-(1-methylethenyl), [1R-(1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]- (CAS) o-Menth-8-ene

it# 2 Entry: 86481 Library: WILEY229.LIB

E90 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 639-99-6 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: Elemol \$\$ Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl-, alpha, alpha, 4-trimethyl-3-(1-methylethenyl), [1R-(1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]- (CAS) o-Menth-8-ene

it# 3 Entry: 86484 Library: WILEY229.LIB

E88 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 21657-90-9 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: hedycolol \$\$

it# 4 Entry: 86678 Library: WILEY229.LIB

E87 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 639-99-6 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: elemol \$\$

it# 5 Entry: 86485 Library: WILEY229.LIB

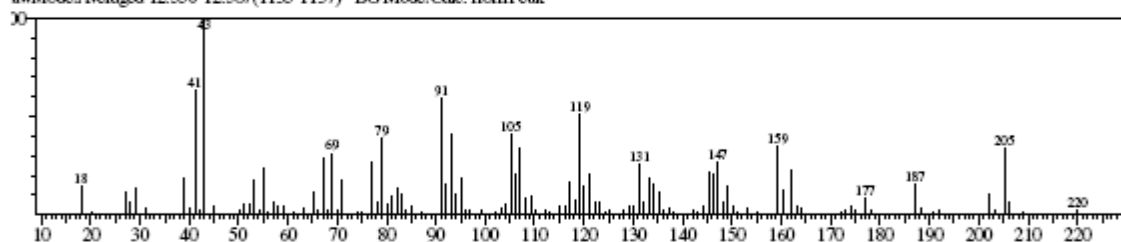
E87 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 21657-90-9 MolWeight: 222 RetIndex: 0

cmpName: hedycolol \$\$

< Target >>

in# 20 R.Time: 12.558(Scan#:1136) MassPeaks:126 BasePeak:43.10(39332)

awMode:Averaged 12.550-12.567(1135-1137) BG Mode:Calc. from Peak



it# 1 Entry: 84590 Library: WILEY229.LIB

E91 Formula: C₁₅ H₂₄ O CAS: 6750-60-3 MolWeight: 220 RetIndex: 0

cmpName: Spathulenol \$\$ 1H-Cycloprop[azulen-7-yl, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-] \$ 1H-

it# 2 Entry: 84624 Library: WILEY229.LIB

E91 Formula: C₁₅ H₂₄ O CAS: 77171-55-2 MolWeight: 220 RetIndex: 0

cmpName: (+) spathulenol \$\$

it# 3 Entry: 84628 Library: WILEY229.LIB

E85 Formula: C₁₅ H₂₄ O CAS: 0-00-0 MolWeight: 220 RetIndex: 0

cmpName: isospathulenol \$\$

it# 4 Entry: 84635 Library: WILEY229.LIB

E79 Formula: C₁₅ H₂₄ O CAS: 0-00-0 MolWeight: 220 RetIndex: 0

cmpName: 4,4-dimethyltricyclo[6.3.2.0(2,5)]trideca-8-ene-1-ol \$\$

it# 5 Entry: 84664 Library: WILEY229.LIB

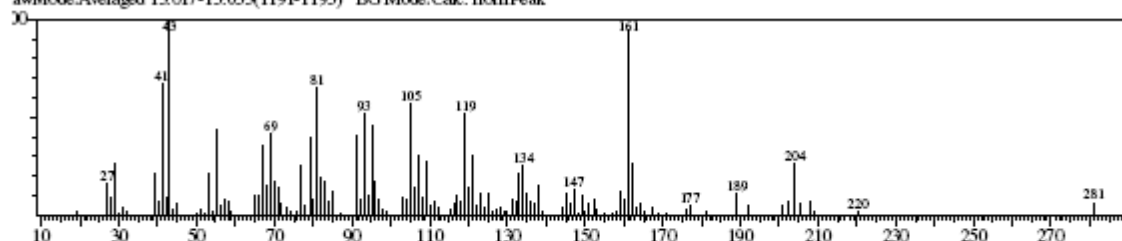
E79 Formula: C₁₅ H₂₄ O CAS: 6750-60-3 MolWeight: 220 RetIndex: 0

cmpName: SPATHULENOL \$\$

<Target>>

Inet# 21 RTime: 13.025(Scan#:1192) MassPeaks: 126 BasePeak: 43.05(18628)

acqMode: Averaged 13.017-13.033(1191-1193) BG Mode: Calc. from Peak



it# 1 Entry: 86618 Library: WILEY229.LIB

E85 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 552-02-3 MolWeight: 222 RetIndex: 0

compName: EPIGLOBULOL \$\$

it# 2 Entry: 71105 Library: WILEY229.LIB

E83 Formula: C₁₅ H₂₄ CAS: 489-39-4 MolWeight: 204 RetIndex: 0

compName: Aromadendrene \$\$

it# 3 Entry: 86617 Library: WILEY229.LIB

E82 Formula: C₁₅ H₂₆ O CAS: 489-41-8 MolWeight: 222 RetIndex: 0

compName: GLOBULOL \$\$

it# 4 Entry: 71034 Library: WILEY229.LIB

E82 Formula: C₁₅ H₂₄ CAS: 489-39-4 MolWeight: 204 RetIndex: 0

compName: (+)-Aromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (C

it# 5 Entry: 71041 Library: WILEY229.LIB

E82 Formula: C₁₅ H₂₄ CAS: 25246-27-9 MolWeight: 204 RetIndex: 0

compName: Alloaromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- (C