

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MAÍRA HONORATO DE MOURA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *C.*
grewioides BAILL. (EUPHORBIACEAE): COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIOXIDANTE**

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MAÍRA HONORATO DE MOURA SILVA

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *C. grewoides* BAILL. (EUPHORBIACEAE): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada à banca examinadora do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Maíra Honorato de Moura

Óleos essenciais de *Croton adamantinus* Müll Arg. e *C. grewoides* Baill. (Euphorbiaceae): composição química e atividades antibacteriana e antioxidante / Maíra Honorato de Moura Silva. – Recife: O Autor, 2016.

61 f.: il.

Orientador: Marcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais 2. Euforbiácea 3. Plantas da caatinga I. Silva, Marcia Vanusa da (orient.) II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE / CB-2017-184

MAÍRA HONORATO DE MOURA SILVA

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *C. grewoides* BAILL. (EUPHORBIACEAE): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE

Trabalho de Dissertação apresentado à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Data de Aprovação: 16 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. MÁRCIA VANUSA DA SILVA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dr. ALEXANDRE GOMES DA SILVA
Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - INSA/MCTI

Prof. Dr. ANTÔNIO FERNANDO MORAIS OLIVEIRA
Departamento de Botânica – UFPE

Profa. Dra. MARIA TEREZA SANTOS CORREA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
Departamento de Bioquímica - UFPE

RECIFE
2016

Dedico este trabalho a duas estrelas que, até hoje, iluminam meu caminho, que sempre me apoiaram e continuam dando-me força esteja onde estiverem. E sei que hoje estão muito orgulhosos de sua filha, por estar vencendo mais uma etapa da sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e sabedoria para alcançar mais uma conquista na minha vida;

Agradeço muito aos meus pais, *in memória*, que tanto se esforçaram para sempre me dar uma boa educação, e, como professores terem me inspirado muito a seguir a carreira acadêmica;

Às minhas irmãs, Maiara e Maiana, por todo carinho, força, cumplicidade e fraternidade em tantos momentos de nossas vidas;

Ao meu namorado, Renato Rufino, por todo carinho, companheirismo, apoio, compreensão, força e incentivo todas as vezes que preciso;

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva, e a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco por terem acreditado e confiado no meu trabalho, por terem investido, ajudado e contribuído com mais um passo na minha formação acadêmica;

Aos meus professores, que se tornaram grandes amigos, Prof. Dr. Antônio Fernando Moraes Oliveira do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco e Prof. Dr. Luiz Oliveira da Costa Filho da Universidade Católica de Pernambuco, que tanto apostaram e investiram na minha formação acadêmica. Que sempre estiveram prontos para me ensinar, ajudar e dar oportunidade de crescer;

A Bióloga Ingrid Torres por ter sido tão companheira, disponibilizando-se sempre a contribuir com o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos Mariana e Diógenes do Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, que sempre estiveram solícitos e pela presteza de sempre ajudarem no desenvolvimento do meu trabalho;

Agradeço muito também a D. Fátima e ao Sr. Wéliton por todo carinho, incentivo, força e inspiração para que hoje eu pudesse estar galgando mais uma etapa na minha carreira acadêmica;

À CAPES pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste projeto, que hoje culmina neste trabalho.

RESUMO

As plantas oferecem diversos compostos que podem produzir diferentes efeitos sobre organismos animais. Os óleos essenciais são frações voláteis naturais que conferem aromas percebidos em algumas espécies vegetais e que tem despertado um interesse considerável para utilização medicinal por todo mundo em virtude de sua complexa composição e seus efeitos farmacológicos, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Muitas espécies do gênero *Croton* L. têm sido utilizadas na medicina tradicional e suas atividades farmacológicas demonstradas. *Croton adamantinus* Müll. Arg. e *C. grewioides* Baill., Euphorbiaceae, são arbustos encontrados na flora do nordeste brasileiro. Os óleos essenciais (OE) de folhas destas espécies foram testados contra oito bactérias e sua atividade antibacteriana avaliada quanto à concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (CMB), além de ter sido testada a atividade antioxidante de acordo com sua habilidade em estabilizar o radical livre DPPH e dosado o conteúdo de fenóis totais expresso em equivalente de Ácido Gálico (EGA). Seus constituintes químicos foram determinados por análises em GC/MS, identificando 88,36% da composição total do óleo essencial de *C. grewioides* e 86,24%, de *C. adamantinus*. Foram detectados 3 compostos majoritários (β -caryophyllene, (+)-sativene, 2,3-dimethyl-1,3-heptadiene) na composição química do óleo essencial foliar de *C. grewioides*, enquanto que 4 (Germacrene D, Germacrene B, Spathulenol) foram detectados em *C. adamantinus*. O OE de *C. grewioides* foi capaz de inibir três das oito bactérias testadas. *Bacillus subtilis* (2.34 μ l/mL), *Staphylococcus aureus* (18.75 μ l/mL) e *S. sapophytica* (12.50 μ g/mL), enquanto teve ação bactericida apenas sobre *S. sapophytica* e *Bacillus subtilis*, com CMB= 50 μ g/mL e 31.25 μ g/mL, respectivamente; e apresentou atividade antioxidante com EC_{50} = 3.09 mg/ml, enquanto que *C. adamantinus* foi capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* (0.78 μ l/mL), *Staphylococcus aureus* (1.56 μ l/mL), e *Salmonella Enteriditis* (75 μ l/mL), enquanto apresentou atividade bactericida para *Staphylococcus aureus* (CMB= 31.25 μ l/mL) e para *Bacillus subtilis* (CMB= 3.12 μ l/mL) e apresentou atividade antioxidante baixa em relação a atividade apresentada por *C. grewioides* com EC_{50} = 130.76mg/ml. Porém, essas espécies apresentaram uma boa quantidade de conteúdo fenóis totais, 269.86 ± 0.923 gEGA/100gDW para *C. grewioides* e 265.69 ± 2.88 gEGA/100gDW para *C. adamantinus*. Considerando o potencial bioativo demonstrado pelos OE's pode-se inferir a importância destes para o uso terapêutico.

Palavras-chaves: Bioatividades. Caatinga. Caracterização química. Croton. Óleos voláteis.

ABSTRACT

Plants offer several compounds that can produce different effects on animal organisms. Essential oils are natural volatile fractions that give flavor perceived in some plant species which have aroused a considerable interest for medical use throughout the world because of its complex composition and its pharmacological effects, making them potential sources for the development of new drugs . Many species of the genus *Croton* L. have been used in traditional medicine and its pharmacological activity demonstrated. *Croton adamantinus* Müll. Arg. and *C. grewioides* Baill., Euphorbiaceae, are found in bushes in northeastern Brazil flora. Essential oils (EO) of leaves of these species were tested against eight bacteria and their antibacterial activity assessed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CMB), and has been tested the antioxidant activity according to their ability to stabilize the free radical DPPH and dosed the content of total phenols expressed equivalent to Gallic acid (EGA). Its chemical constituents were determined by analysis on GC / MS, identifying 88.36% of the total composition of the essential oil of *C. grewioides* and 86.24% *C. adamantinus*. Were detected 3 major compounds (β -Caryophyllene, (+) - sativene, 2,3-dimethyl-1,3-heptadiene) the chemical composition of the leaf essential oil of *C. grewioides*, while 4 (Germacrene D Germacrene B Spathulenol) were detected in *C. adamantinus*. The OE *C. grewioides* was able to inhibit three of the eight bacterial strains tested. *Bacillus subtilis* (2:34 μL / mL) *Staphylococcus aureus* (18.75 μL / mL) and *S. saprophytica* (12:50 mg / mL), while having bactericidal only against *S. saprophytica* and *Bacillus subtilis*, with CMB = 50 mg / mL and 31.25 mg / mL, respectively; and showed antioxidant activity with EC₅₀ = 3.09 mg / mL, whereas *C. adamantinus* was able to inhibit the growth of *Bacillus subtilis* (0.78 μL / mL) *Staphylococcus aureus* (1.56 μL / mL), and *Salmonella Enteritidis* (75 μL / mL), while showed bactericidal activity for *Staphylococcus aureus* (CMB = 31.25 μL / mL) and *Bacillus subtilis* (CMB = 3.12 μL / mL) and showed low antioxidant activity compared to activity by *C. grewioides* with EC₅₀ = 130.76 mg / mL. However, these species had a good amount of total phenols content $269.86 \pm 0.923\text{gEGA} / 100\text{gDW}$ for *C. grewioides* and $265.69 \pm 2.88\text{gEGA} / 100\text{gDW}$ for *C. adamantinus*. Considering the bioactive potential demonstrated by OE's can infer the importance of these for therapeutic use.

Keywords: Bioactivities. Caatinga. Chemical characterization. Croton. Essential oils.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Páginas

- Figura 1: Esquema representando os principais fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas. (Fonte: GOBBO-NETO, L., 2007).21
- Figura 2: Distribuição do gênero *Croton* L, com o número de espécies dos seus principais hot spots. (Fonte: Berry *et al.*, 2005).26

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Páginas

TABELA 1: Revisão de artigos publicados com análise de óleos voláteis em <i>Croton</i> L.	26
--	----

LISTA DE TABELAS DO ANEXO

Páginas

TABELA 1: Compostos majoritários de óleo essencial foliar de *Croton grewoides*.60

TABELA 2: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de folha de *Croton grewoides* (Concentração Inibitória Mínima – MIC; Concentração Bactericida Mínima - CMB em µg/mL).61

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1: Esquema da Cromatografia em Camada Delgada evidenciando classes químicas dos óleos essenciais de *Croton adamantinus* (A) e *C. grewoides* (B) com atividade antioxidante positiva.40

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1: Revisão bibliográfica dos rendimentos dos óleos essenciais de <i>Croton</i> spp.	32
Tabela 2: Compostos majoritários de óleo essencial de folha de <i>Croton adamantinus</i>	37
Tabela 3: Compostos majoritários de óleo essencial de folha de <i>Croton grewioides</i>	38
Tabela 4: Atividade antioxidante de óleo essencial de folha de <i>Croton</i> L.	40
Tabela 5: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de folha de <i>Croton adamantinus</i> e <i>C. grewioides</i> (Concentração Inibitória Mínima – MIC; Concentração Bactericida Mínima - CMB em µl/mL).	41
Tabela 6: Conteúdo de Fenóis Totais de óleos essenciais foliares em <i>Croton</i> spp. expresso em Equivalente de Ácido Gálico (GAE).	43

LISTA DE ABREVIACÕES

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CMB – Concentração Mínima Bactericida

DW – Peso seco

EGA – Equivalente cido Gálico

GC/MS – Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MMA – Ministério do Meio Ambiente

OE – leo Essencial

TPC – Conteúdo de Compostos Fenólicos

SUMÁRIO

Páginas

I. CAPÍTULO 1: ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Croton adamantinus</i> MÜLL. ARG. E <i>C. GREWIOIDES</i> BAILL. (EUPHORBIACEAE): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. Produtos naturais	20
2.2. Óleos essenciais	20
2.3. <i>Croton</i> L. (Euphorbiaceae)	22
2.4. <i>Croton</i> L. X Óleos Essenciais	23
2.5. <i>Croton</i> na Caatinga	27
2.6. <i>Croton</i> X Bioatividades	28
2.6.1. Antibacterianos	28
2.6.2. Antioxidantes	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivos gerais	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Área de Coleta	31
4.2. Coleta do material botânico	31
4.3. Obtenção dos óleos essenciais	32
4.4. Análise da composição química	32
4.5. Avaliação da Atividade Antioxidante	32
4.5.1. Teste qualitativo da Atividade Antioxidante	32
4.5.2. Teste quantitativo da Atividade antioxidante	33
4.6. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	33
4.6.1. Microrganismos	33
4.6.2. Preparação dos meios	34
4.6.3. Preparação das soluções	34
4.6.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	34
4.7. Conteúdo Fenóis Totatis (TPC)	34

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Rendimento do óleo	35
5.2. Perfil químico – Caracterização dos óleos	36
5.3. Atividade antioxidante	39
5.4. Atividade antimicrobiana	40
5.5. Dosagem de compostos fenólicos total	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS - Artigo	54

I. CAPÍTULO 1: ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *C. grewoides* BAILL. (EUPHORBIACEAE): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE

1. INTRODUÇÃO

O acúmulo de conhecimentos sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais alcançado durante séculos por meio da medicina popular representa muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. Atualmente, são utilizadas pela medicina popular mais de 20.000 espécies diferentes de plantas medicinais (DEEPIKA-GUPTA *et al.*, 2008). Isso se dá devido ao baixo custo e a acessibilidade das plantas com propriedades medicinais, aumentando a procura e o interesse nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento. Com isso, as plantas se tornaram uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a produção de inúmeros fármacos (WALL E WANI, 1996). Embora haja utilização de um grande número de espécies pela medicina tradicional, o uso de fitoterápicos e princípios ativos vegetais pela indústria farmacológica ainda é bastante deficitária.

O Brasil, devido sua extensão territorial, possui uma grande variedade de ecossistemas, sendo a Caatinga uma região rica em biodiversidade, com sua flora ainda pouco explorada nesse sentido. Nos últimos anos a caatinga tem sido alvo de atividades de bioprospecção, visando maior conhecimento sobre as espécies nativas e a bioconservação desse importante bioma do Brasil.

A caatinga é um ecossistema exclusivamente brasileiro com clima tipicamente semi-árido presente em quase todos os estados do Nordeste e norte de Minas Gerais e corresponde a cerca de 10% de todo o território nacional. A vegetação é do tipo xerófila, possuindo mecanismos de adaptação às condições extremas de seca, quando comparada a espécies que não estão submetidas constantemente à déficit hídrico.

Este ecossistema apontado como rico em espécies endêmicas e bastante heterogêneo, corresponde a um habitat tipicamente ocupado pelas Euphorbiaceae, uma das famílias botânicas que melhor representa a Caatinga, apresentando grande número de espécies endêmicas.

A família Euphorbiaceae possui grande importância econômica entre as Eudicotiledôneas, estando representada nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta por aproximadamente um total de 5.000 espécies, distribuídas em 300 gêneros (WEBSTER, 1994). No Brasil, ocorrem 63 gêneros e 940 espécies, de hábitos e habitats diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação (CORDEIRO *et al.*, 2016). Sua distribuição é ampla, possuindo representantes em todos os diferentes tipos de vegetação do país.

Dentre os gêneros dessa família destaca-se o *Croton* L. por ser o segundo maior e mais diverso gênero das Euphorbiaceae, com cerca de 1.200 espécies, principalmente distribuídas nas Índias Ocidentais e América do Sul com algumas na América do Norte (WEBSTER, 1994; GOVAERTS *et al.*, 2000), África e Madagascar (WEBSTER, 1993). Suas espécies são árvores, arbustos, ervas e lianas que ocorrem na maioria dos ecossistemas tropicais (SECCO, 1992; SECCO, 2008). No Brasil ocorrem cerca de 316 espécies e 6 variedades, sendo 252 endêmicas (CORDEIRO *et al.*, 2016), levando o país à categoria de mais diverso do gênero. O Nordeste brasileiro revela alta diversidade no gênero, possuindo cerca de 85 espécies, destas, 69 ocorrem na caatinga e 31 espécies em Pernambuco (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009).

As espécies de *Croton*, por estarem em habitats principalmente com condições extremas como a Caatinga, apresentam uma diversidade química de compostos secundário muito grande, com óleos essenciais e constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides, sendo com frequência utilizada na medicina popular (COSTA *et al.*, 2008).

Algumas espécies de *Croton* produzem óleos essenciais contendo principalmente terpenóides e fenilpropanóides, enquanto outras produzem apenas terpenóides (SALATINO *et al.*, 2007). Algumas espécies possuem propriedades terapêuticas já comprovadas (SANTOS ET AL., 2005; PALMEIRA JÚNIOR ET AL., 2006; SOUZA ET AL., 2006; PERAZZO ET AL., 2007; TORRICO ET AL., 2007; ROCHA ET AL., 2008), como antinociceptivos, cura anti-inflamatória, feridas, anticâncer e com atividades antimicrobianas (BIGHETTI *et al.*, 1999; XIMENES *et al.*, 2013). Contudo, o potencial farmacológico de muitas espécies permanece completamente inexplorado.

Óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules das plantas (TISSERAND E BALACS, 1999).

Há algumas décadas, tem havido um crescente interesse no estudo dos óleos essenciais de plantas para utilização médica por todo mundo (LIN *et al.*, 2012), devido sua variedade química e presença de substâncias com bioatividades comprovadas.

As atividades de bioprospecção na região da caatinga vêm buscando encontrar nas espécies endêmicas produtos naturais que possam ser utilizados pelo homem para os mais diversos fins terapêuticos, dentre eles os antimicrobianos e compostos com atividades antioxidantes, uma vez que microrganismos resistentes a antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções e compostos que provocam o desequilíbrio oxidativo no organismo podem acarretar em patologias como o câncer, tornando-se notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas e antioxidantes para serem utilizadas no combate a esses microrganismos e a esses agentes oxidantes.

A atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada (MANTLE *et al.*, 1998; RUBERTO E BARATTA, 2000) e as plantas do Nordeste brasileiro constituem fontes potenciais de óleos essenciais como antioxidantes naturais (CATUNDA *et al.*, 2002), desta forma, com o intuito de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que se tem notado um aumento significativo das pesquisa nos últimos anos (LOLIGER, 1991; BRACCO, 1991).

Por estarem presentes em diversas partes das plantas, possuem o seu potencial farmacológico comprovado em estudos científicos, por serem de fácil extração e economicamente viáveis, os óleos essenciais têm assumido papel de destaque nas pesquisas em produtos naturais.

Contudo, mesmo com toda a relevância medicinal e farmacológica do gênero *Croton* L., os estudos sobre o mesmo na Caatinga, necessitando de um maior esforço no que se refere às investigações em análises químicas e potencial farmacológico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Produtos naturais

Devido ao grande potencial e à descoberta de novas substâncias, tem sido cada vez mais frequente, o estudo aplicado de fármacos com ativos isolados de plantas (VEERPORTE E ALFERMANN, 2000). Sendo assim, tem sido observada uma corrida contra o tempo no intuito não apenas de levantar e catalogar espécies, mas também de realizar estudos químicos que sirvam de base em futuros desenvolvimentos de fármacos e cosméticos.

De acordo com a OMS, entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI & SILVA & TEDESCO, 2007). Dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente de origem vegetal (GURIB-FAKIM, 2006).

Contudo, apesar de toda importância conferida às plantas, o seu potencial ainda é muito pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (BARROS, 2008). O conhecimento das propriedades terapêuticas é indispensável para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Com isso, pesquisas com plantas medicinais tem sido e continuam a ser considerada uma opção importante na busca de novas drogas, entre as quais, as com atividade antimicrobiana.

Nas ultimas décadas, dentre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA, 2006). Devido ao aumento progressivo da resistência, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais de plantas poderia ser uma alternativa, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (NOVAIS, 2003). Mais recentemente, muitas plantas tem sido avaliadas não somente pela atividade antibacteriana, mas também como agente modificador de resistência antibiótica (GIBBONS, 2004)

2.2. Óleos essenciais

Tem-se verificado, nos últimos anos, um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos vegetais, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Dentre estes, destacam-se os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis.

Estes, quanto ao seu aspecto químico, são misturas de substâncias voláteis, geralmente odoríferas, lipofílicas e líquidas. Podem ser extraídos de diversas partes das plantas (flores, inflorescências,

sementes, folhas, gravetos, cascas, frutos e raízes) por processos específicos. São dotados de aroma quase sempre agradável, incolores quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados de aparência oleosa (DEWICK, 2009).

Mesmo podendo ser encontrado em outros tecidos (como súber e raiz) são comumente produzidos em tricomas glandulares e armazenados em células de parênquimas florais e foliares, conferindo o aroma característico destas estruturas (BASTOS, 2014).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois 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 voláteis possuem grande importância na interação da planta com o meio ambiente, apresentando propriedades antiherbivóricas, inseticidas, antifúngicas e antibacterianas, além de ter ação direta na atração de polinizadores e dispersores. Em termos industriais, são utilizados em aromatizantes e perfumes (BUCHANAN *et al.*, 2000). Em termos farmacológicos, possuem uma grande gama de propriedades medicinais como antibacteriana (SUAREZ *et al.*, 2005; SIMIONATTO *et al.*, 2007) antisséptica, antihelmíntica, antiinflamatória (SANTOS *et al.*, 2005) anticâncer (SYLVESTRE *et al.*, 2006; COMPAGNONE *et al.*, 2010), antinoceptiva (ABDON *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005), antioxidante (AGNANIET *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2006; SIMIONATTO *et al.*, 2007; MOHAMED *et al.*, 2009), carminativa, expectorante, fungicida (SOUZA *et al.*, 2006), gastoprotetora (SANTOS *et al.*, 2005), inseticida (SILVA *et al.*, 2004), larvicida (LIMA *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2008) e vasorelaxante (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

A composição e a concentração das substâncias que constituem os óleos essenciais, de uma forma geral, podem sofrer influência de fatores como a radiação, temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, época de coleta e outros (GOUINGUENE & TURLINGS, 2002) (Figura 1).

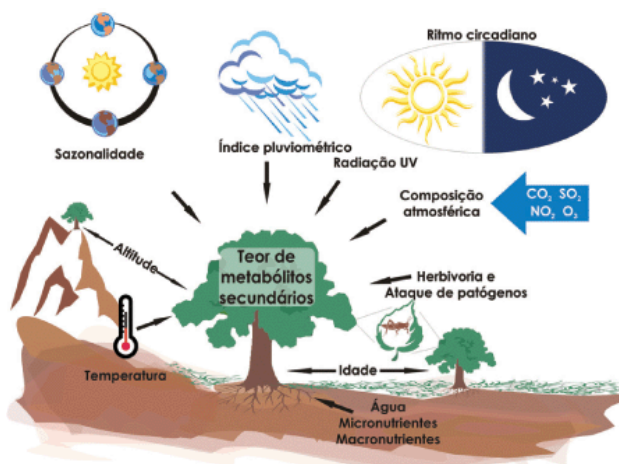


Figura 1: Esquema representando os principais fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas. (Fonte: GOBBO-NETO, L., 2007).

2.3. *Croton* L. (Euphorbiaceae)

A família Euphorbiaceae é um grupo botânico de distribuição pan-tropical conhecida em muitas partes do mundo por seus compostos tóxicos e medicinais. Incluem espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas, com folhas alternas, opostas ou, mais raramente verticiladas, simples, de margem denteada, lobuladas ou palmato-lobadas, com estípulas livres e frequentemente com glândulas foliares aparentes. Monóicas ou dióicas, possuem inflorescências terminais ou axilares, racemosas ou cimosas. As flores diclinas, actinomorfas (raro zigomorfas) possuem perianto com segmentos livres, tricarpelados e estigmas proeminentes. Os frutos esquizocarpáceos ou capsulídeos possuem corumela resistente. Possui uma semente por lóculo (WEBSTER *et al.*, 1994; APG, 2009).

A química das Euphorbiaceae é uma das mais complexas e interessantes entre as famílias de eudicotiledôneas, podendo ser até mesmo comparada à sua alta diversidade biológica (SIEGLER *et al.*, 1998). Muitas Euphorbiaceae são utilizadas com finalidade alimentar, ornamental e como fonte de precursores químicos, resinas, lubrificantes e ativos medicinais.

Quanto aos ativos medicinais, essa família é alvo freqüente de estudos, como visto por Cardoso-Lopes *et al.* (2009) que as altas taxas de cafeína presente em “tamanqueira” (*Pera glabrata*) conferem a esta espécie atividade antifúngica, além de poder ser utilizada no tratamento da perda de memória decorrente do mal de Alzheimer. Já Forero *et al.* (2008) estudaram sete espécies de Euphorbiaceae, das quais três apresentaram atividade antiviral sobre o vírus influenza. A espécie *Phyllanthus emblica*, rica em sesquiterpenoides e flavonoides (bisabolol e campfero, respectivamente), apresenta atividade de redução dos níveis de colesterol HDL em ratos, levando a regulação das taxas glicêmicas e podendo ser utilizada em medicamentos para tratamento do diabetes (KRISHNAVENEI *et al.*, 2010)

Os diterpenos são considerados o grupo de substâncias mais característico e complexo da família, principalmente os com esqueletos do tipo caurano, clerodano e furano (SALATINO *et al.*, 2007).

Croton L., apesar de muito polimórfico, é facilmente reconhecido por inflorescências geralmente racemosas com flores pistiladas proximais e estaminadas polistêmones, indumentos com tricomas simples, estrelados os escamiformes, glândulas peciolares e folhas senescentes, tornando-se laranja antes da descência (BERRY *et al.*, 2005). É caracterizado por espécies arbóreas, arbustivas ou herbáceas, distribuídas por zonas de clima tropical e subtropical da América, Ásia, África e Austrália (Fig. 2).

México e Brasil são áreas importantes como centros de distribuição deste gênero. Talvez o sucesso do gênero em regiões de mata secundária de regiões tropicais tenha sido um fator chave para sua grande diversificação evolutiva (LIMA E PIRANI, 2008).

Em termos de distribuição latitudinal, as espécies podem ser divididas entre espécies com maior representatividade em áreas tropicais (megatérmicas) ou com maior representatividade em regiões subtropicais (mesotérmicas). Das espécies de *Croton* com representatividade no Brasil, as megatérmicas possuem distribuição com limite sul no Trópico de Capricórnio, já as mesotérmicas têm distribuição restrita a áreas da Serra do Mar e Mantiqueira, na região sudeste do Brasil. Um estudo realizado com *Croton* seção *Clerodora* demonstrou que 88% das espécies são essencialmente megatérmicas (DE FELIU, 2000).

Croton adamantinus Müll.Arg. é arbusto e subarbusto e desenvolve-se em substratos terrícolas. É nativa e endêmica do Brasil, está presente geograficamente em Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Minas Gerais, ocupando o domínio fitogeográfico da Caatinga. Conhecido popularmente como carrasco, canela-de-urubu e velame-bravo, é sinônimo heterotípico de *Oxydectes adamantina* (Müll.Arg.) Kuntze. (CORDEIRO *et al.*, 2016). Foi relatado como comumente utilizado para tratar doenças inflamatórias e feridas da pele (XIMENES *et al.*, 2013).

Croton grewioides é arbusto e subarbusto e desenvolve-se em substratos terrícolas. Não é endêmica do Brasil, está presente geograficamente em Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Minas Gerais, ocupando o domínio fitogeográfico da Caatinga. Conhecido popularmente como canelinha e alecrim-de-cabocla, é sinônimo heterotípico de *Croton zehntneri* Pax & K.Hoffm. e homotípico de *Croton glycosmeus* Müll.Arg. e *Oxydectes grewioides*(Baill.) Kuntze. (CORDEIRO *et al.*, 2016).

2.4. *Croton* L. X Óleo essencial

Croton L é um dos gêneros mais importantes das Euphorciaceae por ser o segundo maior e mais diverso desta família, além de produzirem compostos secundários importantes que possuem atividades biológicas relevantes como os óleos voláteis de caule de *Croton urucurana* que possuem mais de 83 compostos distintos e conferem atividade anticâncer, antiinflamatória, antioxidante, antireumática e antiulcérica (SIMIONATTO *et al.*, 2007); os óleos voláteis de *C. matourensis* e *C. micans*, popularmente conhecido como “alecrim de vaqueiro”, possuem atividade cardioprotetora, calmante e antigripal (COMPAGNONE *et al.*, 2010); como as folhas de *Croton adamantinus* da região semi-árida do Nordeste do Brasil, têm sido usadas para tratar inflamações de pele e feridas (XIMENES *et al.*, 2013); como também, segundo Morais *et al.* (2006), os óleos essenciais obtidos de *Croton argyrophylloides*, *C. nepetaefolius* e *C. zehntneri* revelaram-se agentes antioxidantes relevantes, devido a presença comprovada de *E*-anetol no *C. zehntneri* e metileugenol no *C. nepetaefolius*. O óleo de *C. argyrophylloides* apresentou α -pineno, *E*-cariofileno e 1,8-cineol, cujas atividades relatadas são baixas, mas provavelmente estão agindo sinergisticamente.

A composição química de *Croton* é um pouco diversa, embora tenha sido reportados alcalóides (AMARAL E BARNES, 1998; MILANOWSKI *et al.*, 2002), diterpenos (BLOCK *et al.*, 2002) e óleos voláteis, compreendendo mono e sesquiterpenos. No levantamento bibliográfico realizado por Torres (2008) quanto à composição química, os diterpenos que compõem a classe dos terpenoides, e os alcaloides foram os compostos encontrados com maior frequência em espécies do gênero *Croton* estudadas no Brasil.

O aroma agradável de algumas espécies deste gênero é aparentemente devido à presença de terpenos em todas as partes da planta (RANDAU *et al.*, 2004), enquanto as folhas são ricas em flavonoides, e as raízes e casca podem conter predominantemente alcaloides, triterpenoides e esteroides.

Mas os diterpenos do tipo clerodano são os mais comuns em *Croton*, como por exemplo, a cascarilina e os furoclerodanos de *C. eluteria*, que conferem atividade analgésica, antiespasmódica e antitérmica, podendo ser utilizado como substituto de várias espécies de *Chinchona* no tratamento da febre-terça decorrente da malária (FATTORUSSO *et al.*, 2002).

Muitas espécies utilizadas como medicinal são nativas da América do Sul e tem-se notado um crescente interesse na investigação deste grupo (Tabela 1), sendo comuns tanto análises químicas quanto estudos sobre o potencial farmacológico, como *Croton cajucara*, nativa da Amazônia brasileira, conhecida como “sacaca”, apresenta folhas e súber com ação antiinflamatória, antiulcerogênica, antitumoral, antimutagênica, antiestrogênica e hipoglicêmica (ROSA *et al.*, 2003), sendo utilizados em tratamentos de diabetes, colesterol alto, distúrbios gastro-intestinais, distúrbios hepáticos e em tratamentos de obesidade (SOUZA *et al.*, 2006). Os óleos voláteis desta espécie são ricos em linalol, além de já terem sido identificados para a espécie diterpenos e esteróis, o que explica a atividade antiinflamatória, antinociceptiva, antifúngica (SOUZA *et al.*, 2006), anti-leishmaniose (ROSA *et al.*, 2003) e anti-*Trypanossoma cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2010).

C. eluteria é uma árvore de médio porte comum na região norte da América do Sul e que se estende pela América Central e sul do México. Apresenta caule de alto valor medicinal e rico em óleos voláteis, diterpenos, alcalóides e taninos, sendo aplicada como balsâmica, digestiva, estomáquica, febrífuga, hipotensora, narcótica e tônica (FATORUSSO *et al.*, 2002; SALATINO *et al.*, 2007).

C. pullei, espécie amazônica, não apresenta citação como medicinal, mas possui óleo volátil e alcalóides com propriedades bem interessantes, como antiinflamatória, antinociceptiva e antiproliferativa (ROCHA *et al.*, 2008).

Croton micans é um arbusto de ampla ocorrência na região amazônica, conhecido no Brasil como “alecrim de vaqueiro” e reconhecida como sedativo e calmante, sendo também utilizadas no tratamento de distúrbios cardíacos e gripes (COMPAGNONE *et al.*, 2010).

C. matourensis é uma árvore de médio porte encontrada principalmente na região sul da Venezuela, sendo conhecida como “tabaquilo”. Não foram encontrados relatos sobre seu uso medicinal, mas estudos fitoquímicos constataram diterpenos do tipo ácido marúvico (COMPAGNONE *et al.*, 2010).

C. nepetifolius, conhecida como “marmeleiro cravo” ou “marmeleiro de cheiro”, é endêmica do nordeste brasileiro e apresenta estudos fitoquímicos que revela a presença de óleos voláteis, diterpenos, acetofenonas e esteróides (SANTOS *et al.*, 2008). É utilizada na medicina popular como carminativa, estomáquica (SANTOS *et al.*, 2008), antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006), antinoceptiva, sedativa, antiespasmódica e analgésica (ABDON *et al.*, 2002).

Croton sonderianus, comum no nordeste brasileiro, é conhecida popularmente como “marmeleiro preto”. Possui óleo volátil com atividades antiinflamatória, antinoceptiva e gastoprotetora comprovadas, corroborando seu uso popular no tratamento de hemorragias uterinas, dores de estômago, processos inflamatórios (AMARAL *et al.*, 2004) e larvicida (LIMA *et al.*, 2006).

C. celtidifolius, comum na Mata Atlântica do sudeste do Brasil, é conhecido como “sangue-de-adave” e utilizada em infusões para tratamento de inflamações leucemia, úlcera e reumatismo (DE FELIU, 2000).

C. sarcopetaloides, comumente encontrado no norte e nordeste da Argentina, conhecido com “lecherón”. Possui altos teores de diterpenos, alguns com atividade medicinal como antitumoral ou promotor de inflamação cutânea (DE FELIU, 2000).

C. lechleri é um arbusto de pequeno porte comum na região do alto Amazonas. Possui resina com altos teores de proantocianidinas, alcalóides e diterpenóides, que confere atividade antioxidante, antibacteriana, antiinflamatória, antiproliferativa, anticâncer, antimutagênica e antiviral (ROSSI *et al.*, 2003; SALATINO *et al.*, 2007).

C. draconoides pode ser encontrada desde a Amazônia peruana até o norte da América Central. É rica em diterpenos esteróis, óleos voláteis e alcalóides, sendo bastante utilizada no tratamento de tosse, distúrbios intestinais além de anti-séptica e cicatrizante em cortes, queimaduras e herpes (MURILLO *et al.*, 2001).

C. urucurana é uma árvore de médio porte, nativa da região platina da América do Sul, sendo encontrado no Paraguai, Uruguai, Brasil e Argentina. No Brasil, pode ser encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Possui uma composição química bastante complexa em relação às outras espécies de Croton, o que lhe confere uma grande diversidade de propriedades medicinais como analgésica, antiinflamatória, antiulcérica, antidiarréica, anticâncer, protetora gástrica e intestinal, antirreumática, antibacteriana e antioxidante (SIMIONATTO *et al.*, 2007).

C. palanostigma, popularmente conhecida como “marmeleiro”, é uma árvore de médio porte da região amazônica que possui látex rico em óleos voláteis, proantocianidinas, alcalóides e diterpenos,

sendo usado na medicina popular como anticâncer, antidiabético, hipercolesterolêmica, antimalária, antiulcérica (SOCORRO *et al.*, 2007), antifúngica, antihemorrágica, antioxidante, antisséptica e analgésica.

Croton grewoides, conhecida popularmente como canela de cunhã, canelinha ou canela-brava, é usada comumente na medicina popular principalmente como sedativo, estimulante de apetite e para aliviar distúrbios intestinais, sendo comprovados os efeitos antinociceptivos de seus óleos essenciais. É uma planta subarborescente e caducifolia, sendo que o seu aroma varia entre exemplares desta planta coletados em diferentes regiões do Nordeste (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A presença de significativos teores dos óleos essenciais na maioria das espécies de *Croton* L. revela sua importância como composto químico a ser estudado quanto às suas funções em atividades biológicas a partir da medicina tradicional.

TABELA 1: Revisão de artigos publicados com análise de óleos voláteis em *Croton* L.

<i>Espécie</i>	<i>Referência</i>	<i>Compostos majoritários</i>	<i>Atividade biológica</i>
<i>C. argyrophyllodes</i>	Lima <i>et al.</i> , 2006		Larvívora
	Morais <i>et al.</i> , 2006		Antioxidante
<i>C. cajucara</i>	Souza <i>et al.</i> , 2006	α -pineno, cipereno e linalol	Fungicida
<i>C. cajucara</i>	Rosa <i>et al.</i> , 2003	Linalol	Anti-Leishmania
<i>C. flavens</i>	Sylvestre <i>et al.</i> , 2006	Viridifloreno e germacreno	Anticâncer
<i>C. grewoides</i>	Silva <i>et al.</i> , 2004	Anetol e eugenol	Inseticida
<i>C. malambo</i>	Suarez <i>et al.</i> , 2005	Eugenol	Antibacteriana
<i>C. matourensis</i>	Compagnone <i>et al.</i> , 2010	Fenchil acetato (fenilpropanóide) e cariofileno	Anticâncer
<i>C. micans</i>	Compagnone <i>et al.</i> , 2010	Fenchil acetato (fenilpropanóide) e cariofileno	Anticâncer
<i>C. nepetaefolius</i>	Abdon <i>et al.</i> , 2002	1,8-cineol e cariofileno	Antinociceptiva
	Lima, <i>et al.</i> , 2006		Larvívora
	Magalhães <i>et al.</i> , 2008	Metileugenol e α -terpineol	Vasorrelaxante da aorta
	Morais <i>et al.</i> , 2006		Antioxidante
<i>C. oligandrum</i>	Agnaniet <i>et al.</i> , 2005	Linalol	Antioxidante
<i>C. palanostigma</i>	Brasil <i>et al.</i> , 2009	Linalol e cariofileno	
<i>C. pulley</i>	Rocha <i>et al.</i> , 2008	β -cariofileno e germacreno-D	
<i>C. regelianus</i>	Torres <i>et al.</i> , 2008	Ascaridol, p-cimeno e cânfora	Larvívora e nematocida
<i>C. sarcopetalus</i>	Heluani <i>et al.</i> , 2000,	Isoeugenol	
<i>C. selowii</i>	Dias <i>et al.</i> , 2006	Óxido de cariofileno	
<i>C. sonderianus</i>	Santos <i>et al.</i> , 2005		Anti-inflamatória e antinociceptiva.
	Lima <i>et al.</i> , 2006		Larvívora
	Simionatto <i>et al.</i> , 2007	Sesquiceneol, α -bisabolol, α -eudesmol e γ -gurjuneno	Antioxidante e antibacteriana
	Simionatto <i>et al.</i> , 2009	Germacreno e biciclogermacreno (folha) e cadineno e sesquiceneol (caule)	
<i>C. zambesicus</i>	Usman <i>et al.</i> , 2009	Limoneno e β -terpineno	
	Mohamed <i>et al.</i> , 2009	Lupeol e betulina	Antioxidante
<i>C. zehntneri</i>	Costa <i>et al.</i> , 2008	Estragol	Antibacteriana
	Lima <i>et al.</i> , 2006		Larvívora
	Morais <i>et al.</i> , 2006		Antioxidante

(Fonte: De Feliu, 2011)

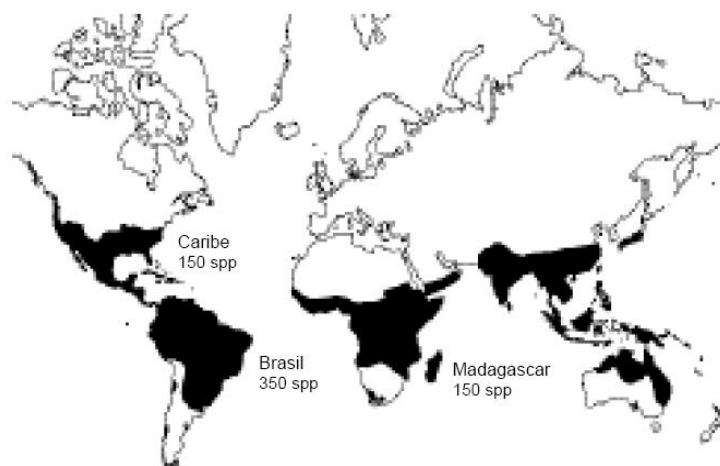


Figura 2: Distribuição do gênero *Croton* L, com o número de espécies dos seus principais hot spots. (Fonte: Berry *et al.*, 2005)

2.5. *Croton* L. na Caatinga

O Brasil abriga a flora mais biodiversa do mundo (FORZZA, 2012), sendo a Caatinga um dos últimos ecossistemas do país insuficientemente conhecidos em termos botânicos, que por contradição reúne uma ampla variedade de formações vegetacionais que abriga um número expressivo de táxons raros e endêmicos (GIULIETTI *et al.*, 2005).

A região Nordeste do Brasil abriga em 54% de sua área essa região semi-árida e apresenta grande biodiversidade, que constitui o chamado Polígono das Secas, incluindo os estados que abrangem o Rio São Francisco, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas que não são encontradas em outras regiões do globo (MAIA, 2004).

A Caatinga estende-se de 2° 45' a 17° 21' S, e estimada em 844.000 Km², que corresponde a 10% da área do país e abriga mais de 23 milhões de pessoas (MMA, 2010). Sua área corresponde a 54% da região Nordeste e a precipitação no ecossistema varia majoritariamente de 240 a 900 mm/ano⁻¹ e os solos variam de moderadamente fértil, salino e raso arenoso, pobres e profundos, tanto em escala de paisagem quanto regional (SAMPAIO, 1995).

É uma formação vegetal única no mundo. Isso significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo além do Nordeste do Brasil. Essa posição única entre os biomas brasileiros não foi suficiente para garantir a Caatinga o destaque que merece. Ao contrario, a Caatinga tem sido sempre colocada em segundo plano quando se discutem políticas para o estudo e a conservação da biodiversidade do país (TABARELLI, 2003).

Há uma grande variação na estrutura vegetacional deste habitat, que é condicionada pela topografia, perturbação humana e, sobretudo, por uma combinação da precipitação media anual e

atributos do solo (PRADO, 2003). Por isso, a Caatinga apresenta elevada heterogeneidade vegetal caracterizada por distintas fisionomias e elevado endemismo, fazendo deste um ambiente de extrema importância biológica.

São descritos 12 diferentes tipos vegetacionais (ANDRADE-LIMA, 1981), envolvendo oito ecorregiões (VELOSO, 2002) constituídas por manchas de floresta sazonalmente seca e vegetação esclerofila, predominantemente formadas por espécies lenhosas de pequeno porte, herbáceas decíduas, plantas caducifólias e espécies espinhosas (TAYLOR, 2004).

A alta diversidade fisionômica da Caatinga faz desse ecossistema um ambiente propício para presença de espécies endêmicas e alta diversidade biológica para alguns táxons, como o que ocorre com o gênero *Croton* L., que no Nordeste brasileiro, trabalhos evidenciaram a alta diversidade de *Croton* como citado por Carneiro-Torres (2009), que reconheceu 68 espécies para o Bioma Caatinga.

Em uma sinopse do gênero *Croton* L. no estado de Pernambuco, Silva *et al* (2010) verificaram expressiva representação de *Croton* na flora de Pernambuco.

Diante do potencial botânico da Caatinga, da falta de preservação deste tipo vegetal e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de microorganismos, assim como com ação antioxidante que espécies endêmicas deste ecossistema vêm sendo investigadas quanto ao seu potencial biológico.

2.6. *Croton* L. X Bioatividades

2.6.1. Antibacterianos

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais de plantas como fontes de produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidos empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente a menos de 30 anos (JANSEN, SCHEFFER, BAERHEIM, 1987).

O avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antibacterianos desencadeou resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO *et al.*, 2004). A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006).

Em decorrência do aumento da resistência, a busca por substâncias antibacterianas derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos (COELHO, 2004). No entanto, os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos, permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiência e outras (CLARDY; WALSH, 2004). Extratos e óleos essenciais de

plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BASTOS, 2014).

Como os óleos essenciais de *Croton* L. que vêm demonstrando ser um bom agente antibacteriano em função da sua complexa composição química, por isso a necessidade da investigação do potencial terapêutico das espécies desse gênero.

2.6.2. Antioxidantes

Os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Podem ser divididos em sintético (tais como substâncias utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se o BHT, BHA, GP, TBHQ) ou naturais, tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides), os quais são os responsáveis pela remoção dessas espécies reativas.

Nas plantas, a síntese de metabólitos secundários antioxidantes que absorvem em 300-400 nm é significativamente aumentada por radiação UV fornecendo, portanto, um alto nível de proteção contra oxidantes prejudiciais gerados termicamente ou pela luz (LARSON, 1988). Em função disso espera-se que as plantas da Caatinga sejam potenciais produtoras de substâncias com alta atividade antioxidante, uma vez que as plantas deste ecossistema estão constantemente submetidas às altas radiações, temperaturas e luminosidades intensas.

Os antioxidantes vegetais, demonstrados em estudos recentes com extratos e óleos essenciais de plantas, podem se apresentar como os mais variados tipos de natureza química, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como os responsáveis pelo maior efeito antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (RAZAVI, 2008), sendo capazes de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres, e consequentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes radicais.

A atividade antioxidante dos óleos voláteis tem sido bastante estudada (MANTLE *et al.*, 1998; RUBERTO E BARATTA, 2000) e os óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro constituem fontes potenciais de antioxidantes naturais (CATUNDA Jr., 2002) a exemplo do *C. zehntneri*, *C. argyrophylloides* e *C. nepetaefolius* que foram investigados por Moraes *et al.* (2006) quanto aos potenciais antioxidantes dos óleos essenciais e verificaram que todas as espécies exibiram boas atividades antioxidantes, embora *C. zehntneri* e *C. argyrophylloides* apresentaram uma atividade maior que a de *C. nepetaefolius*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Investigar a composição química e as atividades antibacterianas e antioxidantes de *Croton adamantinus* e *C. grewioides* do Parque Nacional Vale do Catimbau (Buíque, Tupanatinga e Ibimirim - PE)

3.2. Objetivos específicos

- Extrair os óleos essenciais de folhas das espécies de *Croton adamantinus* e *C. grewioides*;
- Traçar o perfil químico dos óleos essenciais presentes nas folhas por meio de Cromatografia Gasosa acoplada e Espectrometria de Massa (GC/MS);
- Determinar o potencial antibacteriano, *in vitro*, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos OE's das espécies de Croton;
- Avaliar a atividade antioxidante dos OE's, *in vitro*;
- Verificar o conteúdo de compostos fenólicos totais dos OE's das espécies de Croton.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de Coleta

As coletas e observações de campo foram realizadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, localizado a 285 Km do Recife. Fica situado entre o Agreste e o Sertão de Pernambuco, abrangendo terras do município de Buíque e estendendo-se por áreas semi-áridas de Tupanatinga, Inajá e Ibimirim, já em plena Microrregião do Sertão do Moxotó.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2002), o PARNA do Catimbau é uma área de extrema importância para a conservação da biodiversidade. Do ponto de vista geomorfológico, o PARNA do Catimbau está inserido no Planalto da Borborema, apresentando relevo ondulado a fortemente ondulado, com altitudes variando de 650 a 1.000 m (CPRM 2005). Os solos são rasos a profundos, predominando Planossolo e Podzólico nas encostas e circundando a área serrana e Litólicos no topo das serras. O clima é do tipo tropical chuvoso, com verão seco (CPRM 2005). As serras e morros do PARNA do Catimbau, localmente denominados Chapada de São José, pertencem à Formação Tacaratu, que repousa discordantemente sobre o cristalino e aflora em diversos pontos da bacia sedimentar do Jatobá, onde se localiza a área de estudo. Aquela formação apresenta arenitos quartzíticos grosseiros e conglomerados, cinza-claro ou arenitos finos cinzentos, amarelos ou róseos (JACOMINE *et al.*, 1977). As serras apresentam topos suaves com vales abertos e encostas abruptas em cotas altitudinais que variam de 600 a 1.000 m. Nas vertentes a barlavento, ocorre uma vegetação perenifólia arbustiva (RODAL *et al.*, 1998), enquanto nas vertentes a sotavento, há registro de uma vegetação caducifólia arbustiva espinhosa (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2000). Além desses dois tipos vegetacionais, bastante distintos do ponto de vista florístico e ou fisionômico, merece destaque a vegetação das áreas mais elevadas e planas, a qual possui um conjunto florístico particular, os campos rupestres.

O Parque é formado por elevações montanhosas de topo suave, encostas abruptas e vales abertos, distribuídos em aproximadamente 90.000 ha (OLIVEIRA, M. 2010). Temperatura e precipitação médias anuais são de 25°C e 1.095,9 mm com maior pluviosidade entre abril a junho (SILVA; SCHLINDWEIN; RAMALHO, 2007).

4.2. Coleta do material botânico

Folhas de *C. adamantinus* e *C. grewioides* foram coletadas nos meses de agosto/2014 e fevereiro/2015 no Parque Nacional Vale do Catimbau, em Buíque e em Ibimirim (PE).

4.3. Obtenção dos óleos essenciais

Folhas de *C. adamantinus* e *C. grewoides* foram separadas manualmente e secas a temperatura ambiente por três dias (SANTOS *et al.*, 2014). Em seguida, os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação das folhas secas com água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de quatro horas para cada planta (PEREIRA *et al.*, 2011). Em seguida seco em sulfato de sódio anidro e mantido em refrigerador (-5 °C) num frasco de vidro âmbar até a análise.

O rendimento dos óleos essenciais foi definido como o quociente do peso do óleo recolhido e o peso seco do material vegetal extraído (SANTOS *et al.*, 2014).

4.4. Análise da composição química

A identificação química dos compostos foi realizada por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM).

Em um espectrômetro Shimadzu modelo GC FID 2010 plus, operando com energia de ionização de 70 eV. O intervalo de massa foi 30-500 Da e a temperatura da fonte iônica foi de 200°C. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida ZB5-HT (30 m × 0.32 mm × 1.0µm) e carreador de gás hélio com fluxo de ±1 mL/min com split. A programação utilizada foi inicialmente 50°C por 3 minutos e depois aumentando 3°C/min até atingir 280 °C, finalizando com esta temperatura por 5 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram programadas de 250 °C e 300 °C, respectivamente. Um microlitro da amostra do óleo essencial, dissolvido em hexano (1:100, v/v), foi injetado (LIN *et al.*, 2012).

As substâncias foram identificadas por comparação dos seus espectros de massas com os espectros da base de dados NIST 98 (NIST Mass Spectral Library, 1998) e os registrados na literatura (ADAMS, 2007) e por comparação de seus índices de retenção, obtidos a partir do algoritmo de Kovats modificado, utilizando como padrões uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares de C₈H₂₀ (octano) a C₂₆H₅₄ (hexacosano), com os índices de retenção registrados na literatura (ADAMS, 2007).

4.5. Avaliação da Atividade Antioxidante

4.5.1. Teste qualitativo da Atividade Antioxidante

Os óleos essenciais das duas espécies em estudo foram analisados qualitativamente quanto a sua atividade antioxidante por meio de aplicação dos mesmos em placas cromatográficas (folha de alumínio coberta com sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) e embebidos numa mistura de hexano:acetato de etila

(9:1) como fase móvel (SIMIONATTO *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2013). A placa foi pulverizada com o reagente DPPH 0,2% em metanol e deixada à temperatura ambiente sob abrigo de luz por 30 minutos (SIMIONATTO *et al.*, 2007). Foram consideradas como atividade antioxidante positivo, as manchas amarelas formadas a partir de branqueamento da cor roxa de reagente DPPH.

4.5.2. Teste quantitativo da Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foram avaliadas pelo método de monitoramento da habilidade em estabilizar o radical livre DPPH, que foi adaptado de acordo com os métodos descritos por Mensor *et al.* (2001), Kalantzakis *et al.* (2006), Azevedo *et al.* (2013) e Simionatto *et al.* (2007).

Mil e duzentos microlitros (1200µL) de cinco diferentes diluições de etanol com os óleos essenciais (100, 75, 50, 25 e 10mg/ml) foram misturados com 4,8 ml de solução DPPH (100µM) em solução etanólica. Após 30 minutos, sob abrigo de luz e a temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro a 515 nm. As análises foram realizadas em triplicata. O etanol foi utilizado para fazer a calibração do espectrofotômetro.

Foi realizado o cálculo da concentração de DPPH após 30 minutos de reação através da equação da reta obtida na curva de calibração do DPPH, onde $Abs_{515nm} = a[DPPH] + b$. Sendo y a absorbância das amostras após 30 minutos de reação a 515 nm.

Em seguida, o cálculo do % DPPH reduzido foi obtido através da fórmula $\%DPPH_{red} = 100 \times (1 - [DPPH]_{30} / [DPPH]_0)$, onde $[DPPH]_0$ e $[DPPH]_{30}$ são as concentrações de DPPH na amostra controle (t=0) e na mistura teste após 30 minutos, respectivamente.

A atividade antioxidante com DPPH foi expresso como EC₅₀ (a concentração de óleo necessária para reduzir 50% do DPPH, em mg/ml), no qual foi elaborada uma equação da reta a partir de regressão linear ($AbsDPPH_0/2 = ax + b$), onde a abscissa representa a concentração de óleo essencial testado e a ordenada o percentual médio de atividade antioxidante a partir das diferentes concentrações de óleo (AZEVEDO *et al.*, 2013).

4.6. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.6.1. Microrganismos

Foram utilizadas nos testes para atividade antimicrobiana, cinco espécies de bactérias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Enteridis* e três espécies gram-positiva: *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus*

aureus e *Bacillus subtilis*. As bactérias foram obtidas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.6.2. Preparação dos meios

Foram utilizados como meio de cultura para as bactérias, o meio sólido Müller Hinton Agar para determinar a Concentração Mínima Bactericida (CMB) e o meio líquido Müller Hinton na microdiluição seriada na placa de 96 poços para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.6.3. Preparação das soluções

Em tubo estéril foram adicionados 200 µL do OE de *C. adamantinus* e *C. grewioides*, 0,02µL de Tween 80 e q.s.p. 2 mL de água destilada estéril, sendo agitado por 5 minutos usando-se aparelho Vortex, obtendo-se uma solução com concentração final de 100 µg/mL do óleo essencial. A partir de tal solução, utilizando o procedimento de diluição seriada, foi obtido as demais soluções nas seguintes concentrações: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 µg/mL (ALLEGRIINI *et al.*, 1973 com modificações).

4.6.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A avaliação antimicrobiana dos OE's de *C. adamantinus* e *C. grewioides* foi realizada em modelo experimental de microdiluição seriada, conforme descrito pela CLSI (2009) em placas de 96 poços. Para determinar os valores do CIM foram usadas microplacas de 96 cavidades. Da solução mãe de 100 µg/mL foi feita a diluição seriada dos OE's (50 a 0,39 µg/mL) e adicionados 100 µL de cada diluição ao meio apropriado. Em seguida, as placas foram inoculadas com 10 µL de cada microorganismo, ajustadas à escala de MacFarland (10^7 UFC/ml), incubadas a 36°C por 24 horas e realizada a leitura das microplacas. A CBM foi determinada de acordo com os resultados da CIM. Alíquotas de 5ml de cada diluição que inibir o crescimento bacteriano foram semeadas em meio apropriado e incubadas a 36°C por 24 horas. A CBM foi determinada como sendo a concentração mínima que não apresentou crescimento bacteriano no meio de cultura após o período de incubação.

4.7. Conteúdo Fenóis Totais (TPC)

O reagente de Folin-Ciocalteu foi usado para determinar o teor fenóis totais de acordo com o método de Kähkönen *et al.* (1999). 7 mg da amostra de óleo essencial foi misturada com 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteureagent e adicionado 0,8 mL a 7,5% (w/v) de carbonato de sódio. Após

incubação durante 120 minutos à temperatura ambiente, no escuro, a absorvância foi medida a 734 nm. Os compostos fenólicos foram expressas como grama de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de peso seco (DW).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento do óleo

O óleo essencial de *Croton adamantinus* e *C. grewioides* foram extraídos das folhas secas por hidrodestilação e apresentaram rendimento médio com teor de 0,55% e 3%, respectivamente. Valores estes que são comparáveis com os já reportados previamente para outras espécies de *Croton* L. encontrados no Brasil com o mesmo método de extração (Tabela 1).

Como o óleo de ramos frescos de *C. adamantinus* com rendimento de 0,6% (XIMENES *et al.*, 2013), o óleo da casca do caule de *C. urucurana* (0,05%), descrito por Simionatto *et al.* (2007); o óleo essencial das folhas de *C. cajucara* (0,65%) descrito por Azevedo *et al.* (2013), o óleo das folhas secas de *C. rhamnifolioides* (0,8%) descrito por Santos *et al.* (2014); pode-se citar também os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas secas de *C. heliotropiifolius* e *C. pulegioides*, que produziu 0,2% e 5% de óleo, respectivamente (DÓRIA *et al.*, 2010), enquanto e as folhas frescas e ramos de *C. campestris*, 0,04% e 0,02% de óleo, respectivamente (DE ALMEIDA *et al.*, 2013). Além disso, Camurça-Vasconcelos *et al.* (2007) relataram um rendimento de 3,15% de óleo essencial proveniente da destilação a vapor das partes aéreas secas de *C. zehntneri*. Nogueira *et al.* (2015) obtiveram rendimento médio de 0,81% para óleo essencial de folhas *Croton cordiifolius*. Enquanto que Aguiar *et al.* (2014) descreveram cerca de 2% de rendimento médio de óleo essencial para *C. zehntneri*.

Tabela 1: Revisão bibliográfica dos rendimentos dos óleos essenciais de *Croton* spp.

Espécie	Rendimento	Parte da planta	Referência
<i>C. adamantinus</i>	0,60%	ramos frescos	Ximenes et al., 2013
<i>C. argyrophyllus</i>	0,76%	folhas frescas	Ramos et al., 2013
<i>C. blanchetianus</i>	0,70%	Folhas frescas	Melo et al., 2013
<i>C. cajucara</i>	0,65%	folha	Azevedo et al., 2013
<i>C. campestris</i>	0,04%	folhas frescas	De Almeida et al., 2013
<i>C. campestris</i>	0,02%	ramos	De Almeida et al., 2013
<i>C. cascarioides</i>	0,10%	folhas secas	Dai et al., 2014
<i>C. chevalieri</i>	0,12%	folhas secas	Dai et al., 2014
<i>C. cordiifolius</i>	0,81%	folhas	Nogueira et al., 2015
<i>C. heliotropiifolius</i>	0,20%	folhas secas	Dória et al., 2010

<i>C. pulegioidorus</i>	5%	folhas secas	Dória et al., 2011
<i>C. pullei</i>	0,50%	folhas	Peixoto et al., 2013
<i>C. pullei</i>	0,06%	caule	Peixoto et al., 2014
<i>C. rhamnifolioides</i>	0,80%	folhas secas	Santos et al., 2014
<i>C. sacaquinha</i>	0,69%	folhas	Azevedo, 2010
<i>C. tonkinensis</i>	0,16%	folhas secas	Dai et al., 2014
<i>C. urucurana</i>	0,05%	casca do caule	Simionatto et al., 2007
<i>C. zehntneri</i>	3,15%	Partes aéreas secas	Camurça-Vasconcelos et al., 2007
<i>C. zehntneri</i>	1,56%	Folhas	Costa et al., 2008
<i>C. zehntneri</i>	2%	folhas frescas	Aguiar et al., 2014
<i>C. zehntneri</i>	1,80%	Folhas e caules frescos	Andrade et al., 2014

5.2. Perfil químico – Caracterização dos óleos

O perfil químico dos óleos foi analisado em CG/EM e seus componentes foram identificados de forma quantitativa e qualitativa. Foram identificados 10 componentes em *C. adamantinus* e 11 em *C. grewioides*. O que corrobora com o já descrito na literatura a respeito da grande diversidade química deste gênero. Sendo identificados como majoritários os sesquiterpenos hidrocarbonetos tanto em *C. adamantinus* como em *C. grewioides* presentes na tabela 2 e 3.

Tabela 2: Compostos majoritários de óleo essencial de folha de *Croton adamantinus*.

Peak	Compound	Retention time (min)	RI ^a	Relative area (%)
1	NI	12.392	-	0.71
2	Estragole	14.392	1172	1.19
3	2-carene	19.483	948	2.91
4	β -bourbonene	21.150	1339	0.71
5	β -elemene	21.367	1398	1.12
6	β -caryophyllene	22.325	1430	11.06
7	NI	23.442	-	0.43
8	Germacrene D	24.367	1480	27.88
9	Germacrene B	24.874	1561	30.18
10	δ -cadinene	25.650	1530	1.00
11	Spathulenol	27.367	1572	8.22
12	Viridiflorol	27.558	1590	1.97
13	NI	28.225	-	8.12
14	NI	32.308	-	4.50
	Total identified			86.24
	Monoterpene hydrocarbons			2.91
	Oxygenated monoterpenes			0.00
	Sesquiterpene hydrocarbons			71.95
	Oxygenated sesquiterpenes			10.19
	Others			1.19

^a Kovats retention index according to n-alkanes (C8–C26)

Tabela 3: Compostos majoritários de óleo essencial de folha de *Croton grewoides*.

Peak	Compound	Retention time (min)	RI ^a	Relative area (%)
1	Linalool	21.358	1099	0.79
2	β -caryophyllene	22.308	1419	3.19
3	γ -elemene	22.733	1436	1.77
4	NI	23.417		0.27
5	Germacrene D	24.325	1480	2.15
6	(+)-sativene	24.467	-	5.62
7	NI	24.642		0.14
8	NI	24.792		0.93
9	γ -cadinene	25.583	1513	1.20
10	NI	25.725		0.37
11	γ -selinene	26.092	-	0.64
12	Elemol	26.425	1548	0.71
13	Germacrene B	26.733	1550	2.93
14	γ -eudesmol	26.850	1631	2.18
15	NI	29.625		2.27
16	NI	30.535		7.66
17	2,3-dimethyl-1,3-heptadiene	32.422	-	67.18
	Total identified			88.36
	Monoterpene hydrocarbons			0.79
	Oxygenated monoterpenes			0.00
	Sesquiterpene hydrocarbons			17.50
	Oxygenated sesquiterpenes			2.89
	Others			67.18

^a Kovats retention index according to n-alkanes (C8–C26)

Ximenes *et al.* (2013) identificaram vinte compostos em óleo essencial de *C. adamantinus* utilizando os métodos GC-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR, sendo methyl-eugenol (14.81%) e 1,8-cineol (13.74%) os majoritários. De acordo com Simionatto *et al.* (2007), *C. urucurana* apresentou 83 compostos, sendo 27,7% representados pelos principais monoterpenos e 35,7% os sesquiterpenos majoritários. Já Andrade *et al.* (2015) encontraram sete compostos em *C. zehntneri*, classificados como mono e sesquiterpenos; e o estragol foi identificado como majoritário, representando 84,7% dos constituintes do óleo essencial, corroborando com o encontrado por Aguiar *et al.* (2014) que também identificaram o estragol como principal componente (99,15%) para esta mesma espécie, além de identificar o eucaliptol, biciclogermacreno e o espatulenol em baixíssima abundância relativa, bem como o encontrado por Costa *et al.* (2008) que identificaram doze picos, totalizando 97,4% dos constituintes químicos, dentre mono- e sesquiterpenos, sendo reconhecido como componente majoritário o estragol, representando 76,8% do teor do óleo essencial. Analisando óleo essencial de *C. argyrophyllus*, Ramos *et al.* (2013) identificaram 86,02% dos constituintes totais do

óleo, dos quais biciclogermacreno (14.60%), spathulenol (8.27%), (*E*)-caryophylleno (6.79%), β -elemeno (6.19%), β -phellandreno (5.75%), mirceno (4.81%) e caryophylleno oxido (3.68%) se mostraram majoritários, compreendendo 50,09% do óleo. O perfil químico de *C. sonderianus* também foi analisado por Lima *et al.* (2013), onde identificaram 26 compostos (97,39%), dos quais biciclogermacreno (16.36%) apresentou-se como majoritário, seguido pelo α -pinene (15.14%). Óleo de *C. rhamnifolioides* foi caracterizado por Costa *et al.* (2013), que identificaram oito substâncias, equivalente a 100% do conteúdo total do óleo; das quais 65.20% foram monoterpenos e 34.80% sesquiterpenos, sendo o 1,8-cineol (46.32%) o composto majoritário, seguido de 1-felandreno (16.70%), p-cimeno (10.21%), sabineno (8.14%) e trans-caryophylleno (4.81%) como componentes com concentrações significativas.

Nogueira *et al.* (2013) identificaram 1,8-cineol (25.09%) e α -phellandreno (15.43%) como components majoritários de *Croton cordiifolius*.

O óleo de *C. cascarilloides* possui principalmente hidrocarbonetos representados por α -pineno (10.5%), β -caryophylleno (13.5%), β -humuleno (5.9%), germacreno D (6.0%) e α -selinene (6.7%). Enquanto, ciclohexanono (6.8%), *cis*-carano (6.5%), 1-menthol (30.4%) e benzyl benzoato (18.8%) foram os principais constituintes de *C. chevalieri*. Linalool (7.8%), bicicloelemeno (8.0%), β -caryophylleno (10.1%), α -humuleno (7.1%), β -bisabolen (9.6%) e β -sesquiphellandreno (6.9%) pôde ser identificado em altas concentrações em *C. tonkinensis*. Sabineno, linalool, and β -caryophylleno foram identificados em todas as amostras de óleos (DAI *et al.*, 2014).

5.3. Atividade antioxidante

Quanto ao teste qualitativo da atividade antioxidante com DPPH em CCD as espécies em estudo apresentaram atividade antioxidante positiva (Fig. 3), sendo que o *C. grewioides* evidenciou a presença de três classes químicas com atividade antioxidante (Fig. 3B), sendo uma delas a mesma apresentada pelo *C. adamantinus*, porém com uma concentração menor (Fig. 3A).

Para *C. cajucara*, Azevedo *et al.* (2013) identificaram regiões contendo substâncias com atividade mesmo após 45 min de aplicação do DPPH. E a atividade antioxidante foi associada ao 7-hydroxycalamenene (local central) e ao β -caryophyllene (local superior).

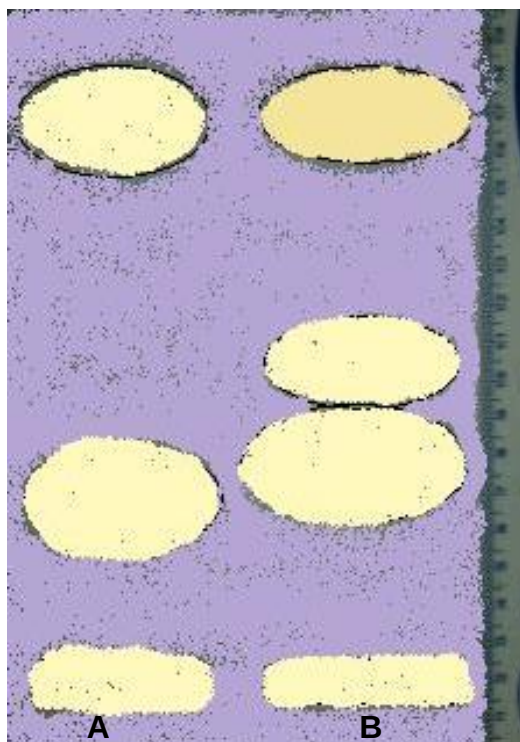


Figura 1: Esquema da Cromatografia em Camada Delgada evidenciando classes químicas dos óleos essenciais de *Croton adamantinus* (A) e *C. grewoides* (B) com atividade antioxidante positiva.

Na análise quantitativa de DPPH, antioxidantes são tipicamente caracterizados pelo seu valor do EC_{50} . *C. adamantinus* apresentou EC_{50} = 130,76 mg/ml e *C. grewoides*, EC_{50} = 3,09 mg/ml (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade antioxidante de óleo essencial de folha de *Croton* spp.

Espécie	EC_{50} (mg/ml)
<i>Croton adamantinus</i>	130,76
<i>Croton grewoides</i>	3,09

C. grewoides apresentou valor de EC_{50} que corrobora com os encontrados em outras espécies de *Croton* L. na literatura, indicando possuir uma boa atividade antioxidante, porém apesar do óleo essencial bruto do *C. adamantinus* demonstrar atividade antioxidante positiva, seu EC_{50} revelou uma baixa atividade em comparação aos valores descritos para o gênero em estudo.

Segundo Simionatto *et al.* (2007), o óleo essencial bruto obtido a partir das cascas do caule de *C. urucurana* apresentou EC_{50} de 3,21mg/ml, já a fração obtida com atividade antioxidante do óleo essencial, apresentou EC_{50} de 1,05mg/ml. O que foi considerado como uma boa atividade antioxidante comparada ao BHT, que apresenta EC_{50} de 0,18mg/ml. Já Azevedo *et al.* (2013) sugerem que o 7-hydroxycalamenene presente no óleo essencial de *C. cajucara* proporciona uma atividade antioxidante mais de acordo com EC_{50} inferior a 63,59 μ g/mL. Azevedo *et al.* (2013)

testaram a atividade antioxidante de *C. cajucara* e atribuiu sua promissora atividade aos compostos 7-hydroxycalamenene e ao β -caryophyllene, uma vez que as amostras dos indivíduos da sacaca vermelha apresentaram EC50 de SV001—45.23 $\mu\text{g/mL}$, SV003—63.59 $\mu\text{g/mL}$, SV004—54.06 $\mu\text{g/mL}$, SV005—44.4 $\mu\text{g/mL}$.

Já Morais *et al.* (2006), analisando a atividade antioxidante por TBARS de três espécies de *Croton* L. do Nordeste brasileiro, verificaram que os óleos essenciais do *C. zenhtneri* e *C. argyrophylloides* mostraram maior ação antioxidante que o *C. nepetaefolius*.

5.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi testada pelo método de microdiluição seriada contra oito bactérias, sendo cinco gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonie*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeroginosa* e *Salmonella Enteridis* e três espécies gram-positiva: *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylucoccus aureus* e *Bacillus subtilis*.

O resultado presente na tabela 5 revela que o óleo essencial bruto de *C. adamantinus* foi capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* (0.78 $\mu\text{L/mL}$), *Staphylucoccus aureus* (1,56 $\mu\text{L/mL}$), e *Salmonella Enteriditis* (75 $\mu\text{L/mL}$), enquanto apresentou atividade bactericida para *Staphylucoccus aureus* (CMB= 31,25 $\mu\text{L/mL}$) e para *Bacillus subtilis* (CMB= 3.12). Já o óleo essencial bruto de *C. grewioides* foi mais eficaz sobre as bactérias gram-positivas, sendo capaz de inibir três das oito bactérias, a *Bacillus subtilis* (2.34 $\mu\text{L/mL}$), *Staphylucoccus aureus* (18,75 $\mu\text{L/mL}$) e *S. saprophyticus* (12,5 $\mu\text{L/mL}$), enquanto teve ação bactericida apenas sobre *S. sapophytica* e *Bacillus subtilis*, com CMB= 50 $\mu\text{L/mL}$ e 31,25 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de folha de *Croton adamantinus* e *C. grewioides* (Concentração Inibitória Mínima – MIC; Concentração Bactericida Mínima - CMB em $\mu\text{L/mL}$).

Microrganismos	<i>Croton adamantinus</i>		<i>Croton grewioides</i>	
	MIC	CMB	MIC	CMB
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtellis</i>	0.78	3.12	2.34	31.25
<i>Klebsiella pneumonie</i>	>100	>100	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i>	100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	100	>100	>100	>100
<i>Salmonella Enteriditis</i>	75	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.56	31.25	18.75	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	>100	12.5	50

Os óleos essenciais de *Croton spp.* testados foram eficientes quanto à inibição do crescimento bacteriano, principalmente, de *B. subtilis*. Embora esta bactéria não seja um patógeno humano, e sim uma saprófita, mas já foi amplamente utilizada em tratamentos antes do desenvolvimento dos antibióticos e continua servindo como organismo modelo para estudos laboratoriais (ARAÚJO, 2016).

Quanto à atividade bactericida desses óleos, pode-se notar a eficiência destes principalmente sobre *B. subtilis*. O que indica a susceptibilidade deste microrganismo aos óleos essenciais de *Croton spp.* comparada às outras bactérias testadas.

O que corrobora com o analisado por Lin *et al* (2012) com óleo essencial de partes aéreas e raízes de *Euphorbia macrorrhiza* (Euphorbiaceae), que também teve efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus*, com MIC = 2.8 µg/mL, enquanto não apresentou efeito sobre *E. coli*.

Como também o analisado por Costa *et al.* (2013) com óleo essencial de *C. rhamnifoliodes* que apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, como também contra *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* com valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) entre 2,5 - 20 µL/mL e 5 - 40 µL/mL, respectivamente, próximo aos intervalos de valores encontrados no presente estudo.

Já a análise feita por Simionato *et al.* (2007) com óleo essencial bruto de *C. urucurana* não corrobora com os efeitos antibacterianos dos óleos essenciais de *Croton adamantinus* e *C. grewioides*, pois *E. coli* e *S. epidermalis* (MIC= 1,25 mg/mL) se mostraram sensíveis, enquanto que *B. subtilis* e *C. albicans* foram os microrganismos mais resistentes (MIC= 10 mg/mL).

5.5. Dosagem de compostos fenólicos totais

Os conteúdos de compostos fenólicos presentes nas amostras de óleos essenciais foliares de *Croton adanatinus* e de *C. grewioides* mostraram-se bastante significativos em equivalência com o Ácido Gálico, apresentando valor total de 265,694±2,88gGAE/100DW e 269,86±0,923 gGAE/100DW, respectivamente, representado na tabela 6.

Poucos são os trabalhos que retratam a dosagem de compostos fenólicos em óleo essencial, sendo a maioria, realizados em extratos. Marino *et al.* (2008) analisaram o conteúdo total de compostos fenólicos em frações de extratos do látex de *Croton lechleri* e obtiveram a maior concentração de fenóis (306 mg/g) na fração n-BuOH e a mais baixa na fração n-hexano (4,84 mg/g). Contudo, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que relate a dosagem de compostos fenólicos para óleo essencial de nenhuma espécie de *Croton* L., o que caracteriza um dado inédito desta pesquisa.

Tabela 6: Conteúdo de Fenóis Totais de óleos essenciais foliares em *Croton spp.* expresso em Equivalente de Ácido Gálico (GAE)/100g de peso seco (DW).

Espécies	Total Phenolic Content (gGAE/100DW)
<i>Croton adamantinus</i>	265,694±2,88
<i>Croton grewioides</i>	269,86±0,923

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das espécies analisadas neste estudo, pode-se perceber o excelente rendimento (3%) de óleo essencial bruto obtido das folhas de *Croton grewioides*. Enquanto que o rendimento obtido de *C. adamantinus* mostrou-se semelhante aos de outras espécies de *Croton* L. já reportados na literatura.

Foi possível concluir que os óleos essenciais brutos de *Croton adamantinus* e *C. grewioides* apresentam uma alta diversidade química de compostos que pertence basicamente a classe dos sesquiterpenos hidrocarbonetos.

Estas espécies apresentaram atividade antioxidante, embora o *C. adamantinus* não tenha demonstrado um bom valor de EC₅₀, *C. grewioides* apresentou-se mais eficiente e com valores semelhantes aos já reportados na literatura pra espécies deste gênero.

Foi possível identificar que *Bacillus subtilis* foi a bactéria mais sensível aos óleos essenciais de *Croton adamantinus* e *C. grewioides*. Demonstrando-se importante também quanto a inibição e atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, um importante patógeno humano que causa infecções e apresenta resistência a antimicrobianos.

Os óleos essenciais foliares das espécies em estudo apresentaram boas quantidades de compostos fenólicos totais em equivalente Ácido Gálico, o que reporta sua importância como antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDON, A. P. V., LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO DE SOUZA, A. N., MORAIS, S. M., SANTOS, C. F. (2002) Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepentaeifolius* on mice. **Brazilian journal of medical and biological research** 35 (10), 1215-1219.
- AGUIAR, L.A.; PORTO, R.S.; LAHLOU, S.; CECCATTO, V.M.; BARBOSA, R.; LEMOS, T.L.G.; DOS SANTOS, H.S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MAGALHÃES, P.J.C.; ZIN, W.A.; ET AL. Antispasmodic effects of a new kaurene diterpene isolated from *Croton argyrophyllodes* on rat airway smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 2012, 64, 1155–1164.
- AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; ALMEIDA, L. T. G. Preparação E caracterização do complexo de inclusão do Óleo Essencial de *Croton zehntneri* com β -Ciclodextrina. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 1, 50-55, 2014.
- AGNANIET, H., AKAGAH, A., MOUNZEO, H. (2005). Aromatic plants of tropical central África. XLI. Volatile constituents of *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch growing in Gabon. **Journal of Essential Oil Research**, 17, 201-203.
- ALLEGRI, J.; BOUCHBERG, M.S.; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles fabrication et applications em microbiologie. **Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, n. 1, p.73-86, 1973.
- AMARAL, A.C.F.; BARNES, R.A. A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. *Phytochemistry* 1998, 47, 1445–1447.
- AMARAL, J. F., SANTOS, F. A., SOUZA, F. C. F., ALMEIDA, F. (2004). Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- ANDRADE, THALLITA C.B.; DE LIMA, SIDNEY G.; FREITAS, RIVELILSON M.; ROCHA, MÁRCIO S.; 1, ISLAM, TOREQUL; DA SILVA, TERESINHA G.; MILITÃO, GARDENIA C. G. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *croton zehntneri* (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2015) 87(1) Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690 www.scielo.br/aabc 173-182 <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140111>
- ARAUJO, M. *Bacillus subtilis*. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/reino-monera/bacillus-subtilis/>> Acesso em: 25/01/2016
- AZEVEDO, MARIANA M. B.; CHAVES, FRANCISCO C. M.; ALMEIDA, CATIA; BIZZO, HUMBERTO; DUARTE, RAFAEL S.; CAMPOS-TAKAKI, GALBA; ALVIANO, CELUTA S.;

- ALVIANO, DANIELA S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxycalamenene-Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. **Molecules** 2013, 18, 1128-1137; doi:10.3390/molecules18011128.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447. 2007.
- BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.)** N. E. Brown. 2008. 162p. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2008.
- BASTOS, S. R. L. *Croton nummularius* Baill. (Euphorbiaceae): composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais. Dissertação. Recife, 2014.
- BERRY, P. E., HIPPEL, A. L., WURDACK, K. J., VAN Ee, B., RIINA, R. (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, 92(9), 1520-1534.
- BIGHETTI, E. J. B.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BRITO, A. R. M. S. "Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* benth," **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 51, no. 12, pp. 1447–1453, 1999.
- BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; HABIB JIWAN, J.-L.; LLABRÈS, G.; DE PAUW-GILLET, M.-C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry** 2004, 65, 1165–1171.
- BLOCK, S., STÉVIGNY, C., DE PAUW-GILLET, M. C., DE HOFFMANN, E., LLABRÈS, G., ADJAKIDJÉ, V. (2002). Ent-trachyloban-3 β -ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. **Planta Medica** 68 (7), 647-649.
- BRACCO, U.; LOLIGER, J.; VIRET, J. I.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, 58, 686.
- BUCHANAN, B. B. GRUISSEM, W., JONES, R. L. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists** Rockville MD
- CAMPOS, M. C. O., SALOMÃO, K., CASTRO-PINTO, D. B., LEON, L. L., BARBOSA, H. S., MACIEL, M. A. M. (2010). *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, 107(5), 1193-1204.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *lippia sidoides* essential oils. **Vet. Parasitol.** 2007, 148, 288–294.

- CARDOSO-LOPES, E. M., PAULA, D. M. B. D., BARBO, F. E., SOUZA, A. D., BLATT, C. T. T., TORRES, L. M. B. (2009) Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 32(4), 819-825.
- CARNEIRO-TORRES, D. S. 2009. Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. Tese doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- CATUNDA JR., F. E. A.; LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M.; *REV. CIÊNCIA E TECNOL. DA UECE* **2002**, 4, 23.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p.829-837. 2004.
- COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 135-143. 2004.
- COMPAGNONE, R. S., CHAVEZ, K., MATEU, E., ORSINI, G., ARVELO, F., SUÁREZ, A. I. (2010). Composition and cytotoxic activity of essential oil from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Methods**, 2, 101-108.
- CORDEIRO, I., SECCO, R., CARDIEL, J.M., STEINMANN, V., CARUZO, M.B.R., RIINA, R., LIMA, L.R. DE, MAYA-L., C.A., BERRY, P., CARNEIRO-TORRES, D.S., O.L.M. SILVA, SALES, M.F.D., SILVA, M.J.DA, SODRÉ, R.C., MARTINS, M.L.L., PSCHIEDT, A.C., ATHIÊ-SOUZA, S.M., MELO, A.L.D., OLIVEIRA, L.S.D., PAULA-SOUZA, J., SILVA, R.A.P. 2016. Euphorbiaceae in lista de espécies da flora do brasil. Jardim botânico do rio de janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/fb113>>. acesso em: 18 JAN. 2016
- COSTA, A. C. V.; MELO, G. F. DO A.; MADRUGA, M. S.; COSTA, J. G. M.; GARINO JUNIOR, F.; QUEIROGA NETO, V. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2853-2864, nov./dez. 2013.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; DE SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; DOS SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade Estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(4): 583-586, Out./Dez. 2008
- CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 773.

- CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanolico de raizes e partes aereas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p.97-103. 2004.
- DAI, D. N.; HUONG, L. T.; THANG, T. D.; OGUNWANDE, I. A. Chemical constituents of Essential Oils of the leaves of three species of *Croton* from Vietnam. **Chemistry of Natural Compounds**, Vol. 50, No. 1, March, 2014
- DE ALMEIDA, T.S.; ROCHA, J.B.T.; RODRIGUES, F.F.G.; CAMPOS, A.R.; DA COSTA, J.G.M. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Ind. Crop. Prod.** 2013, 44, 630–633.
- DEEPIKA G, BLEAKLEY B, GUPTA RK. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **J Ethnopharmacol.** 2008;115:361–380. doi: 10.1016/j.jep.2007.10.018.
- DE FELIU, D. A. Análise de terpenoides de espécies de *Croton* sect. *Lampocroton* (Mull. Arg.) Pax Euphorbiaceae. Dissertação. São Paulo, 2011.
- DEWICK, P. M. (2009) Medicinal Natural Product – A biosynthetic approach. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester (546pp)
- DÓRIA, G.A.A.; SILVA, W.J.; CARVALHO, G.A.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharm. Biol.** 2010, 48, 615–620.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromaticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7. p.1-16. 2006.
- FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., CAMPAGNUOLO, C., SANTELLA, F. U., APPENDINO, G., SPAGLIARDI, P. (2002). Diterpenoids from Cascarilla (*Croton eluteria* Bennet). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50 (18), 5131-5138.
- FORERO, J. E., AVILA, L., TABORDA, N., TABARES, P., LÓPEZ, A., TORRES, F. (2008). In vitro anti-influenza screening of several Euphorbiaceae species: structure of a bioactive Cyanoglucoside from *Codiaeum variegatum*. **Phytochemistry**, 69 (16), 2815-2819.
- FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro - A. Jakobsson Estudio, v. 1, p 1155. 2012.
- GIULIETTI, A. M. et al. Florística e fitossociologia da vegetação arbustiva subcaducifolia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, p. 37-48, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundarios. **Química Nova**, vol. 3, p. 374, 2007.
- GOUNGUENE, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile

- emissions in corn plants. **Plant Physiology**. v. 129, p.1296-1307. 2002.GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae), 1st ed.; **Royal Botanic Gardens**: Kew, UK, 2000; pp. 1, 661.
- GUIMARÃES, L. A. C. O gênero *CROTON* L. seção *CYCLOSTIGMA* Griseb. e seção *LUNTIA* (Raf.) G. L. Webster (EUPHORBIACEAE) ocorrentes na Amazônia brasileira. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-PA, 2006.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93. 2006.
- JANSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie**. v. 45, p. 70. 1987.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K.; *Food Chem.* **2001**, 73, 285.
- KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., HEINONEN, M., 1999. Antioxidant Activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.
- KRISHNAVENI, M., MIRUNALINI, S. (2010). Therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (amla): the ayurvedic wonder. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 21(1), 93-105.
- LARSON, R.; **Phytochemistry** 1988, 2, 969.
- LIMA, JANAÍNA K.A.; ALBUQUERQUE, ELÂNIA L.D.; SANTOS, ANE CAROLINE C.; OLIVEIRA, ALEXANDRE P.; ARAÚJO, ANA PAULA A.; BLANK, ARIE F.; ARRIGONI-BLANK, MARIA DE FÁTIMA; ALVES, PÉRICLES B.; SANTOS, DARLISSON DE A.; BACCI, LEANDRO. Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Industrial Crops and Products** 47 (2013) 246– 251.
- LIMA, L. R., PIRANI, J. R. (2008). Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lampocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s. s.). **Biota Neotropical**, 8(2).
- LIMA, M. G. A., MAIA, I., SOUSA, MORAIS, L., FREITAS, S. (2006). Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 48(4), 211-4.
- LIN, J.; DOU, J.; XU, J.; AISA, H. A. Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules** 2012, 17, 5030-5039; doi:10.3390/molecules17055030
- LOLIGER, J. Em *Free radicals in food additives*; Auroma, I. O.; Halliwell, B., eds.; Taylor & Francis: London, 1991.

- MAIA, G.N. **CAATINGA ÁRVORES E ARBUSTOS E SUAS UTILIDADES**. 1A ED. LEITURA & ARTE. P 19-31. 2004.
- MACIEL, M. A., PINTO, A.C., ARRUDA, C., PAMPLONA, S. G., VANDERLINDE, F. A., LAPA, A. J. (2000). Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, 70(1), 41-55.
- MANTLE, D.; ANDERTON, J. G.; FALKOUS, G.; BARNES, M.; JONES, P.; PERRY, E. K.; *COMP. BIOCHEM. PHYSIOL., PART B: BIOCHEM. MOL. BIOL.* **1998**, 121, 385.
- MARINO, S.; GALA, F.; ZOLLO, F.; VITALINI, S.; FICO, G.; VISIOLI, F.; IORIZZI, M. Identification of Minor Secondary Metabolites from the Latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and Evaluation of Their Antioxidant Activity. **Molecules** 2008, 13, 1219-1229; DOI: 10.3390/molecules13061219
- MELO, G. F. DO A.; DA COSTA, A. C. V.; GARINO JUNIOR, F.; MEDEIROS, R. S.; MADRUGA, M. S.; QUEIROGA NETO, V. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology** 44, 4, 1189-1194 (2013).
- MILANOWSKI, D.J.; WINTER, R.E.K.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 814–819.
- MOHAMED, I. E., BUSHRA, E., NUR, E. E., CHOUDHARY, MUHAMMAD I., KHAN, S. N. (2009). Bioactive natural products from two Sudanese medicinal plants *Diospyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*. **Rec. Nat. Prod**, 3(4), 198-203.
- MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 5, 907-910, 2006
- MORAIS, S. M., CAVALCANTI, E. S. B., BERTINI, L. M., OLIVEIRA, C. L. L., RODRIGUES, J. R. B., CARDOSO, J. H. L. (2006). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Am Mosq Control Assoc**, 22(1), 161-164.
- MURILLO, R. M., JAKUPOVIC, J., RIVERA, J., CASTRO, V. H. (2001). Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). **Revista de Biologia Tropical**, 49(1), 259-264.
- NOGUEIRA, LENISE DE MORAIS; SILVA, MONALISA RIBEIRO; SANTOS, SIMONE MARIA; ALBUQUERQUE, JULIANNA FERREIRA CAVALCANTI; FERRAZ, IGOR CAVALCANTI; ALBUQUERQUE, THAÍSE TORRES; MOTA, CARLOS RENATO FRANÇA DE CARVALHO; ARAÚJO, RENATA MENDONÇA; VIANA, GLAUCE SOCORRO DE BARROS; MARTINS, RENÉ DUARTE; HAVT, ALEXANDRE; XIMENES, RAFAEL MATOS. Antinociceptive Effect of the Essential Oil Obtained from the Leaves of *Croton cordifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in Mice. **Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based**

- Complementary and Alternative Medicine.** 2015, Article ID 620865, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/620865>
- OLIVEIRA A. F. M.; MEIRELLES, S. T.; SALATINO, A. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **An. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v.75 n.4, 2003.
- OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F. L.; DE OLIVEIRA, F. C.; **J. Phys. Chem.** 2011, 115, 8511.
- PALMEIRA JÚNIOR, Sebastião F. et al. Constituintes químicos das folhas e caules de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p.01-05, 2006. Issn 0102-695x.
- PERAZZO FF, CARVALHO JCT, RODRIGUES M, MORAIS EKL, MACIEL MAM 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Rev Bras Farmacogn* 17: 521-528.
- PEREIRA, A.Q.; CHAVES, F.C.M.; PINTO, S.C.; LEITÃO, S.G.; BIZZO, H.R. Isolation and Identification of cis-7-Hydroxycalamenene from the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. *J. Essent. Oil Res.* **2011**, 23, 20–23.
- ROCHA, F. F.; NEVES, E.M.N.; COSTA, E.A.; MATOS, L.G.; MÜLLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P.; CORTES, W.S.; VANDERLINDE, F.A. 2008. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 18: 344-349.
- RANDAU, K.P.; FLORÊNCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Estudo farmacognóstico de *Cróton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, 14, 89–96.
- RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 18, p. 1-5. 2008.
- ROSA, M. D. S. S., MENDOÇA-FILHO, R. R., BIZZO, H. R., RODRIGUES, I. D. A., SOUTO-PADRÓN, T. (2003). Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(6), 1895-1901.
- ROSSI, D., BRUNI, R., BIANCHI, N., CHIARABELLI, C., GAMBARI, R., MEDICI, A. (2003). Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine international journal of phytotherapy and phytopharmacology**. 10 (2-3), 139-144.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M. T.; *Food Chem.* **2000**, 69, 167.

- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *croton* species (euphorbiaceae). **J. BRAZ. CHEM. SOC.** 2007, 18, 11–33.
- SANTOS, F. A., JEFERSON, F. A., SANTOS, C. C., SILVEIRA, E. R., RAO, V. S. N. (2005). Antinociceptive effect of leaf Essentials oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**. 77(23), 2953-2963.
- SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**. 2014, 19, 16573-16587; doi:10.3390/molecules191016573
- SANTOS, H. S., MESQUITA, F. M. R., LEMOS, T. L. G., MONTE, F. J. Q., BRAZ-FILHO, R. (2008). Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Química Nova**. 31 (3), 601-604
- SANTOS, P. M. L., SCHRIPEMA J, KUSTER R. M. 2005. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 321-325.
- SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio. **Acta Bot. Bras.**, Brasília, n. , p.99-118, 03 maio 2008.
- SECCO, R.S. Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Bot.** 1992, 8, 265–281.
- SECCO, R.S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia brasileira: um ensaio taxonômico, 1st ed.; **Museu Paraense Emílio Goeldi**: Belém, Brazil, 2008; pp. 119–123.
- SIMIONATTO *et al.* Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essencial oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **J. Braz. Chem. Soc.** Vol.18, N. 5, 879-885, 2007.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** 24(2): 441-453. 2010.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F. & CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *croton* (euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**. v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6a ed., Ed. da UFSC: Florianópolis, 2010.
- SOUZA, M. A. A., SOUZA, S. R. VIEGA Jr, V. F., CORTEZ, J. K. P. C., LEAL, R. D. S., DANTAS., T. N. C. (2006). Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e

- determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(Supl.), 599-610
- SUARÉZ, A. I., VÁSQUEZ, L. J., MANZANO, M. A, COMPAGNONE, R. S. (2005). Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal**. 20(6), 611-614.
- SYLVESTRE, M., PICHETTE, A., LONGTIN, A., NAGAU, F., LEGAULT, J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, 103(1), 99-102.
- TABARELLI, M. PINTO, L. P., SILVA, J. M. C., HIROTA, M. & BEDE, L. Desafios e oportunidades para a conservacao da biodiversidade na mata atlantica brasileira. **Megadiversidade** 1: 132-138. 2005.
- TISSERAND, R.; BALACS, T.; Essential Oil Safety: A Guide For Health Care Professionals, **Churchill Livingstone: London**, 1999.
- TORRES, M. C. M. Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* Var. *matosii* (Euphorbiaceae). 2008. 8p. Tese (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará, 2008.
- TORRICO F, CEPEDA M, GUERRERO G, MELENDEZ F, BLANCO Z, CANELÓN DJ, DIAZ B, COMPAGNONE RS, SUÁREZ AI 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Rev Bras Farmacogn* 17: 166-169.
- VERPORTE, R., ALFERMANN, A. W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. **Kluwer Academic Publishers**. 2000
- WALL, M. E, WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254. 1996.
- WEBSTER, G. Annals of the Missouri Botanical Garden: Systematic of the Euphorbiaceae; **Missouri Botanical Garden Press**: St. Louis, MO, USA, 1994; Volume 81, pp. 33–144.
- WEBSTER, G.L. Synopsis of the genera and suprageneric tax of Euphorbiaceae. **Ann. Mo. Bot. Gard.** 1994, 81, 33–144.
- WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** 1993, 42, 793–823.
- WENG, X. C.; WANG, W.; *Food Chem.* **2000**, 71, 489.
- XIMENES RM¹, DE MORAIS NOGUEIRA L, CASSUNDÉ NM, JORGE RJ, DOS SANTOS SM, MAGALHÃES LP, SILVA MR, DE BARROS VIANA GS, ARAÚJO RM, DE SENA KX, DE ALBUQUERQUE JF, MARTINS RD. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **J. Nat Med.** 2013 Oct; 67(4):758-64. doi: 10.1007/s11418-012-0740-1. Epub 2013 Jan 22.

ANEXO – Artigo

Periódico: **INDUSTRIAL CROPS AND PRODUC**

Fator de impacto: 2.837

Qualis: B1

**CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS, TOTAL PHENOLIC
CONTENT AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
CROTON GREWIOIDES BAILL. (EUPHORBIACEAE) CAATINGA.**

II. CAPÍTULO 2: CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS, TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Croton grewioides* BAILL. (EUPHORBIACEAE) CAATINGA.

Maíra H. M. Silva^{1*}, Ingrid A. T. A. Ribeiro², Amanda D. A. Uchôa², Antônio F. M. Oliveira³, Alexandre G. Silva⁴, Rafael M. Ximenes⁵, Maria Tereza S. Correia⁶, Márcia V. Silva⁶.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

² Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

³ Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴ Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande-PB.

⁵ Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

⁶ Laboratório de Biomoléculas, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

*Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mairamhms@hotmail.com; Tel.: +55-81-2126-7813

Abstract: Many species of the genus *Croton* L. (Euphorbiaceae) have been used in traditional medicine and its pharmacological activities demonstrated. *Croton grewioides* Baill. is a shrub found in the flora of northeastern Brazil, popularly known as "canelinha". The aim of this study was to determine the chemical composition and analyze the total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewioides* leaves Caatinga. The essential oil (EO) of *Croton grewioides* leaves was tested against four bacteria and their antimicrobial activity was evaluated for its minimum inhibitory concentration (MIC) and its minimum bactericidal concentration (CMB), and has been tested its antioxidant activity according with its ability to stabilize the free radical DPPH and dosed the total phenolic content expressed in Equivalent Gallic Acid (EGA). Their essential oil were determined by analysis on GC/MS. Eleven compounds were detected in the chemical composition of the leaf essential oil of *C. grewioides*, representing 88.36% of the total composition. The OE *C. grewioides* was able to inhibit three of the eight tested strains, *Bacillus subtilis* (2.34 μ L / mL), *Staphylococcus aureus* (18.75 μ L / mL) and *S. saprophytica* (12.5 μ g / ml) while had bactericidal only against *S. saprophyticus* and *Bacillus subtilis*, with CMB = 50 mg / mL and 31.25 mg / mL, respectively; and showed antioxidant activity with EC₅₀ = 3.09 mg / mL. However, this species has a good amount of total phenols content, with 269.86 $\pm$ 0,923g EGA/100gDW. Considering the bioactive potential demonstration by OE can infer the importance of this for therapeutic use.

Keywords: Bioactivity; Caatinga; Croton; Volatil oil, Phenol.

1. INTRODUCTION

The accumulation of knowledge about the therapeutic potential of medicinal plants reached for centuries by folk medicine is often the only therapeutic resource of various communities and ethnic groups. Currently, they are used in folk medicine over 20,000 different species of medicinal plants (Deepika-GUPTA *et al.*, 2008). This is due to the low cost and accessibility of plants with medicinal properties, increasing demand and interest in recent times, especially in developing countries. With this, plants have become an important source of biologically active natural products, many of which can be used for the production of numerous drugs (WALL & WANI, 1996). Although there is use of a large number of species for traditional medicine, the use of herbal and principles active plant by the pharmacological industry is still quite deficient.

The Caatinga is touted as a rich ecosystem of endemic and very heterogeneous species corresponds to a habitat typically occupied by Euphorbiaceae, one of the botanical family that best represents this environment, with large numbers of endemic species, such as some species of *Croton*.

The species of *Croton*, being mainly in extreme conditions habitats such as Caatinga, have a chemical diversity of very large secondary compounds with essential oils and active constituents such as terpenoids, flavonoids and alkaloids, and often used in folk medicine (COSTA *et al.*, 2008). *Croton* L. produce essential oils containing mainly terpenoids and phenylpropanoids, while others produce only terpenoids (SALATINO *et al.*, 2007). Some species have therapeutic properties proven (SANTOS *et al.*, 2005; PALM JR *et al.*, 2006; TORRICO *et al.*, 2007, ROCHA *et al.*, 2008)

Croton grewioides is kind of typical Euphorbiaceae semi-arid, found primarily in northeastern Brazil and known as "canelinha", "caatinga-de-cheiro" or "alecrim-de-cabloco". It is a strongly aromatic plant, cinnamon aroma, often noticeable in herbarium specimens (SILVA *et al.*, 2010), so it has a high content of essential oils. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of leaf essential oil of this species, as well as their income and their chemical characteristics.

Thus, the aim of this study was to characterize the essential oils of *C. grewioides* collected in Pernambuco and establish interrelations of the OE's profile of this species with antimicrobial and antioxidant activities.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Collection of botanical material

C. grewioides leaves were collected in 2014 in Catimbau Valley National Park in Buíque (PE).

2.2. Obtaining essential oils

C. grewioides leaves were separated manually and dried at room temperature for three days (SANTOS *et al.*, 2014). Then, essential oils were obtained by hydrodistillation of dried 60g leaves with distilled water, using the Clevenger type apparatus for a period of four hours for each plant (PEREIRA *et al.*, 2011). Then dried over anhydrous sodium sulfate and kept in the refrigerator (-5°C) in an amber glass bottle until analysis.

The yield of essential oils was determined as the quotient of the collected oil weight and dry weight of the extracted plant material (SANTOS *et al.*, 2014).

2.3. Analysis of the chemical composition of oil

The chemical identification of compounds was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS).

In a spectrometer Shimadzu GC FID 2010 model Plus, working with ionization energy of 70 eV. The mass range was 30-500 Da and the ion source temperature was 200 °C. It was used fused silica capillary column ZB 5-HT (32 mm × 30 m × 1.0µm) and helium carrier gas with a flow of 2.35 ml / min with split 1:39. The schedule used was initially 50 °C for 3 minutes and then increase 3 °C / minute up to 280 °C, ending at this temperature for 5 minutes. The injector and detector temperatures were programmed to 250 °C and 300 °C, respectively. One microliter sample of the essential oil dissolved in hexane (1: 100 v / v) was injected (LIN *et al.*, 2012.).

The compounds were identified by comparison of their mass spectra with the spectra in NIST 98 database (NIST Mass Spectral Library, 1998) and reported in the literature (ADAMS, 2007) and by comparison of their retention indices obtained from Kovats the modified algorithm, using as standard a homologous series of linear hydrocarbon C₈H₂₀ (octane) to C₂₆H₅₄ (hexacosane) with retention rates reported in the literature (ADAMS, 2007).

2.4. Total Phenolic Content (TPC)

The Folin–Ciocalteu reagent was used to determine the total phenolic content according to the method of Kähkönen *et al.* (1999). 7 mg of sample oil essential was mixed with 1 mL of Folin–Ciocalteu reagent and 0.8 mL of 7.5% (w/v) sodium carbonate was added. After incubation for 120 minutes at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 734 nm. The phenolic contents were expressed as gram of gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of dry weight (DW).

2.5. Evaluation of Antioxidant Activity

Antioxidant activity of essential oils were evaluated by the ability of the monitoring method to stabilize the free radical DPPH, which was adapted according to the methods described by AZEVEDO *et al.* (2013) and SIMIONATTO *et al.* (2007). Twelve hundred microliters (1200µL) in five different dilutions of ethanol with essential oils (100, 75, 50, 25 and 10 mg / ml) were mixed with 4.8 ml of DPPH solution (100µM) in ethanolic solution. After 30 minutes under light and under room temperature, absorbance was read with a spectrophotometer at 515 nm. Analyses were performed in triplicate. Ethanol was used to calibrate the spectrophotometer. It was calculated the concentration of DPPH after 30 minutes of reaction through the equation of the line obtained from the calibration curve of DPPH where $Abs_{515nm} = a [DPPH] + b$. As y absorbance of samples after 30 minutes of reaction at 515 nm.

Then the calculation of the % reduced DPPH was obtained using the formula $\% DPPH_{red} = 100 \times (1 - [DPPH]_{30} / [DPPH]_0)$ where $[DPPH]_0$ and $[DPPH]_{30}$ are the DPPH concentration in the control sample ($t = 0$) and the test mixture after 30 minutes, respectively.

The antioxidant activity with DPPH was expressed as EC50 (the concentration of oil required to reduce 50% of DPPH in mg/ml) in which was prepared a straight line equation using linear regression ($Abs_{DPPH0/2} = ax + b$) where the abscissa represents the essential oil concentration tested and the ordinate the average percentage of antioxidant activity from the different oil concentrations (AZEVEDO *et al.*, 2013).

2.6. Evaluation of Antimicrobial Activity

2.6.1. Microorganisms

Were used in tests for antimicrobial activity, eight species of gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella*

Enteridis and three gram-positive species: *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The bacteria were obtained from the Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPE).

2.6.2. Preparation of media

Were used as culture medium for bacteria, Müller Hinton agar solid medium to determine minimum bactericidal concentration (MBC) and the liquid medium Muller Hinton in serial microdilution in a 96 well plate to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

2.6.3. Preparation of solutions

In sterile tube was added 200 μL of EO *C. grewioides*, 0.02 μL Tween 80 and 2 mL of sterile distilled water, and stirred for 5 minutes using Vortex device, yielding a solution with finished concentration of 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the essential oil. From this solution, using the serial dilution procedure, the remaining solutions were obtained at the following concentrations: (ALLEGRIINI *et al*, 1973 with modifications) 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

2.6.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The assessment of the antimicrobial OE's *C. grewioides* was performed in an experimental model of serial microdilution in 96 well plates. To determine the values of MIC were used 96 well microplates. The stock solution of 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ was made serial dilutions of OE (50 to 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and added 100 μL of each dilution to the appropriate medium. Then, plates were inoculated with 10 μL of each microorganism, adjusted to MacFarland scale (107UFC/mL), incubated at 36°C for 24 hours and held reading the microplate. The samples present in each well were applied in Petri dishes with appropriate means and MBC performed to verify bacterial growth in their essential oil applied dosages. The MBC was determined according to the results of the MIC. 5 μL aliquots of each dilution that inhibit bacterial growth were plated in appropriate medium and incubated at 36°C for 24 hours. The MBC was determined as the lowest concentration which showed no bacterial growth in culture medium after the incubation period.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The yield of the crude essential oil was 3%. The major compounds in oil *C. grewioides* sheets are shown in Table 1.

The result for antimicrobial activity of essential oil of *C. grewioides* is present in Table 1.

Table 1: Main compounds of leaf essential oil from *Croton grewioides*.

Peak	Compound	Retention time (min)	RI ^a	Relative area (%)
1	Linalool	21.358	1099	0.79
2	β -caryophyllene	22.308	1419	3.19
3	γ -elemene	22.733	1436	1.77
4	NI	23.417		0.27
5	Germacrene D	24.325	1480	2.15
6	(+)-sativene	24.467	-	5.62
7	NI	24.642		0.14
8	NI	24.792		0.93
9	γ -cadinene	25.583	1513	1.20
10	NI	25.725		0.37
11	γ -selinene	26.092	-	0.64
12	Elemol	26.425	1548	0.71
13	Germacrene B	26.733	1550	2.93
14	γ -eudesmol	26.850	1631	2.18
15	NI	29.625		2.27
16	NI	30.535		7.66
17	2,3-dimethyl-1,3-heptadiene	32.422	-	67.18
	Total identified			88.36
	Monoterpene hydrocarbons			0.79
	Oxygenated monoterpenes			0.00
	Sesquiterpene hydrocarbons			17.50
	Oxygenated sesquiterpenes			2.89
	Others			67.18

^a Kovats retention index according to n-alkanes (C8–C26)

This 4 major compounds were identified in the crude oil of *C. grewioides*, including sesquiterpene hydrocarbons represented 17,5% of the total sample, and identified the presence of 11 compounds.

Oil *C. rhamnifolioides* was characterized by Costa *et al.* (2013), who identified eight substances equivalent to 100% of the total oil content; of which 65.20% was 34.80% monoterpenes and sesquiterpenes, and 1.8-cineol (46.32%) was the major compound, followed by 1-phellandrene (16.70%), p-cymene (10.21%), sabinene (14.8%) and trans caryophylleno (4.81%) as significant components concentrations.

The essential oil from the leaves of *Croton zehntneri* consists mainly of monoterpenoid and sesquiterpenoids among their constituents, it proved to be the majority presence of estragole (76.8%) (COSTA *et al.*, 2008).

The antimicrobial activity of essential oils was tested by the method of serial microdilution against eight bacteria, five of gram-negative bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Enteridis* and three gram-positive species *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

According Sartorato *et al.* (2004) is considered as high activity MIC values between 0.05 - 0.50 mg/ml, moderate activity values between 0.6 – 1.50 mg/ml to values below 1.50 mg/ml as weak activity.

Thus, the present results in Table 2 reveals that the raw leaf essential oil of *C. grewioides* was able to inhibit, with high antimicrobial activity. The crude essential oil of *C. grewioides* was more effective on gram-positive bacteria, being capable of inhibiting three of the eight bacteria, *Bacillus subtilis* (2.34 μ L/mL) *Staphylococcus aureus* (18.75 μ L/mL) and *S. saprophyticus* (12.5 μ L/mL), while having bactericidal only against *S. sapophytica* and *Bacillus subtilis*, with MIC = 50 μ L/ml and 31.25 μ L/mL, respectively.

What corroborates or analyzed by Lin *et al.* (2012) with essential oil of aerial parts and roots of *Euphorbia macrorrhiza*, who also had an inhibitory effect on one species of *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*), with MIC = 2.8 mg / mL, while not it had no effect on *E. coli*. And with tested by Azevedo *et al.* (2013) in red sacaca accesses (*Croton cajucara*) rich 7-hydroxy-calameneno as their viability in antimicrobial activity, were effective against *Mycobacterium smegmatis* (MIC = 39.06 mg / ml), *M. tuberculosis* (MIC = 4.88 μ g / ml) and *Staphylococcus aureus* (MRSA MIC = 19,07ng / ml). But the essential oil of *C. rhamnifolioides* presented antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* with minimum inhibitory concentration values (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) between 2.5 to 20 μ L / ml and 5 - 40 μ L / mL, respectively (COSTA *et al.*, 2013.), showing sensitivity of *Staphylococcus spp.* essential oils *Croton spp.* The essential oil of *C. zehntneri* showed significant activity only against *Shigella flexneri* strain showing sensitivity at concentrations of 1000, 500, 100 and 50 mg / mL, with MIC 50 mg / mL (COSTA *et al.*, 2008).

Table 2: Antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewioides* sheet (Minimum Inhibitory Concentration - MIC; Minimum Bactericidal Concentration - CMB on μ L / mL).

Microrganismos	Croton grewioides	
	MIC	CMB

<i>Escherichia coli</i>	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i>	2.34	31.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i>	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>100
<i>Salmonella Enteritidis</i>	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.75	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12.5	50

The total phenolic content present in the leaf essential oil sample *C. grewioides* proved to be very significant in equivalent Gallic Acid, with a total amount of 269.86 ± 0.923 , represented in table 3.

There are few studies that show the dosage of phenolic compounds in essential oil, mostly, performed on extracts. Marino et al. (2008) analyzed the total phenolic content in *Croton lechleri* latex extracts and fractions obtained the highest concentration of phenols (306 mg / g) in n-BuOH fraction and the lower fraction in n-hexane (4.84 mg/g). However, it found no work in the literature that reports the dosage of phenolic compounds for essential oil of any kind of *Croton* L., which characterizes a given unheard of this research.

In the quantitative analysis of DPPH, antioxidants are typically characterized by their value of EC50. *C. grewioides* presented EC50 = 3.09 mg / ml, which corroborates those found in other species of *Croton* L. in the literature, indicating have a good antioxidant activity (Fig. 2), as seen by Simionatto et al. (2007) showed that *C. urucurana* EC50 3,21mg / ml. While Azevedo et al. (2013) tested the antioxidant activity of *C. cajucara* their promising activity and assigned to the compounds hydroxycalamenene-7 and β -caryophyllene, since the samples of individuals red sacaca showed EC50 SV001-45.23 / mL, SV003-63.59 ug / mL SV004-54.06 / mL, SV005-44.4 / mL.

Already Moraes et al. (2006) analyzed the antioxidant activity by TBARS of three species of *Croton* L. northeastern Brazil, found that essential oils of *C. zenhtneri* and *C. argyrophyloides* showed higher antioxidant activity than *C. nepetaefolius*.

4. CONCLUSIONS

- ❖ One can see the excellent yield (3%) of crude essential oil obtained from the leaves of *Croton grewioides* compared the species already reported in the literature for this genre.
- ❖ It was concluded that the essential oils *Croton grewioides* have a high chemical diversity of compounds that basically belongs to the class of sesquiterpenes hydrocarbons.
- ❖ The crude essential oil of *C. grewioides* was able to inhibit, with high antimicrobial activity, two of the four bacteria, *S. sapophytica* (MIC = 12.5 μ l / ml) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC =

0.78 μl / ml), while having bactericidal action thereon with CMB = 50 μl / mL and 12.5 μl / mL, respectively.

- ❖ Based on the results presented in this paper and in the literature, we conclude that species of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* are sensitive to essential oils from *Croton spp.*
- ❖ *Croton grewoides* showed good antioxidant activity compared already described in the literature with other *Croton* L. species, EC50 = 3.09 mg / ml. Although medicinal plants have rarely been used as antioxidants in traditional medicine, this species has proven to be very promising, since their therapeutic characteristics could be applied to diseases that have been related to oxidative stress such as cancer, emphysema, cirrhosis, atherosclerosis and arthritis, since it has sweeping capacity of free radicals.
- ❖ The leaf essential oils of the species under study presents good amount of total phenolic content equivalent Gallic Acid, which reports its importance as an antioxidant.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) for the financial aid granted during the period of development of this work.

REFERENCES

- ALLEGRI, J.; BOUCHBERG, M.S.; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles fabrication et applications em microbiologie. **Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, n. 1, p.73-86, 1973.
- AZEVEDO, MARIANA M. B.; CHAVES, FRANCISCO C. M.; ALMEIDA, CATIA; BIZZO, HUMBERTO; DUARTE, RAFAEL S.; CAMPOS-TAKAKI, GALBA; ALVIANO, CELUTA S.; ALVIANO, DANIELA S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxycalamenene-Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. **Molecules** 2013, 18, 1128-1137; doi:10.3390/molecules18011128.
- COSTA, A. C. V.; MELO, G. F. DO A.; MADRUGA, M. S.; COSTA, J. G. M.; GARINO JUNIOR, F.; QUEIROGA NETO, V. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2853-2864, nov./dez. 2013.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; DE SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; DOS SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de

- Croton zehntneri* (variedade Estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(4): 583-586, Out./Dez. 2008
- KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., HEINONEN, M., 1999. Antioxidant Activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.
- LIN, J.; DOU, J.; XU, J.; AISA, H. A. Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules** 2012, 17, 5030-5039; doi:10.3390/molecules17055030
- MARINO, S.; GALA, F.; ZOLLO, F.; VITALINI, S.; FICO, G.; VISIOLI, F.; IORIZZI, M. Identification of Minor Secondary Metabolites from the Latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and Evaluation of Their Antioxidant Activity. **Molecules** 2008, 13, 1219-1229; DOI: 10.3390/molecules13061219
- MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 5, 907-910, 2006
- PEREIRA, A.Q.; CHAVES, F.C.M.; PINTO, S.C.; LEITÃO, S.G.; BIZZO, H.R. Isolation and Identification of cis-7-Hydroxycalamenene from the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. *J. Essent. Oil Res.* **2011**, 23, 20–23.
- SANTOS, F. A. Atividade antibacteriana, antinoceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais *Psidium guyanenses* PERS. e *Psidium pohlium* BERG. Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, 1997.
- SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Molecules**. 2014, 19, 16573-16587; doi:10.3390/molecules191016573
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, C. T.; REHDER, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SILVA *et al.*: Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** 24(2): 441-453. 2010.
- SIMIONATTO *ET AL.* Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Cróton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **J. Braz. Chem. Soc.** Vol.18, N. 5, 879-885, 2007.