



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS



**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton linearifolius*
(EUPHORBIACEAE)**

ALINE VIANA ROCHA BRITO

ITAPETINGA

2014

ALINE VIANA ROCHA BRITO

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton linearifolius*
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, área de concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Andrade Gualberto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Lúcia da Cunha e Silva

ITAPETINGA

2014

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	9
1.2 - OBJETIVOS.....	11
1.2.1. - Objetivo Geral.....	11
1.2.2 - Objetivos Específicos	11
2 – REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1- A Caatinga e o gênero <i>Croton</i>	12
2.2 - Metabólitos secundários.....	15
2.3 - Óleos essenciais.....	18
2.4 - Atividade antioxidante.....	20
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1- Local de coleta e preparação do material botânico.....	23
3.2 - Extração dos óleos essenciais.....	24
3.3 - Prospecção química dos óleos essenciais obtidos.....	25
3.4 - Composição química dos óleos essenciais.....	27
3.5 - Análise das atividades antioxidantes dos óleos essenciais	28
3.4.1 - Método do DPPH.....	28
3.4.3 - Método FRAP.....	29
3.4.4 - Quantificação dos compostos fenólicos totais.....	30
3.6 - Análise estatística.....	31
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5- CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

RESUMO

Nas últimas décadas as pesquisas vêm apontando evidências sobre os prejuízos causados pelos radicais livres nas células, produzindo envelhecimento precoce, doenças crônicas, disfunções cerebrais e declínio no sistema imunológico. Os antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar os danos provocados pelo processo natural de oxidação nos organismos vivos. Este trabalho busca investigar a composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas do *Croton linearifolius*, em diferentes períodos do ano, e avaliar sua atividade antioxidante, através de ensaios *in vitro*, correlacionando sua possível propriedade antioxidante aos constituintes químicos encontrados na planta. Foram feitas três coletas do material vegetal nos meses de março, abril e setembro de 2013. Os óleos essenciais das folhas das plantas foram obtidos por hidrodestilação em um extrator de Clevenger modificado, utilizando-se 70 g de material vegetal previamente desidratado para cada extração, durante 2h e 30 minutos. A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais foi realizada pelos métodos do sequestro de radicais livres DPPH e poder redutor de íons ferro (FRAP). Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais, utilizando o reagente de Folin-Ciocauteau. O rendimento dos óleos extraídos foi de 0,13%, 0,15% e 0,14%, a partir da matéria seca. O percentual médio de redução do DPPH, produzido pelos óleos essenciais nas concentrações testadas (2,5; 5,0 e 10 mg.mL⁻¹), foi inferior a 10%. A quantidade de Fe²⁺ produzida pelos óleos foi, respectivamente, de 0,66, 0,13 e 0,22 mg de Fe²⁺ / g de óleo. Os teores de compostos fenólicos encontrados nos óleos A e B foram de 276,79 e 155,77 mg de EAG / g de óleo essencial.

Palavras-chave: Óleos voláteis, DPPH, Caatinga.

ABSTRACT

In recent decades surveys have indicated evidence of the damage caused by free radicals in cells, producing premature aging, chronic disease, brain dysfunction and decline in the immune system. Antioxidants are substances that neutralize the damage caused by natural oxidation process in living organisms. This work aims to investigate the chemical composition of the essential oils obtained from the leaves of *Croton linearifolius* at different times of the year, and evaluate its antioxidant activity through *in vitro*, correlating their possible antioxidant properties to chemical constituents found in the plant. Three collections of plant material were made in the months of March, April and September 2013. Essential oil of the leaves of the plants were obtained by hydrodistillation in a modified Clevenger extractor, using 70 g of previously dried plant material for each extraction during 2 hours and 30 minutes. Evaluation of antioxidant activity of essential oils was performed by the methods of scavenging free radicals DPPH and reducing power of iron (FRAP). Determined the content of total phenolics using the Folin-Ciocalteu. The yield of extracted oil was 0.13 %, 0.15 % and 0.14 %, based on dry matter. The average percentage reduction of DPPH, produced by essential oils at different concentrations (2.5, 5.0 and 10 mg.mL⁻¹) was less than 10 %. The amount of Fe²⁺ produced by the oils were respectively 0.66, 0.13 and 0.22 mg of Fe²⁺ / g of oil. The content of phenolic compounds found in the oils A and B were 276.79 and 155.77 mg GAE / g of essential oil.

Keywords: Volatile oils, DPPH, Caatinga.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes dos terpenóides, considerações, efeitos, exemplos e algumas atividades biológicas.	17
Tabela 2. Peso do material coletado em diferentes períodos, após pré-secagem em estufa a 40°C por 12 horas.	25
Tabela 3. Rendimento de extração dos óleos essenciais de <i>Croton linearifolius</i> .	33
Tabela 4. Resultados da prospecção química preliminar por CCD dos óleos de <i>C. linearifolius</i> .	34
Tabela 5. Dados dos constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas do <i>C. linearifolius</i> coletadas no mês de março de 2013 na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.	36
Tabela 6. Constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas do <i>C. linearifolius</i> coletadas no mês de abril de 2013 na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.	37
Tabela 7. Constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas do <i>C. linearifolius</i> coletadas no mês de setembro de 2013 na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.	38
Tabela 8. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH produzidas pelos óleos essenciais de <i>C. linearifolius</i> e pelos padrões positivos em diferentes concentrações	42
Tabela 9. Produção de íons Fe ²⁺ pelos óleos essenciais de <i>C. linearifolius</i> na concentração de 5 mg/ml e pelos padrões na concentração de 0,5 mg/ml.	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Relação dos metabolitos primários com a biossíntese dos metabólitos secundários. 16
- Figura 2. Espécie de *Croton linearifolius* encontrada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) em diferentes períodos de coleta. 23
- Figura 3. Extrator de Clevenger modificado. 24
- Figura 4. Cromatógrafo gasoso Shimadzu, acoplado ao detector de massas. 27
- Figura 5. Testes realizados com as amostras dos óleos essenciais com o radical livre DPPH. 29
- Figura 6. Placas cromatográficas borrifadas com os seguintes reveladores: Vanilina, Dragendorff, Cloreto Férrico e Ninhidrina. 33
- Figura 7. Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas do *C. linearifolius*, coletadas nos meses de março, abril e setembro de 2013, obtido por CG-EM. 34
- Figura 8. Gráfico da precipitação mensal no ponto de coleta na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, durante os meses de dezembro de 2012 a outubro de 2013. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA - Butil-hidroxi-anisol

BHT - Butil-hidroxi-tolueno

CAT - Catalase

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG-DIC - Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EROs - Espécies reativas do oxigênio

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder redutor de íons ferro)

GPx - Glutathione peroxidase

PG - Propil galato

SOD - Superóxido dismutase

UV - Ultravioleta

TBHQ - Terc-butil-hidroquinona

1 - INTRODUÇÃO

A Caatinga é considerada atualmente um rico bioma brasileiro, com uma diversidade vegetal de elevado potencial econômico e farmacológico. Grande parte do seu patrimônio químico e biológico é encontrado apenas no Brasil (IBAMA, 2010). Em meio às inúmeras espécies vegetais que compõem esse bioma, aquelas pertencentes ao gênero *Croton* tem se destacado por apresentar diversas propriedades farmacológicas já comprovadas cientificamente, dentre elas, atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (FONTENELLE, 2008).

A descoberta de novos antioxidantes naturais, com potencial para aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos, tem sido foco de diversas investigações realizadas por pesquisadores em todo o mundo, que vislumbram nas suas pesquisas a descoberta de novos produtos que possam ser aplicados no tratamento e prevenção de enfermidades, além de melhorarem as propriedades nutricionais e funcionais dos alimentos, bem como sua conservação.

Dentre os produtos do metabolismo secundário dos vegetais, os óleos essenciais são de grande interesse, devido às suas propriedades farmacológicas e aromáticas, que os tornam potencialmente úteis para aplicação terapêutica, cosmética e tecnológica. Esses produtos geralmente apresentam-se como misturas de substâncias químicas de natureza terpênica, incluindo seus derivados alcoólicos e aldeídicos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Várias espécies do gênero *Croton* produzem óleos essenciais, para os quais já foram demonstradas atividades biológicas e, entre elas, a atividade antioxidante (FONTENELLE, 2008). Outro fator de interesse para o estudo com espécies pertencentes a este gênero, é que existem muitas delas espalhadas pelo nordeste brasileiro, que não foram estudadas, do ponto de vista taxonômico, químico e biológico (PORTO, 2007), sobretudo no Bioma Caatinga, e que são amplamente empregadas pelas comunidades locais na medicina popular.

Em vista disso, o estudo de espécies vegetais, visando obter extratos e constituintes químicos bioativos, que possam ser associados ou até mesmo vir a substituir produtos sintéticos, são de grande interesse científico e tecnológico, uma vez que os produtos naturais possuem potencial para serem aplicados como fitoterápicos, cosméticos, inseticidas, adjuvantes e co-adjuvantes em alimentos, além de constituírem protótipos para a síntese de substâncias bioativas (LÓPEZ, 2006). Dessa forma, é de

suma importância o desenvolvimento de estratégias que garantam a conservação das espécies vegetais da Caatinga, pois apresentam papel relevante como recursos naturais em pesquisas farmacêuticas e de prospecção química.

Portanto, este trabalho busca investigar a composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas do *Croton linearifolius*, em diferentes períodos do ano, e avaliar sua atividade antioxidante, através de ensaios *in vitro*, para correlacionar sua possível propriedade antioxidante aos constituintes químicos encontrados na planta.

1.2 - OBJETIVOS

1.2.1 - Geral

Determinar a composição química e avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Croton linearifolius*, em função dos diferentes períodos do ano.

1.2.2 - Específicos

1. Identificar e quantificar os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais das folhas de *C. linearifolius*;
2. Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais.

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - A Caatinga e o gênero *Croton*

A Caatinga é um dos biomas brasileiros mais diferenciados e que possui maior extensão territorial no Nordeste, compreendendo uma área de aproximadamente 844.453 km², representando 11% do território nacional (PALMEIRA *et al.*, 2006).

Até meados do século XX existia uma convicção equivocada de que a Caatinga seria produto da modificação de uma formação vegetal anterior, possuindo baixa diversidade biológica, sem nenhuma espécie endêmica e, por esse motivo, foi o bioma brasileiro mais desvalorizado e pouco estudado durante o período (SILVA *et al.*, 2003). Esse bioma caracteriza-se por possuir altas taxas de evapotranspiração, solos rasos e uma baixa capacidade de retenção de água, além de longos períodos de seca, o que demonstra a fragilidade desse ecossistema (SILVA *et al.*, 2009). No entanto, possui alto poder de resiliência, pois, mesmo na ocorrência de chuvas escassas e irregulares, ele consegue reestabelecer sua vegetação. Estudos também demonstram que a caatinga contém uma grande variedade de espécies vegetais e um nível elevado de endemismo (GIULIETTE *et al.*, 2002).

O sertanejo e a vegetação da caatinga estão intimamente ligados, pois dela provém produtos madeireiros (lenha, carvão e estacas) e não-madeireiros (frutas, mel, plantas medicinais, sementes), utilizados para os mais diversos fins, desde a construção de suas casas até a alimentação de animais (MENEZES, 2005). Estudos apontam que o uso de espécie vegetais na medicina popular tem finalidade variada e frequente, como sedativos, estimulante do apetite, distúrbios intestinais, estomáquico e cólicas intestinais, sendo esta última ação cientificamente comprovada, atribuída ao *Croton nepetaefolius* (MORAES *et al.*, 2006). No entanto, o uso inadequado dos seus recursos naturais pode resultar em destruição da sua rica biodiversidade, acarretando em perda do patrimônio genético do bioma, bem como da qualidade de vida das populações rurais.

O gênero *Croton*, pertencente à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae, tribo Crotonea, está distribuído em regiões diversificadas dos trópicos, possuindo mais de 1.300 espécies. Este grupo é taxonomicamente pouco estudado, em virtude da sua complexidade e variedade morfológica. No Brasil, mais precisamente na região Nordeste, existem 52 espécies descritas, em revisão feita por Muller (1837). Berry *et al.* (2005) afirma ainda que, o Brasil é o país que possui o maior número de espécies desse

gênero, sendo este, o segundo maior representante da família Euphobiaceae. Esta família é a mais extensa do Bioma Caatinga, com ocorrência nos Estados da Bahia, Pernambuco, Fortaleza e Sergipe e compreende cerca de 300 gêneros e 7600 espécies (RANDAU et al., 2004). Embora novos táxons de *Croton* tenham sido propostos em trabalhos realizados posteriormente, eles ainda são insuficientes para avaliar os limites entre espécies de *Croton* (PORTO, 2007). Além disso, o polimorfismo das espécies (que vai desde ervas até árvores de grande porte) dificulta sua identificação. Apesar das espécies do gênero *Croton* possuírem ampla ocorrência, principalmente na região Nordeste, o cenário de degradação ambiental atual compromete o seu potencial socioeconômico e coloca em risco sua sobrevivência (VUNDA, 2011), fazendo-se necessário o desenvolvimento de estratégias que garantam a conservação das espécies existentes nessa região.

Palmeira Jr. et al. (2006), afirma que a maioria dos espécies de *Croton* são produtoras de óleos essenciais e possuem uma composição química rica em monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, apresentando ampla heterogeneidade estrutural, o que as torna fontes promissoras de substâncias bioativas. Estudos comprovam que as espécies desse gênero são ricas em constituintes terpênicos, já descritos em *Croton zehntineri*, *Croton sonderianus*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides*. Outros autores também constataram que todas essas espécies apresentam propriedades farmacológicas e inseticidas, como por exemplo, o *C. zehntineri*, que apresenta efeito antiinflamatório comprovado, o *C. sonderianus*, que possui atividade antimicrobiana e larvicida contra *Aedes aegypti* e *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides*, que apresentam atividade antioxidante e larvicida (ROCHA et al., 2008).

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tem aumentado muito nos últimos anos, principalmente em países em desenvolvimento, pois, uma grande parcela da população não possui fácil acesso aos medicamentos sintéticos (BAGATINI et al., 2007). Nas áreas rurais do nordeste brasileiro utilizam-se várias espécies do gênero *Croton*, como terapia auxiliar no tratamento de diversas doenças, já sendo comprovados os efeitos antinoceptivos do óleo essencial de *Croton zehntneri* (MORAIS et al., 2006). E, por suas espécies apresentarem uma gama de propriedades farmacológicas, como atividades antiinflamatória, antiulcerogênica, analgésica, antisséptica, antimicrobiana e anti-hipertensiva e pelo poder inseticida presente principalmente em suas folhas e caules

(CUNHA E SILVA *et al.*, 2010) é que esse o gênero tem despertado o interesse de estudiosos e pesquisadores nos últimos anos.

2.3 - Metabólitos Secundários

No metabolismo vegetal são produzidos os metabólitos primários, que possuem funções vitais para o organismo, e os metabólitos secundários, que derivam dos primários. Eles possuem ações biológicas que garantem benefícios adaptativos, protegendo as plantas contra herbívoros e patógenos, servindo como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e, ainda, funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Há alguns anos atrás, os metabólitos secundários eram considerados substâncias excretadas do vegetal, no entanto, sabe-se que eles estão ligados à adaptação do organismo ao ambiente em que se encontram. Eles exercem atividades biológicas e possuem diferentes ações farmacológicas, fornecendo aos estudiosos subsídios para aplicações na melhoria da saúde humana (PEREIRA, 2012). Santos (2004), afirma que, normalmente, as substâncias medicinais extraídas das plantas são metabólitos secundários e que, a época de coleta é um dos fatores fundamentais na determinação da composição e da quantidade desses metabólitos presentes em óleos essenciais.

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados, todos provenientes do metabolismo da glicose, via ácido chiquímico e acetato (PERINI, 2008). Os terpenos são derivados de isoprenóides, obtidos pela via do mevalonato, sintetizados a partir do acetil-CoA. A Tabela 1 apresenta resumidamente, algumas propriedades e utilização desses compostos.

Tabela 1. Classes dos terpenóides, considerações, efeitos, exemplos e algumas atividades biológicas.

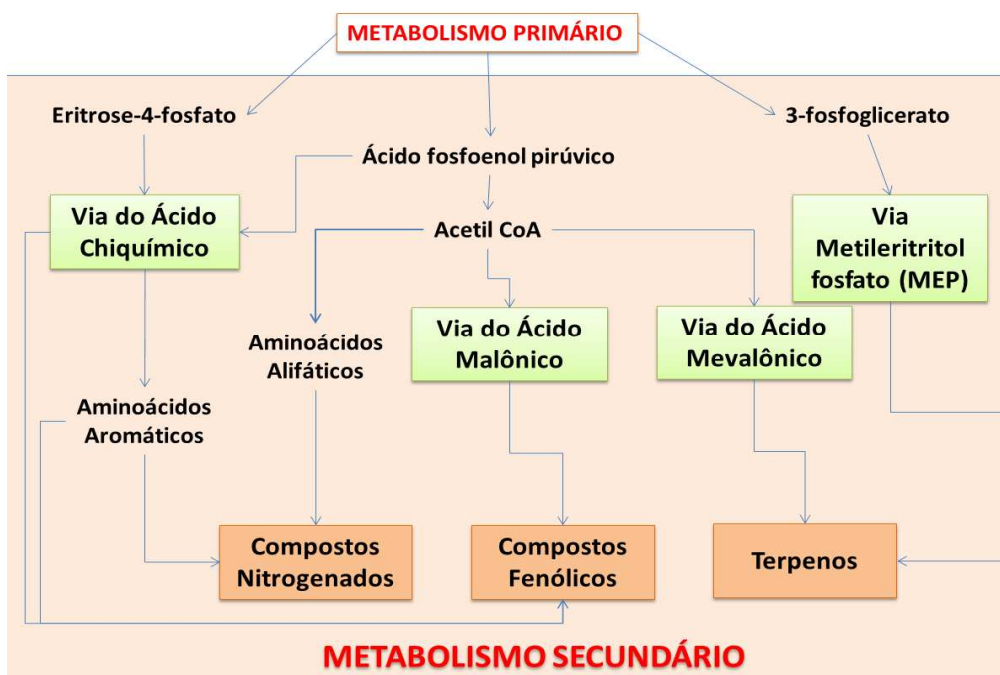
Fonte: Adaptado de NETO & CAETANO (2005).

Terpenóides	Considerações	Efeitos	Exemplos
Monoterpenóides	Compostos com 10 átomos de carbono na molécula, produzidos via acetato, voláteis (90% dos óleos voláteis); estimados mais de 150 compostos diferentes.	Compostos voláteis empregados para proteção contra herbívoros, insetos-pragas, etc.	α e β -pineno (inseticida); mentol (inibidor de larvas).
Sesquiterpenóides	Com 15 átomos de C, voláteis, produzidos via acetato, estimados mais de 1.00 compostos diferentes.	A maioria fitolexinas de atividade anti-alimentar e antibióticos.	β -cariofileno (antiinflamatório); cadineno.

Os compostos fenólicos são sintetizados, principalmente, a partir da rota do ácido chiquímico e, também, pela rota do ácido mevalônico. A Figura 1 apresenta, resumidamente, a relação entre metabolismo primário e secundário e as principais vias biossintéticas para compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos.

Figura 1. Relação dos metabolitos primários com a biossíntese dos metabolitos secundários.

Fonte: Adaptado de TAIZ e ZEIGER (2009).



Os metabólitos secundários são substâncias responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais, além de serem importantes na proteção das plantas contra fatores ambientais e bióticos (VIZZOTO et al., 2010). Farah e Donangelo (2006), afirmam que os compostos fenólicos estão, geralmente, envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou a agressão por agentes patogênicos. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir de lisina, tirosina e triptofano, dando origem aos alcalóides. A biossíntese dos alcalóides ocorre a partir de aminoácidos sintetizados na rota do ácido chiquímico e do acetil-CoA (TAIZ & ZEIGER, 2009). Estes constituem uma família com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados e se caracterizam como um grupo bastante conhecido, devido aos importantes efeitos farmacológicos em animais vertebrados, como antimicrobianos, anestésico local e analgésicos (NETO & CAETANO, 2005).

2.4 - Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas e líquidas, sendo a volatilidade uma das suas principais características, o que os difere dos óleos fixos e misturas de substâncias lipídicas, além de possuírem um intenso e agradável aroma, sendo, por isso, também chamados de essências (SIMÕES *et al.*, 2007). Sua extração pode ocorrer por diversos processos, sendo o mais comum o arraste em vapor d'água (BRUNETON, 1995). Os óleos voláteis podem ser encontrados em diferentes partes das plantas (folhas, flores, caules, sementes e frutos) e apresentam coloração e viscosidade semelhantes, mesmo quando coletados em órgãos distintos, porém, a composição química, as características físico-químicas e o odor podem variar consideravelmente (ROBBERS *et al.*, 1997). Reis *et al.* (2003), afirmam que essa variação vai depender da época da coleta, uma vez que, algumas espécies apresentam, em períodos específicos, maior quantidade tecidual de óleos voláteis. Outros fatores, como o estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo também influenciam na composição desses óleos (SIMÕES & SPITZER, 2004). Dessa forma, para que a produção dos constituintes químicos esteja em níveis desejáveis é importante que haja um estudo do ambiente ocupado pela planta, pois, dependendo da sua idade e localização, ocorrerão variações na sua composição (MARTINS, 2012).

Muitos óleos essenciais obtidos de plantas são utilizados no controle de insetos e podem ser usados como uma alternativa às substâncias sintéticas, ou adicionados a outros inseticidas nos programas de controle de vetores (MACIEL *et al.*, 2010). Os produtos naturais obtidos de plantas, como extratos e óleos, são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação em vários segmentos da indústria. Nos últimos anos, pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos provenientes desses vegetais têm assumido papel relevante, pois, existe o uso e comercialização indiscriminada de produtos com finalidade terapêutica, que não possuem comprovação científica de sua eficácia e do nível de toxicidade no ser humano (PRETTO, 2005). O desenvolvimento de novas substâncias a partir de espécies nativas, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade é uma possibilidade no combate às moléstias, uma vez que, é crescente a resistência dos patógenos aos antimicrobianos sintéticos (COSTA *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário, constituídos por substâncias voláteis, pertencentes principalmente à classe dos terpenos e

fenilpropanóides. Apesar dos terpenos estarem presentes em maior quantidade e constância, os fenilpropainóides, quando presentes, conferem fragrância e sabor aos óleos (JAKIEMIU, 2008). Ambos são de fundamental importância para a sobrevivência das plantas, pois atuam na sua defesa contra microrganismos e patógenos (OLIVEIRA, 2006).

Os terpenos são formados por unidades de cinco átomos de carbonos, denominadas unidades de isopreno (u.i.) e sua classificação é feita de acordo com o número dessas unidades na sua estrutura. Monoterpenos (C₁₀, duas u.i.), sesquiterpenos (C₁₅, três u.i.), diterpenos (C₂₀, quatro u.i.), sesterterpenos (C₂₅, cinco u.i.), triterpenos (C₃₀, seis u.i.) e tetraterpenos (C₄₀, oito u.i.) (CASTRO *et al.* 2004). Cada unidade de isopreno origina-se a partir do ácido mevalônico. Já os fenilpropanóides são provenientes do ácido chiquímico (SPITZER, 2004). Os compostos mais frequentes encontrados nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos, sendo os diterpenos encontrados apenas quando extraídos com solventes orgânicos, pois volatilizam a altas temperaturas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos óleos essenciais. Segundo Silva *et al.* (2008), esses produtos têm sido largamente estudados, em virtude de suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e inseticidas. Apresentam também atividade larvicida, antioxidante (ROCHA *et al.*, 2008), analgésica e antiinflamatória (HENRIQUES *et al.*, 2009).

2.5 - Atividade antioxidante

Os sistemas biológicos mantêm o equilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres, por meio de sofisticados mecanismos antioxidantes. As substâncias antioxidantes são aquelas que, presentes em concentrações reduzidas, comparando-se ao substrato oxidável, diminuem significativamente ou impedem a oxidação do substrato (SOUSA, 2007).

Naturalmente, os seres vivos produzem uma quantidade de radicais livres como consequência do seu metabolismo, sendo equilibrados pelo sistema antioxidante intrínseco. No entanto, a produção de radicais livres em níveis elevados, fora do alcance da defesa dos antioxidantes, causa o estresse oxidativo (KOURY & DONÂNGELO, 2003). Esse estresse é promovido pela formação exacerbada das espécies reativas do oxigênio (EROs), que são constituídas principalmente pelo radical superóxido ($O_2\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Quando os mecanismos de proteção antioxidante se tornam ineficientes por fatores diversos, pode ocorrer a deterioração das funções fisiológicas, aumentando a liberação das EROs no organismo, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento (OLIVEIRA, 2011).

Um composto antioxidante em potencial é definido pela sua capacidade em doar elétrons ou radicais hidrogênio, de transportar ou estabilizar um elétron desemparelhado, reagir com outro antioxidante ou com o oxigênio molecular (MORAES & COLLA, 2006). Estudiosos acreditam que os antioxidantes auxiliam na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas, como Alzheimer, câncer, doenças cardíacas, artrite, entre outras (MATTOS, 2009). Moraes (2006), também afirma que as lesões causadas pelos radicais livres às células podem ser evitadas ou amenizadas pelos antioxidantes encontrados nos alimentos e estes podem agir diretamente na neutralização desses radicais ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função.

Na literatura podem ser encontradas as seguintes classificações para os antioxidantes: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, agentes quelantes e biológicos. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que agem doando radicais hidrogênio às moléculas de radicais livres, removendo ou inativando a reação em cadeia (RAMALHO & JORGE, 2006). Nesse grupo temos os antioxidantes sintéticos: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), o propil galato (PG) e os naturais (tocoferóis). Já os sinergistas possuem pouco ou nenhuma

atividade antioxidante, porém, associados em quantidades exatas, potencializam o efeito dos primários. Os removedores de oxigênio atuam sequestrando os oxigênios instáveis, tornando-os indisponíveis ao meio, impedindo sua autooxidação. Já os agentes quelantes formam complexos com íons metálicos, responsáveis por acelerar a oxidação lipídica, por possuírem pares de elétrons livres em sua estrutura molecular. Por fim, os biológicos, que compreendem diversas enzimas capazes de retirar oxigênio e outros compostos altamente reativos das células e alimentos. Dentre elas estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), que neutralizam os radicais livres. A SOD reduz o radical superóxido e forma peróxido de hidrogênio, a CAT e a GPx trabalham conjuntamente com a proteína glutatona, na redução do peróxido de hidrogênio para produzir água (DOSSIÊ ANTIOXIDANTES, 2009, p. 16).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres, porém, estudos recentes têm demonstrado que a utilização desses antioxidantes pode provocar efeitos tóxicos. Em vista disso, pesquisas têm sido desenvolvidas, no intuito de se buscar produtos naturais com atividade antioxidante, que substituam os sintéticos, ou que sejam associados a eles (SOUSA, 2007). Existe uma série de procedimentos para padronizar as medidas ideais de uma atividade antioxidante *in vitro*, tais como:

- ✓ Avaliar reações de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons;
- ✓ Especificar o substrato de oxidação;
- ✓ Ser um método simples e possuir mecanismo e ponto final definido;
- ✓ Possuir uma instrumentação que seja acessível;
- ✓ Estar apto a medir antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos;
- ✓ Estar adaptado para o uso rotineiro em grande escala.

Porém, o fato é que, não existe nenhum método até o momento, que reúna todos estes benefícios, o que torna inviável avaliar a atividade antioxidante de uma amostra através de um único método, o que se faz atualmente é reunir vários deles para obter os resultados esperados (RUFINO, 2008).

Apesar dos antioxidantes vegetais serem de natureza variada, os compostos fenólicos, que são os principais responsáveis pela atividade antioxidante e são representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, ligninas, xantonas e outros, têm despertado o interesse dos pesquisadores nas últimas décadas, devido ao seu potencial de aplicação (RAZAVI *et al.*, 2008) e por possuírem uma série de propriedades

farmacológicas, atuando sobre os sistemas biológicos (MORAES & COLLA, 2006). Moraes *et al.* (2006), verificaram que óleos essenciais de duas espécies de *Croton*, *C. zehntneri* e *C. argyrophyloides* apresentaram atividade antioxidante significativa, valorizando a utilização popular dessas espécies.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta e preparação do material botânico

O material botânico, folhas do *Croton linearifolius*, objeto deste estudo, foi coletado na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, localizada entre os municípios de Contendas do Sincorá-BA e Tanhaçu-BA, (13°56'34.61"S, 41°06'46.75"O), em três períodos: março, abril e setembro de 2013. Exsicatas do material botânico foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Feira de Santana (HUEFS), sob o número HUEFS 146620. Posteriormente, o material vegetal foi levado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LAPRON da UESB, para separação, pesagem e secagem. A pré-secagem foi realizada em estufa de circulação de ar a temperatura de 40°C, por um período de 12 horas e, em seguida, as folhas foram trituradas manualmente e submetidas à extração do óleo essencial.

Abaixo (Figura 1), pode-se perceber a diferença morfológica entre as plantas coletadas na estação chuvosa e na estação seca.

Figura 2: Espécie de *C. linearifolius* encontrada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) em diferentes períodos de coleta.



3.2 Extração dos óleos essenciais

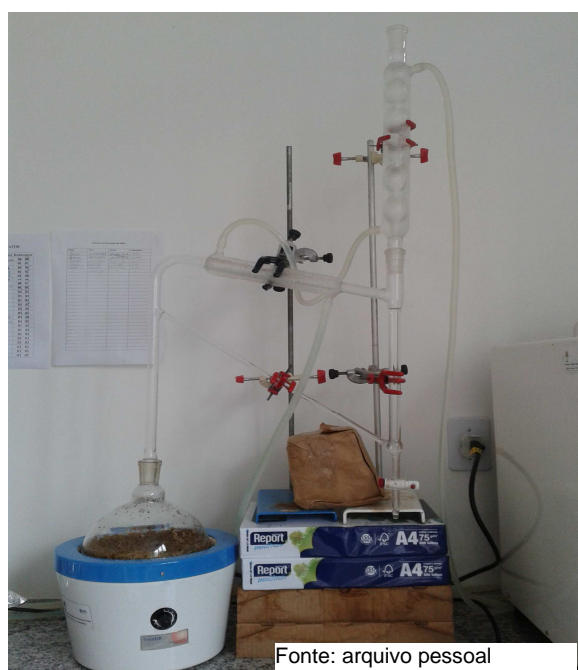
Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em extrator de Clevenger modificado (Figura 2). A tabela 1 apresenta o peso pós-secagem, do material vegetal.

Tabela 2. Peso do material coletado em diferentes períodos, após pré-secagem em estufa a 40°C por 12 horas.

Períodos de coleta	Massa seca das folhas em g
1ª coleta - março/2013	580
2ª coleta - abril/ 2013	225
3ª coleta - setembro/2013	250

Para cada extração foram pesadas cerca de 70 g de folhas secas e trituradas e adicionadas em um balão de fundo redondo de dois litros. Adicionou-se um litro de água deionizada, agitou-se bem, até que as folhas estivessem totalmente imersas na água e realizou-se a extração por um período de 2h e 30 minutos. Após o processo de extração, o óleo foi recolhido e a água residual foi eliminada através da adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Em seguida, o óleo foi pesado e armazenado em tubo eppendorf, o qual foi envolvido em papel alumínio e mantido sob refrigeração a 10°C até o momento da sua utilização. Para diferenciar os períodos de coleta, os óleos foram identificados como: óleo A (1ª coleta), óleo B (2ª coleta) e óleo C (3ª coleta).

Figura 3: Extrator de Clevenger modificado



3.3 Prospecção química dos óleos essenciais obtidos

Para a identificação preliminar dos constituintes químicos, os óleos essenciais foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se diferentes soluções reveladoras.

As placas cromatográficas foram feitas no laboratório, com 25 mm de espessura, através da preparação de uma suspensão de 7 g de sílica gel com indicador de ultravioleta (Marcherey-Nagel) em 15 mL de água deionizada. A suspensão foi espalhada sobre as cromatoplasmas com o auxílio de um espalhador e, posteriormente, levadas à estufa de secagem à 110°C, durante duas horas, para ativá-las antes da sua utilização. A análise qualitativa dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais foi realizada utilizando-se as soluções reveladoras listadas abaixo, preparadas de acordo com os protocolos descritos.

- Sulfato Cérico (CeSO_4) a 1% em Ácido Sulfúrico (H_2SO_4): pesou-se 2,5 g de CeSO_4 em um béquer e adicionou-se uma quantidade de água deionizada suficiente para dissolver o soluto, transferindo o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 250 mL. Na capela, utilizando-se uma proveta graduada, acrescentou-se 13,6 mL de H_2SO_4 concentrado, e completou-se o volume com água deionizada, agitando o balão para homogeneizar a solução.
- Vanilina a 0,1% em Etanol acidificado com H_2SO_4 : em um béquer pesou-se 100 mg de vanilina e dissolveu-se com 20 mL de etanol absoluto, transferindo-se seu conteúdo para um balão volumétrico de 100,0 mL. Com o auxílio de uma pipeta graduada de 5,0 mL, acrescentou-se 20 gotas de H_2SO_4 concentrado à solução, completando-se o volume com etanol.
- Ninhidrina a 0,2% em Metanol: em um béquer pesou-se 0,2 g de Ninhidrina e dissolveu-se com metanol, transferindo-se para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com metanol.
- Cloreto Férrico (FeCl_3) a 0,5% em Etanol: em um béquer pesou-se 0,5 g de FeCl_3 e dissolveu-se com quantidade suficiente de etanol. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com etanol.
- Reagente de Dragendorff Modificado: este reagente é preparado através da mistura de duas soluções, A e B. Para preparar a solução A, dissolveu-se 1,7 g

de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água deionizada; a solução B foi preparada com 16 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água deionizada. O reagente foi obtido misturando-se partes iguais das duas soluções. Transferiu-se 25,0 mL do reagente para um balão volumétrico de 100,0 mL, acrescentou-se 10,0 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume com água deionizada.

Para a identificação dos metabólitos secundários, pequenas quantidades dos óleos essenciais foram colocadas em uma placa de toque, solubilizadas com diclorometano PA e as soluções aplicadas com um capilar nas placas cromatográficas preparadas, a cerca de 1 cm da parte inferior. Utilizou-se como eluente uma solução de diclorometano PA, em um béquer, no qual as placas cromatográficas foram inseridas na posição vertical, deixando-se eluir até que a fase móvel alcançasse aproximadamente 1 cm da borda superior. Logo após, borrifou-se as placas com as soluções reveladoras descritas anteriormente, colocando-as em placa aquecedora por 60 segundos.

3.4. Composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais do *C. linearifolius* foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM), o que permitiu a separação, identificação e quantificação dos seus constituintes químicos majoritários. Essa etapa do experimento foi realizada em parceria com a Universidade do Vale do Itajaí/UNIVALI – Santa Catarina.

O cromatógrafo gasoso usado foi da marca Shimadzu, com detector de massa modelo GCMS-QP2010S (Figura 4) apresentando interface acoplada a um computador para controle e aquisição de dados com sistema de amostragem automatizada. As condições de operação do equipamento foram às seguintes: Coluna: Marca Agilent – DB-1: 0,25 mm x 30 m, espessura do filme 0,25 um de 100% de dimetil polisiloxano; Forno: Rampa = início 100°C (2min) até 200°C a 10°C/min, logo após a 25°C/min até 300°C permanecendo por 4 min; Volume de injeção: 1,0 uL; Detector: MS – razão m/z com scan 40 a 450 uma; Eluente: He, 0,75 mL/min (100°C); Injetor: splitless = razão do split 50,0:1 a 280°C. As análises dos espectros de massas foram feitos por comparação aos espectros encontrados na biblioteca NIST 8.0.

Figura 4: Cromatógrafo gasoso Shimadzu, acoplado ao detector de massas.



3.5 Análise das atividades antioxidantes

A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais foi realizada por dois diferentes métodos: sequestro de radicais livres DPPH e poder redutor de íons ferro (FRAP).

3.5.1 Método DPPH (Atividade sequestrante de radicais livres DPPH)

Inicialmente, foi determinado através da cinética de reação, o tempo necessário para se considerar como completa, a reação entre os componentes do óleo essencial obtido das folhas de *C. linearifolius*, com uma solução de concentração conhecida de DPPH. Para tanto, transferiram-se alíquotas de 0,1 mL de solução metanólica do óleo essencial a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, para três frascos âmbar e, em ambiente escuro, adicionou-se 3,9 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06 mM e homogeneizou-se as soluções em agitador de tubos. Os testes foram realizados em triplicata. Utilizou-se o metanol como branco para zerar o espectrofotômetro e, em seguida, foram feitas as leituras das absorvâncias das soluções a 515 nm, a cada 5 minutos, até as leituras se estabilizarem.

Para a quantificação da atividade antioxidante pelo método DPPH, adotou-se a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2006). Foram adicionados, em tubos de ensaio, 0,1 mL de cada uma das diluições obtidas a partir dos óleos essenciais (2,5, 5,0 e 10,0 mg.mL^{-1}), bem como os controles positivos, butilhidroxitolueno (BHT), quercetina e rutina (0,25, 0,5 e 1,0 mg.mL^{-1}) em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se para os tubos de ensaio, 3,9 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06mM e homogeneizou-se as soluções em agitador de tubos (Figura 3). A solução de DPPH foi preparada pesando-se 2,4 mg do reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich), diluído em metanol PA, completando-se o volume para 100,0 mL em balão volumétrico. As soluções foram mantidas no escuro a temperatura ambiente e, após 50 minutos (tempo ótimo determinado através da cinética de reação), foram feitas as leituras em espectrofotômetro UV-Vis, em comprimento de onda de 515 nm. Foi utilizado como branco a mistura de 3,9 mL da solução de DPPH e 0,1 mL de metanol PA. A curva de calibração foi preparada com soluções de DPPH nas concentrações de 10 a 60 μM em álcool metílico, e as absorvâncias foram lidas no comprimento de onda de 515 nm, para obter a equação de regressão linear.

A partir das leituras das absorvâncias das amostras, foi calculado o EC_{50} , que corresponde à quantidade de óleo necessário para reduzir em 50% a concentração inicial

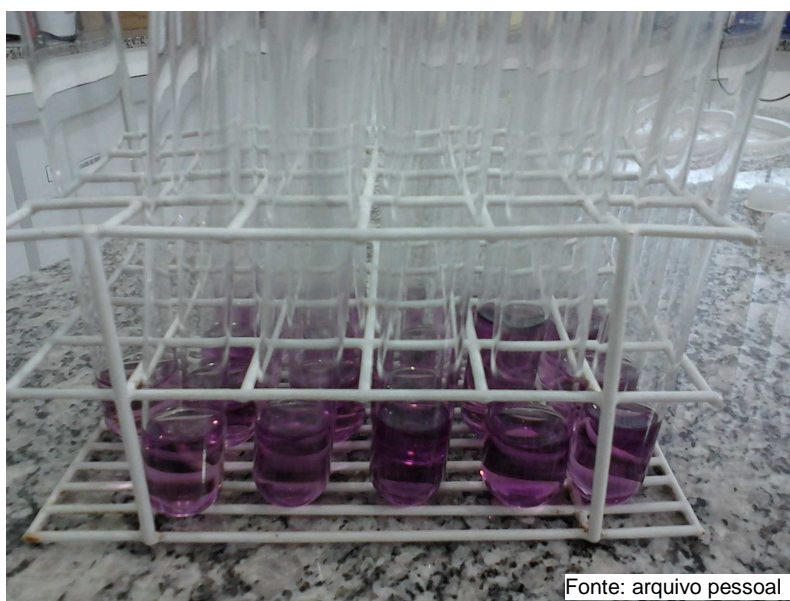
do radical DPPH, e o valor final foi expresso em g de óleo / g de DPPH. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical e foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do radical} = [(A_o - A_f) / A_o] \times 100$$

Onde: A_o : absorvância inicial

A_f : absorvância final

Figura 5. Testes realizados com as amostras dos óleos essenciais com o radical livre DPPH.



3.5.2 Método FRAP (Poder redutor dos íons ferro)

Para a quantificação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método FRAP, adotou-se a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2006). A solução do reagente FRAP foi obtida misturando-se 25,0 mL de tampão acetato a 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL da solução de 2,4,6-Tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, marca Sigma-Aldrich), na concentração de 10 mM em solução aquosa de HCl a 40 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM, utilizando-se logo após seu preparo.

Transferiu-se para tubos de ensaio, 90,0 μL das soluções dos óleos essenciais A, B e C na concentração de 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos controles positivos (BHT, Rutina

e Quercetina), em triplicata e acrescentou-se 270,0 µL de água deionizada e 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizando-se em agitador de tubos. As soluções foram mantidas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, fazendo-se a leitura das absorvâncias ao final desse tempo, a 595 nm. Construiu-se a curva padrão com soluções de sulfato ferroso, nas concentrações de 500 a 2000 µM. As absorvâncias das amostras foram lidas e os resultados foram expressos em mg de Fe²⁺ / g de óleo essencial.

3.5.3. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais adotou-se a metodologia proposta por Sousa *et al.* (2007), com modificações, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura foi realizada a 750 nm e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g do óleo essencial das folhas de *C. linearifolius*.

Em balão volumétrico de 10,0 mL, uma alíquota de 500,0 µL das soluções dos óleos essenciais A e B, na concentração de 3,0 mg.mL⁻¹, foi agitada com 500,0 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6,0 mL de água deionizada, por 60 segundos, em ambiente escuro. Após esse tempo, 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15% foi adicionada à mistura e, novamente agitado por 30 segundos. Finalmente, o volume foi completado para 10,0 mL com água deionizada. Após 2 horas em ambiente escuro, as leituras das absorvâncias foram realizadas a 750 nm.

3.6 Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para a análise estatística dos resultados foi feita uma análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5% e, aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software SAS (Statistical Analysis System) 9.1.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento dos Óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas do *C. linearifolius*, coletadas nos meses de março, abril e setembro de 2013, foram extraídos com rendimentos descritos na Tabela 2. O cálculo de porcentagem foi feita em relação à massa seca das folhas de cada coleta. Angélico (2011), apresentou rendimentos de 0,075% e 0,72% para os óleos essenciais obtidos das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropifolius*. O autor atribui essa variação a fatores como, temperatura ambiente, umidade do ar, diversidade genética de cada espécie, bem como a época do ano.

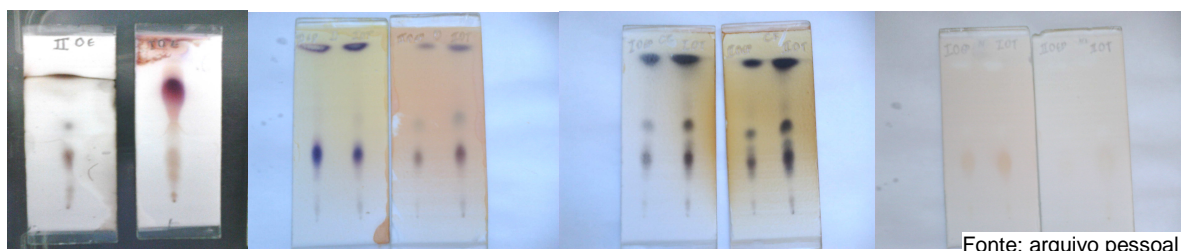
Tabela 3. Rendimento de extração dos óleos essenciais de *C. linearifolius*.

Óleos	Peso inicial da massa seca em g	Volume em mL	Massa em mg	% em massa
A	580	3,2	0,73	0,13
B	225	1,2	0,33	0,15
C	250	1,5	0,35	0,14

4.2. Prospecção Química por CCD

Nos testes de identificação preliminar, foram identificados diferentes metabólitos secundários nos óleos essenciais A, B e C. A revelação das cromatoplasmas com vanilina ácida indicou a presença de terpenos ou terpenóides, devido ao aparecimento de manchas amareladas, arroxeadas e azuladas. A revelação com o reagente de Dragendorff indicou a presença de alcalóides, devido ao aparecimento de manchas arroxeadas nas cromatoplasmas. A revelação com o Cloreto Férrico indicou a presença de compostos fenólicos, devido ao aparecimento de manchas azuladas (Figura 4).

Figura 6. Placas cromatográficas reveladas com os seguintes reveladores: 1- Vanilina ácida, 2- Dragendorff, 3- Cloreto Férrico e 4- Ninhidrina.



Fonte: arquivo pessoal

As placas cromatográficas foram analisadas de acordo a presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos secundários identificados pelos reveladores, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 4. Resultados da prospecção química preliminar por CCD dos óleos essenciais de *C. linearifolius*.

Classe de metabólitos secundários	Revelador	Coloração desenvolvida	Resultado
Compostos Aminados	Ninhydrina	Púrpura	-
Terpenóides e Esteróides	Vanilina acidificada	Violeta - Roxo	+
Compostos Fenólicos	Cloreto férrico	Azul escuro	+
Alcalóides	Dragendorff (modificado)	Azul - Roxo	+

(+) reação positiva (-) reação negativa

4.3. Composição química do óleo essencial obtido das folhas de *C. linearifolius*.

Através da utilização da técnica de Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foi possível separar, quantificar e identificar os constituintes químicos majoritários presentes nos óleos essenciais das folhas do *C. linearifolius*, coletadas nos meses de março, abril e setembro de 2013 (Figura 5). Tais resultados foram possíveis a partir da determinação das áreas dos principais picos observados nos cromatogramas de cada um deles, bem como da comparação dos espectros de massas de cada constituinte presente no óleo com aqueles encontrados na biblioteca da base de dados do NIST 8.0.

Figura 7. Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas do *C. linearifolius*, coletadas nos meses de março, abril e setembro de 2013, obtido por CG-EM.

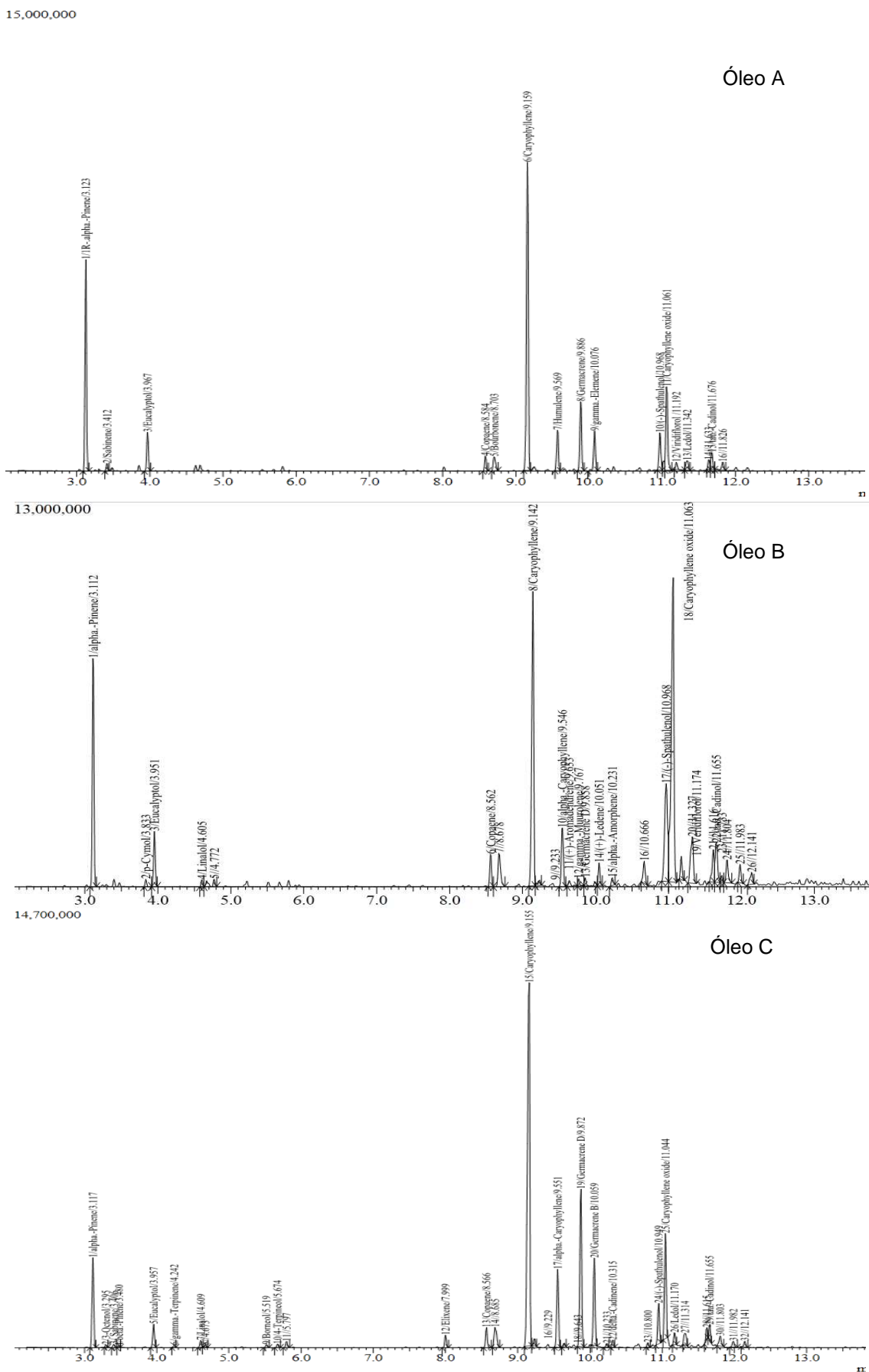
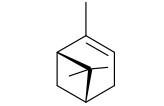
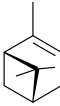
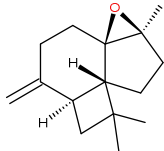
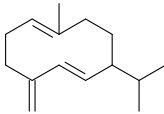
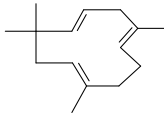
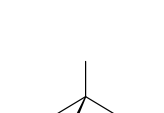
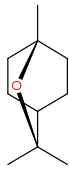
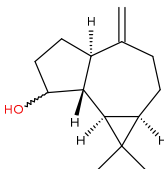
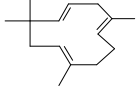
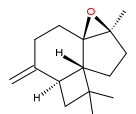
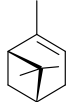
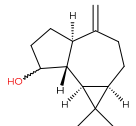
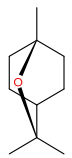
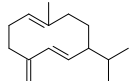


Tabela 5. Dados dos constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas do *C. linearifolius* coletadas no mês de março de 2013 (óleo A) na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.

Composto	Estrutura química	TR*	Classe de Terpenos	% do metabólito no óleo
β -cariofileno		9,159	Sesquiterpeno	33,69
α -pineno		3,123	Monoterpeno	23,10
óxido de cariofileno		11,061	Sesquiterpeno	9,13
germacreno		9,886	Sesquiterpeno	7,52
α -cariofileno		9,569	Sesquiterpeno	4,42
γ -elemeno		10,076	Sesquiterpeno	4,32
eucaliptol		3,967	Monoterpeno	4,22
espatulenol		10,968	Sesquiterpeno	4,05

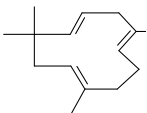
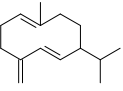
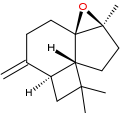
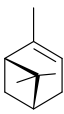
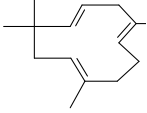
*TR: Tempo de Retenção

Tabela 6. Dados dos constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas do *C. linearifolius* coletadas no mês de abril de 2013 (óleo B) na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.

Composto	Estrutura química	TR*	Classe de Terpenos	% do metabólito no óleo
β -cariofileno		9,175	Sesquiterpeno	20,94
óxido de cariofileno		11,063	Sesquiterpeno	21,65
α -pineno		3,112	Monoterpeno	16,22
espatulenol		11,000	Sesquiterpeno	6,95
eucaliptol		3,992	Monoterpeno	3,92
germacreno		8,055	Sesquiterpeno	3,56

*TR: Tempo de Retenção

Tabela 7. Dados dos constituintes químicos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas do *C. linearifolius* coletadas no mês de setembro de 2013 (óleo C) na Floresta Nacional Contendas do Sincorá.

Composto	Estrutura química	TR*	Classe de Terpenos	% do metabólito no óleo
β -cariofileno		9,192	Sesquiterpeno	32,25
germacreno D		9,917	Sesquiterpeno	13,99
óxido de cariofileno		11,075	Sesquiterpeno	9,33
α -pineno		3,117	Monoterpeno	7,97
germacreno B		10,100	Sesquiterpeno	7,76
α -cariofileno		9,592	Sesquiterpeno	6,92

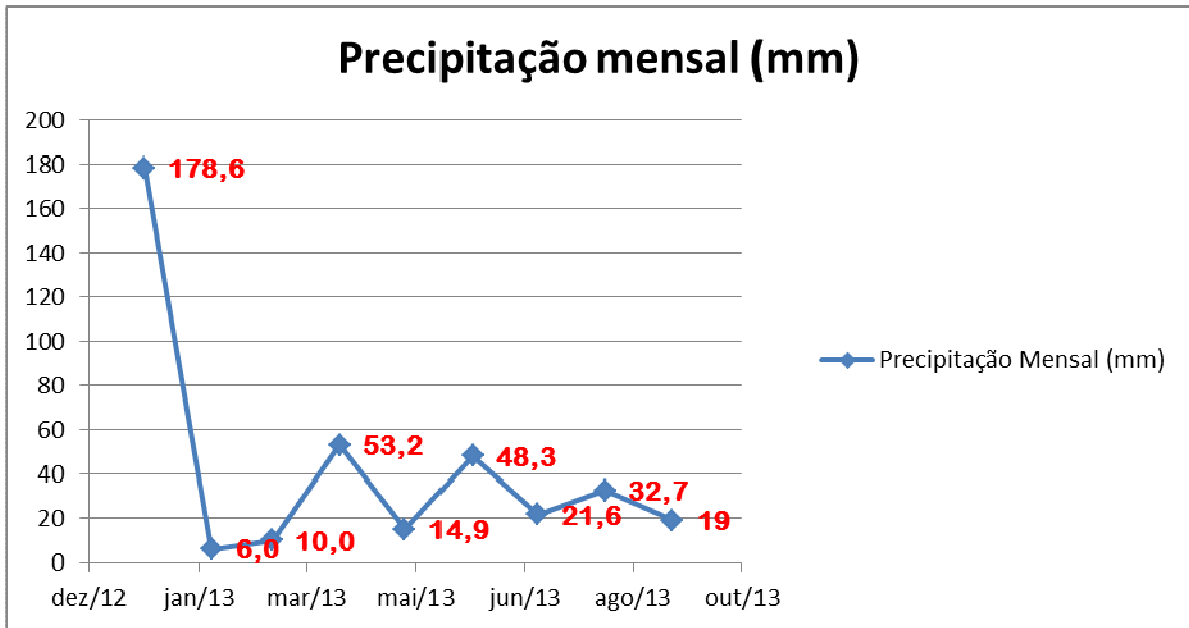
A maioria dos compostos identificados nos óleos essenciais pertence à classe dos sesquiterpenos, com ocorrência de alguns monoterpenos. No cromatograma do óleo A (Figura 6, Tabela 4), os componentes encontrados foram o β -cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno, humuleno e espatuleno, correspondendo a um percentual de 72,68% dos constituintes identificados. Os compostos cadinol, ledol, viridiflorol, sabineno, bourboneno e copaeno representam menos de 1,7% do total dos componentes do óleo essencial. Os únicos monoterpenos identificados neste estudo foram o α -pineno e o eucaliptol, representando 27,32% dos constituintes do óleo. Entre os compostos identificados, o β -cariofileno foi o componente encontrado em maior concentração (33,69%), seguido do α -pineno (23,10%), do óxido de cariofileno (9,3%) e do germacreno (7,52%).

Na análise do óleo B (Figura 6, Tabela 5), também foi possível identificar os constituintes químicos majoritários e pode-se perceber que este, apresentou constituintes

químicos semelhantes ao óleo A, o β -cariofileno correspondeu a 20,94% dos constituintes majoritários, seguido do óxido de cariofileno com 21,65% e do α -pineno com 16,22%, porém, o óxido de cariofileno apareceu em maior porcentagem, enquanto a porcentagem do β -cariofileno reduziu em mais de 10%. Os outros compostos representaram um percentual inferior a 7%. Na análise cromatográfica do óleo C (Figura 6, Tabela 6), a quantidade de constituintes majoritários encontrados foi reduzida, percebendo um aumento na composição do β -cariofileno (32,25%) em comparação aos demais compostos bem como, a identificação do germacreno D, que até então não aparecia em quantidade significativa. Spósito (2013), relaciona a atividade inseticida comprovada para a espécie *C. linearifolius* os compostos β -cariofileno e óxido de cariofileno presentes nos óleos essenciais. Outros estudos evidenciam a ocorrência acentuada dos compostos β -cariofileno, α -pineno e óxido de cariofileno em óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*, entre elas, o *C. heliotropiifolius* (ANGÉLICO *et al.*, 2012), *C. argyrophyloides* (Morais *et al.*, 2006), *C. muscicapa* (FREITAS *et al.*, 2010) e *C. zambesicus* (ANGÉLICO, 2011). Outros pesquisadores também avaliaram a composição química de espécies do gênero *Croton* e demonstraram a presença de constituintes químicos diversos presentes em seus óleos essenciais, a exemplo do *C. nepetaefolius*, que apresenta o metil-eugenol (MORAIS *et al.*, 2006), o *C. zehntneri*, que apresenta o E-anetol, (MORAIS *et al.*, 2006) e o estragol (COSTA *et al.*, 2008) e o *C. heliotropiifolius*, que contém o eucaliptol (ANGÉLICO *et al.*, 2012) como compostos majoritários.

A variação na quantidade dos constituintes majoritários entre os óleos estudados está relacionada ao período de coleta, uma vez que, mudanças climáticas influenciam na produção de alguns metabólitos secundários. A Figura 7 demonstra a precipitação mensal acumulada de acordo com estudos feitos pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE (FREITAS *et al.*, 2011).

Figura 8. Gráfico da precipitação mensal no ponto de coleta na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, durante os meses de dezembro de 2012 a outubro de 2013.



Angélico (2011), observou que diferenças na composição química dos óleos essenciais podem estar relacionadas à fisiologia vegetal, pois, a composição e quantidade de metabólitos produzidos dependem, principalmente, das enzimas específicas que estimulam a produção de compostos voláteis em um órgão, bem como do estágio de desenvolvimento e de estresses abióticos sofridos ao longo das estações. Morais (2009), afirma que a produção dos óleos essenciais é mais efetiva em ambientes com temperaturas elevadas, no entanto, se o aumento for excessivo, o seu teor poderá ser reduzido. Outros fatores influenciam diretamente tanto na concentração quanto na composição dos óleos essenciais são a intensidade luminosa e a sazonalidade.

4.4. Atividade Antioxidante

4.4.1 Cinética de reação

A leitura da absorbância da solução de DPPH no tempo inicial (t_0) foi de 0,569. A média das leituras das amostras nos primeiros 5 minutos foi de 0,545. A cada 5 minutos as absorbâncias das amostras foram monitoradas e, após 50 minutos, percebeu-se a estabilização das leituras, com valor médio de 0,538.

4.4.2 Método DPPH

As atividades antioxidantes dos óleos essenciais das folhas de *C. linearifolius*, baseada na captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) estão apresentadas em porcentagem de inibição do radical na Tabela 7.

Observou-se que os percentuais de redução do radical livre DPPH, produzidos pelos óleos essenciais da espécie avaliada, mesmo em concentrações elevadas (10,0 mg.mL⁻¹, 5,0 mg.mL⁻¹ e 2,5 mg.mL⁻¹) foram baixos. Apesar do óleo B ter produzido a maior porcentagem de inibição nos radicais DPPH em relação aos demais, verifica-se que estes percentuais são muito inferiores aos dos padrões analisados, mesmo estes estando em concentrações 10 vezes menores (1,0 mg.mL⁻¹, 0,5 mg.mL⁻¹ e 0,25 mg.mL⁻¹). Isso indica que uma baixa capacidade antioxidante dos óleos analisados pelo método do DPPH.

Em trabalho realizado por Hess & Zanini (2008), os resultados demonstraram que os óleos essenciais das folhas e flores de *Vernonia scabra* são inativos frente ao radical livre DPPH, devido ao fato dos óleos desta espécie apresentarem uma composição exclusiva de terpenos, com ausência de fenilpropanóides, compostos que geralmente evidenciam significativas atividades antirradicais.

Neste trabalho, também não foram encontrados fenilpropanóides em nenhuma das amostras analisadas, o que corrobora com os resultados dos autores.

Alguns fenilpropanóides comuns em óleos essenciais de manjeriço, erva-doce e cravo, também têm sido relatados como principais constituintes dos óleos essenciais de algumas espécies de *Croton*, a exemplo do *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*, onde foi comprovada uma atividade antioxidante significativa, utilizando o método TBAR's (quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) em trabalho realizado por Moraes *et al.*, 2006.

Tabela 8. Porcentagens de inibição do radical livre DPPH produzidas pelos óleos essenciais de *C. linearifolius* e pelos padrões positivos em diferentes concentrações.

Amostras	Inibição (%) ± DP	CE ₅₀ (µg/mL) ± DP
Óleo A	2,60 ± 0,007 ^c	289,54 ± 0,040 ^e
Óleo B	9,36 ± 0,083 ^c	81,50 ± 0,013 ^d
Óleo C	4,11 ± 0,146 ^c	424,71 ± 0,06 ^f
Quercetina	93,77 ± 0,002 ^a	3,192 ± 0,006 ^a
Rutina	74,94 ± 0,12 ^a	6,741 ± 0,010 ^b
BHT	45,16 ± 0,13 ^b	13,790 ± 0,005 ^c

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4.3 Método FRAP

Os resultados da atividade antioxidante dos óleos essenciais encontrados pelo método FRAP estão demonstrados na Tabela 8. Existe diferença na produção de Fe²⁺ entre os óleos, indicando que, o período de coleta é importante na produção de espécies antioxidantes. No entanto, esses valores são relativamente baixos quando comparados aos padrões. Essa diferença pode refletir na habilidade dos compostos antioxidantes presentes nos óleos em reduzir o íon ferro em sistemas *in vitro* (Rufino, 2008), uma vez que, neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe³⁺-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe²⁺-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas (Sucupura *et al.*, 2012).

Tabela 9. Produção de íons Fe²⁺ pelos óleos essenciais de *C. linearifolius* e pelos padrões positivos.

Amostras	FRAP (mg de Fe ²⁺ / g óleo) ± DP
Óleo A	54,86 ± 0,533 ^c
Óleo B	13,05 ± 0,662 ^d
Óleo C	19,77 ± 1,165 ^d
Quercetina	167,872 ± 0,002 ^a
Rutina	148,939 ± 0,12 ^b
BHT	126,699 ± 0,13 ^b

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4.4 Compostos Fenólicos

De acordo com a metodologia seguida, os óleos essenciais A e B apresentaram resultado positivo para compostos fenólicos. O teor de compostos fenólicos totais, encontrado para o óleo A foi de 276,79 mg de EAG / g de óleo essencial, e no óleo B foi de 155,77 mg de EAG / g de óleo.

Oliveira (2009), afirma que esse método não é eficaz, porque ele superestima o conteúdo fenólico em larga extensão. Angelo e Jorge (2007), destacam ainda que, apesar do método utilizado ser um dos mais comuns para identificar compostos fenólicos em vegetais, ele não é específico, pois o reagente de Folin é capaz de reagir com outros compostos doadores de elétrons presentes no extrato, produzindo resultados falso positivos. Assim sendo, os resultados encontrados para os óleos essenciais analisados enquadram-se nessa premissa, uma vez que a análise dos óleos por CG-EM demonstrou que os óleos são constituídos principalmente por compostos da classe dos terpenos, não sendo identificados compostos fenólicos.

5- CONCLUSÕES

A análise dos óleos essenciais de *Croton linearifolius* por CG-EM demonstrou que os mesmos são ricos em constituintes terpênicos, principalmente pertencentes à classe dos sesquiterpenos.

Os resultados da atividade antioxidante demonstraram que os óleos essenciais de *C. linearifolius* não apresentaram uma boa capacidade antioxidante quando analisados pelos métodos do DPPH e FRAP.

Entretanto, os teores de compostos fenólicos encontrados nos dois óleos analisados (A e B), foram relativamente altos, indicando resultados falso positivos. Esses resultados demonstram a capacidade dos constituintes presentes nos óleos em doar elétrons para os componentes do reagente de Folin-Ciocalteu, indicando que alguns deles podem apresentar propriedades antioxidantes.

Este trabalho fornece subsídios para descobertas relevantes, uma vez que a literatura é carente de informações sobre o *C. linearifolius*, evidenciando a necessidade de pesquisas que visem investigar a composição química, as atividades biológicas, a toxicidade e o potencial para utilização comercial de produtos e extratos obtidos a partir desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ANGÉLICO, E. C. *Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de Croton heliotropiifolius Kunt e Croton blanchetianus Baill.* 2011. 86p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde Tecnologia Rural. Patos. 2011.
- ANGÉLICO, E. C. *et al.* Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (Sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. *Revista de Biologia e Farmácia*, v 07, n 01, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- 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.
- BERRY, P.E. *et al.* Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto). *American Journal of Botany*, v 92, 2005.
- CASTRO, H. G. *et al.* Contribuição ao estudo das plantas medicinais Metabólitos Secundários. 2. ed. Visconde do Rio Branco: *Suprema*, 113 p. 2004.
- COSTA, J. G. M. da. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p. 583-586, Out./Dez. 2008.
- CUNHA E SILVA, S. L. da. *et al.* Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 4, p. 252-258. 2010.
- DOSSIE, Antioxidantes. *Revista FIB (Food Ingredients Brasi)[online]*. São Paulo, n. 06, p. 16-22, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>> Acesso em: 29 jun. 2013.
- FARAH, A.; DONÂNGELO, C.M. Compostos fenólicos em café. *Braz. J. Plant Physiol.* [online], v.18, 2006.
- FONTENELLE, R. O. dos S. *Efeito antifúngico de óleos essenciais de Lippia sidoides Cham., Croton argyrophylloides Muell., Croton zehntneri Pax et Hoffm., Croton nepetaefolius Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e Candida spp. isolados de cães.* 2008. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2008.
- FREITAS, J.V.B. *et al.* Constituintes, químicos voláteis das folhas de *Croton muscicapa* Mull. Arg. In: Congresso Brasileiro de *Química*, 2010. *Resumo...*, 2010.
- FREITAS, R. M. *et al.* Virtual laboratory of remote sensing time series: visualization of MODIS EVI2 data set over South America. *Journal of Computational Interdisciplinary Sciences* (2011). Disponível em: <<http://www.epacis.net/jcis>>

HENRIQUES, A.T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M.A. Principais aspectos químicos e biológicos dos terpenos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: UNIVALI Editora, 2009.

HESS, S. C.; ZANINI, P.B.; Estudos químicos e avaliação da atividade antioxidante de *Vernonia scabra*. X Encontro de iniciação científica da UFMS. Mato Grosso do Sul, 2008.

IBAMA. Monitoramento dos biomas brasileiros: bioma caatinga. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2010.

JAKIEMIU, E. A. R *et al.* *Estudo da composição química e do rendimento do óleo essencial de tomilho (Thymus vulgaris L.). Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 683-688, jul./set. Londrina 2010.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 16, n.4, p.433-441, 2003.

GIULIETTI, A.M. *et al.* Plantas endêmicas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V.S.B. *et al.*, (ed.). *Vegetação e flora das caatingas*. Recife: APNE / CNIP, 2002.p.103-115.

LIMA, M. G. A. *et al.* Effect of stalk and leaf extracts from Urophorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. *Revista Instituto Medicina Tropical*, v. 48, p. 211-214, 2006.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, v.1, 2006.

MACIEL, M.V. *et al.* Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. *Revista brasileira de plantas medicinais [online]*. vol.12, n.1, p. 105-112. ISSN 1516-0572, 2010.

MARTINS, C. de M. *Estudo químico, atividade antioxidante, atividade microbiana e análise do óleo essencial da espécie Kielmeyera coriácea Mart. & Zucc (pau-santo) do Cerrado*. 2012. 117 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Uberlândia, 2012.

MATTOS, T. C. G. de. Mecanismos da ação antioxidantes dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro. 2009. 206 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade de Brasília, Instituto de Química, Brasília, 2009.

MORAIS, S. M. de. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Química Nova*, v. 29 n.5. São Paulo, 2006.

MORAIS L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 2. Brasília, 2009.

MORAES, P. F.; COLLA, M. L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, Legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, 109-122, 2006.

- NETO, P. A. de S. P.; CAETANO, L. C. *Plantas Mediciniais: Do popular ao científico*. Maceió: EdUfal, 2005. 90 p.
- NUNES, R. S. Avaliação da atividade antioxidante e antimutagênica da acerola (*Malpighia glabra* L). 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada). Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, 2007.
- OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. S. Vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, 689-702, 2009.
- OLIVEIRA, A. M. C. de. *Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero Capsicum spp.* 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
- OLIVEIRA, R. A. G. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p. 77-82, Jan./Mar. 2006.
- PALMEIRA-JR, R. S. F. *et al. c.* *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 16, 2006.
- PERINI, V. B. de M. *Análise do óleo essencial, produção de biomassa e Fungitoxicidade do capim citronela (cymbopogon nardus)*. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2011.
- PEREIRA. R.J; CARDOSO. M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade*. v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012.
- PRETTO, J. B. *Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense*. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- PORTO, N. A. *Citotaxonomia de espécies do gênero Croton I. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil*. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia. 2007.
- RAMALHO, V. C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v.29, n.4. São Paulo, 2006.
- RANDAU, K.P. *et al.* Estudo farmacognóstico de *C. rhamnifolius* H.B.K e *C. rhaminifolioides* Pax & Hoffms (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 14, 2004.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Farmacognosia e farmacobiologia*. São Paulo: Premier, 1997. 327p.
- ROCHA, F. F. *et al.* Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effect of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, 2008.

- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Comunicado Técnico *On line* Embrapa 125. Fortaleza, CE. Dezembro, 2006.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico *On line* Embrapa 127. Fortaleza, CE. Julho, 2007.
- RUFINO, M. S. M. *Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais*. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2008.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, v. 18, n. 1, p. 11-33. 2007.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5° ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 403-434, 2004.
- SANTOS, V.M.R. dos. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, Vol. 30, p 159-170, 2007.
- SILVA, A. P. N. et al. Dinâmica espaço-temporal da vegetação no semi-árido de Pernambuco. *Revista Caatinga*. Natal, v. 22, n. 4, p. 195-205, 2009.
- SILVA, J. M. C. da. et al. *Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco. 2003. p. 47- 78.
- SILVA, W. J. et al. Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, v. 99, 2008.
- SIMÕES, C.M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, ED.UFRGS, 2007.
- SOUSA, M. C. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, Vol. 30, p 351-355, 2007.
- SPITZER, A. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, n 14, p 263-269, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artemed: 2009.
- TORRES, M. C. M. *Estudo Químico e Biológico de Croton regelianus Var. matosii (Euphorbiaceae)*. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

VIZZOTO, M.; KROLOW, C.; WEBER, G. E. B. *Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.