



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**Análise dos constituintes químicos e avaliação das
atividades biológicas do óleo essencial de *Lantana
caatingensis* M., preparo e caracterização do complexo de
inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri***

ULISSES NOGUEIRA DE AGUIAR

TERESINA

2013

ULISSES NOGUEIRA DE AGUIAR

Análise dos constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M.; preparo e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri*

Dissertação, como requisito complementar para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima

TERESINA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A282a Aguiar, Ulisses Nogueira de

Análise dos constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M., preparo e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* / Ulisses Nogueira de Aguiar K.-- 2013. 63 f.: il

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceutica) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima.

]

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades que tem me dado.

Ao meu pai, Guilherme Alves de Aguiar, meu exemplo de profissional e pai. A minha mãe, Joselina Nogueira de Aguiar, exemplo de mulher e mãe. A minha esposa, Maria Pereira de Queiroga Aguiar, pelo carinho e compreensão. Aos meus queridos filhos, Ulisses Nogueira de Aguiar Filho, Gustavo Single de Aguiar e João Guilherme Queiroga de Aguiar, pelo incentivo e respeito. As minhas irmãs, Kaline Nogueira de Aguiar e Gisleise Nogueira de Aguiar, pelo companheirismo. A minha sogra, Maria de Fátima Clemente Pereira, pelo apoio e carinho.

A toda minha família, especialmente a minha tia Nadir do Nascimento Nogueira, pelo exemplo de profissional ligado a pesquisa e ao ensino.

Ao professor Sidney Gonçalo de Lima, pela orientação científica, dedicação e paciência durante a realização deste trabalho e principalmente por sua valiosa amizade.

Aos Professores Rivelilson Mendes de Freitas, Luciano da Silva Lopes e Mariana Helena Chaves pelas contribuições ao meu trabalho.

Ao meu grande amigo e colaborador Márcio dos Santos Rocha e a todos os meus amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Departamento de Química da UFPI.

“O papel do farmacêutico no mundo é tão nobre quão vital. O farmacêutico representa o órgão de ligação entre a medicina e a humanidade sofredora. É o atento guardião do arsenal de armas com que o Médico dá combate às doenças. É quem atende às requisições a qualquer hora do dia ou da noite. O lema do farmacêutico é o mesmo do soldado: servir.”

Monteiro Lobato

ULISSES NOGUEIRA DE AGUIAR

Análise dos constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M.; preparo e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri*

Dissertação, como requisito complementar para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima

Universidade Federal do Piauí

(Orientador – Presidente)

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

Faculdade Integral Diferencial – FACID

(Examinador Externo)

Prof. Dra. Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí

(Examinador Interno)

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes

Análise dos constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M.; preparo e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri*. Ulisses Nogueira de Aguiar. Orientador: Dr. Sidney Gonçalo de Lima. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

Este trabalho relata pela primeira vez o estudo sobre a composição química e atividade biológica do óleo essencial (OE) das folhas de *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae), uma planta medicinal de Simões - Piauí, Nordeste do Brasil. Além disso, a composição química do óleo essencial de *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae) foi avaliada por CG-EM, e seu complexo de inclusão com a β -ciclodextrina foi caracterizado por métodos espectroscópicos e cromatográficos. O OE *L. caatingensis* foi obtido por hidrodestilação e analisado CG-EM em diferentes períodos do ano. As atividades antibacterianas do óleo essencial de *L. caatingensis*, bem como a interferência do mesmo na atividade de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos foram avaliadas. Foi possível identificar cerca de 90% dos constituintes integrados, sendo identificado um total de 39 componentes. Dos constituintes químicos analisados observou-se uma elevada proporção de hidrocarbonetos sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno e o biciclogermanecreno os seus principais representantes. δ -3-careno, cariofileno, humuleno, biciclogermacreno e espatulenol foram encontrados em todos os períodos analisados em diferentes concentrações. A avaliação da toxicidade foi realizada frente à *Artemia salina* com resultado considerado ativo ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). A atividade antimicrobiana foi avaliada isoladamente e com associação dos antibióticos aminoglicosídeos ao óleo de *L. caatingensis* pelo método da microdiluição. Foram utilizadas bactérias padrão e multiresistentes. O óleo essencial apresentou atividade inibitória para seis linhagens analisadas, sendo que cinco apresentaram atividade significativa, do ponto de vista clínico, ao óleo essencial de *L. caatingensis*. Os resultados obtidos nesse ensaio indicam que a associação do óleo essencial com os antibióticos aminoglicosídeos frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) apresentou sinergismo importante, com uma redução em 75% da concentração para o valor da concentração inibitória mínima (CIM) da amicacina. Na linhagem *Escherichia coli* (EC 27) o sinergismo com amicacina também foi observado com redução de 50% do valor da CIM e com a neomicina em 50% do valor. Os dados revelam o potencial do óleo essencial de *L. caatingensis* para atividades antibacterianas e como moduladoras na ação de antibióticos do grupo aminoglicosídeos. Utilizando a β -ciclodextrina, na formação de um complexo de inclusão com o óleo essencial de *Croton zehntneri*, podemos melhorar a estabilidade, alterar a solubilidade de fármacos, modelar a velocidade de dissolução e a liberação controlada desse óleo. Nesse estudo buscou-se a formação do complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zehntneri* com β -ciclodextrina, bem como a sua caracterização por métodos espectroscópicos e cromatográficos. Os espectros de infravermelho indicaram interação da β -ciclodextrina com o óleo essencial de *C. zehntneri*, fato corroborado pelo valor da constante de estabilidade e pelo perfil apresentado na calorimetria exploratória diferencial.

Palavras-chave: *Croton zehntneri*, *Lantana caatingensis* M., óleo essencial.

Analysis of the chemical constituents and evaluation of biological activities of essential oil of *Lantana caatingensis* M.; preparation and characterization of inclusion complex of essential oil of *Croton zehntneri*.

ABSTRACT

This work reports for the first time the study over the chemical composition and biological activity of the essential oil (EO) from the leaves of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae), a medicinal plant from Simões, Piauí, Northeastern Brazil. Furthermore, the chemical composition of the essential oil of *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae) was measured by GC-MS, and its inclusion complex with β -cyclodextrin was characterized by spectroscopic and chromatographic methods. The EO *L. caatingensis* was obtained by hydrodistillation and analyzed through GC-MS at different times of the year. The antibacterial activities of the essential oil of *L. caatingensis* as well as the interference in the activity of antibiotics of the class of aminoglycosides were evaluated. It was possible to identify 90 percent of the constituents integrated, being identified a total of 39 components. Of the chemical constituents analyzed it was observed a high proportion of sesquiterpene hydrocarbons, being the β -caryophyllene and bicyclogermacrene its main representatives. δ -3-carene, caryophyllene, humulene, bicyclogermacrene and spathulenol were found in all periods analyzed at different concentrations. The toxicity evaluation was performed on *Artemia salina* with results considered active ($LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). The antimicrobial activity was evaluated separately and with the association of aminoglycoside antibiotics to the oil of *L. caatingensis* by microdilution method. We used standard and multiresistant bacteria. The essential oil showed inhibitory activity for six strains analyzed, with five of them showing significant activity, from the clinical point of view, to the essential oil of *L. caatingensis*. The results of this trial indicate that the combination of the essential oil with aminoglycoside antibiotics against *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) showed significant synergism, with a 75 percent reduction in the concentration to the value of the minimum inhibitory concentration (MIC) of amikacin. In the strain *Escherichia coli* (EC 27) the synergism with amikacin was also observed with a reduction of 50 percent of the MIC and with neomycin at 50 percent of the value. The data show the potential of the essential oil of *L. caatingensis* for antibacterial activities and as modulators in the action of aminoglycoside antibiotics. Using the β -cyclodextrin in the formation of an inclusion complex with the essential oil of *Croton zehntneri*, we can improve the stability, change the drug solubility, and model the dissolution speed and the controlled release of this oil. In this study we sought the formation of inclusion complex of essential oil of *C. zehntneri* with β -cyclodextrin, as well as their characterization by spectroscopic and chromatographic methods. The infrared spectra showed interaction of β -cyclodextrin with the essential oil of *C. zehntneri*, a fact corroborated by the value of the stability constant and by the profile presented in the differential scanning calorimetry.

Keywords: *Croton zehntneri*, *Lantana caatingensis* M., essential oil.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Resumo | |
| Abstract | |
| Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos | |
| Lista de Figuras | |
| Lista de Tabelas | |
| 1.1. Introdução..... | 13 |
| Referências..... | 16 |
| 2.1. Objetivos..... | 18 |
| 2.1.1. Gerais..... | 18 |
| 2.2.1. Específicos..... | 18 |
| | |
| Capítulo I - Análise dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>L. caatingensis</i> | |
| M..... | 19 |
| Resumo..... | 19 |
| Abstract..... | 20 |
| 3.1. Introdução..... | 21 |
| 3.2. Material e Métodos..... | 22 |
| 3.2.1. Material Vegetal..... | 22 |
| 3.2.2. Extração do Óleo Essencial..... | 22 |
| 3.2.3. Análise da Composição Química por CG-EM..... | 22 |
| 3.2.4. Avaliação da toxicidade..... | 22 |
| 3.3. Resultados e Discussão..... | 23 |
| 3.4. Conclusão..... | 29 |
| Referências..... | 30 |
| | |
| Capítulo II - Avaliação das atividades antibacterianas e da interferência do óleo essencial de <i>Lantana caatingensis</i> Moldenke na resistência de aminoglicosídeos..... | 34 |
| Resumo..... | 34 |
| Abstract..... | 35 |
| 4.1. Introdução..... | 36 |
| 4.2. Materiais e Métodos..... | 36 |
| 4.2.1. Material Vegetal..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2. Extração do Óleo Essencial..... | 37 |
| 4.2.3. Análise da Composição Química por CG-EM..... | 37 |
| 4.2.4. Atividade antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 37 |
| 4.2.4.1. Cepas Microbianas..... | 37 |
| 4.2.4.2. Preparação da Suspensão Microbiana..... | 37 |
| 4.2.4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 38 |
| 4.2.5. Avaliação da atividade moduladora por contato direto..... | 38 |
| 4.3. Resultado e Discussão..... | 39 |
| 4.4. Conclusão..... | 41 |
| Referências..... | 43 |

Capítulo III - Preparo e Caracterização do Complexo de Inclusão Óleo Essencial de *Croton zehntneri*.....46

| | |
|--|----|
| Resumo..... | 46 |
| Abstract..... | 47 |
| 5.1. Introdução..... | 48 |
| 5.2. Materiais e Métodos..... | 50 |
| 5.2.1. Material Vegetal..... | 50 |
| 5.2.2. Extração do Óleo Essencial..... | 50 |
| 5.2.3. Análise da por Cromatografia Gasosa..... | 50 |
| 5.2.4. Preparo do Complexo de Inclusão..... | 51 |
| 5.2.5. Preparo da Mistura Física..... | 51 |
| 5.2.6. Diagrama de solubilidade do óleo essencial de <i>C. zehntneri</i> | 51 |
| 5.2.7. Caracterização do Complexo de Inclusão..... | 51 |
| 5.2.7.1. Espectroscopia de Infravermelho | 52 |
| 5.2.7.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... | 52 |
| 5.3. Resultado e Discussão..... | 52 |
| 5.3.1. Diagrama de solubilidade do óleo essencial de <i>C. zehntneri</i> | 52 |
| 5.3.2. Preparo do Complexo OEC/ β -CD..... | 54 |
| 5.3.3. Espectroscopia de Infravermelho..... | 55 |
| 5.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... | 56 |
| 5.4. Conclusão..... | 57 |
| Referências..... | 59 |

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

| | |
|--------------|---|
| β - CD | Beta- Ciclodextrina |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CDB | Convenção da Diversidade Biológica |
| CDs | Ciclodextrinas |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa |
| CI | Complexo de Inclusão |
| CI-L | Complexo de Inclusão Liofilizado |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| DSC | Calorimetria Diferencial de Varredura |
| EC | Eficiência de Complexação |
| IV | Infravermelho |
| Kc | Constante de estabilidade |
| LAPETRO | Laboratório de Análises de Combustível |
| LIMAV | Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados |
| MF | Mistura física |
| NTF | Núcleo de Tecnologia Farmacêutica |
| OE | Óleo essencial |
| OEC | Óleo essencial de <i>Croton</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Lantana caatingensis</i> M. | 14 |
|---|----|

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Constituintes majoritários do óleo de <i>L. caatingensis</i> : β -cariofileno (A); biciclogermanecreno (B); valeceno (C); escapulenol (D);..... | 26 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 2 - Porcentagens e principais constituintes químicos presentes no óleo essencial obtido da espécie de <i>Lantana caatingensis</i> , coletados em diferentes meses do ano no município de Simões-Piauí, Brasil..... | 27 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 3 - Avaliação da toxicidade frente a <i>A. salina</i> | 28 |
|---|----|

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>Lantana caatingensis</i> | 40 |
|---|----|

CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura do estragol..... | 49 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 2 – β -ciclodextrina (β -CD)..... | 50 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 3 - Perfil cromatográfico (TIC) do óleo essencial de <i>C. zehntneri</i> | 52 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 4 - Leitura espectrofotométrica do OEC..... | 53 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 5 - Curva de calibração do OEC..... | 53 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 6 - Diagrama de solubilidade de OEC em presença de β -CD..... | 54 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 7 - Espectros de Infravermelho de β -CD, OEC, MF e CI-L..... | 56 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 8 - Termograma de DSC do β -CD, MF, CI-L e OEC..... | 57 |
|---|----|

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Composição química e porcentagens dos óleos essenciais da espécie de *Lantana caatingensis*, coletados em diferentes meses do ano no município de Simões-Piauí, Brasil.....24

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial das folhas de *Lantana caatingensis*, coletada em Simões-Piauí, Brasil.....39

Tabela 2 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *Lantana caatingenses* M. em relação às linhagens bacterianas.....40

Tabela 3 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) de aminoglicosídeos na ausência e presença do óleo essencial (OE) de *Lantana caatingenses* M.....41

1.1. Introdução

A flora terrestre e aquática é considerada um verdadeiro laboratório biossintético capaz de produzir uma grande variedade de substâncias complexas. Algumas das famílias de plantas se caracterizam por apresentarem grupos de substâncias bem definidas (ROBBERS et al., 1997), relacionadas com diversas atividades farmacológicas, levando a grande parte dos grupos de pesquisas acadêmicas em fitoquímica no país realizarem a busca de novos fármacos a partir de extratos vegetais (LEITE et al., 2001).

Atualmente, uma significativa quantidade dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO et al., 2009).

Do ponto de vista tecnológico, a busca de novos fármacos oriundos de plantas é um processo iterativo de descoberta de protótipos moleculares (*lead compounds* ou *templates*), a partir do fracionamento biomonitorado de espécies vegetais, seguido de melhoramento dos protótipos pelo planejamento e síntese de análogos, visando incrementar propriedades farmacológicas (LEE, 2004).

Acoplado a esse paradigma pode ser observado o aumento no emprego dos óleos essenciais como fontes alternativas a outros produtos dispostos no mercado. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros, sendo que a grande maioria, constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2010).

Os óleos essenciais além de desempenharem papéis ecológicos importantes na proteção das plantas, atuam como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas. Devido a essas propriedades, principalmente a antimicrobiana, o uso desses óleos nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia está se difundindo cada vez mais como alternativa aos produtos sintéticos (MONTANARI, 2010).

Com esse enfoque, foi realizada uma investigação com algumas espécies produtoras de óleos essenciais ocorrentes na região de Simões, município localizado ao sul do Piauí. Com os dados obtidos foi efetuada avaliação diferenciada de duas espécies dessa região, a *Lantana caatingensis* M., da família Verbenaceae, e a *Croton zehntneri* da família Euphorbiaceae.

A família Verbenaceae compreende cerca de 100 gêneros e 2600 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na zona temperada do hemisfério sul (JOLY, 1993). Desta família o gênero *Lantana* compreende cerca de 150 espécies de plantas floríferas perenes utilizadas popularmente como antireumática, estimulante, antibacteriana, controle biológico e como planta ornamental (GHISALBERT, 2000). Sendo também conhecida por ser praticamente imune a herbivoria devido à presença de uma grande variedade de diversos grupos fitoquímicos (RAVINDER et al., 2006). A *Lantana caatingensis* M. (**Figura 1**) é uma planta nativa e endêmica do Brasil, sua distribuição geográfica se encontra entre Pernambuco, Bahia, Piauí e Minas Gerais, e ainda, não há estudos científicos sobre esta espécie.



Figura 1 – Fotografia parcial de um espécimen de *Lantana caatingensis* M. em seu habitat natural, destacando ramos com inflorescência.

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 300 gêneros e 7600 espécies (FARNSWORTH et al., 1969; CRONQUIST, 1981), possuindo hábito heterogêneo, onde se incluem árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (LEME, 1994). Desta família o gênero *Croton* possui cerca de 800 espécies, sendo que o seu aroma varia entre exemplares desta planta coletados em diferentes regiões do Nordeste. Isto se deve à variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos seus óleos essenciais dessa espécie (CRAVEIRO et al., 1982). Assim, distinguem-se quatro tipos químicos como: anetol - para os exemplares coletados em Fortaleza (CE) e Viçosa (CE); eugenol- para os coletados em Areia Branca (RN) e Quixadá (CE); metil-eugenol – para os coletados em Ipu (CE) e Oeiras (PI); estragol –

para os exemplares coletados em Simões (PI), Tianguá (CE) e Granja (CE) (MORAIS et al., 2006). A espécie *Croton zehntneri* conhecida popularmente como canela de cunha, canelinha ou canela-brava, é usada comumente na medicina popular principalmente como sedativo, como estimulante de apetite e para aliviar distúrbios intestinais, sendo comprovados os efeitos antinociceptivos de seu óleo essencial (OLIVEIRA et al., 2001). Seu óleo tem como componente majoritário o estragol.

Em adição a este tipo de abordagem racional para a busca de compostos naturais bioativos, o conhecimento das espécies destas famílias ocorrentes no Piauí, a avaliação dos seus compostos com atividades biológicas, as novas formas de utilização desses constituintes químicos fornecem subsídios para uma melhor valorização destes recursos naturais disponíveis e sistematicamente vislumbra novas formas de aplicação farmacológica dos metabólitos secundários dos mesmos.

As duas primeiras partes do trabalho, tem como resultados, os produtos obtidos pós extração, analisando a composição química do óleo essencial bem como o resultado da avaliação das atividades biológicas e interferência desse óleo na ação de antibióticos do grupo aminoglicosídeos.

Na última parte dessa dissertação o objetivo foi preparar um complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri*, que é insolúvel em água, com uma β -ciclodextrina (β -CD), e em seguida a caracterização do mesmo utilizando técnicas de espectroscopia.

Referências

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

CRAVEIRO, A.A.; SILVEIRA, E.R. Two cleisthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 21, p. 2571-2574, 1982.

CRONQUIST, D. C. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, 1981.

FARNSWORTH, N.R.; BLOMSTER, R.N.; MESMMER, W.M. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **Lloyd**, n.32, p.1-28, 1969.

GHISALBERT, E. L. *Lantana camara* L. (verbennaceae). **Fitoterapia**, v. 71, p. 467-486, 2000.

JOLY, A. B.; Botânica: Introdução a Taxonomia Vegetal. 11^a ed., **Compania Editora Nacional**: São Paulo, 1993.

LEE, K. Current Developments in the Discovery and Design of New Drug Candidates from Plant Natural Product Leads. **Journal Natural Products**, v. 67, p. 273-283, 2004.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G. & OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of Flavonoid glycosids from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 49, p. 3796–3801, 2001.

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

MONTANARI, R. M. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardi, Siparunaceae e Verbenaceae. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A. J.; SILVA, A. R. A.; MARTINS, J. S. N. Atividade antioxidante de óleos essenciais de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

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

RAVIDER, K. K.; DAIZY R.; BATISH AND SINGH & KULDIP S. D. Status, invasiveness and environmental threats of three tropical American invasive weeds (*Parthenium hysterophorus* L., *Ageratum conyzoides* L., *Lantana camara* L.) in India. **Biological Invasions**, v. 8, p. 1501-1510, 2006.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. São Paulo, **Editorial Premier**, p. 372, 1997.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P. G.; GOSMANN, J.C.P. MELLO, L.A. MENTZ AND P.R. PETROVICK. (ORG.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6th. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

2.1. Objetivos

2.1.1. Gerais

- Avaliar os constituintes químicos e de atividades biológicas do óleo essencial da *Lantana caatingensis*.
- Preparar e caracterizar por meio de estudos físico-químicos o complexo de inclusão óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -Ciclodextrinas (β -CD).

2.2.1. Específicos

- Analisar por CG-EM os constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *L. caatingensis*, coletadas no município de Simões-PI.
- Avaliar a toxicidade do óleo essencial das folhas de *L. caatingensis*.
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *L. caatingensis*.
- Determinar a interferência do óleo de *L. caatingensis* M. na atividade dos antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos.
- Investigar a melhor proporção de β -ciclodextrina a ser usada para formação do complexo de inclusão com o óleo de *Croton zehntneri*.
- Caracterizar os complexos de inclusão (β -ciclodextrina + óleo) por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espectrometria na região do infravermelho.

CAPÍTULO I

Análise dos constituintes químicos do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M.

Aguiar, U.N.¹; Rocha, M.S.¹; Lima, S.G.¹

1 - Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

Resumo

Este estudo relata pela primeira vez a composição química do óleo essencial da *Lantana caatingensis* (Verbenaceae), uma planta medicinal de Simões – Piauí, nordeste do Brasil. Os óleos essenciais obtidos foram analisados por CG-EM. Foi possível a identificação e quantificação de 16 componentes em janeiro/2010 (98,00%), 24 em janeiro/2011 (95,00%), 22 em junho/2011 (89,50%) e 09 em março/2012 (90,46%), sendo observada desta forma uma grande variação qualitativa e quantitativa durante os diferentes meses de coleta. Dos constituintes químicos analisados no óleo essencial observou-se uma elevada proporção de hidrocarbonetos sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno e o biciclogermanecreno os seus principais representantes. δ -3-careno, cariofileno, humuleno, biciclogermacreno e espatulenol foram encontrados em todos os períodos analisados em diferentes concentrações. Esses dados são promissores e indicam que o extrato de *L. caatingensis* pode ser uma fonte alternativa de produto natural com atividade biológica.

Palavras chaves: *Lantana caatingensis*, óleo essencial, Verbenaceae.

Analysis of the chemical constituents of the essential oil *Lantana caatingensis* M.

Abstract

This study reports for the first time on the chemical composition and toxicity of the essential oil of *Lantana caatingensis* (Verbenaceae), a medicinal plant from Simões - Piauí, Northeastern Brazil. The essential oils were analyzed by GC-MS. It was possible the identification and quantification of 16 components in January/2010 (98.00%), 24 in January/2011 (95.00%), 22 in June 2011 (89.50%) and 09 in March/2012 (90.46%). From the chemical constituents of the essential oil analyzed we observed a high proportion of sesquiterpene hydrocarbons, being the β -caryophyllene and bicyclogermacrene its main representatives. δ -3-carene, caryophyllene, humulene, bicyclogermacrene and spathulenol were found in all periods analyzed at different concentrations. The toxicity evaluation was performed on *Artemia salina* with results considered active ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). These data are promising and indicate that the extract of *L. caatingensis* can be an alternative source of natural products with biological activity.

Keywords: *Lantana caatingensis*, essential oil, Verbenaceae.

3.1. Introdução

Lantana é um gênero de aproximadamente 150 espécies, sendo que algumas destas são utilizadas pela medicina popular como antireumática, estimulante, controle biológico e como planta ornamental (GHISALBERT, 2000). Animais ruminantes e não-ruminantes como cobaias, coelhos e fêmeas de ratos apresentaram suscetibilidade à ação de hepatotoxinas, da classe dos triterpenóides pentacíclicos denominados de lantadenos. Os frutos da planta também são tóxicos para o homem (COSTA et al., 2011). Estudos fitoquímicos de espécies de *Lantana* levaram ao isolamento de triterpenos, esteróides e flavonóides. Sendo que em extratos etanólico de suas folhas e raízes demonstrou um amplo espectro de atividades biológicas (SOUSA et al., 2009).

A *Lantana caatingensis* M. é uma planta nativa e endêmica do Brasil, sua distribuição geográfica se encontra entre Pernambuco, Bahia, Piauí e Minas Gerais. Esta espécie é também conhecida por ser praticamente imune a herbivoria devido à presença de uma grande variedade de diversos grupos fitoquímicos (RAVINDER et al., 2006). Encontrada nas florestas serranas, *L. caatingensis* apresenta-se como arbusto, localizada nos topos destas serras (RODAL e NASCIMENTO, 2002).

Em estudos *in vitro*, foi comprovada a ação antibacteriana dos extratos de *L. camara* e *L. montevidensis*, tanto para linhagens de bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas (SOUSA et al., 2011).

Em outros estudos, extratos e componentes isolados da *L. camara* mostraram atividade anti-helmíntica (BEGUM et al., 2008).

O extrato etanólico da *Lantana* sp. tem mostrado atividade anti-protozoária principalmente para a espécie *Leishmania amazonensis* (VALADEU et al., 2009).

A atividade antibacteriana também já foi constatada com o extrato metanólico de *L. balansae* (SALVAT et al., 2004), com o etanólico de *L. macrophylla* (SILVA et al., 2005) e de *L. inermis* (AHMAD; BEG, 2001). Os ensaios antibacterianos dos extratos clorofórmicos e metanólicos das folhas de *L. camara* e *L. hispida* apresentaram atividade frente as linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* (JIMINEZ-ARELLANES et al., 2007; KIRITUMUHUZYA et al., 2009). O potencial inibitório frente à *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *seudomonas. aeruginosa* e ao *Staphylococcus aureus* foi apresentado pela utilização do extrato metanólico das folhas de *L. lilacina* (PEREIRA et al., 2008).

Uma forma de complementar os estudos fitoquímicos é associá-los a bioensaios, por essa razão muitos laboratórios de Produtos Naturais tem inserido dentro de suas rotinas

ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (NASCIMENTO et al., 2008).

Considerando-se que não há estudos com a *Lantana caatingensis* M., foi decidido pesquisar sobre quais constituintes químicos estão presentes no óleo essencial da *Lantana caatingensis* provenientes de Simões no estado do Piauí, coletados em diferentes períodos (meses).

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material Vegetal

As folhas de *L. caatingensis* Moldenke foram coletadas do município de Simões, nas coordenadas geográficas de latitude de 07° 35' S e longitude 040° 40' W, sudeste do estado do Piauí. Em seguida uma amostra representativa da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Piauí, sob identificação número 27.183 e identificada pelo Professor Jorge Yoshio Tamashiro (IQ-UNICAMP).

As amostras de folhas frescas foram coletadas às 08:00h a partir de sub arbusto diferente da mesma população de *L. caatingensis* em Janeiro (2010 e 2011), em Junho (2011) e em Março (2012).

3.2.2. Extração do Óleo Essencial

O óleo essencial das folhas frescas (cerca de 300 g) foi obtido por hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger®, por um período de três horas. O óleo foi mantido sob refrigeração até a realização das análises.

3.2.3 Análise da composição química por CG-EM

As análises através do método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foram realizadas em aparelho Shimadzu GC-17A/MS QP5050A com ionização por de impacto de elétrons a 70 eV. Os espectros de massa foram obtidos de 43 a 350 m/z. A temperatura do injetor/detector e o programa térmico foram mantidas a 240° C. O gás de arraste utilizado foi o hélio. A identificação foi feita por comparação de espectros padrões da biblioteca interna de dados e dos tempos de retenção e baseada no índice de retenção linear (ADAMS, 2007).

3.2.4 Avaliação da toxicidade

O bioensaio de letalidade com larva de *Artemia salina* (MACLAUGHLIN et al., 1991) foi adaptado para o método de Parra et al., 2001 para investigar a toxicidade do óleo essencial de *L. caatingenses*. Ovos de *A. salina* foram eclodidos em água do mar artificial (1.0 L de água mineral e 33,0 g de sal marinho) e usados após 24 h. Os experimentos foram feitos

em triplicatas e acompanhados de grupos controles. Foram usadas diferentes concentrações do óleo (25, 50, 100, 200, e 400 µg/mL) em um conjunto de três tubos por dose. Sobreviventes foram contatos depois de 24 h de incubação e o percentual de mortes em cada dose e no controle foram determinados. Os valores de concentração letal (CL₅₀) foram obtidos pelo método de regressão linear (MEYER, 1982). A concentração letal de 50% (CL₅₀) foi obtida pela análise PROBIT (SPSS 15.0).

3.3. Resultados e Discussão

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por comparação dos seus índices de retenção no CG-EM. O padrão para identificação foi obtido pelo Índice de Kovats. Foi utilizado também o índice de Kovats estimado por um programa de computador baseado na regressão linear ao quadrado que utiliza o tempo de retenção de pequenas quantidades de componentes conhecidos no cromatograma e compatível com a literatura (ALENCAR et al., 1990).

Os rendimentos dos óleos essenciais de *L. caatingensis* foram os mesmos nos quatro períodos de coleta (0,4%) em janeiro/2010, 0,4% em janeiro/2011, 0,4% em junho/2011 e 0,4% em março/2012, indicando que não houve diferença significativa associada à estação do ano, apesar de estar comprovado em outros estudos que no período de verão há uma maior perda de óleo essencial, devido o aumento da temperatura ambiente podendo assim provocar a volatilização dos constituintes mais voláteis do óleo. Em muitos artigos sobre o gênero *Lantana* foram observados rendimentos variando entre 0,01 e 0,9 (ALENCAR et al., 1990; SILVA, et al., 1999, GHISALBERTI, 2000; SONIBARE e EFFIONG, 2008; SOUSA et al., 2010).

Através dos dados espectrométricos e de cromatografia foi possível a identificação e quantificação de um total de 39 constituintes presentes no óleo de *L. caatingensis*, sendo que diferenças qualitativas e quantitativas foram verificadas ao comparar os diferentes meses de coletas (**Tabela 1**).

As análises CG-EM possibilitaram identificar 16 componentes (98,00%) em janeiro/2010, 24 (95,00%) em janeiro/2011, 22 (89,50%) em junho/2011 e 09 (90,46%) em março/2012. A presença de mono e sesquiterpenos como componentes majoritários também foram confirmadas em várias espécies do gênero *Lantana* por outros autores (SOUSA et al., 2010; COSTA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2008; DAMBOLENA et al., 2010).

Tabela 1 – Composição química e porcentagens dos óleos essenciais da espécie de *Lantana caatingensis*, coletados em diferentes meses do ano no município de Simões-Piauí, Brasil.

| Composto | IK _{experimental} | (%) Janeiro/2010 | (%) Janeiro/2011 | (%) Junho/2011 | (%) Março/2012 |
|-----------------------|----------------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| α -pipeno | 929 | 0,40 | - | - | - |
| sabineno | 968 | 0,60 | 2,00 | - | 1,27 |
| δ -3-careno | 1007 | 1,50 | 2,10 | 0,70 | 2,44 |
| para-cimeno | 1019 | - | 3,10 | - | - |
| limoneno | 1024 | 3,80 | - | - | 6,06 |
| 1,8- cineol | 1024 | - | 3,80 | - | - |
| β - felandreno | 1031 | - | - | 1,20 | - |
| β - ocimeno | 1045 | 1,20 | - | 0,40 | - |
| γ - terpineno | 1054 | 2,10 | - | 0,80 | - |
| α -terpinoleno | 1084 | 0,40 | - | - | - |
| linalol | 1097 | - | 1,50 | 0,40 | - |
| terpinen -4-ol | 1171 | - | 0,60 | - | - |
| estragol | 1196 | 22,10 | - | - | - |
| α -copaeno | 1367 | - | 0,90 | 0,50 | - |
| β -elemeno | 1384 | - | 1,70 | 0,50 | - |
| itacileno | 1405 | - | - | 0,70 | - |
| β -cariofileno | 1411 | 11,10 | 21,20 | 21,30 | 37,07 |
| β -bergamoteno | 1428 | - | 1,00 | - | - |
| α -humuleno | 1445 | 1,50 | 2,50 | 2,00 | 3,16 |
| aromadendreno | 1450 | - | 1,50 | - | - |
| γ - muuroloeno | 1468 | - | 0,70 | - | - |
| germacreno-D | 1471 | 6,70 | 2,90 | - | 2,71 |
| α -amorfenno | 1483 | - | - | 10,30 | - |
| biciclogermacreno | 1487 | 38,20 | 8,40 | 1,50 | 15,06 |
| α -muuroloeno | 1492 | - | 0,40 | - | - |
| valeceno | 1496 | - | - | 30,30 | - |
| germacreno A | 1497 | 0,80 | - | 0,90 | - |
| pentadecano | 1500 | - | - | 2,20 | - |
| γ -cadineno | 1517 | 0,40 | 1,20 | 1,20 | - |
| δ -cadineno | 1514 | - | 0,70 | 0,70 | - |
| farneseno | 1548 | - | - | 1,50 | - |
| nerolidol | 1561 | - | 0,70 | - | - |

| | | | | | |
|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| espatulenol | 1568 | 1,10 | 28,00 | 2,00 | 18,88 |
| óxido de cariofileno | 1572 | - | 6,90 | 1,50 | 3,81 |
| viridiflorol | 1581 | - | 1,50 | - | - |
| hexadecano | 1600 | - | - | 5,00 | - |
| α -cedrol | 1607 | 6,10 | - | - | - |
| δ -cadinol | 1637 | - | 0,70 | - | - |
| torreiol | 1644 | - | 1,00 | 3,90 | - |
| Total identificado | | 98,00 | 95,00 | 89,50 | 90,46 |
| Total sesquiterpenos | | 66,30 | 81,90 | 67,80 | 80,69 |
| Total monoterpenos | | 9,60 | 13,10 | 13,80 | 9,77 |
| Total - outros | | 22,10 | - | 7,90 | - |

Segundo Chowdhury, Nandi e Bhuiyan (2007), o cariofileno e seus isômeros, são constituintes comuns em óleos essenciais de partes aéreas de espécies do gênero *Lantana*. Saleh (1974) verificou a presença do α e β -cariofileno no óleo essencial de *L. camara*, e Saxena e Sharma (1999) observaram o α -cariofileno em *L. aculeata*. Sundufu e Shoushab (2003) observaram a presença do germacreno D e o biciclogermacreno no óleo essencial de *L. camara*.

Uma variação na presença e teor de alguns constituintes do óleo essencial de *L. caatinguensis* foi detectada. Essa variação do óleo essencial de uma planta pode sofrer variações significativas devido às condições ambientais tais como o ciclo vegetativo ou fatores extrínsecos (temperatura, umidade relativa do ar, duração total de exposição ao sol e ao regime de ventos (SIMÕES et al., 2010). A variação dos constituintes químicos presentes nas espécies geralmente são abundantes, tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo, sendo que diferentes locais de coleta, secagem e diferentes formas de preparo das plantas e seus produtos dificultam a reprodutibilidade dos trabalhos (FARIAS, 2003). Nas plantas os óleos apresentam-se em misturas de diferentes concentrações tendo normalmente um composto majoritário (SIMÕES et. al., 2010), sendo que condições ambientais são capazes de causar variações significativas.

O β -cariofileno e o biciclogermanecreno (**Figura 1**) foram os principais constituintes identificados no óleo de *L. caatinguensis* e foi determinado que suas concentrações variam dependendo da época do ano de coleta (**Figura 2**). O espatulenol e o β -cariofileno foram os constituintes principais na coleta de janeiro/2011, atingindo 28,00% e 21,20% respectivamente. O valeceno aparece como componente majoritário na coleta do mês de junho/2011 (30,30%). Em janeiro/2010 o biciclogermanecreno atingiu a porcentagem de 38,20% em relação aos outros constituintes e o β -cariofileno chegou a 37,07% em março/2012. δ -3-careno, cariofileno, cumuleno, biciclogermacreno e espatulenol foram encontrados em todos os períodos analisados em diferentes concentrações.

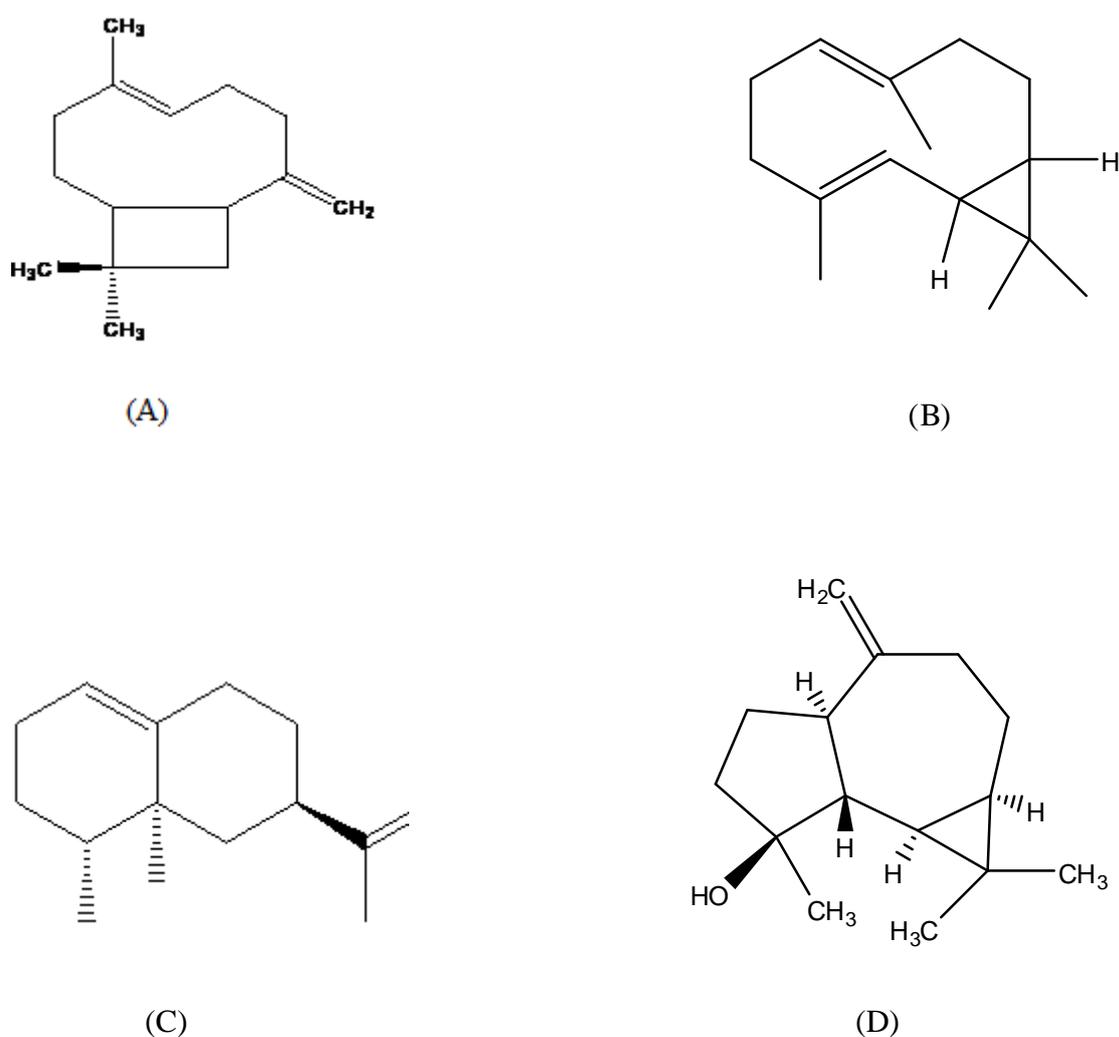


Figura 1 – Constituintes majoritários do óleo de *L. caatinguensis*: β -cariofileno (A); biciclogermanecreno (B); valeceno (C); escapulenol (D);

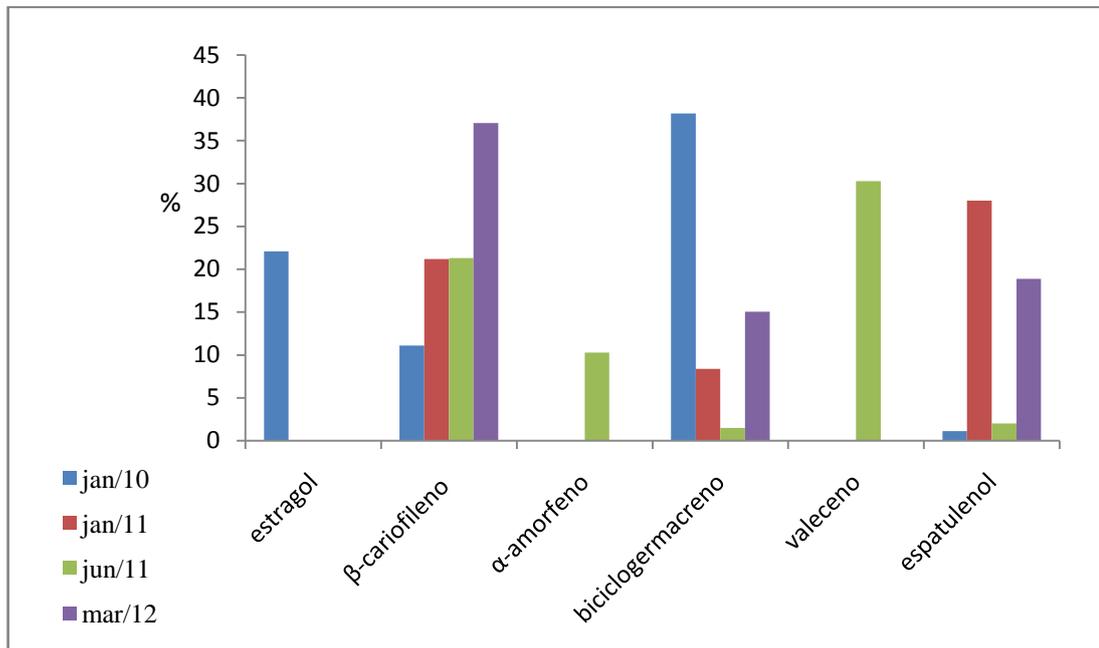


Figura 2 – Porcentagens e principais constituintes químicos presentes no óleo essencial obtido da espécie de *Lantana caatinguensis*, coletados em diferentes meses do ano no município de Simões-Piauí, Brasil.

O β -cariofileno é um sesquiterpeno descrito em diversos óleos essenciais responsável pelo aroma forte e por diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007; PASSOS et al., 2007), antialérgica (GHELARDINI et al., 2001), anestésica local (COSTA et al., 2000), antifúngica (ZHENG et al., 1992) e anticarcinogênica (CHINOUE et al., 1996).

Os índices de mortalidade das larvas no bioensaio de toxicidade do óleo essencial de *L. caatinguensis* (amostra de janeiro/2011) sobre *Artemia salina* variam entre 0 e 100% (**Figura 1**). A dose necessária para matar 50% das larvas (CL_{50}) foi calculada em 62,5 $\mu\text{g/mL}$ indicando que esse óleo possui atividade considerada significativa por apresentar CL_{50} menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER et al., 1982). Costa et al., (2009), reportou que os óleos essenciais de folhas de *L. camara* e *L. sp.* apresentaram atividades significativas com valores CL_{50} de 14 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

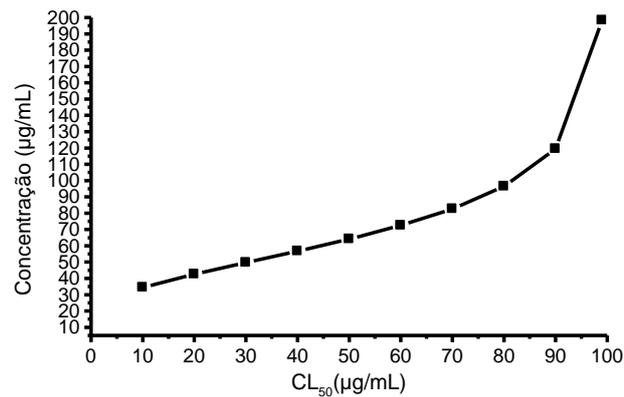


Figura 3 – Avaliação da toxicidade frente a *A. salina*.

3.4. Conclusão

Neste primeiro trabalho sobre a composição química do óleo essencial de *Lantana caatinguensis* M., foi observado pela análise cromatográfica do óleo a prevalência de constituintes de natureza terpênic, sendo os sesquiterpenos mais abundantes do que os monoterpenos. Existe uma variação nos componentes majoritários identificados no óleo essencial de *L. caatinguensis* decorrente do período (mês) em que a planta é coletada. O constituinte majoritário presente no óleo obtido em janeiro/2010 foi o biciclogermacreno, mas outros sesquiterpenos como o β -cariofileno e o valeceno também estão presentes em quantidade significativa nos meses de março/2012 e junho/2011 respectivamente. O espatulenol foi majoritário na coleta de janeiro/2011. δ -3-careno, cariofileno, cumuleno, biciclogermacreno e espatulenol foram encontrados em todos os períodos analisados em diferentes concentrações. A avaliação da toxicidade realizada frente à *Artemia salina* demonstrou resultado considerado ativo ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Portanto, por já serem conhecidas as atividades biológicas de muitos desses componentes químicos, há necessidade da realização de mais estudos para servirem de subsídios para pesquisas relacionadas a produtos naturais nos destinos.

Referências

ADAMS, R. P. Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, IL, USA, 2007.

AHMAD, A. & BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 113-213, 2001.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats` índices simulation in essencial oils analysis. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

BEGUM, S.; ZEHRA, S. Q.; SIDDIQUI, B. S.; FAYYAZ, S.; RAMZAN, M. Pentacyclic triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* and their nematocidal activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 1856-1866, 2008.

CHINOU, I.B. ; ROUSSIS, V. ; PERDEZOGLOU, D.; LOUKIS, A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. **Planta Medica**, v. 62, n. 4, p. 377-379, 1996.

CHOWDHURY, J. U.; NANDI, N. C.; BHUIYAN, N. I. Chemical composition of leaf essential oil of *Lantana camara* L. from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 193-194, 2007.

COSTA, J.G. M.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; LIMA, S. G.; BRAZ-FILHO, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19: p. 721-725, 2011.

COSTA, T.R.; FERNANDES, O.F.L.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA, C.M.A.; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 111-117, 2000.

DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LUCINI, E. I.; ZYGADLO, J. A.; BANCHIO, E.; BIURRUN, F.; ROTMAN, A.; AHUMADA, O. Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, p. 289-293, 2010.

FARIAS, M. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões CMO, Shenkel EP, GOSMANN G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 262-288, 2003.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n.3, p. 228-236, 2007.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **II Farmaco**, v. 56, p. 387-389, 2001.

GUISALBERT, E. L. *Lantana camara* L (Verbenaceae). **Fitoterapia**, v. 71, p. 467-486, 2000.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A.; MECKES, M.; TORRES, J.; LUNA-HERRERA, J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 202-205, 2007.

KIRIMUHUZYA, C.; WAAKO, P.; JOLOBA, M.; ODYER, O. The anti-mycobacterial activity of *Lantana camara* a plant traditionally used to treat symptoms of tuberculosis in South-western Uganda. **African Health Sciences**, v. 19, p. 40-45, 2009.

MCLAUGHLIN J. L.; CHANG C. J. AND SMITH D. L.; Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Studies in Natural Products Chemistry. Edits., Mclaughlin J. L., Chang C. J. and Smith D. L., p. 383-409, **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, 1991.

MYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MACLAUHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; IMA E SILVA, T. C.; VERAS, F. J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-50, 2008.

OLIVEIRA, J. C. S.; NEVES, I. A.; CAMARA, C. A. G.; SCHWARTZ, M. O. E. Essential oil composition of two *Lantana* species from Mountain forests of Pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 530-532, 2008.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n.2, p. 323-333, 2007.

PEREIRA, A.; CARVALHO, H.W.P.; SILVA, G.H.; OLIVEIRA, D.F.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CAVALHEIRO, A.J.; CAVALHO, D.A; Purification of na antibacterial compound from *Lantana lilaina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 24-208, 2008.

RAVIDER, K. K.; DAIZY R.; BATISH AND SINGH & KULDIP S. D. Status, invasiveness and environmental threats of three tropical American invasive weeds (*Parthenium hysterophorus* L., *Ageratum conyzoides* L., *Lantana camara* L.) in India. **Biological Invasions**, v. 8, p. 1501-1510, 2006.

RODAL, M. J. N.; NASCIMENTO, L. M. Levantamento Florístico da Floresta Serrana da Reserva Biológica de Serra Negra, Microrregião de Itaparica, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n.(4), p. 481-500, 2002.

SALEH, M. Gas-chromatographic analysis of the essential oil of *Lantana camara* L. varieties. **Planta Medical**, v. 25, n. 4, p. 373-375, 1974.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; SUAREZ, E. Y.; GOODOY, H. M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**, v. 11, p. 230-234, 2004.

SAXENA, V. K.; SHARMA, R. N. Antimicrobial activity of essential oil of *Lankana aculeata*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 59-60, 1999.

SILVA, G. N.; MARTINS, F. R.; MATHEUS, M. E.; LEITÃO, S. G.; FERNANDES, P. D. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lantana trifolia*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 254-259, 2005.

SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G.; LUZ, A. I. R.; SILVA, J. D.; MAIA, J. G. S. Essential Oils of *Lantana camara* L. occurring at North Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, n. 4, p. 208-210, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P. G.; GOSMANN, J.C.P. MELLO, L.A. MENTZ AND P.R. PETROVICK. (ORG.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6th Ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/UFSC, Brasil, 2010.

SONIBARE, O. O.; EFFIONG, I. Antibacterial activity and cytotoxicity of essential oil of *Lantana camara* L. leaves from Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 2618-2620, 2008.

SOUSA, E.O.; ALMEIDA, T. S.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J.G. M. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana camara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 710-714, 2009.

SOUSA, E.O.; BARRETO, F. S.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J.G. M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n.1, p. 1-5, 2011.

SOUSA, E. O.; COLARES, A. V.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA S. G.; COSTA, J. G. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) Growing in Brazil Northeastern. **Records of Natural Products**, v. 4, p. 31-77, 2010.

SUNDUFU, A. J.; SHOUSHAN, H. Chemical composition of the essential oils of *Lantana camara* L. occurring in south China. **Flavour and Fragrance**, v. 19, p. 229-232, 2003.

VALADEU, C.; PABON, A.,; DEHARO, E.; ALBÁN-CASTILLO, J.; ESTEVEZ, Y.; LORES, F. A.; ROJAS, R.; GAMBOA, D.; SAUVAIN, M.; CASTILLO, D.; BOURDY, G. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Jornal of Etnopharmacology**, v. 123, p. 413-422, 2009.

ZHENG, G.Q.; KENNY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryphyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n.7, p. 999-1003, 1992.

CAPÍTULO II

Avaliação da atividade antibacteriana e da interferência do óleo essencial de *Lantana caatingensis* Moldenke na resistência de aminoglicosídeos.

Aguiar, U.N.¹; Rocha, M.S.¹; Lima, S.G.¹

1 - Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades antibacterianas do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M., bem como investigar a interferência do mesmo na atividade de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. Folhas de *L. caatingensis* foram coletadas no mês de janeiro/2011 e submetidas ao processo de hidrodestilação. O óleo essencial obtido foi analisado por CG-EM. Foi possível a identificação e quantificação de 24 componentes. Dos constituintes químicos analisados no óleo essencial observou-se uma elevada proporção de sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno, o espatulenol e o biciclogermanecreno os seus principais representantes. A atividade bacteriana foi avaliada isoladamente e com associação dos antibióticos aminoglicosídeos ao óleo de *L. caatingensis* pelo método da microdiluição. Foram utilizadas bactérias padrão e multiresistentes. O óleo essencial apresentou atividade inibitória para seis linhagens analisadas, sendo que cinco apresentaram atividade significativa, do ponto de vista clínico. Os resultados obtidos nesse ensaio indicam que a associação do óleo essencial com os antibióticos aminoglicosídeos frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) apresentou sinergismo importante, com uma redução em 75% da concentração para o valor da concentração inibitória mínima (CIM) da amicacina. Na linhagem *Escherichia coli* (EC 27) o sinergismo com amicacina também foi observado com redução de 50% do valor da CIM e com a neomicina em 50% do valor. Os dados revelam o potencial do óleo essencial de *L. caatingensis* para atividades antibacterianas e como moduladoras na ação de antibióticos do grupo aminoglicosídeos.

Palavras-chave: aminoglicosídeos; *Lantana caatingensis*; óleo essencial.

Evaluation of antibacterial activities and the interference of oil resistance in *Lantana caatingensis* Moldenke aminoglycosides.

Abstract

The present study aimed to evaluate the antibacterial activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. and investigate the interference in the activity of aminoglycoside antibiotics class. Sheets *L. caatingensis* were collected in the month of January/2011 and submitted to hydrodistillation process. The essential oil obtained was analyzed by GC-MS. It was possible to identify and quantify 24 components. Chemical constituents of the essential oil showed a high proportion of sesquiterpenes, and the β -caryophyllene, and the spathulenol and bicyclogermanene its main representatives. The antimicrobial activity was evaluated separately and with the association of aminoglycoside antibiotics oil *L. caatingensis* by microdilution method. We used standard and multiresistant bacteria. The essential oil showed inhibitory activity for six strains analyzed, five showed significant activity, the clinical point of view, the essential oil of *L. caatingensis*. The results of this trial indicate that the combination of the essential oil with aminoglycoside antibiotics against *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) showed significant synergism, with a 75% reduction in the concentration to the MIC value of amikacin. In strain *Escherichia coli* (EC 27) with amikacin synergism has also been observed with a reduction of 50% of the MIC and with neomycin at 50% of the value. The data show the potential of essential oil of *L. caatingensis* antibacterial activities and how to modulate the action of aminoglycoside antibiotics. The antimicrobial activity was evaluated separately and with the association of aminoglycoside antibiotics oil *L. caatingensis* by microdilution method. We used standard and multiresistant bacteria. The essential oil showed inhibitory activity for six strains analyzed, five showed significant activity, the clinical point of view, the essential oil of *L. caatingensis*. The results of this trial indicate that the combination of the essential oil with aminoglycoside antibiotics against *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692) showed significant synergism, with a 75% reduction in the concentration to the MIC value of amikacin. In strain *Escherichia coli* (EC 27) with amikacin synergism has also been observed with a reduction of 50% of the MIC and with neomycin at 50% of the value. The data show the potential of essential oil of *L. caatingensis* antibacterial activities and how to modulate the action of aminoglycoside antibiotics.

Keywords: aminoglycoside; *Lantana caatingensis*; essential oil.

4.1. Introdução

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). São compostos complexos voláteis, caracterizados por um odor forte, e são formados como metabólitos secundários de plantas aromáticas. Os componentes encontrados nos óleos essenciais possuem importantes propriedades farmacológicas, como atividade antiinflamatória (α -humuleno e cariofileno), antibacteriana, antiúlcera e antifúngicos (cariofileno e seu óxido) e antisséptico (linalol), podendo ser alguns desses constituintes, fonte alternativa de produto natural (LIMA et al., 2009). São relatados aos óleos ricos em compostos monoterpenos, altos níveis de atividade antimicrobiana (MANN et al., 2000).

A *Lantana* é um gênero de aproximadamente 150 espécies, sendo uma grande quantidade dessas utilizadas pela medicina popular como antireumática, estimulante, controle biológico e como planta ornamental (GHISALBERT, 2000). A *Lantana caatingensis* é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, sua distribuição geográfica se encontra em Pernambuco, Bahia, Piauí e Minas Gerais. Encontrada nas florestas serranas, a *Lantana caatingensis* apresenta-se como arbusto, localizada nos topos destas serras (RODAL; NASCIMENTO, 2002). Esta espécie é conhecida por ser praticamente imune a herbivoria devido à presença de uma grande variedade de diversos grupos fitoquímicos (RAVINDER, et al. 2006).

Ensaios *in vitro* mostraram que diversas espécies de *Lantana* apresentam ação antiinflamatória, anticancerígeno, antibactericida, antifúngica e vermífuga, podendo ser utilizado, portanto, na elaboração de fármacos específicos a partir dos compostos extraídos dos talos, raízes e em sua grande maioria das folhas (GHISALBERT, 2000).

O aumento da resistência bacteriana e a associação de antibióticos e produtos naturais para tentar diminuir essa resistência também têm atraído a atenção da comunidade científica para pesquisa de drogas novas e eficazes de origem natural (BOTELHO et al., 2007).

Neste trabalho, foram analisadas as atividades antibacterianas frente a três linhagens de bactérias Gram-positivas e três Gram-negativas e as ações moduladoras do óleo essencial obtido a partir das folhas de *Lantana caatingensis* M.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Material Vegetal

As folhas de *L. caatingensis* Moldenke foram coletadas do município de Simões, nas coordenadas geográficas de latitude de 07° 35' S e longitude 040° 40' W, sudeste do estado do

Piauí, no mês de janeiro de 2011. Em seguida uma amostra representativa da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Piauí, sob identificação número 27.183 e identificada pelo Professor Jorge Yoshio Tamashiro (IQ-UNICAMP).

4.2.2. Extração dos Óleos Essenciais

O óleo essencial das folhas frescas foi obtido por hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger®, por um período de três horas. O óleo foi mantido sob refrigeração até a realização das análises.

4.2.3. Análise da composição química por CG-EM

As análises através do método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foram realizadas em aparelho Shimadzu GC-17A/MS QP5050A com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os espectros de massa foram obtidos de 43 a 350 m/z. A temperatura do injetor/detector e o programa térmico foram mantidas a 240° C. O gás de arraste utilizado foi o hélio. A identificação foi feita por comparação de espectros padrões da biblioteca interna de dados e dos tempos de retenção e baseada no índice de retenção linear (ADAMS, 2007).

4.2.4. Atividade antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.2.4.1. Cepas Microbianas

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas três linhagens de bactérias Gram-negativas e três Gram-positivas. São elas respectivamente: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Staphylococcus aureus* SA 358, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* EC 27 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Entre estas foi utilizado um isolado clínico multirresistente Gram-negativo *Escherichia coli* 27, coletado a partir de escarro, e um Gram-positivo *Staphylococcus aureus* 358 de ferida cirúrgica.

4.2.4.2. Preparação da Suspensão Microbiana

Previamente aos testes, as cepas bacterianas foram ativadas em meio Brain Heart Infusion (BHI 3,8%) para o crescimento bacteriano (24 h, 35 ± 2°C). Após este subcultivo, os inóculos foram padronizados a partir de uma suspensão bacteriana a uma concentração final de aproximadamente 1 x 10⁸ UFC/mL (0,5 unidades de turbidez nefelométrica- escala McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída a 1 x 10⁶ UFC/mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram adicionados e então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações do óleo, resultando num inóculo final de 5 x 10⁵ UFC/mL (HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2003; VILJOEN et al., 2003).

O óleo foi diluído em água destilada e dimetil sulfóxido (DMSO) a uma concentração de 1024 µg/mL. Outras diluições seriadas foram realizadas através da adição de caldo BHI para alcançar uma concentração final no intervalo de 512 a 8 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as placas de microdiluição foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. A atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico pela adição de 25 µL de solução de resazurina (0,01%) após o período de incubação (SALVAT et al., 2004).

4.2.4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, proposta pelo CLSI (2010). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo MüellerHinton nos orifícios das placas de microdiluição, contendo 96 cavidades. Em seguida, foram distribuídos 100 µL da amostra no primeiro orifício da placa, e depois realizadas diluições seriadas, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Nos orifícios de cada coluna foram dispensadas alíquotas de 10 µL do inoculo correspondente a cada cepa ensaiada.

Como controle negativo, foi verificada a viabilidade das cepas ensaiadas, com a inoculação da suspensão bacteriana apenas no meio de cultura. As microplacas foram incubadas a 36 ± 1 °C durante 24 horas. A leitura para determinação da CIM de cada extrato sobre as cepas foi feita a partir do método visual, onde foi considerada a formação ou não de aglomerados de células no fundo da cavidade da placa. Dessa forma, considerou-se como CIM, a menor concentração do produto em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos. Para confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foi dispensada uma alíquota de 10 µL do corante Resazurina em todas as cavidades da placa (inclusive nos controles), 24 horas após a incubação. Isto tornou possível distinguir as amostras viáveis, coloridas de vermelho, daquelas não-viáveis, que mantiveram a sua cor azul. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento de bactérias e a leitura dos resultados foi indicada pela coloração da resazurina.

4.2.5. Avaliação da atividade moduladora por contato direto

Para avaliar o óleo essencial como potencializador da atividade de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (neomicina, gentamicina e ampicilina) foram utilizadas linhagens bacterianas que obtiveram valores de $CIM \leq 512$ µg/mL. O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do óleo através de microdiluição em triplicata.

Os inócuos bacterianos (CIM/8) em BHI a 10% foram distribuídos em placas de microdiluição seguido da adição de 100 µL das soluções de antibióticos (1024 µg/mL) seguido de diluições seriadas (1:2). As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 ° C por 24 h e a leitura dos resultados foi realizada de acordo como descrito anteriormente (SAGDIÇ, 2005).

4.3. Resultados e Discussão

O resultado da análise dos componentes químicos do óleo essencial estão presentes na Tabela 2, e mostra uma elevada proporção de sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno, o espatulenol e o biciclogermanecreno os seus principais representantes. A Figura 2 apresenta o perfil cromatográfico do óleo em estudo. Os sesquiterpenos também foram os constituintes predominantes encontrados no óleo essencial das folhas de *Lamara camara*, coletadas no município de Simões e em outras regiões (SOUSA et al., 2010; COSTA et al., 2011; SILVA et al., 1999; RANDRIANALJAONA et al., 2005).

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Lantana caatingensis*, coletada em Simões-Piauí, Brasil.

| Composto | IK _{experimental} | Área percentual |
|----------------------|----------------------------|-----------------|
| sabineno | 968 | 2,00 |
| δ -3-careno | 1007 | 2,10 |
| para-cimeno | 1019 | 3,10 |
| 1,8- cineol | 1024 | 3,80 |
| linalol | 1097 | 1,50 |
| terpinen -4-ol | 1171 | 0,60 |
| α -copaeno | 1367 | 0,90 |
| β -elemeno | 1384 | 1,70 |
| β -cariofileno | 1411 | 21,20 |
| β -bergamoteno | 1428 | 1,00 |
| α -humuleno | 1445 | 2,50 |
| aromadendreno | 1450 | 1,50 |
| γ -muuroleno | 1468 | 0,70 |
| germacreno-D | 1471 | 2,90 |
| biciclogermacreno | 1487 | 8,40 |
| α -muuroleno | 1492 | 0,40 |
| γ -cadineno | 1517 | 1,20 |
| δ -cadineno | 1514 | 0,70 |
| nerolidol | 1561 | 0,70 |
| espatulenol | 1568 | 28,00 |
| óxido de cariofileno | 1572 | 6,90 |
| viridiflorol | 1581 | 1,50 |
| δ -cadinol | 1637 | 0,70 |
| torreiol | 1644 | 1,00 |
| Total identificado | | 95,00 |
| Total sesquiterpenos | | 81,90 |
| Total monoterpenos | | 13,10 |

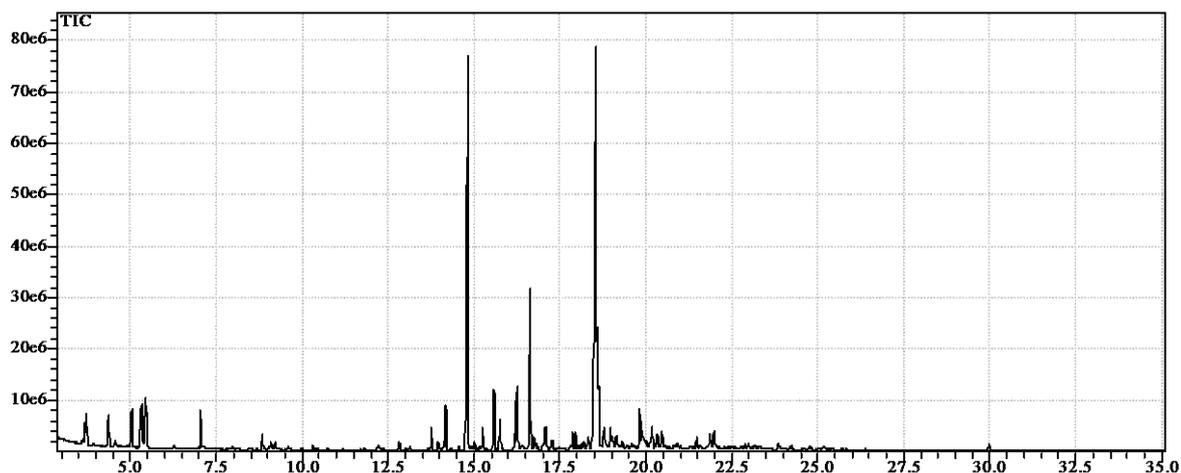


Figura 1 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *Lantana caatingensis*.

Nos ensaios de atividade antibacteriana *in vitro*, das seis linhagens analisadas, cinco apresentaram atividade significativa (do ponto de vista clínico $CIM \leq 1024 \mu\text{g/mL}$) ao óleo essencial de *Lantana caatingensis*, exceto a cepa multiresistente *S. aureus* (ATCC 6538), sendo o melhor resultado para a linhagem *S. aureus* (ATCC 12692) com CIM de $64 \mu\text{g/mL}$, seguido de *E. coli* multiresistente (EC 27) com CIM de $256 \mu\text{g/mL}$ e *P. aeruginosa* (ATCC 15442) com CIMs de $256 \mu\text{g/mL}$, como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M. em relação às linhagens bacterianas.

| Linhagens bacterianas | <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) | <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | <i>S. aureus</i> (358) | <i>E. coli</i> (27) | <i>S.aureus</i> (ATCC 12692) | <i>P.aeruginosa</i> (ATCC 15442) |
|--|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| CIM ($\mu\text{g/mL}$) | ≥ 1024 | 512 | 512 | 256 | 64 | 256 |

Muitas das substâncias constituintes de óleo essencial possuem habilidade de romper ou penetrar na estrutura lipídica presente na estrutura bacteriana levando ao processo de morte (KOYAMA et al., 1997). Para se conhecer o modo de ação dos constituintes presentes nos óleos essenciais será necessário examinar isoladamente cada constituinte, e a sincronização entre eles, para averiguar as atividades bacterianas (COSTA et al., 2011). Já a tolerância relativa aos óleos essenciais encontrada nas bactérias Gram negativa tem sido atribuída à

presença de uma camada hidrofílica externa que pode bloquear a penetração de componentes hidrofóbicos através da membrana da célula-alvo (MANN et al., 2000).

Na Tabela 3 pode-se observar a ocorrência de interferência do óleo essencial de *L. caatingensis* sobre o poder antibacteriano dos antibióticos utilizados na clínica (amicacina, neomicina e gentamicina), frente às linhagens de *S. aureus* e *E. coli* em graus variados de susceptibilidade.

Tabela 3 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos aminoglicosídeos neomicina (NEO), amicacina (AMI) e gentamicina (GEN) na ausência e presença do óleo essencial (OE) de *Lantana caatingensis* M.

| Linhagens | AMI | AMI + OE | NEO | NEO + OE | GEN | GEN + OE |
|---------------------------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| <i>S. aureus</i> 12692 | 32 | 8 | 64 | 64 | 128 | 512 |
| <i>E. coli</i> 27 | 64 | 32 | 16 | 8 | 64 | 64 |

Os resultados obtidos nesse ensaio indicam que a associação do óleo essencial com amicacina apresentou um sinergismo importante, com uma redução de 75% do valor da CIM frente a *S. aureus* (ATCC 12692) e redução em 50% do valor da CIM frente à linhagem *E. coli* (EC 27). Com relação aos demais aminoglicosídicos não houve qualquer efeito sinérgico frente a *S. aureus*, sendo que sua associação com gentamicina promoveu uma interferência negativa, promovendo uma ação antagônica, com o aumento da CIM de 128 µg/mL para 512 µg/mL, representando um aumento da CIM em 400%. Resultados semelhantes foram encontrados por OLIVEIRA, et al. (2006) com óleos essenciais de *Plectranthus amboinicus*, *Conyza bonariensis* e *Eucalyptus citriodora*. O óleo essencial de *L. caatingensis* conferiu um efeito sinérgico à neomicina frente a linhagem de *E. coli* (EC 27), com redução de 50% da CIM, não interferindo com o efeito antibacteriano da gentamicina.

4.4. Conclusão

Foi possível a identificação e quantificação de 24 componentes no óleo essencial de *Lantana caatingensis*. Observou-se uma elevada proporção de sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno, o espatulenol e o biciclogermanecreno, os seus principais representantes. O óleo apresentou atividade antibacteriana, sendo mais expressivos frente a linhagens de *S. aureus*

(ATCC 12692), *E. coli* (EC 27) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442). A modulação da resistência bacteriana na presença de óleo e antibióticos a atividade antibacteriana foi observada com a redução do halo e sua inibição do crescimento das cepas, principalmente frente a *S. aureus* (ATCC 12692), apresentando sinergismo importante, com uma redução de 75% da concentração para o valor da CIM da amicacina. Tais resultados justificam estudos posteriores com o óleo de *Lantana caatingensis*, fracionamento do óleo essencial das folhas para a identificação dos constituintes ativos, a existência de efeitos sinérgicos para sua possível utilização associado aos aminoglicosídeos ou a outros antibióticos elevando seu potencial antibacteriano, sua eficácia e evitando as possíveis resistências ao medicamento.

Referências

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, IL, USA, 2007.
- BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.;MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349-356, 2007.
- COSTA, J.G. M.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; LIMA, S. G.; BRAZ-FILHO, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 721-725, 2011.
- GHISALBERT, E. L. *Lantana camara* L (verbennaceae). **Fitoterapia**, v. 71, p. 467-486, 2000.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, compatibility of results and assay choice. **Phytochem Analysis**, v. 11, p. 137-147, 2000.
- KOYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with na interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kisohinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacology**, v. 28, p. 797-804, 1997.
- LIMA, A. C. **Preparação de dispersões sólidas de praziquantel com polivinilpirrolidona pelo processo do fluido supercrítico**. Tese – Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009.
- MANN, C.M.; COX, S.D.; MARKHAM, J.L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology** v. 30, p. 294-297, 2000.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**, Approved Standard M7-A6, 6th ed., NCCLS: Wayne, 2003.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 77-82, 2006.

RANDRIANALJAONA, J.-A.; RAMANOELINA, P. A. R.; RASOARAHONA, J. R. E.; GAYDOU, E. M. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. **Analytica Chimica Acta**, v.545, p.46-52, 2005.

RAVIDER, K. K.; DAIZY R.; BATISH AND SINGH & KULDIP S. D. Status, invasiveness and environmental threats of three tropical American invasive weeds (*Parthenium hysterophorus* L., *Ageratum conyzoides* L., *Lantana camara* L.) in India. **Biological Invasions**, v. 8, p. 1501-1510, 2006.

RODAL, M.J.N., NASCIMENTO, L. M. Levantamento Florístico da Floresta Serrana da Reserva Biológica de Serra Negra, Microrregião de Itaparica, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n.(4), p. 481-500, 2002.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogens pathogenic bacteria to Turkish thyme and Oregano hydrossols. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 36, p. 467-473, 2005.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L; SUAREZ, E. Y.; GOODOY, H. M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**, v. 11, p. 230-234, 2004.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.103, p.277-281, 2008.

SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R.; SILVA, J. D.; MAIA, J. G. S. The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.14, p.208-210, 1999.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA M.C.; HENRIQUES M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SOUSA, E. O.; COLARES, A. V.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA S. G.; COSTA, J. G. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) Growing in Brazil Northeastern. **Records of Natural Products**, v. 4, p. 31-77, 2010.

VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSE, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B.E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal Ethnopharmacology**, v.88, p.137-143, 2003.

CAPÍTULO III

Preparo e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina.

Aguiar, U.N.¹; Rocha, M.S.¹; Lima, S.G.¹

1 - Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

Resumo

O *Croton zehntneri* é uma planta do nordeste brasileiro, largamente utilizada na medicina popular como agente sedativo, estimulante de apetite e calmante de distúrbios intestinais. O seu óleo essencial e seus constituintes químicos tem demonstrado várias atividades farmacológicas. Entretanto, sua instabilidade térmica e sua baixa solubilidade em água dificultam sua aplicação tecnológica. Utilizando a β -ciclodextrina, na formação de um complexo de inclusão com o óleo essencial de *C. zehntneri*, podemos melhorar a estabilidade, alterar a solubilidade de fármacos, modelar a velocidade de dissolução e a liberação controlada desse óleo. Nesse estudo, preparou-se o complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zehntneri* com β -ciclodextrina, e realizou-se a sua caracterização por métodos espectroscópicos e cromatográficos. Os espectros de infravermelho indicaram interação da β -ciclodextrina com o óleo essencial de *C. zehntneri*, fato corroborado pelo valor da constante de estabilidade e pelo perfil apresentado na calorimetria exploratória diferencial. No entanto técnicas mais detalhadas serão empregadas a fim de elucidar tais sistemas, como difração de raio-X, ressonância magnética nuclear, microscopia eletrônica de varredura e cálculos computacionais.

Palavras-chave: complexo de inclusão, *Croton zehntneri*, óleo essencial, solubilidade.

Preparation and characterization of the inclusion complex essential oil of *Croton zehntneri* with β -ciclodextrina

Abstract

The *Croton zehntneri* is plant in northeastern Brazil is widely used in folk medicine as a sedative agent, appetite stimulant and calming intestinal disorders. The essential oil and its chemical constituents have demonstrated several pharmacological activities. This However, their thermal instability and low water solubility hinder their technological application. Using β -cyclodextrin to the formation of inclusion complex with the essential oil of *C. zehntneri*, we can improve the stability, alter the solubility of drugs, shaping the dissolution rate and control the release of oil. In this study we sought the formation of the inclusion complex of essential oil from *C. zehntneri* with β -cyclodextrin, and their characterization by spectroscopic and chromatographic methods. The IR spectra indicate a interaction of β -cyclodextrin with essential oil from *C. zehntneri*, a fact corroborated by the stability constant and for scanning calorimetry. However more detailed techniques will be employed to elucidate such systems, such as X-ray diffraction, nuclear magnetic resonance, scanning electron microscopy and computer calculations.

Keywords: inclusion complex, *Croton zehntneri*, essential oil, solubility.

5.1. Introdução

A espécie *Croton zehntneri*, conhecida popularmente como canela de cunha, canelinha ou canela-brava, pertence à família Euforbiaceas, é usada comumente na medicina popular principalmente como sedativo, como estimulante de apetite e para aliviar distúrbios intestinais, sendo comprovados os efeitos antinociceptivos de seus óleos essenciais (OLIVEIRA, 2001). É uma planta subarborescente e caducifolia, sendo que o seu aroma varia entre exemplares desta planta coletados em diferentes regiões do Nordeste. Isto se deve à variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos seus óleos essenciais (CRAVEIRO, 1978). Assim, distinguem-se para esta espécie quatro tipos químicos como: anetol - para os exemplares coletados em Fortaleza (CE) e Viçosa (CE); eugenol - para os coletados em Areia Branca (RN) e Quixadá (CE); metil-eugenol – para os coletados em Ipu (CE) e Oeiras (PI); estragol – para os exemplares coletados em Simões (PI), Tianguá (CE) e Granja (CE) (MORAIS et al., 2006).

Por estarem presentes em diversas partes das plantas, produzidos através de seu metabolismo, possuir o seu potencial farmacológico comprovados em estudos científicos, de fácil extração e serem economicamente viáveis, os óleos essenciais tem assumido papel de destaque nas pesquisas em produtos naturais. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros, sendo que a grande maioria é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2010).

Os óleos essenciais das espécies do *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius* apresentam na sua constituição monoterpenóides e sesquiterpenóides, como também fenilpropanóides; O *C. argyrophylloides* apresentam monoterpenóides e sesquiterpenóides, mas não contém fenilpropanóides (MORAIS et al., 2006).

Resultados publicados sobre o óleo essencial de espécies do gênero *Croton*, verificaram na espécie *C. zehntneri*, estragol (76,8%), como composto majoritário (COSTA et al., 2008).

O estragol ou metilchavicol, um dos principais constituintes do óleo essencial de *C. zehntneri*, caracteriza-se por ser um éter fenilpropanóide, designado 4-metoxi-2-propenilbenzeno (**Figura 1**) (VINZENCI et al. 2000).

Segundo SHAHAT et al. (2008), o componente ativo responsável pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Enterolobium contortisiliquum* (Leguminosae) é o estragol.

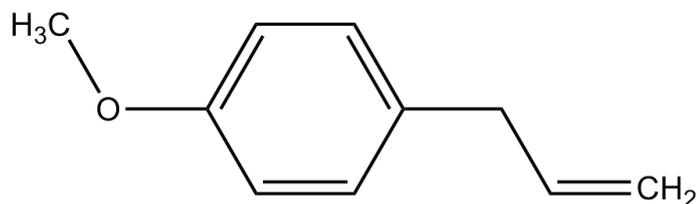


Figura 1 – Estrutura do estragol.

A essa substância já foram descritas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, o que credencia como constituinte para um possível fármaco. Foram demonstradas também atividade antinociceptiva (OLIVERA et al., 2004) e depressora sobre o sistema nervoso central (BATATINHA et al., 1995). Considerando suas propriedades físico-químicas, é uma substância que se apresenta líquida a temperatura ambiente, de aspecto oleoso, incolor ou levemente amarelado. Possui pouca estabilidade quando exposto ao ar, umidade, luz, calor e metal (SIMÕES et al., 2010). Entretanto, sua instabilidade térmica, sua baixa solubilidade em água e sua elevada volatilidade dificultam aplicabilidade tecnológica. Essas características podem ser melhoradas através da formação do complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zenhtneri* com β -Ciclodextrina (OEC/ β -CD).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, obtidos a partir de degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (LYRA et al., 2010; GUEDES et al., 2008), solúveis em água que possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando de forma exponencial sua solubilidade em meio aquoso (BARRETO, 2008). Apesar do grande número de trabalhos desenvolvidos na linha de pesquisa de compostos de inclusão com CDs, a caracterização dos complexos, constitui, ainda hoje, uma etapa delicada no processo de síntese (BRITTO et al., 2004).

Estruturalmente as CDs apresentam conformação espacial tronco cônica, com grupos hidroxilas primários e secundários voltados para a face externa, delimitando a face mais estreita e a face mais larga do cone, respectivamente (**Figura 2**). A cavidade da molécula é hidrofóbica, enquanto a superfície é hidrofílica.

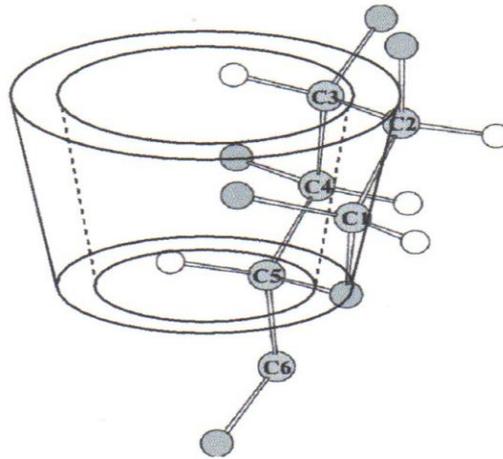


Figura 2 - β -ciclodextrina (β -CD). **Fonte:** (ADAPTADO de BRITTO; NASCIMENTO; DOS SANTOS, 2004).

Neste trabalho foi avaliada a preparação e análise do complexo de inclusão do óleo essencial de *C. zenhtneri*, coletado em Simões (PI), com β -ciclodextrina usando técnicas de espectroscopia. A escolha do desenvolvimento desse trabalho, inicialmente com *C. zenhtneri*, é devido a sua ampla presença no município e região circunvizinha, a extensa e potencial aplicação terapêutica do componente estragol, substância majoritária dessa planta, de fácil extração e baixo custo de produção.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Material Vegetal

Folhas de *C. zenhtneri* (Euforbiaceae), foram coletadas em maio de 2011 no município de Simões-PI, Brasil (S = 7° 35'900'' W = 40° 40'404''; 786 m.), para extração dos constituintes voláteis. Uma amostra foi identificada e depositada no Herbário Caririrense Dárdaro de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri, sob o número 1619.

5.2.2. Extração dos Óleos Essenciais

O óleo essencial das folhas frescas de *C. zenhtneri* (OEC) foi extraído continuamente durante 3 horas em um aparelho tipo Clevenger®, seco com sulfato de sódio anidro, pesado e armazenado em frasco tampado, protegido com papel alumínio, armazenado em refrigerador sob temperatura média de 4 °C, até o momento das análises.

5.2.3. Análise por Cromatografia Gasosa

A análise da amostra de óleo foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) utilizando equipamento Hewlett-Packard, modelo 5890 SERIES II, coluna capilar apolar DB-5, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de

0,25 μm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1 mL/min e modo de divisão 1/10. A temperatura do injetor e do detector foram 250 °C e 270 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 50 °C a 180 °C a uma taxa de 4 °C/min e em seguida 180 °C a 260 °C a uma taxa de 10 °C/min., permanecendo 10 minutos a 260 °C. Os espectros de massas foram gravados na faixa de 30 a 450 m/z, e o volume injetado foi de 1 μL .

Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, obtidos com fonte de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Uma série de C8-C20 n-alcanos foi usada como referência para o cálculo do índice de retenção, bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura. A composição percentual foi obtida a partir da medida da integração das áreas sobre os picos (DE LIMA et al., 2009; ADAMS, 2007; JOULAIN e KÖNIG, 1998; SOUSA et al., 2010).

5.2.4. Preparo do Complexo de Inclusão

O complexo de inclusão entre o óleo essencial de *C. zehntneri* com β -ciclodextrina (OEC/ β -CD) foi preparado, em triplicata, de acordo com o método proposto por BHANDARI; D'ARCY; BICH (1998), com algumas modificações. Uma alíquota 25 mg do OEC foi solubilizado em 500 μL de etanol PA, adicionado 200 mg de β -CD e 10 mL de uma mistura etanol:água (1:2). Após a adição do OEC, a mistura foi agitada a 150 rpm por 4 horas a 25 °C. Após este período, a suspensão foi retirada da agitação e resfriada a 4 °C por 12 horas. O precipitado foi recolhido, seco por liofilização e pesado.

5.2.5. Preparo da Mistura Física

A mistura física entre o OEC e a β -CD na razão de 1:1 foi homogenizada com o auxílio de gral com pistilo. A mistura física (MF) foi armazenada em frasco hermeticamente fechado.

5.2.6. Diagrama de Solubilidade do Óleo Essencial de *C. zehntneri*

O estudo de solubilidade foi realizado conforme o método descrito por Higuchi e Connors (1965), adicionando-se excesso de OEC a tubos de ensaio contendo soluções aquosas da β -CD, em concentrações crescentes (0 – 10 mM). As amostras foram mantidas sob agitação, por 24 horas. Alíquotas foram retiradas, filtradas em papel filtro e adequadamente diluídas em água destilada. O conteúdo foi determinado em espectrofotômetro (Varian AA 50) em 475 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A constante de estabilidade (K_c) foi calculada com os dados obtidos da equação da ciclodextrina, usando a seguinte fórmula: $K_{1:1} = \text{Inclinação} / S_0 (1 - \text{Inclinação})$ onde, S_0 corresponde à solubilidade intrínseca do óleo essencial.

5.2.7. Caracterização do Complexo de Inclusão

5.2.7.1. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de IV do OEC, β -CD, MF e CI-L foram obtidos na região do IV médio (4000 a 600 cm^{-1}) em um espectrômetro Vertex 70. Os espectros foram obtidos a partir de 64 varreduras, com uma resolução de 4 cm^{-1} . Aproximadamente 20 μL do óleo essencial de *L. caatingensis* e 5 mg da β -CD, da mistura física e do CI foram no espectrômetro.

5.2.7.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica através de DSC (2920 TA Instruments), foi realizada em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, empregando uma massa de aproximadamente 5,5 mg, acondicionada em porta-amostra de alumina hermeticamente fechado. Analisou-se o OEC, a β -CD, a MF e o CI-L entre 25 – 600 $^{\circ}\text{C}$, sob um razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

5.3. Resultados e Discussão

O rendimento do óleo, obtido a partir de 325g de folhas de *C. zehntneri*, canelinha, foi de cerca de 2,0%. A análise por CG-EM permitiu a identificação de 100% dos constituintes integrados. Os principais componentes identificados foram: eucaliptol, estragol (constituintes majoritário), espatulenol. A **Figura 3** mostra o perfil cromatográfico da amostra de óleo analisada por CG-EM. Foi possível identificar quatro constituintes principais, sendo o estragol (99,15%) o principal componente. eucaliptol, biciclogermacreno e o espatulenol aparecem em baixíssima abundância relativa.

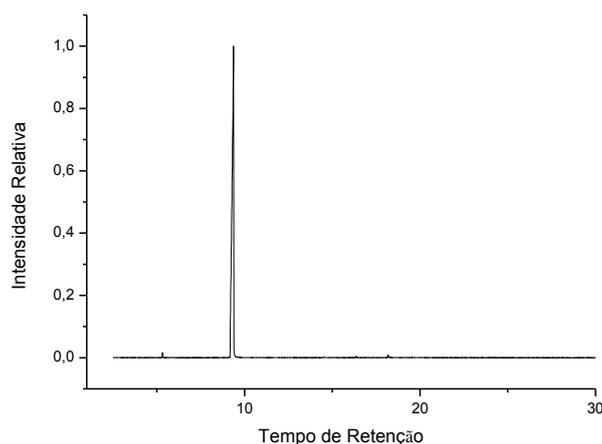


Figura 3 – Perfil cromatográfico (TIC) do óleo essencial de *C. zehntneri*

5.3.1. Diagrama de solubilidade do óleo essencial de *C. zenhtneri*

Por meio da leitura espectrofotométrica observou-se que o OEC tem um pico máximo de absorvância em 268 nm em etanol (**Figura 4**). A curva de calibração do OEC foi construída em 268 nm e a equação foi $Y = 0,018X - 0,315$ (**Figura 5**). A correlação foi 0,9962, onde X era a concentração de OEC (ppm), e Y era a absorvância a 268 nm.

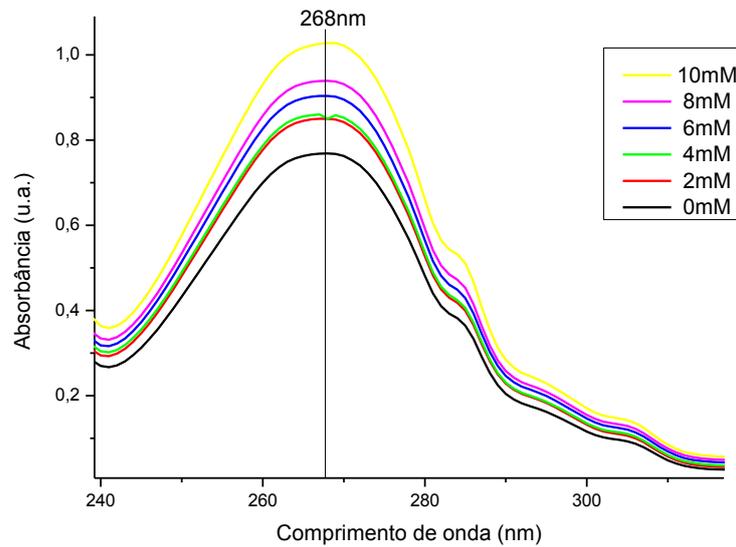


Figura 4 – Leitura espectrofotométrica do OEC.

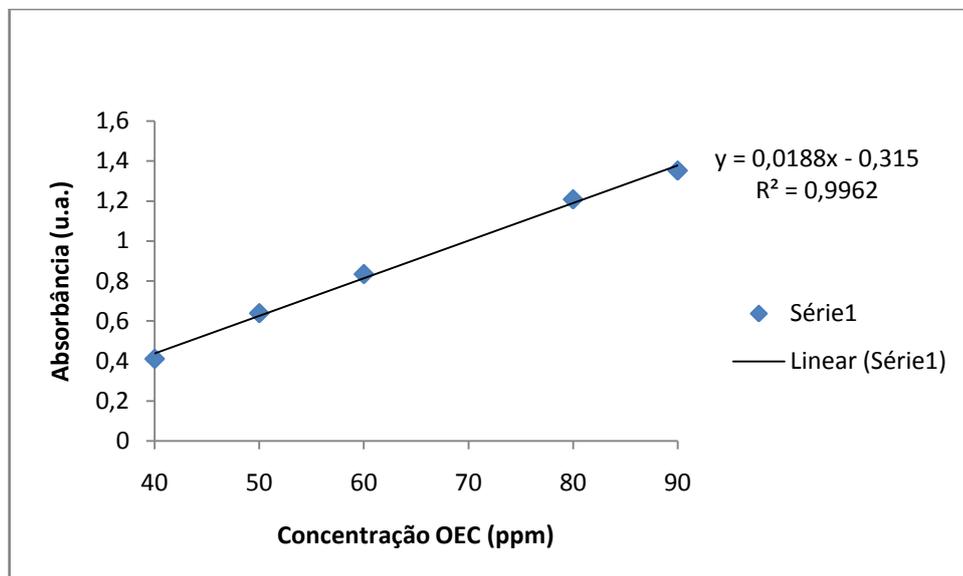


Figura 5 – Curva de Calibração do OEC.

O diagrama de solubilidade obtido a partir da β -CD demonstrou um aumento linear da solubilidade do OEC, conforme **Figura 6**, com uma inclinação (S_0) igual a um, caracterizando-o como um diagrama do tipo A_L , ou seja, o aumento da solubilidade é

proporcional ao incremento das concentrações do agente complexante em uma estequiometria 1:1 (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

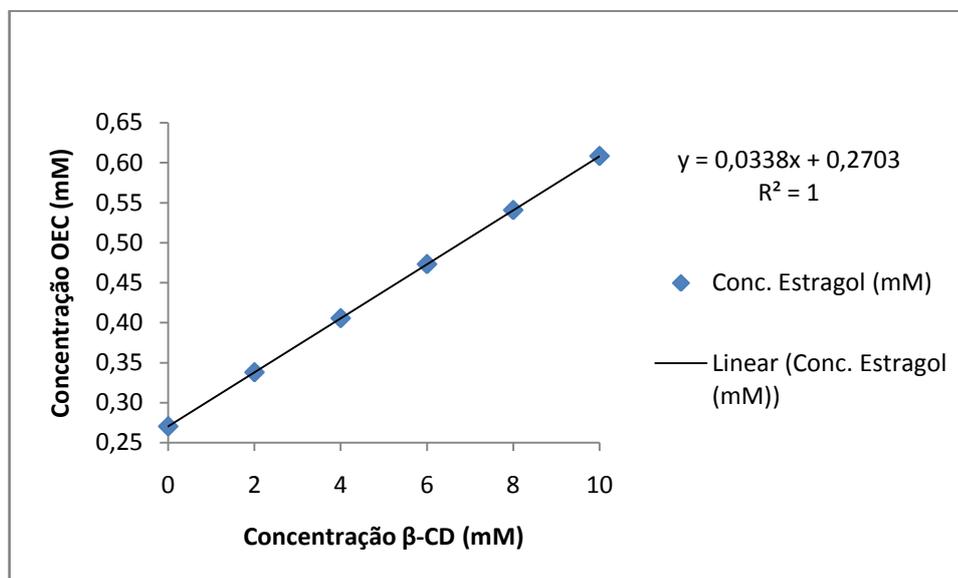


Figura 6 – Diagrama de solubilidade de OEC em presença de β -CD.

A constante de estabilidade (K_c) do sistema OEC/ β -CD obtido foi de $129,6 \text{ M}^{-1}$, indicando uma interação entre o OEC e a β -CD. Esse resultado está de acordo com outros complexos de inclusão obtidos onde a β -CD, é incorporada a pequenas moléculas, através da parte hidrofóbica de sua estrutura (FERNANDES et al., 2009). O K_c é um parâmetro de grande interesse para a caracterização da interação molecular entre os diversos componentes do complexo, sua estequiometria e viabilidade prática (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

No entanto, deve-se buscar não apenas o melhor incremento de solubilidade, mas também a menor proporção de β -CD para solubilização do fármaco (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2005).

5.3.3. Preparo do Complexo OEC/ β -CD

Por sua grande eficiência e facilidade de execução em escala laboratorial, a técnica de co-precipitação no preparo do complexo de inclusão (WANG et al., 2011), combinada com sua ampla utilização para obtenção de complexo de inclusão da β -CD com óleos essenciais (WANG et al., 2011; WANG; JIANG; LI, 2009; TIAN; JIANG; LI, 2008; WALECZEK et al., 2003; ZHAN et al., 2008; CEVALLOS; BUERA; ELIZALDE, 2010), foi escolhida para o preparo do complexo de inclusão OEC/ β -CD.

A formação do complexo de inclusão é facilitada pela remoção das moléculas de água do interior da cavidade, parcialmente hidrofóbica, da CD e sua substituição por moléculas

apolares de forma espontânea, sendo, portanto, um processo energeticamente viável (ROCHA, 2012; RIBEIRO, 2008; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; OLIVEIRA et al., 2011; SZEJTLI, 1998; WANG et al., 2011; LYRA et al., 2010, GUEDES et al., 2008).

A solubilidade intrínseca da molécula hóspede também é determinante neste processo (RIBEIRO, 2008) e por fim, como o fenômeno de complexação é um processo concentração dependente, a razão molar entre a molécula hóspede e a ciclodextrina também influencia no processo de formação dos complexos de inclusão (OLIVEIRA et al., 2011).

Sabendo que o OEC é constituído quase que em sua totalidade por estragol, verificou-se compatibilidade da massa molecular desse fenilpropanóide ($148,2 \text{ g mol}^{-1}$) para a formação do complexo com β -CD, além de terem baixa solubilidade intrínseca em água.

5.3.4. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de absorção no IV é restrita a espécies moleculares que apresentam alteração do momento de dipolo elétrico intrínseco como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional, provocado pela absorção da energia radiante (SILVA, 2008), sendo essa técnica analítica bastante utilizada para a avaliação da ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido, mediante comparação das bandas da molécula hóspede e do carreador, com a mistura física e o complexo (CORTI et al., 2007; MACEDO et al., 2010). Os espectros fornecem informações sobre a estrutura molecular, dinâmica e ambiente (LARKIN, 2011; THYGESEN et al. 2003), sendo estas informações de grande importância na confirmação da identidade de uma substância analisada. Os espectros de infravermelho (IV) da β -CD, OEC, MF e CI-L são apresentados nas **Figura 7**.

O espectro de infravermelho da β -CD mostrou bandas de absorção em 3381 cm^{-1} (estiramento O – H), 2922 cm^{-1} (estiramento C – H), 1153 cm^{-1} (estiramento C – O) e 1024 cm^{-1} (estiramento C – O – C). O espectro de IV do OEC mostrou bandas de absorção em 3000 e 2945 cm^{-1} (estiramento C – H), 1658 e 1506 cm^{-1} (estiramento C = C) de aromático, 1250 e 1010 cm^{-1} (estiramento C – O arílico e C – O alquílico respectivamente) característicos da presença do estragol. No espectro do complexo de inclusão (CI-L) observou-se uma não similaridade com o espectro do OEC e forte semelhança com o espectro da β -CD. Nas bandas localizadas em 2945 , 1658 e 1506 cm^{-1} houve a redução da sua intensidade comparada ao espectro do OEC e da MF, sugerindo que as ligações duplas possivelmente, estão implicadas na formação destes complexos, visto que a inserção de uma molécula-hóspede no interior da cavidade da β -CD provoca uma restrição conformacional, reduzindo a livre movimentação das moléculas encapsuladas, além de conferir uma barreira para a detecção no equipamento o que contribui para a redução da intensidade de seu sinal. Esse mesmo efeito foi percebido por

FINI et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2011 e ROCHA, 2012 quando prepararam complexos de inclusão utilizando a β -CD.

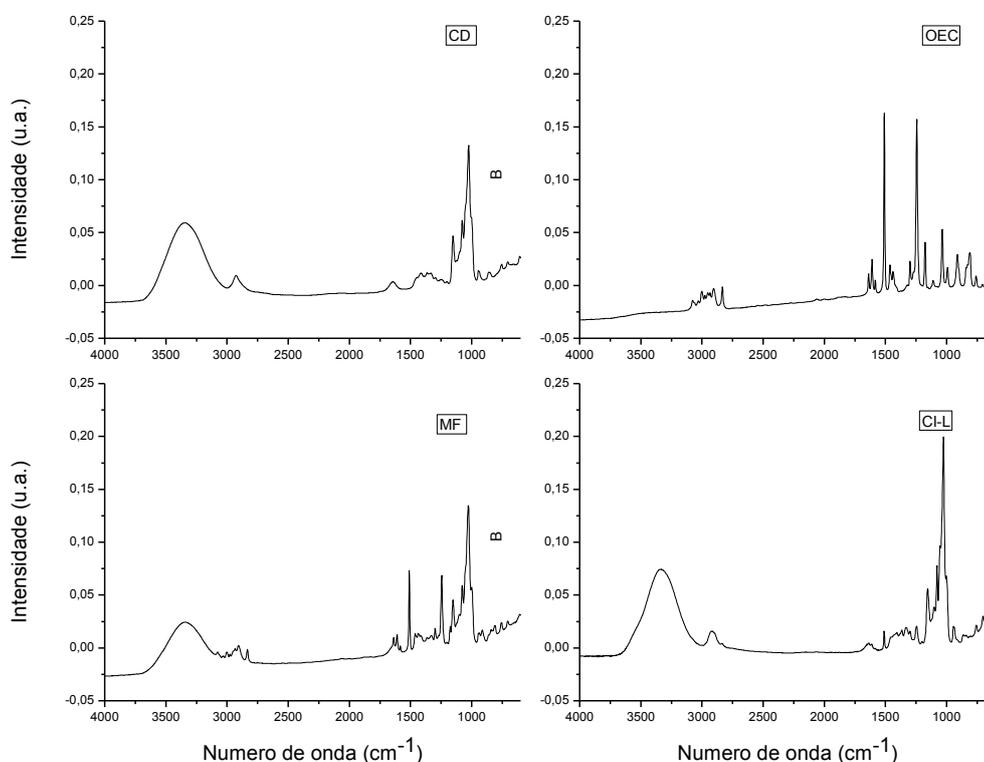


Figura 7 - Espectros das Amostras de β -CD, MF, CI-L e OEC

5.3.5. DSC

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma das técnicas mais utilizadas para confirmar a formação do complexo de inclusão no estado sólido, devido a sua sensibilidade em detectar possíveis alterações nos eventos térmicos característicos da molécula hóspede quando esta se encontra no interior da cavidade da ciclodextrina (WANG et al., 2011; LYRA et al., 2010; KARATHANOS et al., 2007), bem como a estabilidade do sistema e sua cristalinidade (CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007). O comportamento térmico de todos os materiais foi investigado, usando DSC em atmosfera inerte (**Figura 8**). O termograma da β -CD e da MF mostra um acentuado pico endotérmico em 120 °C provocado pela perda de água presente no interior de sua cavidade hidrofóbica. Este pico está muito reduzido no termograma do CI-L, indicando um possível deslocamento das moléculas de água por moléculas de estragol, indicando que ocorreu a formação do complexo. Ainda na **Figura 8**,

pode ser observado no termograma de DSC característica do OEC, composto por um pico endotérmico em 80 °C, seguido de um pico exotérmico em 177 °C. A curva DSC da MF parece ser a simples superposição da curva DSC da β -CD. Entretanto, um padrão diferente foi observado na curva DSC do CI-L. O pico endotérmico em 120°C teve sua intensidade reduzida, indicando que parte da água que estava inicialmente presente na β -CD foi deslocada pelo OEC, devido sua maior afinidade pela cavidade hidrofóbica da β -CD (WANG et al., 2011), sugerindo a formação do complexo. O pico exotérmico, desaparece no CI-L, indicando uma maior estabilidade do OEC complexado quando comparado ao óleo livre.

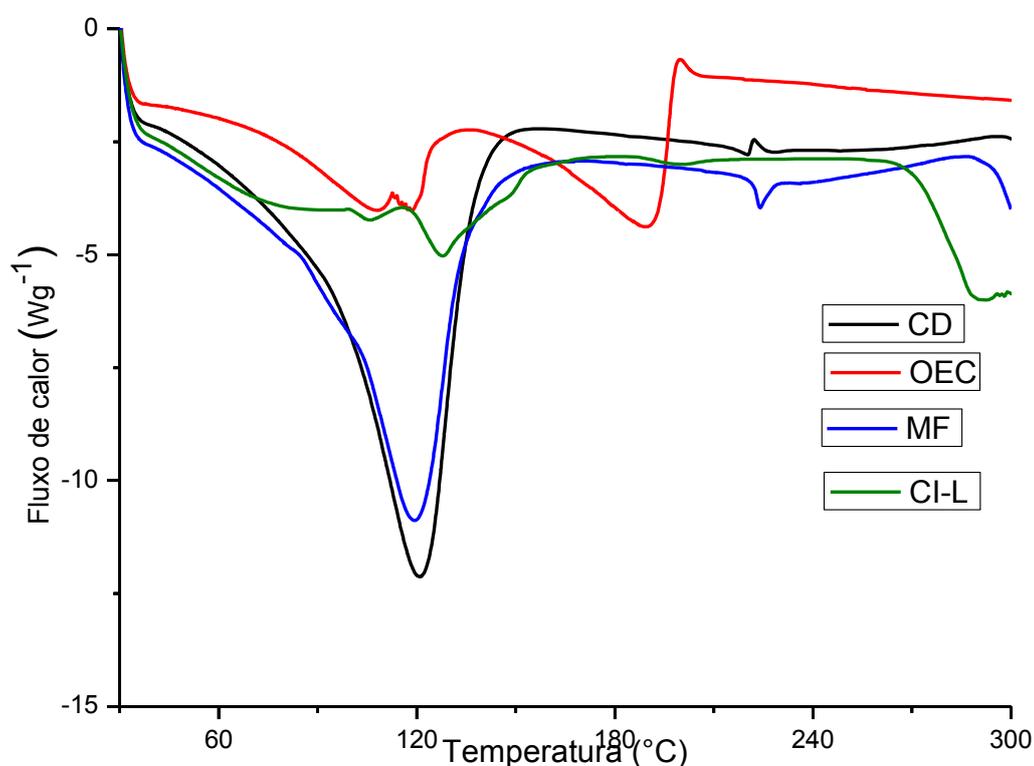


Figura 8 - Termograma de DSC do β -CD, MF, CI-L e OEC

5.5. Conclusão

Os resultados deste trabalho mostram claramente a formação do complexo de inclusão entre o óleo essencial de *C. zehntneri* com β -Ciclodextrina pelo método de co-precipitação, em todas as proporções avaliadas. Os resultados da espectroscopia de IV e DSC demonstram as diferenças nas propriedades físico-químicas do OEC livre e complexado. Além disso, observou-se que existe compatibilidade da massa molecular desse fenilpropanóide para a

formação do complexo com β -CD, referendada pelo valor da constante de estabilidade, sendo assim possível a aplicabilidade prática do material estudado.

5.6. Referências

ADAMS, R. P. Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, IL, USA, 2007.

BARRETO, L. C. L. S.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, V. 4, n. 27, p. 629-636, 2008.

BATATINHA M.J.; DE SOUZA-SPINOSA H.; BERNARDI M.M. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 53-57, 1995.

BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T. Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.1494-1499, 1998.

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR., C. S.; DOS SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v.27, n.6, p.882-888, 2004.

CEVALLOS, P. A.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v.99, p.70-75, 2010.

CORTI, G; CAPASSO, G; MAESTRELLI, F; CIRRI, M; MURA, P. Physicochemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 480-486, 2007.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O. CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R., SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 583-584, 2008.

- CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO, M. I. L. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de *Croton*. **Ciências e Cultura**, v. 30, p. 326-327, 1978.
- CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.1-9, 2007.
- DE LIMA, S.G.; MOITA NETO, J.M.; COSTA, J.G.M.D.; CITÓ, A.M.G.L.; REIS, F.A.M. Monoterpenes, sesquiterpenes and fatty acids from *Julocroton triqueter* (euphorbiaceae) from Ceará-Brazil. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.53, p.1718-1720, 2009.
- FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I. M.; NOVÁK, C. S. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.95 n.3, p.855-863, 2002.
- FINI, A.; OSPITALI, F.; ZOPPETTI, G.; PUCCINI, N. ATR/Raman and Fractal Characterization of HPBCD/Progesterone Complex Solid Particles. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.9, p. 2030-2040, 2008.
- GUEDES, F. L.; ALVES, G. M. C.; SANTOS, F. L. A.; LIMA, L. F.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.89, n.3, p.220-225, 2008.
- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. **Advanced Analytical Chemistry Instrumental**, v. 4, p. 207–212, 1965.
- JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. E.B.-Verlag Hamburg, 1998.
- KARATHANOS, V. T.; MOURTZINOS, I.; YANNKOPOULOU, K.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v.101, p. 652-658, 2007.
- KOHATA, S.; KOUKI, J.; AKIRSA, O. Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ - and modified β -CyD) and of metal-(β -CyD) complexes in the solid phase. **Termochim Acta**, v.217, p.187-198, 1993.

LARKIN, P. J. IR and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. Oxford: Elsevier, 2011.

LIMA, A. C. **Preparação de dispersões sólidas de praziquantel com polivinilpirrolidona pelo processo do fluido supercrítico.** Tese – Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009.

LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 18–28, 2005.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

MACEDO, L, F, O. Preparação e Caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2-Hidroxipropil-Gama-Ciclodextrina. Dissertação - Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. 2010.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A. C.; DA SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1471-1474, 2001.

OLIVEIRA, H. D.; HOLANDA, F. R.; PONTE, E. L.; EVANGELISTA, G. L; CARVALHO, M. A. S.; SANTOS, C. F.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; OLIVEIRA, A. C.; LEALCARDOSO, J. H. Toxicidade aguda e sub-aguda do óleo essencial de *Croton zehntneri* em camundongos. **Ciências e Tecnologia**, Fortaleza/CE, v. 6, n. 2, p. 11-21, 2004.

OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F.;L. DE OLIVEIRA, F. C. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v.115, p.8511-8519, 2011.

RIBEIRO, A. M. **Preparação, caracterização e aplicação de complexos de inclusão de miconazol com metil- β -ciclodextrina: administração bucal.** Dissertação. Universidade do porto, 2008.

ROCHA, M. S. **Análise cromatográfica do complexo OELC β -CD.** Dissertação. Universidade Federal do Piauí, 2012.

SHAHAT, A. A.; EL-BAROUTY, G.; HASSAN, R. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDELRAHMAN, F. H.; SALEH, M. A. Chemical composition and antimicrobial activities os the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 43, n. 6, p. 519-525, 2008.

SILVA, F. E. B. **Determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em formulações farmacêuticas por ATR-FTIR e DRIFTS empregando calibração multivariada.** [Tese]. Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P. G.; GOSMANN, J.C.P. MELLO, L.A. MENTZ AND P.R. PETROVICK. (ORG.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6th Ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/UFSC, Brasil, 2010.

SOUSA, E. O.; SILVA, N. F.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; DE LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. **Pharmacognosy Magazine**, v.22, p.78-82, 2010.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, v.98, p.1743-1753, 1998.

THYGESEN, L. G.; LØKKEY, M. M.; MICKLANDER, E.; ENGELSEN, S. B. Vibrational microspectroscopy of food Raman vs. FT-IR. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p.50-57, 2003.

TIAN, Z.-N.; JIANG, Z.-T.; LI, R. Inclusion interactions and molecular microcapsule of *Salvia sclarea* L. essential oil with β -cyclodextrin derivatives. **European Food Research and Technology**, v.227, p.1001-1007, 2008.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: **MinervaCoimbra**, 2006.

VINCENZI M. DE; SILANO M.; MAIALETTA F.; SCAZZOCCHIO B. Constituents of aromatic plants: II Estragole. **Fitoterapia**, v. 71, p. 725-729, 2000.

WALECZEK, K. J.; CABRAL MARQUES, H. M.; HEMPEL, B.; SCHMIDT, P. C. Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.55, p.247-251, 2003.

WANG, Y.; JIANG, Z.-T.; LI, R. Complexation and molecular microcapsules of *Litsea cubeba* essential oil with β -cyclodextrin and its derivatives. **European Food Research and Technology**, v.228, p.865-873, 2009.

WANG, J.; CAO Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v.127, p.1680-1685, 2011.

ZHAN, H.; JIANG, Z.-T.; WANG, Y.; LI, R.; DONG, T.-S. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β -cyclodextrin and its derivatives. **European Food Research and Technology**, v.227, p.1507-1513, 2008.