

ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE

Maíra Honorato de Moura Silva¹; Nathália Bandeira Carvalho dos Santos²; Rayza Helen Graciano dos Santos³; Antônio Fernando Morais Oliveira⁴.

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica. (mairamhms@hotmail.com); ²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica. (nathaliabandeiraa@gmail.com); ³Graduanda em Ciências Biológicas/Bacharelado, Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (rayzahelen@hotmail.com); ⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica. (afmoliveira@gmail.com).

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. 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.

As atividades de bioprospecção na região da Caatinga, também conhecida como Floresta Tropical Sazonal Seca, 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.

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.

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. 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.

As espécies de *Cróton* L., 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).

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.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar a composição química e as atividades antibacterianas e antioxidantes de *Croton adamantinus*.

METODOLOGIA

❖ Coleta e processamento do material vegetal

Folhas de *Croton adamantinus* foram coletadas exclusivamente no perímetro da Caatinga (Vale do Catimbau, Buíque, PE) em novembro de 2015.

❖ Extração dos óleos essenciais

O óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* foi obtido por hidrodestilação com água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de quatro horas (PEREIRA *et al.*, 2011). Em seguida, o óleo foi coletado e seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e mantido em refrigerador (-5 °C) num frasco de vidro âmbar até as análises químicas e ensaios biológicos.

O rendimento dos óleos essenciais foram definido como o quociente do peso do óleo recolhido e o peso seco do material vegetal extraído (SANTOS *et al.*, 2014) e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com teste de média (Teste de Tukey 5%).

❖ Caracterização química

A identificação química dos compostos foram realizada por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), em um espectrômetro Shimadzu, operando com energia de ionização de 70 eV. O intervalo de massa será 30-500 Da e a temperatura da fonte iônica foi de 200°C. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-5 (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 40°C por 5 minutos e depois aumentando 5°C/min até atingir 250°C, finalizando com esta temperatura por 5 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram programadas de 250 °C e 200 °C, respectivamente. Um microlitro da amostra do óleo essencial, dissolvido em hexano (1:100, v/v), foi injetado (LIN *et al.*, 2012).

❖ Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A concentração inibitória mínima das diferentes concentrações do óleo essencial diluídos em Tween 80 à 2% foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (NCCLS, 1997; 2000). Os inóculos foram preparados nos mesmos meios, a densidade ajustada para o tubo 0,5 da escala McFarland (10⁸ para bactérias) e diluídas 1:10 para o procedimento de microdiluição. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O CIM foi realizado em duplicata e definido como a menor concentração do óleo essencial que não demonstra crescimento bacteriano visível.

❖ Avaliação da atividade antioxidante

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

Mil e duzentos microlitros (1200 µL) de cinco diferentes diluições de etanol com os óleos essenciais (100, 75, 50, 25 e 10 mg/ml) foram misturados com 4,8 ml de solução DPPH (100 µM) em solução etanólica. Após 30 minutos, sob abrigo de luz e a temperatura ambiente, foram

realizadas leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 515 nm. As análises serão realizadas em triplicata.

A atividade antioxidante com DPPH foi expressa 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, 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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

* Rendimento do óleo

O óleo essencial de *Croton adamantinus* foi extraído de folhas secas por hidrodestilação e apresentaram rendimento médio com teor de 0,55%. Valor este que é comparável com os já reportados previamente para outras espécies de *Croton* L. encontrados no Brasil com o mesmo método de extração (Tabela 1).

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. pulegioides</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

* Perfil químico – Caracterização dos óleos

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

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	Gemacrene D	24.367	1480	27.88
9	Gemacrene 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)

* Atividade antioxidante

Na análise quantitativa de DPPH, antioxidantes são tipicamente caracterizados pelo seu valor do EC₅₀. *C. adamantinus* apresentou EC₅₀= 130,76 mg/ml.

Apesar do óleo essencial bruto do *C. adamantinus* demonstrar atividade antioxidante positiva, seu EC₅₀ revelou uma baixa atividade em comparação aos valores descritos para o gênero em estudo, uma vez que segundo Simionatto *et al.* (2007), o óleo essencial bruto obtido a partir das cascas do caule de *C. urucurana* apresentou EC₅₀ de 3,21mg/ml, já a fração obtida com atividade antioxidante do óleo essencial, apresentou EC₅₀ de 1,05mg/ml. O que foi considerado como uma boa atividade antioxidante comparada ao BHT, que apresenta EC₅₀ 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 EC50 inferior a 63,59 µg/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 µg/mL, SV003—63.59 µg/mL, SV004—54.06 µg/mL, SV005—44.4 µg/mL.

* Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi testada pelo método de microdiluição seriada contra oito bactérias, sendo cinco 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*.

O resultado presente na tabela 3 revela que o óleo essencial bruto de *C. adamantinus* foi capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* (0.78 µl/mL), *Staphylococcus aureus* (1,56

$\mu\text{l/mL}$), e *Salmonella Enteritidis* (75 $\mu\text{l/mL}$), enquanto apresentou atividade bactericida para *Staphylococcus aureus* (CMB= 31,25 $\mu\text{l/mL}$) e para *Bacillus subtilis* (CMB= 3.12).

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de folha de *Croton adamantinus* (Concentração Inibitória Mínima - MIC; Concentração Bactericida Mínima - CMB em $\mu\text{l/mL}$).

Microrganismos	<i>Croton adamantinus</i>	
	MIC	CMB
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i>	0.78	3.12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i>	100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	>100
<i>Salmonella Enteritidis</i>	75	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.56	31.25
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	>100

O óleo essencial de *Cróton adamantinus* testado foi eficiente 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 ao óleo essencial 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 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{L/mL}$ e 5 - 40 $\mu\text{L/mL}$, 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 do óleo essencial de *Croton adamantinus*, 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).

CONCLUSÕES

O rendimento obtido em *C. adamantinus* mostrou-se semelhante aos de outras espécies de *Croton L.* já reportados na literatura.

O óleo essencial bruto de *Croton adamantinus* apresentou uma alta diversidade química de compostos que pertence basicamente a classe dos sesquiterpenos hidrocarbonetos.

Esta espécie apresenta atividade antioxidante, embora não tenha demonstrado um bom valor de EC_{50} .

Foi possível identificar que *Bacillus subtilis* foi a bactéria mais sensível ao óleo essencial de *Croton adamantinus*. Demonstrando-se importante também quanto à inibição e a atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, 18, 1128-1137; doi:10.3390/molecules18011128, 2013.
- 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.D.A., 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
- 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**, 17, 5030-5039; doi:10.3390/molecules17055030, 2012.
- 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**, 23, 20–23, 2011.
- 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**, 19, 16573-16587; doi:10.3390/molecules191016573, 2014.
- SIMIONATTO ET AL. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **J. Braz. Chem. Soc.** Vol.18, N. 5, 879-885, 2007.

