

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SARAH ROMINI DE LIMA BASTO

***Croton nummularius* Baill. (EUPHORBIACEAE):
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA,
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE PRELIMINAR DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS.**

RECIFE, 2014

SARAH ROMINI DE LIMA BASTO

***Croton nummularius* Baill. (EUPHORBIACEAE):
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA,
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE PRELIMINAR DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada
para o cumprimento
parcial das exigências
para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e
Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

RECIFE, 2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Basto, Sarah Romini de Lima

Croton nummularis Baill. (Euphorbiaceae): composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais/ Sarah Romini de Lima Basto. – Recife: O Autor, 2013.

46 folhas

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Química vegetal 2. Euphorbiaceae 3. Óleos vegetais I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorientadora) III. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-264

SARAH ROMINI DE LIMA BASTO

***Croton nummularius* Baill. (EUPHORBIACEAE):
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA,
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE PRELIMINAR DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada
para o cumprimento
parcial das exigências
para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e
Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por:

Prof^ª Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia (Presidente)

Prof^ª Dr^ª. Elineide Barbosa de Souza

Prof. Dr. Thiago Napoleão Henrique

Prof^ª. Dr^ª. Giovanna Machado

Data:07/08/2013

Dedicatória

À Deus, minha mãe ao meu pai e familiares, ao meu marido José Carlos, e aos meus filhos Carlinhos e Sarinha, amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que é a minha fortaleza.

Desejo dedicar meus sinceros agradecimentos àqueles que, de alguma forma, participaram e colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais José Maria e Jacilene, pelo “porto seguro” que sempre representaram na minha vida, por todo o apoio, força, amor e confiança que sempre me dedicaram e que jamais conseguirei retribuir por me ensinarem a amar os estudos e por me proporcionarem, com muita luta e esforço, todo o alicerce para que a conquista deste sonho fosse possível;

Aos meus familiares por estarem sempre ao meu lado, compartilhando cada momento, me apoiado, confiado e acreditado no meu sucesso mais do que eu mesma;

Ao meu grande companheiro, José Carlos, há quem muito devo, que mais do que ter me apoiado, esteve comigo durante todas as etapas do trabalho, e pela compreensão incondicional nos momentos mais difíceis e decisivos da minha vida, sempre me ouvindo e ajudando, com muita paciência e amor, proporcionando momentos que me trouxeram muitas alegrias;

A Alexandre Gomes, por sua co-orientação fundamental, pelo apoio, incentivo, amizade e confiança que sempre demonstrou em mim. Por escolher, em todos os momentos, o melhor para meu aprendizado e para minha formação. Apesar do pouso tempo parceria que deu certo desde o início e que continuará com nossa amizade;

À Profa. Márcia Vanusa e a Profa Maria Tereza, pelos exemplos de amor ao que faz, um sentimento que nos contagia, pelo carinho, incentivo e dedicação sempre demonstrado;

Ao apoio financeiro e NANOBIOTEC-Brasil da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e Chico Mendes de Instituto Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para autorizar coleções no Parque Nacional do Catimbau em Buíque-PE.

“Se não houver frutos, valeu a
beleza das flores; se não houver
flores, valeu a sombra das
folhas; se não houver folhas,
valeu a intenção da semente.”

Henfil

RESUMO

O gênero *Croton* L. pertence à família Euphorbiaceae. O Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero. Este gênero é muitas vezes usado na medicina popular para aliviar a dor, para tratamento de câncer, diabetes, inflamação e outros. Dado o potencial botânico da Caatinga e a necessidade de encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de microorganismos, procurou-se realizar um trabalho que permita um maior conhecimento das espécies na região, em especial a espécie de *Croton nummularius* Baill. As folhas e ramos de *C. nummularius* forneceram um rendimento de óleo de 0,72% e 0,36%, respectivamente. Os principais compostos encontrados no óleo de folhas foram espatulenol (27,73%) e beta-cariofileno (14,37%). O óleo do ramo foi dominado por isolongifolene (35,60%), nerolidol (12,13%) e beta-cariofileno (11,76%). O óleo essencial de folhas de *C. nummularius* mostrou uma elevada atividade larvívica (CL₅₀, $2,34 \pm 0,01$ µg.mL⁻¹). Os resultados demonstraram que o óleo essencial das folhas inibiram o crescimento de todas as bactérias gram-positivas e gram-negativas (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*), e somente não apresentou ação bactericida contra *Streptococcus pyogenes*. Na atividade antioxidante o óleo essencial das folhas de *C. nummularius*, reduziu aproximadamente 76,16% a 5 mg / ml dos radicais livres DPPH.

Palavras-chave: Caatinga, *Croton nummularius*, perfil fitoquímico, atividade antimicrobiana, DPPH.

ABSTRACT

The genus *Croton* L. belongs family Euphorbiaceae. Brazil is one of the main centers of diversity of the genus. This genus is often used in folk medicine to relieve pain, for cancer treatment, diabetes, inflammation and others. Given the potential botanical Caatinga and the need to find new compounds capable of controlling the action of microorganisms, we sought to perform a job that allows for a greater understanding of the species in the region, specifically the kind of *Croton nummularius*. The leaves and branches of *C. nummularius* provided oil yields of 0,72% and 0,36% respectively. The main compounds found in the oil of leaves were spathulenol (27.73%) and beta-caryophyllene (14.37%). The oil of branches was dominated by isolongifolene (35.60%), nerolidol (12.13%) and beta-caryophyllene (11.76%). The oil essential of leaves of *C. nummularius* showed a high brine shrimp larvicidal activity (LC50, 2.34 ± 0.01 mg.mL⁻¹). The results demonstrated that the MIC of the essential oil of *Croton nummularius* inhibited the growth of all gram-positive and gram-negative bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*), bactericidal concentration to MIC of essential oil had only to *Streptococcus pyogenes*, all others were growth inhibited.

Keyword: Caatinga, *Croton nummularius*, Phytochemical Profile, Antimicrobial activity, DPPH.

SUMÁRIO

1.Introdução	11
2.Fundamentação Teórica	12
2.1 Informações Teóricas	12
2.1.1 A Caatinga	12
2.1.2 A Caracterização	13
2.1.3 Considerações gerais sobre a família Euphorbiaceae	14
2.2 Informações Botânicas	15
2.2.1 Gênero <i>Croton</i>	15
2.2.2 <i>Croton nummularius</i> Baill.	15
2.2.3 Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial de espécies de <i>Croton</i>	16
2.2.4 Óleo essencial	18
2.2.5 Atividade Antibacteriana	19
2.2.6 Atividade Antioxidante	20
3.Objetivos	22
3.1 Objetivos Gerais	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4.Referências	23
5. Artigo	27
6.Considerações Finais	40
7. Anexos	41
Anexo 1: Carta de apresentação	41
Anexo 2: Autorização de coleta	42
Anexo 3: Ficha de identificação botânica	44
Anexo 4: Produção científica	45
Anexo 5: Artigos em andamento	46

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais alcançado por meio da medicina popular vem se acumulando durante séculos e esse conhecimento empírico representa muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. O uso e a eficácia de plantas medicinais são atribuídas às observações populares que somam de forma relevante para a propagação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência devido aos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitas vezes não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL, 2002).

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). Isso se dá devido ao baixo custo e à acessibilidade das plantas com propriedades medicinais, aumentando a procura e o interesse nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento. Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a produção de inúmeros fármacos (WALL & WANI, 1996). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 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 é ainda 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.

Nas últimas 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). Nos últimos anos, muitas plantas têm sido avaliadas não somente pela atividade antibacteriana, mas também como agente modificador de resistência antibiótica (GIBBONS, 2004).

A região Nordeste do Brasil abriga em 80% de sua área uma região semi-árida e uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas que não são encontradas em outras regiões do globo (MAIA, 2004). Diante do potencial botânico da Caatinga, da falta de preservação deste tipo vegetacional, e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de microorganismos, assim como com ação antioxidante, buscou-se realizar um trabalho que viabilizasse um maior conhecimento da espécie *Croton nummularius* Baill., com isto, contribuindo para identificação de novas substâncias com atividades biológicas definidas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivos analisar a composição química, atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais das folhas e ramos de *C. nummularius*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Informações Teóricas

2.1.1 A Caatinga

O interesse científico por regiões do Brasil pouco conhecidas, como a Caatinga, o Cerrado e até mesmo a Floresta Amazônica, aumentou consideravelmente desde o século XIX. Esperava-se encontrar, do ponto de vista teórico, uma grande diversidade de plantas. Sabia-se também da imensa adaptabilidade dos vegetais as mais extremas situações' (CARRARA, 1996). Quando, porém, efetivamente os exploradores se depararam com a vegetação do semiárido brasileiro e com as longas secas, foi preciso algum tempo para se entender a beleza subjacente a esse tipo de adaptação. Foi quando a Caatinga recebeu importantes botânicos, como Martius, Gardner e Saint-Hilare. Dos nascidos no Brasil, exploraram os sertões do Nordeste homens de ciência como o ilustre Manuel Arruda da Câmara, Francisco Freire Allemão, possivelmente o maior botânico do século XIX, e Theodoro Sampaio, homem de múltiplos e reconhecidos talentos (FREIRE, 1998).

Na *Flora Brasilienses*, Martius dedicou algumas densas páginas de fisionomias das paisagens da Caatinga. Ele observou a rapidez da transformação das plantas, após seu contato com a umidade:

“Eu vi as catingas perto da margem do Rio Verde e de outros rios que se espalham pelo verde do Rio São Francisco, na província de Minas Gerais, onde sempre produzem folhagens. Quando, na verdade, se apoiam num solo árido, o que já foi lembrado, podem atrasar o desenvolvimento do ornamento durante um ou mais anos.

Na verdade, é sempre muito semelhante, a chuva cai ou o orvalho é frequente, e folhas maravilhosas brotam rapidamente. Daí facilmente pode acontecer que numa tarde quente tu te depares com uma árvore sem folhas e, se tiver chovido durante a noite, no dia seguinte encontres a árvore mudada” (MARTIUS, 1996, p.51).

O Brasil nos limites de seu vasto território abriga uma admirável diversidade florística e faunística, que em muito se deve a sua igualmente admirável variedade geomorfológica. Na interação desses fatores, encontramos paisagens e processos ecológicos que se desenvolvem ao longo de alguns milhões de anos e que constituíram as feições naturais do nosso país (SIQUEIRA FILHO, 2012). Além disso, abriga a flora mais mega 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).

2.1.2 Caracterização da Caatinga

A Caatinga estende-se de 2° 45' a 17° 21' S, é 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 constitui o chamado Polígono das Secas, incluindo os estados que abrangem o Rio São Francisco. 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 à Caatinga o destaque que merece. Ao contrário, 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).

A variação da estrutura da vegetação é condicionada pela topografia, perturbação humana e, sobretudo, por uma combinação da precipitação média anual e atributos do solo (PRADO, 2003). São descritos 12 diferentes tipos vegetacionais (ANDRADE-LIMA, 1981), envolvendo oito ecorregiões (VELOSO, 2002) constituídas por manchas de floresta sazonalmente seca e vegetação esclerófila (*apud* MOONEY, 1995), predominantemente

formadas por espécies lenhosas de pequeno porte, herbáceas decíduas, plantas caducifólias e espécies espinhosas, como ao representantes da família Cactaceae (TAYLOR, 2004).

Nas classificações, tem sido descrita como uma vegetação aberta, formando parques e facultando o trânsito por toda a parte, com o solo coberto de relva áspera (LUETZELBURG 1922) e com plantas arbustivas e arbóreas atrofiadas e esparsas (ANDRADE- LIMA 1981). O porte reduzido e a fisionomia aberta da vegetação tem sido um dos critérios para classificar a região como um dos núcleos de desertificação, (SAMPAIO, 2003).

Além disso, apresenta taxas elevadas de diversidade taxonômica e de endemismo, fazendo-se necessário um melhor conhecimento de sua flora para possíveis medidas de conservação de suas áreas (PRADO, 2003). De acordo com Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2003), a Caatinga apresenta elevada heterogeneidade vegetacional caracterizada por distintas fisionomias e elevado endemismo, fazendo deste um ambiente de extrema importância biológica.

2.1.3 Considerações gerais sobre a família Euphorbiaceae

No Brasil, estima-se a ocorrência de 1.100 espécies de plantas e 72 gêneros, habitando os mais diferentes tipos vegetacionais (BARROSO, 1991; SOUZA & LORENZI, 2006). Trabalho desenvolvido por Cordeiro & Carneiro- Torres (2006) indica a ocorrência de 211 espécies vegetais e 45 gêneros para a região Nordeste do Brasil.

Euphorbiaceae tem se destacado como uma família de importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular. Algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, principalmente na região Nordeste do Brasil, como *Manihot esculenta* Crantz, da qual extrai-se a farinha de mandioca (BRAGA, 1979).

Alguns representantes da família já movimentaram grandes riquezas no Brasil, especialmente pela extração de látex para a produção de borracha natural, como as espécies dos gêneros *Hevea Aublet* (seringueira), que fortaleceram economicamente a região amazônica ou espécies de *Manihot Miller*, que foram responsáveis por manter, durante algum tempo, a economia da região da Caatinga nordestina (ALLEM & IRGANG, 1975).

Além do uso industrial das borrachas naturais, as Euphorbiaceae destacam-se economicamente pela produção de óleos que apresentam diversos usos na indústria de tintas, plásticos, plastificantes, sabões duros, sabões têxteis, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons, cosméticos, dentifrícios, papel, fertilizantes ou como lubrificante de

motores de alta rotação e turbinas de aviões à jato, especialmente os extraídos de espécies do gênero *Ricinus* L. (BRAGA, 1979). Os óleos extraídos de espécies de *Croton* L. e *Jatropha* L., são usados em mistura de combustíveis (MORAES, 1981). Craveiro *et al.* (1981) publicaram extenso estudo sobre óleos essenciais de espécies de várias famílias, inclusive 23 espécies de *Croton* L., destacando *C. eleuteria* Bennet. que fornece óleo essencial em escala comercial para o preparo de substâncias aromáticas e bebidas amargas, porém diante da grande diversidade a família Euphorbiaceae ainda é pouco estudada.

2.2 Informações Botânicas

2.2.1 Gênero *Croton* L.

Croton foi proposto por Linnaeus em 1753 ao descrever 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Depois dessa proposta, o gênero já recebeu atenção de diversos estudiosos (e.g., BAILLON 1858; MUELLER 1865, 1866, 1873; BENTHAM 1880), destacando-se WEBSTER (1992, 1993, 1994, 2001), que propôs a classificação infragenérica mais recente para o gênero (SILVA; SALES & CARNEIRO-TORRES, 2009).

É um grupo funcionalmente importante dentro do ecossistema terrestre. Várias de suas espécies são pioneiras, colonizando locais perturbados, tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. Essa característica se deve principalmente a produção massiva de flores e frutos durante a maior parte do ano, o que torna suas espécies candidatas para a restauração de áreas degradadas (LIMA & PIRANI, 2008). Além disso, *Croton* possui forte potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido aos diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides (RIZSCK 1987; PAYO *et al.* 2001), que conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies.

2.2.2 *Croton nummularius* Baill.

Croton nummularius é uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como “alecrim-branco” e apresenta-se como subarbustos, sendo um táxon bem delimitado. Distingue-se das demais espécies por apresentar folhas orbiculares, de margem denteado-glandular, além de pecíolo curto (1,4–4 mm compr.) e sépalas das flores pistiladas glandulares. Em campo, pode ser reconhecida pelo caule bem ramificado, prostrado ou

decumbente, e folhas pequenas ($0,2-1 \times 0,3-1$ cm), geralmente conduplicadas quando secas (SILVA, 2009).

Em Pernambuco, Silva *et al.* (2010) registraram 35 espécies de *Croton*, 12 delas presentes no Parque Nacional do Catimbau. *Croton nummularius*. é uma espécie disjunta entre a Cadeia do Espinhaço (Bahia, Minas Gerais e Pernambuco), crescendo em vegetação de caatinga e cerrado. Em Pernambuco apresenta distribuição restrita ao município de Buíque (PARNA do Catimbau). Tradicionalmente, as folhas, frutos e os ramos são usados no tratamento da diarreia, febre e reumatismo pela população local. Não há registro na literatura envolvendo estudos fitoquímicos com esta espécie, o que torna este trabalho inédito e de grande relevância social, científica e biológica.

2.2.3 Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial de espécies de *Croton*

As espécies de *Croton* têm sido largamente estudadas em relação aos seus constituintes voláteis e não-voláteis. Muitas espécies são produtoras de um grande número de substâncias pertencente às classes dos alcalóides, fenilpropanóides e terpenóides (RANDAU *et al.*, 2004). Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Croton* de ocorrência brasileira têm proporcionado ao isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais tais como diterpenos (35,6%), alcalóides (24,8%) flavonóides (12,8%) e triterpenos (11%) (TORRES, 2008).

Os fenilpropanóides, como anetol e derivados do eugenol, comuns nos óleos de erva-doce, cravo e manjerição, têm sido relatados como os principais componentes dos óleos essenciais de espécies de *Croton* encontradas em diferentes partes do mundo, como por exemplo, *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*. no Brasil (MORAIS, 2006); *C. molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ, 2005); *C. pseudonivenus* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR; MONROY & BUSTAMANTE, 2007).

Estudo realizado com óleo essencial extraído de diferentes partes de *C. blanchetianus* (folhas, flores, raízes e cascas do lenho) coletadas em diferentes regiões do estado do Ceará, em diferentes horas do dia, possibilitou investigar e identificar 32 compostos dentre os quais β -felandreno, nas folhas 20,4%, biciclogermacreno nas flores 29,1% e nas folhas 17,7%, β -elemeno nas flores 17,8% e nas cascas do caule 22,0%, cipereno nas raízes 14,2% e germacreno D nas cascas do caule 12,8% sendo os constituintes majoritários (DOURADO, 2005).

De acordo com Block (2006) o óleo essencial das folhas de *C. zambesicus* possui como constituintes majoritários, os compostos óxidos de cariofileno (19,5%), β -cariofileno (10,8%), α -copaeno (6,3%), linalol (6,1%) e β -pineno (5,2%).

Sylvestre *et al.*, (2006) verificaram que no óleo essencial das folhas de *C. flavens* há 47 compostos, dos quais o viridifloreno (12,2%), a germacrona (5,2%), o (E)- γ -bisaboleno (5,2%) e o β -cariofileno (4,9%) são os compostos principais.

A espécie *C. nepetaefolius*, comumente conhecida como “marmeleiro sabiá”, foi estudada quimicamente e foram identificados como constituintes majoritários o 1,8-cineol (37,5%), o β -cariofileno (23,0%) e o γ -elemeno (12,0%) (CRAVEIRO, 1980). A composição do óleo essencial das cascas de *C. aubrevillei* e folhas de *C. zambesicus* foram estudadas por Menut (1995) constatando-se que ambas as espécies possuem os mesmos constituintes majoritários, porém em proporções diferentes respectivamente: Linalol (34,6% e 9,9%) e β -cariofileno (11,9% e 9,9%).

As atividades biológicas são investigadas utilizando tanto óleo essencial, como extratos ou frações, principalmente as constituídas de alcalóides e compostos fenólicos. O diterpeno clerodano trans-desidrocrotonia (DCTN), isolado de *C. cajucara*, apresentou diversas atividade como hipoglicêmica, hipolipidêmica, antienotóxica, antiulcerogênica, antitumoral, antiinflamatória, antinociceptiva, antiestrogênica e cardiovascular (COSTA, 2007). Ensaios com flavonóides extraído dessa mesma espécie também demonstraram atividade antiinflamatória e antioxidante (NARDI, 2007).

Análises químicas realizada por Fontenell, (2008) mostraram que *C. nepetaefolius* tem metil-eugenol (15,7%) e biciclogermacreno (14,1%) como principais constituintes, enquanto que os principais constituintes do óleo de *C. argyrophyllloides* são espatulenol (20,3%) e biciclogermacreno (11,7%), e os de *C. zehntneri* são estragol (72,9%) e anetol (14,3%). O óleo essencial de *C. zenhteneri* apresenta atividade antifúngica (FONTENELL *et al.*, 2008). Essa atividade pode ser atribuída ao estragol, principal constituinte, e/ou anetol, que já demonstraram propriedades antifúngicas contra *Aspergillus parasiticus* (SINGH *et al.*, 2006).

Os principais constituintes identificados no óleo essencial extraído das folhas de *C. palanostigma* foram linalol (25,4%), (E)-cariofileno (21,0%), metileugenol (17,2%) e β -elemeno (6,0%) o qual foram analisados por CG e CG-EM. Já o óleo da casca do tronco de *C. palanostigma* mostrou atividade larvicida com CL50 de $3,71 \pm 0,01$ mg.mL⁻¹, podendo ser considerado altamente tóxico (BRASIL *et al.*, 2009), pois quanto menor o valor de CL50 maior a atividade biológica.

Um total de 22 compostos foi identificado no óleo essencial de *C. grewioides* perfazendo 98,6 e 99,9 % dos óleos de caule e folha, respectivamente. Desses 22 compostos, somente (E)-anetol, metil-eugenol, (E)-metil-isoeugenol, β -cariofileno, δ -cadineno e óxido de carifileno foram encontrados simultaneamente nos óleos de caule e folhas (SILVA, 2007).

O óleo essencial de *C. grewioides* mostrou atividade inseticida quando avaliada sobre o caruncho do feijão *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) sendo a ação do óleo essencial das folhas 3,4 vezes menor do que a estimada para o óleo essencial do caule (SILVA, 2007).

No levantamento bibliográfico realizado por Torres (2008) quanto à composição química, os diterpenos que compõem a classe dos terpenóides, e os alcalóides foram os compostos encontrados com maior frequência em espécies do gênero *Croton* estudadas no Brasil.

2.2.4 Óleos Essenciais (OE's)

Nos últimos anos, tem se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO & YUNES, 1997). Neste sentido, dentre os agentes terapêuticos provenientes de plantas destacam-se os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis ou óleos etéreos.

Os OE's do ponto de vista químico são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. São 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. Tem como característica principal a volatilidade, que os difere dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas não voláteis obtidas geralmente de sementes (SIMÕES, 2007).

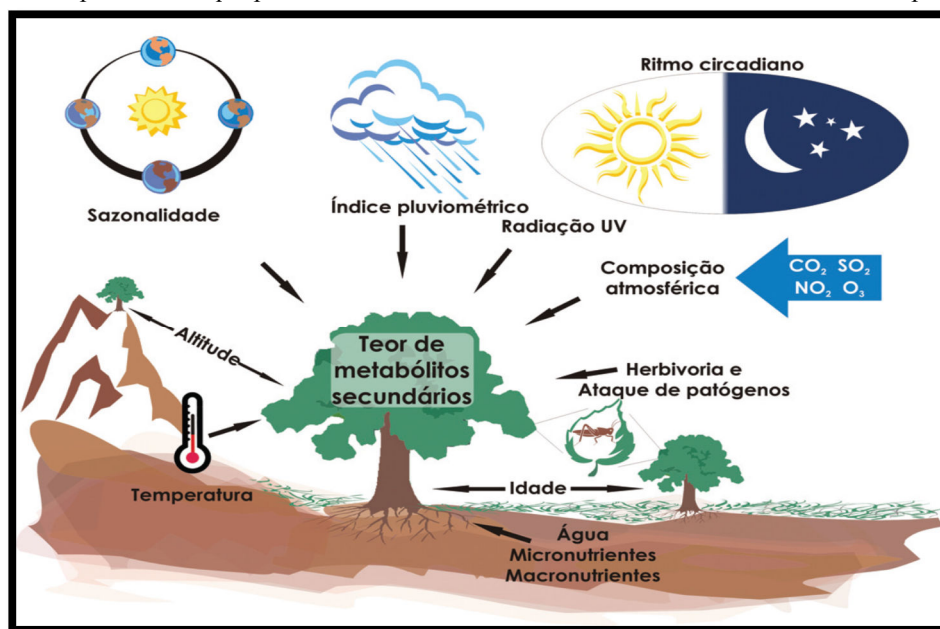
As substâncias químicas encontradas nos óleos essenciais são formadas por ésteres de ácidos graxos, terpenóides, fenilpropanonas, alcoóis, aldeídos e em alguns casos, por hidrocarbonetos alifáticos. No entanto, óleos essenciais são constituídos principalmente de terpenos, sesquiterpenos, ésteres, alcoóis, fenóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos (ROCHA & SANTOS, 2007). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos são os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos, podendo também está presente os diterpenos quando extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES, 2007).

A composição e a concentração das substâncias que constituem os óleos essenciais podem sofrer influência de fatores como a radiação, temperatura, precipitação, ventos fortes,

altitude, solo, época de coleta e outros (GOUINGUENÉ & TURLINGS, 2002) (Figura 1). Os óleos essenciais demonstram uma imensa variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Dentre estas ações estão à antiparasitária, antimicrobiana, analgésica, diurético, antimalárico, antihemorroidário, miorelaxante, antiespasmótico, antiinflamatório, anticonvulsivante e gastroprotetora (OLIVEIRA, 2001; ABDON, 2002).

Diversas funções biológicas da planta são atribuídas aos óleos voláteis, tais como a atração de polinizadores, a defesa contra o ataque de predadores, a proteção contra perda de água e aumento de temperatura e a inibição de germinação. Os óleos essenciais são considerados produtos de desintoxicação, desempenhando a adaptação do organismo ao meio (SIMÕES, 2000).

Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.



Fonte: GOBBO-NETO, L. (2007)

2.2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Ao longo das décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, 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 (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), 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.

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

2.2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O organismo humano produz constantemente radicais livres por meio de suas atividades metabólicas normais que envolvem reações de transferência de elétrons. Os radicais livres são definidos como sendo moléculas ou átomos que possuem elétrons de valência desemparelhados, tornando-os altamente reativos. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidante, conseqüentemente ocorre o estresse oxidativo, originando processos fisiopatológicos como aterosclerose, diabetes, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, como o envelhecimento (SALVADOR & HENRIQUES, 2004). Os principais alvos de ataque dos radicais livres são os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (DNA) (HENRIQUES, 2001) comprometendo desta forma a integridade celular.

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) (SOUSA, 2007), os quais são os responsáveis pela remoção dessas espécies reativas. Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (RAZAVI, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que vários extratos e óleos essenciais de plantas, particularmente os que contêm flavonóides, parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres, e conseqüentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes radicais (NUNES, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Diante do exposto, este trabalho objetiva avaliar a caracterização química, as atividades biológicas antibacteriana e antioxidante, além da toxicidade preliminar dos óleos essenciais extraídos das folhas e ramos de *C. nummularius*.

3.2. Específicos

- ❖ Extrair os Óleos a partir do material botânico coletado, através da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger;
- ❖ Quantificar e identificar os compostos químicos dos óleos, usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS);
- ❖ Avaliar o potencial do óleo essencial em reduzir radicais livres, através do método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);
- ❖ Avaliar a toxicidade preliminar dos óleos essenciais frente ao *Artemia salina* Leach.
- ❖ Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial, através de Concentração Inibitória Mínima (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB);

4. REFERÊNCIAS

- ABDON, A. P. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1215-1219. 2002.
- ALLEM, A. C.; IRGANG, B. E. **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul: Euphorbiaceae**. Boletim do Instituto Central de Biociências, Série Botânica, v. 34, n. 4, p. 1-97. 1975.
- 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 bio-guiado, 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.
- BARROSO, G.M., GUIMARÃES, E.F. & ICHASO, C.L.F. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, São Paulo, Universidade de São Paulo, p.310. 1991.
- BRAGA, R., **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Natal, RN: ESAM, p. 540. 1979.
- BRASIL, D. S. B., MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1188-1192. 2009.
- BLOCK, S.; FLAMINI, G.; BRKIC, D.; MORELLI, I.; QUETIN-LECLERCQ, J. Analysis of the essential oil from leaves of *Croton zambesicus* Muell. Arg. growing in Benin, **Flavor Fragrance Journal**, v. 21, p. 222-224. 2006.
- CARRARA, Â. A. **O “sertão” no espaço econômico da mineração, LPH**. Revista de História da Universidade Federal de Sergipe, n. 6, p. 40-48, 1996.
- 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.
- CORDEIRO, I. & CARNEIRO-TORRES, D.S. In: M.R.V. BARBOSA, C. SOTHERS, S. MAYO, C.F.L. GAMARRA & A.C. MESQUITA. (orgs.). **Checklist das plantas do Nordeste brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, v.1 p.71-74. 2006.

COSTA, M. P.; MAGALHÃES, N. S. S.; GOMES, F. E. S.; MACIEL, M. A. M.; DONNICI, C. L. A review of the biological activities of trans-desidrocrotonina a natural product obtained from de *Croton cajucara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 275-286. 2007.

CRAVEIRO, A. A, ANDRADE, C. H. S., MATOS, F.J. A.; ALENCAR, J. W.; DANTAS, T. N. C. Fixe and volatile constutuints of *Croton aff. nepetifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 756-757. 1980.

CRAVEIRO, A.A., RODRIGUES, AS., ANDRADE, C.H.S., MATOS, F.J.A., ALENCAR, J.W, MACHADO, M.I.L. Volatile constituents of Brazilian euphorbiaceae. Genus Croton. **J Nat Prod**; v.44(5), p.602-608. 1981.

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 etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p.97-103. 2004.

DOURADO, R. C. M., SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation, **Journal of Essential Oil Research**, v. 17. p.36-40. 2005.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7. p.1-16. 2006.

FILHO, V. C., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99. 1998.

FREIRE, F. **História territorial do Brasil**: edição fac-similar. Salvador: Instituto Geográfico e Histórico da Bahia/ Secretaria da Cultura e Turismo, p.9.1998.

FONTENELLE, R. O. S., MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p.1383-1390. 2008.

FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro - A. Jakobsson Estúdio, 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 metabólitos secundários. **Química Nova**, vol. 3, p. 374, 2007.

GOUNGUENÉ, 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.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93. 2006.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L. A., DE BARROS N. M., AZEVEDO J. L. (Eds.), *Biotecnologia na agricultura e na indústria*. Guaíba: **Agropecuária**, v. 1, p. 227-256. 2001.

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.

LIMA, H.R.P. et al. Influência dos fatores abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v.10, n.2, p.71-77. 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

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

MAIA, G.N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. 1a Ed. Leitura & Arte. p 19-31. 2004.

MARTIUS, C.F.P.V. **A viagem Von Martius: flora brasiliensis**. Rio de Janeiro: Index, . v.1, p. 140.1996.

MENUT, C., LAMATY, G., BESSIÈRE, J. M., SEULEIMAN, A. M., FENDERO, P., MAIDOU, E., DÉNAMGANAI, J. Aromatic plants of tropical central África. XXII. Volatile constituents of *Croton aubrevillei* J. Léonard and *C. zambesicus* Muell. Arg. **Journal of Essential Oil Research**. v. 7, p. 419-422. 1995.

NOVAIS, T.S; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.L.P; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p. 05- 08. 2003.

NARDI, G. M.; DALBO, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107. p.73-8. 2006.

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

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

PEREZ-AMADOR M. C., MONROY, M. A. & BUSTAMANTE, G. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C. suberosus* (Euphorbiaceae) species. **Phyton**, v. 53, p.109-112. 2003.

RANDAU, K. P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacoquímico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax e Haffm. (Euphorbiaceae).** 2001. 143p. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife- PE, 2001.

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.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L.; O uso comercial e popular do Eucalipto eucalyptus Globulus Labill- Myrtaceae. **Revista Duque de Caxias**, v. 2. p 23-24. 2007.

SILVA, J. S., SALES, M. F. & CARNEIRO-TORRES, D. S. **O gênero *Croton* (euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil.** Tese (Doutorado em ciências biológicas), 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. Ed. 6a, Porto Alegre, ED. UFRGS, 2007.1102p.

SINGH, G., MAURYA, S., LAMPASONA, M.P. AND CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food control**, v. 17, p.745–752. 2006.

SIQUEIRA FILHO, J.A. A Flora das caatingas do Rio São Francisco: histórias e conservação. Rio de Janeiro: I ed, p.552. 2012.

SYLVESTRE, M., PICHETTE, A., LONGTIN, A., NAGAU, F., LEGAULT. J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103. p 99-102. 2006.

TABARELLI, M. PINTO, L. P., SILVA, J. M. C., HIROTA, M. & BEDÊ, L. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade** 1: 132-138. 2005.

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.

WALL, M. E, WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254. 1996.

5. ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

Journal of Essential Oil Research

Chemical characterization, biological activity, antioxidant and preliminary toxicity of essential oil of *Croton nummularius* Baill. from Pernambuco

Sarah Romini de Lima Basto¹, Alexandre Gomes da Silva², Isabel Renata de Souza Arruda², Cibele Maria Alves da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia³, Márcia Vanusa da Silva³

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, 1235, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil.

E-mail: sarahbasto@hotmail.com

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, 1235, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil.

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, 1235, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil.

ABSTRACT

The genus *Croton* L. belongs family Euphorbiaceae. Brazil is one of the main centers of diversity this genus. The genus often used in folk medicine to relieve pain, for cancer treatment, diabetes, inflammation and others. Given the potential botanical of Caatinga and the need to find new compounds capable of controlling the action of microorganisms, we sought to perform a job that allows for a greater understanding of the species in the region, specifically *Croton nummularius*. *C. nummularius* Baill. is endemic to northeastern Brazil occurring in PARNA (Park National do Vale do Catimbau) is known “Alecrim Branco” the population local often use leaves and branches for treatment of diarrhea, fever and rheumatism, But in the literature there were no records on phytochemical studies of this plant. The leaves and branches of *C. nummularius* provided oil yields of 1% and 0,5% respectively. The main compounds found in the oil of leaves were spathulenol (27.73%) and beta-caryophyllene (14.37%). The oil of branches were dominated by isolongifolene (35.60%), nerolidol (12.13%) and beta-caryophyllene (11.76%). The oil essential of leaves of *C. nummularius* showed a high brine shrimp larvicidal activity (LC50, 2.34 ± 0.01 mg.mL⁻¹), the antioxidant activity of oil essential captured 76,16% of DPPH. The results demonstrated that essential oil of *Croton nummularius* inhibited the growth of all gram-positive and gram-negative bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*), bactericidal concentration of essential oil had only to *Streptococcus pyogenes*, all others were growth inhibited.

Keywords: *Croton nummularius*, essential oil, biological activity, preliminary toxicity, Caatinga.

INTRODUCTION

Croton L. is one of the largest genera of Euphorbiaceae, with about 1,300 species, mostly distributed in the West Indies and South America with some in North America (1), Africa and Madagascar (2). Their species are trees, shrubs, herbs and lianas that occur in the most variable tropical ecosystems (3,4). With 313 species (5) Brazil is one of the main centers of diversity of the genus, which is represented in various environments and vegetation types (6). Species of this genus are often used in folk medicine (in the form of infusions, teas and poultices) to relieve pain (7), for cancer treatment, constipation, diarrhea and other digestive problems, diabetes, wounds, inflammation, fever and hypertension (8). Many studies have reported that the genus *Croton* displayed a variety of biological activities to its chemical composition as several pharmacological activities, such as antidiabetic (9), antiinflammatory, antiulcer, analgesic and anti-hypertensive (10), among other. Many species of *Croton* have strong economic potential, especially for the pharmaceutical industry, due to various secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids and terpenoids (11).

These secondary metabolites showed several biological activities: antibacterial (12; 13;14), fungicides (15;16), inflammatory (17), anti-nematodes (18), and inhibitors of protein Bcl-xL, a anti-apoptotic protein of the family of Bcl-X(19;20). In relation to chemical volatile constituents from *Croton*, previously published studies showed a predominance of terpenoids and phenylpropanoids (21). *Croton nummularius* Baill. is a endemic species from Brazilian flora. It is a subshrub found growing in savannah vegetation. Popularly known as “alecrim-branco” and can be found between the Cadeia do Espinhaço (Bahia and Minas Gerais states) and Pernambuco state. In Pernambuco it has a restricted distribution to the Park National do Catimbau, occurring only in rock formations (22). This plant is widely used in traditional medicine to treat wound infection and to accelerate wound healing, and to treat rheumatism, diabetes, cancer and other illnesses.

Given the botanical potential and the need to find new compounds capable of controlling the action of microorganisms, we sought to perform a job that allows for a greater understanding of the species in the region, specifically the kind of *C. nummularius* allowing mainly contribute to identifying new substances with biological activities defined. The biological significance and the rapid decline of source of *C. nummularius* and the fact that no previous chemical no biological studies has been reported about this species, led us to the study of this plant.

MATERIALS AND METHODS

Plant material: The leaves and branches were collected in in rock formations from Parque Nacional do Catimbau, state of Pernambuco, in November 2011. The plant was identified following usual taxonomic technique and a voucher (84.790) was deposited in the Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA).

Essential oil isolation: Leaves and branches were submitted to stem distillation using a modified Clevenger apparatus for 6 h. Oils yields were determined (w/w) on the fresh material.

Analysis: The analysis of the oils was performed using a gas chromatograph (HP 6890N Network CG System) with a capillary column HP-5 MS (30 m x 0.32 mm x 0.25 mm film thickness) with flow at 0.5 mL/min; 1/20 split ratio mode (split/splitless injector). The oven temperature was programmed from 70°C (held for 5 min) to 250°C at 3°C/min with He as the carrier gas at an inlet pressure of 3.14 psi. The injections were of 1 mL from 2 mg/mL CH₂Cl₂ solution. The percentage compositions were obtained from electronic integration

measurements using flame ionization detection (FID, 250°C). All the samples were analyzed by GC/MS (HP 6890N) equipped with MSD Productivity ChemStation Software, in the same chromatographic conditions as described above, operating with ion source at 250°C and electron impact ionization at 70 eV and acquisition mass range from 10–400 m/z (3.66 scan/s).

Identification of components: The identification of oil components was accomplished by comparison of their CG retention indices (determined relatively to the retention times of the series of n-alkanes) and mass spectra fragmentation patterns with those from the Wiley Library Software 59943B and data from the literature (23).

DPPH radical scavenging assay: DPPH radical scavenging activity was measured using methods described by Nanjo (24). A 60 μ L of essential oil of leaves (or ethanol as control) with various concentrations was added to 60 μ L of DPPH (60 IM) in ethanol solution. After mixing vigorously for 10 s, the solution was then transferred into a 100 μ L quartz capillary tube, and scavenging activity of essential oil the *C. nummularius* on DPPH radical was measured using a JES-FA electron spin resonance (ESR) spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The spin adduct was measured on an ESR spectrometer exactly 2 min later. Experimental conditions were as follows: magnetic field, 336.5 ± 5 mT; power, 5 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1×1000 ; sweep time, 30 s.

Brine shrimp lethality assay: The assay was performed following previously reported procedure (25) with some modifications (22). The growth medium was prepared with sea water in a small tank divided into two compartments. The *Artemia salina* eggs were added to the covered compartment. A lamp was placed above the open side of the tank to attract hatched shrimps through perforations in the partition wall. After 48 h, the shrimps mature as nauplii (*A. salina*) and are ready for the assay. Test oils were dissolved in 1 mL of Tween® and sea water to complete 5 mL of total volume. Appropriate volumes of the resulting solution were then added in tubes, in quadruplicate, with 5 mL of saline solution containing 10 nauplii each to afford the final sample concentrations. The control samples containing Tween®, under the same conditions, do not cause significant brine shrimp mortality. After 24 h incubation under light, the number of dead and survivor brine shrimps in each tube was counted. The LC50 values were calculated by graphics from drug concentration vs. lethality percentage using a probit scale adjust. Data analysis was performed with STATISTICA software.

Antibacterial activity: The Department of Antibiotics (DA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE), provided the bacteria Difco™ Nutrient Agar (NA) and they armazened at 4°C. Gram-positive bacteria were *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*, Gram-negative bacteria were *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*.

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution technique: It was established varied concentrations of the essential oil in the following scheme: in a sterile assay tube 0.4 mL of the essential oil of leaves were placed, added with 0.04 mL of TWEEN 80 and q.s.p. 5 mL with distilled water, and agitated during two minutes in a Vortex, obtaining a solution with a final concentration of 8% of essential oil (26). With this sequence of procedures, the final obtained concentrations correspond to : 4, 2, 1, 0.5 e 0.25%, 0.125%, 0.062%, 0.031% and 0.015% dilutions.

The determination of the MIC of the *C. nummularius* essential oil was carried through the microdilution technique using sterilized microplates with 96 wells with deep flat and proper cover, where was placed 100 μ L of the essential oil solution. After that, 100 μ L of

nutrient broth doubly concentrated were added and inoculated with the assayed microorganism. In the eighth line of the microdilution plate, 200 μ L of the broth inoculated with the microbial suspension (control of the assayed strain viability) were placed, in this way that the first sequence of wells presented the highest concentration of the essential oil, and the ninth line, presents it lesser concentration of the studied oil. The system was incubated at 35-37 °C during 24 hours (27).

For the reading of the microdilution assay the colorimetric method was used, which consists of the addition of 20 μ L of the water solution of the resazurin (Sigma-Aldrich) in the 0.01% concentration, which is recognized as a colorimetric marker of oxide-reduction reaction (28;29;30). The change of coloration of the resazurin (blue for rose) indicates microbial growth. The lesser concentration of the oil essential capable to inhibit the growth of strain assayed, verified for the blue coloration of the resazurin is considered as the MIC (31).

Determination of minimum bactericidal concentration (MBC): For the determination of the MBC, 50 μ L of the four last concentrations of the oil with growth absence were removed, from the microdilution plate, and were inoculated in a petri plate containing Nutrient Agar (Biobras). The plates same ones were incubated at 35 ± 1 °C during 24-48 hours and, after this, the reading was made. The minimum bactericidal concentration (MBC) was considered starting at the concentration that did not allow to the reactivation of the microorganism in the medium without antimicrobials (32; 33; 29;34).

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical characterization

The *Croton* species have been extensively studied with respect to their volatile constituents and non-volatile. Many species are producing a large number of substances belonging to the class of alkaloids, terpenoids and phenylpropanoids (35).

The leaves and branches of *C. nummularius* provided oil yields of 0,72% and 0,36% respectively and their volatile constituents were analyzed by GC-FID and GC-MS. The individual components of the oils were identified by comparison of both their mass spectra and their GC retention data with those of authentic compounds previously analyzed and stored in the data system. Other identifications were made by comparison of mass spectra with those existing in data system libraries or cited in the literature (36). The main compounds found in the oil of leaves were spathulenol (27.73%), beta-caryophyllene (14.37%), isolongifolene (11.74%) and germacrene B (10.91%) and gemacrene D (7.03%). The oil of branches was dominated by isolongifolene (35.60%), nerolidol (12.13%), beta-caryophyllene (11.76%) and docosane (11.06%). The twenty-eight constituents identified in the oils of *C. nummularius* are listed in Table 1.

According to Block (37) the essential oil from the leaves of *C. zambesicus* has as major constituents, compounds caryophyllene oxide (19.5%), β -caryophyllene (10.8%), α -copaene (6.3%), linalool (6.1%) and β -pinene (5.2%). Sylvestre *et al.*, (38) found that in essential oil from leaves of *C. flavens* there are 47 compounds, of which the viridifloreno (12.2%), the germacrone (5.2%), (E) - γ -bisabolene (5.2%) and β -caryophyllene (4.9%) are major compounds.

The species *C. nepetaefolius*, commonly known as “marmeleiro sabiá” has been studied and chemically identified as the major constituents 1,8-cineole (37.5%), the β -caryophyllene (23.0%) and γ -elemene (12.0 %) (39). The composition of the essential oil of

the bark of *C. aubrevillei* and leaves of *C. zambesicus* were studied by Menut (40) who found that both species have the same major constituents, but in different proportions: Linalool (34.6% and 9.9%) and β -caryophyllene (11.9% and 9, 9%).

Chemical analysis carried out by Fontenell (41) showed that major component of oil *C. nepetaefolius* is methyl-eugenol (15.7%) and bicyclogermacrene (14.1%) as major constituents, while the major constituents of *C. argyrophylloides* oil are spathulenol (20.3%) and bicyclogermacrene (11.7%), and of *C. zehntneri* oil are estragol (72.9%) and anethole (14.3%). The essential oil of *C. zenhteneri* has antifungal activity (41). This activity can be attributed to the major constituents estragol and / or anethole, which already showed antifungal properties against *Aspergillus parasiticus* (Singh et al., 2006).

Components	RI ^a	RI ^b	Leaves	Branches
Cyclobutane	-	546	-	2.18%
Cyclopentane	-	567	-	2.63%
Octane	-	920	-	8.60%
Longipinene	1347	-	0.75%	-
β -Elemene	1375	-	1.62%	-
Isolongifol	1402	1409	11.74%	35.60%
β -Caryophyllene	1421	-	3.86%	-
α -Humulene	1453	-	2.09%	-
Germacrene D	1480	-	7.03%	-
α -muurolene	1496	-	1.52%	-
δ -Cadinene	1524	1530	4.55%	4.60%
α -Calacorene	1528	-	2.81%	-
Propanoic Acid	-	1531	-	0.69%
α -Cadinene	1534	-	2.85%	-
Nerolidol	-	1562	-	12.13%
Germacrene B	1557	-	10.91%	-
Ledol	-	1573	-	4.32%
Spathulenol	1575	-	11.77%	-
Trans-Caryophyllene	1578	1574	14.37%	11.76%
Isospathulenol	1619	1640	15.96%	1.61%
Farnesene	1636	-	4.63%	-
Naphthalene	1718	-	3.57%	-
Docosane	-	2210	-	11.06%
Tetratriacontane	-	3400	-	4.81%

Table 1: CG of essential oils *C. nummularius* and respective retention indices (Adams, 2007).

The majoritary compounds from leaves of *C. nummularius* like caryophyllene oxide (42) and spathulenol (43) have been reported to present notable antibacterial activity and isolongifolene that is a sesquiterpene used for estrogen receptor that could be useful in regulating fertility, preventing, and treating breast cancer, and for menopausal hormone replacement. The activity of nerolidol, that is majoritary from branches and is a sesquiterpene used as a food-flavoring agent and currently under testing as a skin penetration enhancer for the transdermal delivery of therapeutic drugs, was evaluated against *Leishmania* species (44)

The essential oils of *Croton nummularius* are rich in terpenoids and phenylpropanoids. According to Salatino (8), the essential oils of *Croton* species are rich in terpenoids and phenylpropanoids, or only in terpenoids.

Preliminary Toxicity

The essential oil of leaves of *C. nummularius* showed (Figure 1) a high brine shrimp larvicidal activity (LC₅₀, 2.34 ± 0.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). According to Meyer (25) crude extracts and pure substances are toxic when LC₅₀ value < 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and as lower the value of LC₅₀ as the higher the biological activity. So the leaves oil of *C. nummularius* can be considered highly toxic.

Biological Activity

For minimum inhibitory concentration (MIC) was considered as the lowest concentration able to completely inhibit bacterial growth. MIC values were determined by visual reading after revelation with resazurin being considered as positive for the wells that remained with the blue color and those who had negative staining red (45). The results presented in Table 2 demonstrate that the essential oil of *C. nummularius* inhibited the growth of all bacteria both gram-positive and gram-negative. Bactericidal activity of essential was not detected only, for *Streptococcus pyogenes*.

Microorganismo	Oil from leaves of <i>Croton nummularius</i>		
	MBC*	MIC*	MBC/MIC
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.062%	0.062%	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.031%	>4%	-
<i>Escherichia coli</i>	0.062%	0.031%	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.031%	0.015%	2
<i>Micrococcus luteus</i>	0.031%	0.031%	1
<i>Bacillus subtilis</i>	0.062%	0.031%	2
<i>Bacillus cereus</i>	0.125%	0.031%	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.031%	0.031%	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.015%	0.015%	1

<i>Salmonella enteritidis</i>	0.125%	0.062%	2
---	--------	--------	---

Table 2: Minimum inhibitory concentration (% percentage)

It is observed antimicrobial activity with other essential oils from *Croton* species such as *Croton neptaeifolius* (46), *Croton tiglium* (47) and *Croton lechleri* L. McChesney (48) examined the constituent 3,4-seco-traquilobanóico isolated from the roots of *Croton blanchetianus*, which showed antibacterial effect against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Gonçalves (47), reported that the extract of *Croton blanchetianus* antibacterial activity against showed resistant strains of *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* and *S. aureus*. Constituents belonging to the class of sesquiterpenes such as β -caryophyllene and germacrene D (Table1) reported in this study, has shown remarkable antibacterial activity (49). The (E)-caryophyllene also showed antibacterial activity (50) and caryophyllene oxide showed analgesic and anti-inflammatory (51).

According to the results reported (46), it was found that the essential oil of *C. heliotropiifolius* showed inhibitory activity only for multiresistant *Staphylococcus aureus* strain with MIC 512 μ g/mL. In the same manner, the essential oil of *C. blanchetianus* showed inhibitory activity against the *E. coli* strains (MIC 512 μ g/mL), *Bacillus cereus* (MIC 256 μ g / mL) and *Staphylococcus aureus* representing the most significant result with a lower MIC of 64 μ g / mL.

Due to the complex nature of essential oils, would be difficult to attribute the observed activity to a single component present in it. Therefore, to know the mode of action of the oils would be necessary to examine separately each component of the essential oil, and mix to see if the chemical constituents have inhibitory action alone or in synergism.

Antioxidant activity

The human body constantly produces free radical through their metabolic activities. Despite being a normal process in the life of living organisms, when in excess, can cause oxidative stress, leading to tissue changes responsible for various diseases, such as inflammatory arthritis (52), ulcers (53) diabetes (54), and degenerative processes such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, arteriosclerosis and aging (55) among others. In addition to these antioxidants produced in the body, there are synthetic compounds used in the food industry, highlighting the BHT, BHA, GP, TBHQ and natural such as α -tocopherol (vitamin E), β -carotene, ascorbate (vitamin C) and phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) (56) which are responsible for the removal of these reactive species.

The use of synthetic antioxidants has been reduced due to suspected activities as promoters of carcinogenesis as well as due to the rejection of synthetic additives in foods (56). In this context, the demand for natural antioxidants has increased in recent decades, particularly natural products extracted from medicinal plants. The plant antioxidants are very varied in nature, but the phenolic compounds have been identified as responsible for higher antioxidant capacity, being represented by flavonoids and isoflavonoids, tannins, lignans, xanthenes and other. The antioxidant action of most of these natural substances is due to the presence of phenolic hydroxyls and their redox properties, as they act as reducing agents, hydrogen donors. In addition to these compounds, several others with antioxidant activity have been isolated from various plant families (57,58).

DPPH radical scavenging activity of *C. nummularius* leaves was measured by ESR spectroscopy. Scavenging activity was augmented with increasing concentrations of essential oil of *C. nummularius*, reaching 76.16% at 5 mg/ml. Calculated IC₅₀ value of essential oil was 62.52 mg/ml. Peroxyl radical scavenging activity of essential oil *C. nummularius* increased in a dose-dependant manner.

The antioxidant activity have been described in some *Croton* species, such as *C. celtidifolius* (59), *C. nepetaefolius* (60) and *C. argyrophylloides* (61). However, there are no reports of studies of antioxidant potential with species extracts of *C. nummularius*. Therefore, the results described in this study are promising and encourage continued research to evaluate the antioxidant power of single substances of the species studied.

REFERENCES

- 1.WEBSTER, G.L. Synopsis of the genera and suprageneric tax of Euphorbiaceae. **Ann. Mo. Bot. Gard.** 1994.
- 2.WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon.** 1993.
- 3.SECCO, R.S. Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae). Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. **Sér. Bot.** 1992.
- 4.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.
- 5.CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; LIMA, L.R. DE; CARUZO, M.B.R.; BERRY, P.; RIINA, R.G.; SILVA, O.L.M.; SILVA, M.J.DA; SODRÉ, R.C. *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** 2013.
- 6.BERRY, P. E. CORDEIRO, I. WIEDENHOEFT, A. C., VITTORINO-CRUZ, M. A. & LIMA, L. R.. Brasiliocroton, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae from eastern Brazil. **SystemBot.** 2005.
- 7.ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica.** 2001.
- 8.SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 2007.
- 9.BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F.; Modesto-Filho J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2005.
- 10.PALMEIRA-JUNIOR, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONVERSA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 2006.
- 11.PAYO, H. A.; DOMINICIS, M. E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M. & SARDUY, R.. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmacia.** 2001.

- 12.COSTA J.G.M., SOUSA E.O., RODRIGUES F.F.G., LIMA S.G.D., BRAZ-FILHO R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Rev Bras Farmacogn.** 2009.
- 13.JIMÉNEZ-ARELLANES A., MECKES M., TORRES J., LUNA-HERRERA J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). **J Ethnopharmacol.** 2007.
- 14.PEREIRA A.C., CARVALHO H.W.P., SILVA G.H., OLIVEIRA D.F., FIGUEIREDO H.C.P., CAVALHEIRO A.J., CARVALHO D.A. 2008. Purification of an antibacterial compound from *Lantana lilacina*. **Rev Bras Farmacogn.** 2008.
- 15.RWANGABO P.C., CLAEYS M., PIETERS L., CORTHOUT J., VANDEN BERGHE D.A., VLIETINCK A.J. Umuhengerin, a new antimicrobially active flavonoid from *Lantana trifolia*. **J Nat Prod.** 1988.
- 16.SOUSA E.O., COLARES A.V., RODRIGUES F.F.G., CAMPOS A.R., DE LIMA S.G., COSTA J.G.M. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) growing in Brazil Northeastern. **Rec Nat Prod.** 2009.
- 17.JULIÃO L.D.S., PICCINELLI A.L., MARZOCCO S., LEITÃO S.G., LOTTI C., AUTORE G., RASTRELLI L. Phenylethanoid glycosides from *Lantana fucata* with in vitro anti-inflammatory activity. **J Nat Prod.** 2009.
- 18.BEGUM S., WAHAB A., SIDDIQUI B.S., QAMAR F. Nematicidal constituents of the aerial parts of *Lantana camara*. **J Nat Prod.** 2000.
- 19.HAYASHI K., CHANG F., NAKANISHI Y., BASTOW K.F., CRAGG G., MCPHAIL A.T., HI NOZAKI H., LEE K. Antitumor agents. 233.1 lantalucratins A-F, new cytotoxic naphthoquinones from *Lantana involucre*. **J Nat Prod.** 2004.
- 20.LITAUDON M., JOLLY C., CALLONEC C.L., CUONG D.D., RETAILLEAU P., NOSJEAN O., NGUYEN V.H., PFEIFFER B., BOUTIN J.A., GUÉRITTE F. 2009. Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Combretum sondaicum* and *Lantana camara* as inhibitors of Bcl-xL/BakBH3 domain peptide interaction. **J Nat Prod.** 2009.
- 21.SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** 2007.
- 22.SILVA T.M.S., CAMARA C.A., BARBOSA T.P., SOARES A.Z., CUNHA L.C., PINTO A.C., VARGAS M.D. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorg Med Chem.** 2005.
- 23.ADAMS, R. P. Identification of Essencial Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois: **Allured Publishing Corporation**, 2001.

25. NANJO, F., GOTO, K., SETO, R., SUZUKI, M., SAKAI, M., & HARA, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Free Radical Biology and Medicine**. 1996..
25. MEYER B.N., FERRIGNI N.R., PUTNAM J.E., JACOBSEN L.B., NICHOLS D.E., VMACLAUGHLIN. Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Plant Med JL**. 1982.
26. ALLEGRINI J., SIMEON M. 1972 Study of essential oil antibacterial power. **Prod Prob Pharm**. 1972.
27. VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSER, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B.E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **J. Ethnopharmacol**. 2003.
28. MANN C.M., MARKHAM J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **J Appl Microbiol**. 1998.
29. SALVAT A., ANTONNACCI L., FORTUNATO R.H., SUAREZ E.Y., GODOY H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Lett Appl Microbiol**. 2001.
30. BURT S.A., REINDERS R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Lett Appl Microbiol**. 2003.
31. ESPINEL-INGROFF A., KISH JR C.W., KERKERING T.M., FROMTLING R.A., BARTIZAL K., GALGIANI J.N., VILLAREAL K., PFALLER M.A., GERARDEN T., RINALDI M.G. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J Clin Microbiol**. 1992.
32. BENOUDIA H., HASSAR M., BENJILALLI B. Lês propriétés antiseptiques dès huiles essentielles in vitro, testées contre dès germes pathogènes hospitaliers. *Fitoterapia*. 1988.
33. SMITH-PALMER A., STEWART J., FYFE L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett Food Microbiol**. 1998.
34. SAHIN F., GULLUCE M., DAFERERA D., SOKMEN A., POLISSIOU M., AGAR G., OZER H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**. 2004.
35. RANDAU K.P., FLORÊNCIO D.C., FERREIRA C.P., XAVIER H.S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Rev Bras Farmacogn**. 2004.
36. NIST/EPA/HHI Mass Spectral Library, Nist Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d), The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, MD, USA, 2005.
37. BLOCK S., BACCELLI C., TINANT B., VAN MEERVELT L., ROZENBERG R., HABIB JIWAN J.L., LLABRÉS G., DE PAUW-GILLET M.C., Quetin-Leclercq J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**. 2004.

- 38.SILVESTRE A.J.D., CAVALEIRO J.A.S., FEIO S.S., ROSEIRO J.C., DELMOND B., FILLIATRE C. Synthesis of some new benzylic ethers from 1,8-cineole with antimicrobial activity. **Monatshefte fur Chemie**. 1999.
- 39.CRAVEIRO, A.A.; ANDRADRE, C.H.; MATOS, F.J.A; ALENCAR, J.W.; DANTAS, T.N. Fixed and volatile constituents of Croton aff. Nepetifolius. **Journal of Natural Products**. 1980.
- 40.BOYOM, F.F.; KEUMEDJIO, F.; DONGMO, P.M.J; NGADJUI, B.T.; ZOLLO, P.H.A; MENUT, C.; BESSIERE, J.M.. Essential oils Croton zambesicus Muell. **Arg. Growing in Cameroon. Flavour and Frangance Journal**. 2002.
- 41.FONTENELLE, R.O.S., MORAIS, S.M., BRITO, E.H.S., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., NASCIMENTO, N.R.F., KENTOPF, M.R., SIDRIM, J.J.C. AND ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oil of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**. 2008.
- 42.Magiatis, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; CHINOU, I.; HAROUTOUNIAN, S. A.; Z. NATURFORSCH., C: **J. Biosci**. 2002.
- 43.CHINOU, J. B.; BOUGATSOS, C.; PERDETZOUGLOU, D.; **J. Essential Oil Res**. 2004.
- 44.ARRUDA, DENISE C.; D'ALEXANDRI, FABIO LUIZ; KATZIN, ALEJANDRO M.; ULIANA, SILVIA R. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** . 2005.
- 45.SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology and Biotechnology**. 2001.
- 46.LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; GUIMARÃES, A.M. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de Croton nepetaefolius. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Resumo. 1992.
- 47.TSAI, J.C., TSAI, S., CHANG, W. C. Effect of ethanol extracts of three Chinese medicinal plants with laxative properties on ion transport of the rat intestinal epithelia. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 2004.
- 48.McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of Croton sonderianus II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. **Pharmacology Research**. 1991.
- 49.OZÜRK, M.; DURU, M. E.; AYDOGMUS-OZTURK, F.; HARMANDAR, M.; MAHLIÇLI, M.; KOLAK, U.; ULUBEEN, A. CG-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of Stachys cretica subsp. smyrnaea. **Natural Products Communication**. 2009.
- 50.JULIANI, H.R. Jr; BIURRUN, F; KOROCH, A.R; OLIVA, M.M; DEMO, M.S; TRIPPI, V.S; ZYGADLO, J.A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of Lantana xênica. **Planta medica**. 2002.

51. CHAVAN, M. J.; SHINDE, D. B.; NIRMAL, S.A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark. **Natural Products Research**. 2006.
52. HADJIGOGOS, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Panminerva Médica**. 2003.
53. LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALACRÓN DE LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**. 2000.
54. EL-REMESSY, A. B., BEHZADIAN, M. A., ABOU-MOHAMED, G., FRANKLIN, T. CALDWELL, R. W., CALDWELL, R. B. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. **American Journal of Pathology**. 2004.
55. SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**. 2008.
56. SOUZA, T. J. T, APEL, M. A, BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I, ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2007.
57. FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; SOUZA, J. S. N, MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDEL, G. A.; BRAZ-FILHO R, LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2009.
58. REBELO, M. M.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2009.
59. NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**. 2003.
60. MORAIS, S. M.; CATUNDA-JÚNIOR F. E. A.; SILVA, A. R. A.; STONE, J.; NETO, M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**. 2006.
61. CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil. **Revista de Ciência & Tecnologia**. 2002.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais das plantas pertencem à classe dos terpenóides e fenilpropanóides, tendo como compostos majoritários o β -cariofileno, espatulenol, isolongifileno e nerolidol.

Considerando os resultados obtidos, observou-se que o óleo essencial de *C. nummularius* inibiu o crescimento de todas as bactérias (MIC) tanto das gram-positivas quanto das gram-negativas, sendo bem eficaz para *Enterococcus faecalis* 0,062%, *Micrococcus luteus* 0,031%, *Staphylococcus aureus* 0,031 e *Klebisella pneumoniae* 0,015% para a atividade bactericida mínima (MBC) o óleo essencial agiu em quase todas as bactérias, sendo mais eficiente em *Pseudomona aeruginosa* 0,015% e *Klebisella pneumoniae* 0,015% e apresentou pouca atividade em *Streptococcus pyogenes*. Na atividade antioxidante o óleo essencial de *C. nummularius* capturou consideravelmente os radicais livres, cujos os resultados mais promissores se apresentaram em 76,16% a 5 mg/ml. A atividade captadora de radical de óleo essencial de *C. nummularius* aumentou de maneira dose-dependente.

O óleo essencial de folhas de *C. nummularius* apresentou uma elevada toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. que teve uma CL50 de $2,34 \pm 0,01$ mg.mL⁻¹.

7. ANEXOS

O artigo intitulado “**Chemical characterization, biological activity and preliminary toxicity of essential oil of *Croton nummularius* Baill. from Pernambuco**” foi encaminhado para a revista *JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH*.

Carta de apresentação



Recife, April 08th, 2014

Journal of Essential Oil Research

Dear Sirs,

Please find enclosed our paper “**Chemical characterization, biological activity and preliminary toxicity of essential oil of *Croton nummularius* Baill. from Pernambuco**”

Sarah Romini de Lima Basto, Alexandre Gomes da Silva, Cibeles Maria Alves da Silva, Maria Tereza dos Santos Correia and Márcia Vanusa da Silva *

Looking forward to hear from you

Sincerely yours,

Corresponding author. Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas.
Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.
Tel.: +55 81 fax: +55 81 2126-8405.
e-mail addresses: marcia.vanusa@ufpe.br (M.V. Silva).

Anexo 2: Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO).



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26743-1	Data da Emissão: 28/01/2011 12:34
Dados do titular	
Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição : EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUARIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material botânico	01/2011	12/2014

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BUIQUE	PE	PARQUE NACIONAL DO CATIMBAU	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Angiospermae (*Qtde: 5), Pteridophyta (*Qtde: 5), Magnoliophyta (*Qtde: 5), Bryophyta (*Qtde: 5)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44726333



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26743-1	Data da Emissão: 28/01/2011 12:34
Dados do titular	
Nome: ALEXANDRE GOMES DA SILVA	CPF: 038.585.604-05
Título do Projeto: Atividade Antimicrobiana da Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição : EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA	CNPJ: 10.912.293/0001-37

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44726333



Página 2/2

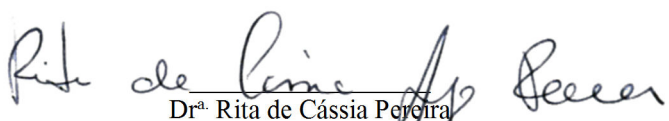
Anexo 3: Ficha de Identificação Botânica – FIB.

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº. 43/2012

Nº	Nº de Tombo	Família	Nome Científico
01	8808	<i>Euphorbiaceae.</i>	<i>Croton nummularius</i> BAILL.

Obs.: Amostra coletada para trabalho de conclusão do curso.


 Dr.ª Rita de Cássia Pereira

Curadora do Herbário IPA

Consulta: Sarah Romini de Lima Basto– aluna da Pós-graduação em Bioquímica da UFPE

Procedência: Material coletado em Pernambuco, Parque Nacional do Catimbau, às margens da pedra do cachorro, em área de Caatinga. Determinada em: Outubro de 2012.

Recebi em 16/10/2012

 Sarah Romini de Lima Basto

Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
 Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
 CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
 Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento

Anexo 4: Produção Científica

RESUMOS

1. BASTO, S. R. L. ; SILVA, C. M. A. ; SILVA, A. G. ; CORREIA, M. T. ; SILVA, M. V. Essential oil composition of leaves and branches of *Croton nummularius* Baill. from northeast Brazil. 2012.
2. BASTO, S. R. L. ; SILVA, A. G. ; SILVA, C. M. A. ; CORREIA, M. T. ; SILVA, M. V. Evaluation of the toxicity of three essential oils from Caatinga against *Artemia salina* Leach.. 2012.
3. BASTO, S. R. L. ; SILVA, A. G. ; SILVA, C. M. A. ; CORREIA, M.T.S; SILVA, M. V. Caracterização do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* müll.arg. (euphorbiaceae). 2012.
4. BASTO, S. R. L. ; SILVA, J.C.F. ; SILVA, C. M. A. ; SILVA, A. G. ; SANTOS, L.M.M. ; CORREIA, M.T.S. ; SILVA, M. V. Characterization of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* kunth (euphorbiaceae). 2012.
5. BASTO, S. R. L. . caracterização do óleo essencial das folhas de *Ocotea glomerata* (nees) mez (lauraceae). 2012.
6. BASTO, S. R. L. ; SILVA, J.C.F. ; ARAÚJO, D.R.C. ; SILVA, M. V. ; CORREIA, M.T.S. Avaliação da atividade antimicrobiana e toxicidade preliminar do óleo essencial de *Croton nummularius* baill (euphorbiaceae).

Anexo 5: Em andamento**ARTIGOS**

1. Evaluation of bactericidal and fungicidal activity of essential oils of the genus *Croton* L. (Euphorbiaceae) present in the state of Pernambuco, National Park Catimbau.