

ÓLEO DE MARMELEIRO (*Croton blanchetianus* BAILL): FITOQUÍMICA, PREVISÕES *DRUGLIKENESS* E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO*

Illa F. M. Silva¹; Heloisa C. R. Madeiro²; Filipe C. Soares²; João Pedro M. Leite²; Victor José C. Vilanova²; Luanna C. P. Bezerra²; Johnnatan D. de Freitas³; Francisco A. e Silva Filho⁴; Valdiléia T. Uchôa⁵; Antônio L. M. Maia Filho^{5,6}

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Piauí, Campus Torquato Neto, Teresina-PI.

²Discente de Iniciação Científica, Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Estadual do Piauí, Campus Torquato Neto, Teresina-PI.

³Docente e Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais, Instituto Federal de Alagoas, Campus Marechal Deodoro, Maceió-AL.

⁴Docente, Universidade Estadual do Piauí, Campus Parnaíba, Parnaíba-PI.

⁵Docente e Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Piauí, Campus Torquato Neto, Teresina-PI.

⁶Pesquisador do Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Estadual do Piauí, Campus Torquato Neto, Teresina-PI.

Palavras-Chave: Analgésico, *in silico*, óleo essencial.

Introdução

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a danos reais ou potenciais nos tecidos (Sluka e George, 2021). Diversos analgésicos mostraram eficácia no alívio da dor, contudo, os efeitos adversos associados representam desafios para um tratamento eficaz. Por exemplo, o paracetamol (acetaminofeno) possui potencial hepatotóxico e é amplamente disponível, o que resulta em casos frequentes de overdose, podendo causar danos hepáticos graves e, em casos extremos, insuficiência hepática aguda (Lee, 2020).

Croton blanchetianus Baill, conhecida popularmente como marmeleiro, é uma planta que ocorre naturalmente no semiárido brasileiro, sendo uma espécie pioneira e característica da caatinga. Sua distribuição geográfica abrange as regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe) e Sudeste (Minas Gerais) (Silva *et al.*, 2024).

Na medicina tradicional, as folhas e a casca desta planta são empregadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais, reumatismo e dores de cabeça (Freitas *et al.*, 2020). Tem-se investigado as atividades biológicas da planta, nas suas diversas preparações, como antimicrobiana (Vasconcelos *et al.*, 2022; Malveira *et al.*, 2022), antioxidante (Oliveira *et al.*, 2022; Figueiredo *et al.*, 2022) e antifúngica (Porto *et al.*, 2021). Entretanto, são escassos na literatura a investigação da atividade antinociceptiva do óleo essencial.

Este estudo tem como objetivo realizar uma análise fitoquímica do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*, avaliar parâmetros de semelhança com fármacos de acordo com as regras de Lipinski e Veber dos principais compostos, e investigar o provável efeito antinociceptivo deste através do modelo de dor do teste de formalina na pata em camundongos. Espera-se que os resultados obtidos contribuam para o desenvolvimento de novas terapias para o manejo da dor.

Material e Métodos

Para preparação do óleo essencial, foram coletadas as folhas da planta *C. blanchetianus* na zona rural de Parnaíba-PI. O material vegetal foi triturado, submetido a hidrodestilação em aparelho Clevenger no laboratório de química, *Campus* Parnaíba/UESPI. Realizou-se identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS) de acordo com Silva *et al.* (2023), no Laboratório de Análise Instrumental do Instituto Federal de Alagoas (IFAL).

Utilizaram-se 30 camundongos machos (*Mus musculos*), provenientes do biotério da UESPI, mantidos em gaiolas, à temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), em ciclo claro-escuro de 12 horas. Oito horas antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos em jejum e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UESPI), com parecer nº 000528/2023-51. Ao final dos testes, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (cetamina 50mg/kg e xilazina 3mg/kg). Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio) da UESPI.

Realizou-se o teste de formalina, onde os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=6): (1) Controle positivo, recebeu morfina 10mg/kg, via subcutânea; (2) Controle negativo, recebeu solução fisiológica 0,9% (0,1mL/10g/peso animal), via oral; (3) Grupos teste que receberam doses de 50, 100 e 200 mg/kg do óleo de *C. blanchetianus*, via oral. Os tratamentos foram 30 minutos (morfina) e 1h (controle negativo e testes), antes da administração de formalina 2% (20 μL) na pata direita traseira do animal.

O protocolo consiste da observação do tempo de lambida da pata durante os primeiros 5 minutos (fase aguda ou neurogênica), após a injeção de formalina na pata, com intervalo de 10 minutos, e observação de 15 minutos (fase crônica ou inflamatória), perfazendo um total de 30 minutos de protocolo.

Para a análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism 5, onde os dados foram analisados com One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, sendo considerado nível de significância de 5%.

As características moleculares dos compostos têm um papel fundamental na seleção destes como potenciais medicamentos. As propriedades físico-químicas dos compostos foram previstas utilizando o servidor online SwissADME (<https://www.swissadme.ch/>).

Os principais compostos do óleo essencial foram selecionados e avaliados de acordo com as regras de Lipinski e Veber para determinar sua adequação como candidatos a medicamentos. Os parâmetros avaliados foram peso molecular (≤ 500), doador de ligações de hidrogênio (≤ 5), aceceptor de ligações de hidrogênio (≤ 10), lipofilicidade ($\leq 4,15$), número de ligações rotativas (≤ 10) e a área de superfície polar topológica ($\leq 140 \text{ \AA}^2$) (Lipinski *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002). Os códigos SMILES canônicos utilizados para as previsões foram obtidos no site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Resultados e Discussão

Para a extração do óleo essencial de *C. blanchetianus*, foram utilizados 1.910 g de folhas, resultando em um rendimento de 0,24%. Foram identificados por CG-MS 31 compostos, todos pertencentes à classe dos terpenos e terpenoides. A Tabela 1 apresenta a composição fitoquímica do óleo, a classe de cada composto e suas respectivas porcentagem de área.

Tabela 1 – Composição fitoquímica do óleo essencial de *C. blanchetianus*

Área (%)	Composto	Classe
16,65	α -Pinoeno	monoterpeno
16,09	Espatuleno	sesquiterpenoide
15,4	Eucaliptol	monoterpenoide
12,9	Cariofileno	sesquiterpeno
9,24	Biciclogermaceno	sesquiterpeno
3,5	Óxido de isocariofileno	sesquiterpenoide
3,17	Silvestreno	monoterpeno
2,69	α -Terpineol	monoterpenoide
2,66	D-Germaceno	sesquiterpeno
2,58	α -Humuleno	sesquiterpeno
1,34	(+)-Aromadendreno	sesquiterpeno
1,21	9-epi-(E)-Cariofileno	sesquiterpeno
1,15	(-)-Globulol	sesquiterpenoide
0,96	Selina-5,11-dieno	sesquiterpeno
0,81	Sabineno	monoterpeno
0,81	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	sesquiterpenoide
0,76	L-terpinen-4-ol	monoterpenoide
0,76	δ -Cadineno	sesquiterpeno
0,72	β -Elemeno	sesquiterpeno
0,7	gama-Cadineno	sesquiterpeno
0,67	Linalol	monoterpenoide
0,63	(-)-Isoledeno	sesquiterpeno
0,62	β -Selineno	sesquiterpeno
0,58	Cubebol	sesquiterpenoide
0,58	Viridiflorol	sesquiterpenoide
0,53	Cimeno	monoterpeno
0,49	Di-epi-1,10-cubenol	sesquiterpenoide
0,49	Cadin-4-en-10-ol	sesquiterpenoide
0,47	β -Pinoeno	monoterpeno
0,42	α -Copaeno	sesquiterpeno
0,42	β -Elemeno	sesquiterpeno

O α -pinoeno é o componente mais prevalente, representando 16,65% da composição total, seguido pelo espatuleno, que está presente em 16,09%. O eucaliptol contribui com 15,4% da composição, enquanto o cariofileno compreende 12,9% e, por último, o biciclogermaceno é o quinto composto mais abundante, com 9,24% da composição total do óleo essencial. Esses achados estão em concordância com a literatura. Camara *et al.* (2021) também revelaram a presença de espatuleno no óleo essencial das folhas e caules. Em estudos realizados por Vasconcelos *et al.* (2022) e Malveira *et al.* (2022) relataram a presença de eucaliptol, biciclogermaceno, α -pinoeno e espatuleno como compostos majoritários. Além destes, Angélico *et al.* (2014), Rodrigues *et al.* (2019), Porto *et al.* (2021), Nunes *et al.* (2022) e Nascimento *et al.* (2024) também relataram a presença de eucaliptol e α -pinoeno, sendo estes terpenos predominantes nos estudos com a planta *C. blanchetianus* (Silva *et al.*, 2024).

A administração oral do óleo, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, reduziu em 14,84%, 29,33% e 73,68%, respectivamente, o comportamento do animal de lambe a pata no teste de formalina na primeira fase, assim como 59,68%, 39,71% e 79,33%, respectivamente, na segunda fase, em relação ao controle negativo (Figura 1). A morfina foi utilizada como controle positivo por ser um potente analgésico opioide e reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata nas duas fases desse teste.

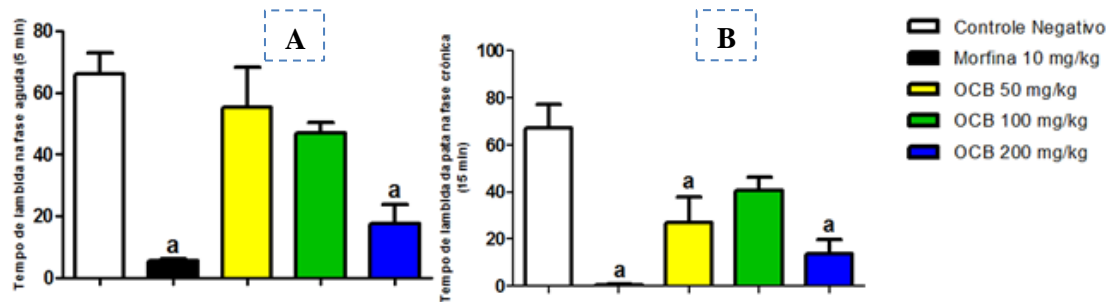


Figura 1. Efeito do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill (OCB) no teste de formalina 2%. Os animais receberam óleo (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), solução fisiológica 0,9% (controle negativo, 0,1 mL/10 g/animal, v.o.), 60 minutos antes e morfina (10 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração intraplantar de solução formalina 2% (20 µL, pata direita), (n=6). O tempo de lambida (segundos) na fase aguda foi observado durante 5 minutos (A) e o da fase crônica foi observado durante 15 minutos (B), após um intervalo de 10 minutos seguidos da fase aguda. Os valores em cada coluna representam a média ± desvio-padrão do tempo de lambida da pata. Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: a = p < 0,05, comparado ao controle negativo.

O teste da formalina envolve a administração intraplantar de uma solução de formaldeído (formalina) na pata posterior do animal, desencadeando uma dor intensa pela ativação direta dos nociceptores. Isso se manifesta por meio de lambeduras vigorosas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante. Considerado de longa duração, esse teste permite observar os sinais presentes na fase de modulação dos impulsos nervosos, bem como a participação de sistemas endógenos, como o sistema de opioides (Batista *et al.*, 2016).

Neste ensaio, podem ser identificadas duas fases distintas de comportamento nociceptivo, sugerindo o envolvimento de diferentes estímulos. A primeira fase ocorre imediatamente após a injeção de formalina e dura aproximadamente cinco minutos. Essa fase resulta da estimulação química direta dos nociceptores, especialmente das fibras C, e está associada à liberação de neuropeptídeos e outras substâncias que provocam respostas locais, caracterizadas como inflamação neurogênica (Batista *et al.*, 2016).

Na segunda fase desse ensaio, a liberação de mediadores nociceptivos resulta em extravasamento plasmático, vasodilatação dos capilares adjacentes e ativação de várias células, incluindo mastócitos e macrófagos. Além disso, há a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, que contribuem para a sensibilização das vias de dor tanto periféricas quanto centrais. Essas mudanças são características da segunda fase, que se manifesta entre quinze e trinta minutos após a administração da formalina (Batista *et al.*, 2016).

Notavelmente, a dose de 200 mg/kg demonstrou ser a mais eficaz, apresentando uma redução de 73,68% na dor neurogênica e 79,33% na dor inflamatória, em comparação com o controle negativo. Além disso, a análise estatística revelou diferenças significativas entre as diferentes doses administradas, corroborando a eficácia da dosagem mais elevada.

Na fase aguda, apenas a dose de 200 mg/kg de óleo essencial demonstrou uma diferença estatisticamente significativa em relação à morfina. Por outro lado, na fase crônica, as doses do óleo essencial 50 mg/kg e 200 mg/kg mostraram diferenças significativas em relação à morfina.

Nascimento *et al.* (2024) investigaram o óleo de *C. blanchetianus* em doses de 50 e 100 mg/kg, observando uma significativa redução no tempo de lambadura da pata. Não há registros na literatura de ensaios realizados com a dose de 200 mg/kg. Portanto, este estudo se destaca por ser pioneiro ao investigar os efeitos da dose de 200 mg/kg.

Os parâmetros de semelhança com fármacos (ou drug-likeness, em inglês) são critérios que uma molécula deve atender para ser considerada similar a fármacos conhecidos ou medicamentos aprovados. Na fase de descoberta, a “regra dos 5” de Lipinski indica que a má absorção é mais provável quando há mais de cinco doadores de ligações de hidrogênio, mais de dez aceitadores de ligações de hidrogênio, um peso molecular superior a 500 e um Log P maior que 4,15 (Lipinski *et al.*, 2001).

Além disso, a flexibilidade molecular reduzida, indicada pelo número de ligações rotativas, que não deve exceder dez, juntamente com uma área de superfície polar topológica (TPSA) reduzida (não superior a 140 Å²) são fatores importantes para prever uma boa biodisponibilidade oral (Veber *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Parâmetros de semelhança com fármacos

Compostos	Regras de Lipinski				Violações da regra*	Regras de Veber	
	PM	AH	DH	Log P		LR	TPSA
Regra	≤ 500	< 5	≤ 10	≤ 4,15	≤ 1	≤ 10	≤ 140 Å ²
Espatuleno	220,35	1	1	3,67	0	0	20,23 Å ²
Cariofileno	204,35	0	0	4,63	1	0	0,00 Å ²
Biciclogermacreno	204,35	0	0	4,63	1	0	0,00 Å ²
Eucaliptol	154,25	1	0	2,45	0	0	9,23 Å ²
α-pineno	136,23	0	0	4,29	1	0	0,00 Å ²

Peso molecular (PM),ceptor de ligação de hidrogênio (AH), doador de ligação de hidrogênio (DH), lipofilicidade (Log P), número de ligações rotativas (LR), área de superfície polar topológica (TPSA);
*Violações da regra de Lipinski.

Todos os cinco compostos avaliados estão de acordo com as regras de Lipinski e Veber (Tabela 2). Cariofileno, biciclogermacreno e α-pineno violaram a regra Log P ≤ 4,15, apresentando valores superiores. É importante destacar que fármacos fitoterápicos nem sempre estão de acordo com as regras, ou seja, essas regras não são rígidas e possuem limitações (Silva *et al.*, 2023).

Considerações finais

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o óleo essencial de *C. blanchetianus* apresenta uma composição fitoquímica rica em terpenos e terpenoides, com destaque para o α-pineno, espatuleno e eucaliptol como os principais componentes. Essa composição está em conformidade com estudos prévios, corroborando a relevância desses compostos na formulação do óleo essencial desta planta.

A avaliação do potencial analgésico do óleo essencial demonstrou uma significativa redução no comportamento nociceptivo dos animais, especialmente na segunda fase do teste de formalina, indicando um efeito antinociceptivo pronunciado. Esses resultados sugerem o potencial terapêutico do óleo essencial de *C. blanchetianus* como um agente analgésico, com efeitos promissores na modulação da dor neurogênica e inflamatória.

Além disso, a análise dos parâmetros de semelhança com fármacos revelou que os principais compostos do óleo essencial estão em conformidade com as regras de Lipinski e Veber, indicando sua adequação como candidatos a medicamentos. Embora alguns compostos tenham violado a regra de lipofilicidade, é importante ressaltar que essas regras não são absolutas e não invalidam o potencial farmacêutico desses compostos fitoterápicos.

Portanto, os resultados deste estudo sugerem que o óleo essencial de *C. blanchetianus* possui propriedades farmacológicas promissoras, destacando-se como uma potencial fonte de novos agentes terapêuticos no tratamento da dor. Futuras investigações devem se concentrar na elucidação dos mecanismos de ação desses compostos e na avaliação de sua eficácia em modelos adicionais de dor, visando o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras para o manejo da dor.

Agradecimentos

UESPI, IFAL, FAPEPI e NPBio.

Referências

- Angélico, E.; Rodrigues, O. G.; Costa, J. G. M. da; Lucena, M. de F. A.; Queiroga-Neto, V.; Medeiros, R. S. de; Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and Croton's varieties modulator in the Brazilian's Northeast semiarid. **African Journal of Plant Science**, 8(7), 2014.
- Batista, E. K. F.; Trindade, H. I.; Lira, S. R. S.; Muller, J. B. B. S.; Silva, L. L. B.; Batista, M. C. S. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 18(2), 433–441, 2016.
- Camara, C. A. G.; Araújo, C. A. de; Moraes, M. M. de; Melo, J. P. R. de; Lucena, M. F. A.; New sources of botanical acaricides from species of Croton with potential use in the integrated management of *Tetranychus urticae*. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 20(3), 244–259, 2021.
- Figueiredo, M. J. de; Grisi, C. V. B.; Santiago, A. M.; Vieira, E. de A.; Cordeiro, A. M. T. de M. C.; Vilela, A. F.; Viana, A. D.; Sousa, S. de; Conrado, L. de S. Characterization and application of *Croton blanchetianus* Baill extract for lamb ribs preservation. **Food Chemistry**, 373, 2022.
- Freitas, A. F. S.; Costa, W. K.; Machado, J. C. B.; Ferreira, M. R. A.; Paiva, P. M. G.; Medeiros, P. L.; Soares, L. A. L.; Oliveira, A. M.; Napoleão, T. H.; Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, 133, 2020.
- Lee, W. M. Acetaminophen Toxicity: A History of Serendipity and Unintended Consequences. **Clinical Liver Disease**, 16(S1), 34–44, 2020.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 46(1–3), 3–26, 2001.
- Malveira, E. A.; Souza, P. F. N.; Neto, N. A. S.; Aguiar, T. K. B.; Rodrigues, N. S.; Henrique, C. W. B.; Silva, A. F. B.; Lima, L. B.; Albuquerque, C. C.; Freitas, C. D. T.; Essential Oil from *Croton blanchetianus* Leaves: Anticandidal Potential and Mechanisms of Action. **Journal of Fungi**, 8(11), 1147, 2022.
- Nascimento, M. F. do; Costa, W. K.; Aguiar, J. C. R. de O. F. de; Navarro, D. M. do A. F.; Silva, M. V. da; Paiva, P. M. G.; Oliveira, A. M. de; Napoleão, T. H. Essential oil from leaves of *Croton blanchetianus* Baill does not present acute oral toxicity, has antigenotoxic action and reduces neurogenic and inflammatory nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 318, 116908, 2024.
- Nunes, A. K. A.; Malveira, E. A.; Andrade, A. L.; Silva, W. M. B.; Moraes, S. M. de; Santos, H. S. dos; Albuquerque, C. C. de; Teixeira, E. H.; Souza, D. N. do N.; Vasconcelos, M. A. de; Chemical Composition

Determination and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) against Clinically Relevant Bacteria. **Chemistry & Biodiversity**, 20(1), e202200777, 2022.

Oliveira, A. M. de; Widmer, R.; Nascimento, M. F. do; Costa, W. K.; Paiva, P. M. G.; Napoleão, T. H.; Flavonoid-Rich Fraction from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) Leaves Exerts Peripheral and Central Analgesic Effects by Acting via the Opioid and Cholinergic Systems. **Chemistry & Biodiversity**, 19(3), e202100853, 2022.

Porto, J. C. S.; Coelho, F. A.; Oliveira, F. V. B.; Lima, S. G. de; Mobin, M.; Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. **Revista Interdisciplinar**, 14(1), 2021.

Rodrigues, O. G.; Falcão, B. R. M.; Barbosa, B. C.; Pereira, A. V.; Aquino, V. V. F. de; In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 7(2), 2019.

Silva, C. P. M.; Neves, G. M.; Poser, G. L.; Eifler-Lima, V. L.; Rates, S. M. K. In silico Prediction of ADMET/Drug-likeness Properties of Bioactive Phloroglucinols from *Hypericum Genus*. **Medicinal Chemistry**, 19(10), 1002–1017, 2023.

Silva, I. F. M., Sousa, M. das D. B., Albuquerque, J. M. M., Marques, R. B., Uchôa, V. T., & Maia-Filho, A. L. M. Biological and phytochemical activity of Marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill): a review. **Science, Society and Emerging Technologies** (pp. 113–127). Amplla Editora, 2024.

Silva, M. L. S. da; Mourão, P. S.; Reis, V. R. da S.; Costa, C. A. C. B.; Moura, O. F. da S.; Moreira, R. de A.; Freitas, J. D. de; Freitas, S. D. L. de; Marques, R. B.; Figueredo-Silva, J.; Ferreira, D. C. L.; Uchôa, V. T.; Maia-Filho, A. L. M. Therapeutic action of the ethanolic extract of *Platonia insignis* Mart. leaves on induced respiratory distress syndrome in rats. **South African Journal of Botany**, 160, 235–245, 2023.

Sluka, K. A.; George, S. Z. A New Definition of Pain: Update and Implications for Physical Therapist Practice and Rehabilitation Science. **Physical Therapy**, 101(4), 1–3, 2021.

Vasconcelos, E. C.; Longhi, D. A.; Paganini, C. C. de; Severo, D. de S.; Canuto, K. M.; Souza, A. S. de Q.; Figueiredo, E. A. T.; Aragão, G. M. F. de; Modeling the effect of *Croton blanchetianus* Baill essential oil on pathogenic and spoilage bacteria. **Archives of Microbiology**, 204(10), 1–12, 2022.

Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, 45(12), 2615–2623, 2002.