

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CROTON SP.

Ane Caroline Rocha Batista¹, Cláudio Costa dos Santos²

Resumo: O óleo essencial das folhas frescas do *Croton* sp, chamado de OECS, foi obtido pelo processo de hidrodestilação e sua composição química foi caracterizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A análise crítica demonstrou que o composto majoritário do OECS foi o β -copaeno-4-ol com teor 32,45%. No teste de atividade citotóxica em MTT foi averiguado um potencial inibidor (CI-50) promissor do óleo essencial das folhas frescas do *Croton* sp para células cancerígenas humanas de glioblastoma (SNB-19) com concentração 40 mg.mL⁻¹ e de cólon (HCT-116) com concentração 31 mg.mL⁻¹.

Palavras-chaves: Óleo essencial, *Croton* sp, hidrodestilação, atividade citotóxica.

1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica. Frequentemente apresentam odor agradável e marcante [1]. Estes óleos, constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, normalmente são usados “*in natura*”, isto é, como misturas, pois as propriedades organolépticas estão associadas a vários componentes [2].

Os óleos essenciais podem ser divididos em 2 grupos: aqueles obtidos pela compressão de frutas cítricas e os obtidos por destilação a vapor de materiais vegetais, como folhas e sementes [3]. Possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos [4].

Algumas espécies do gênero *Croton* (Euphorbiaceae), como a pertencente no presente estudo, são produtoras de óleos essenciais e conhecidas popularmente como marmeleiro, canelas e velames. Estas plantas são comumente encontradas na região Nordeste, especialmente no Estado do Ceará [5].

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo conhecer a potencialidade de uma planta da região do semiárido, por meio da extração do óleo essencial, identificar sua composição química e testar sua atividade citotóxica.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. O gênero *Croton*.

O gênero *Croton* é o segundo gênero mais representativo da família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Crotonae, e está constituído por aproximadamente 1300 espécies de ervas, arbustos e árvores. Cerca de 650 espécies ocorrem na América e aproximadamente 300 destas existem no Brasil com muitos representantes ocorrendo na região Nordeste [6].

As espécies de *Croton* nativas do Nordeste são conhecidas com as denominações populares: marmeleiros, canelas e velames. Os marmeleiros são arbustos ou pequenas árvores. São plantas aromáticas que produzem óleos essenciais com rendimentos que variam de 0,5% a 1,7%. Dentre essas plantas podemos citar como exemplos as seguintes espécies: “marmeleiro preto” (*Croton sonderianus*), “marmeleiro branco” (*Croton jacobinensis*) e “marmeleiro sabiá” (*Croton nepetaefolius*). As canelas silvestres são arbustos com folhas e ramos de aromas fortes, característico, semelhante ao da erva-doce. Alguns espécies com nomes populares são “canela-de-cunhã”, “canela de cheiro”, “canela-braba”, “canela-mansa”, “canelinha”, etc. Os velames são arbustos e subarbustos que também recebem denominações específicas “velames”, “velaminho”, “velame-de-cheiro”, “velame verdadeiro”. São também plantas produtoras de óleos essenciais. São geralmente plantas muito rústicas, resistentes a longos períodos de seca [5].



Figura 1: Fotos do *Croton* sp com detalhes das folhas, flores e frutos. (Autoria própria).

2.2. Processo de hidrodestilação

Existem três variações diferentes do processo de destilação com água/vapor: destilação com água (hidrodestilação), destilação com água e vapor e destilação a vapor. Na hidrodestilação, a planta aromática permanece em contato com a água fervente, podendo estar completamente imersa ou

flutuando [7]. A hidrodestilação é um dos processos mais antigos para obtenção de óleos essenciais. Esse processo utiliza, para destilação de plantas em laboratório, um aparato conhecido como clewenger [8].

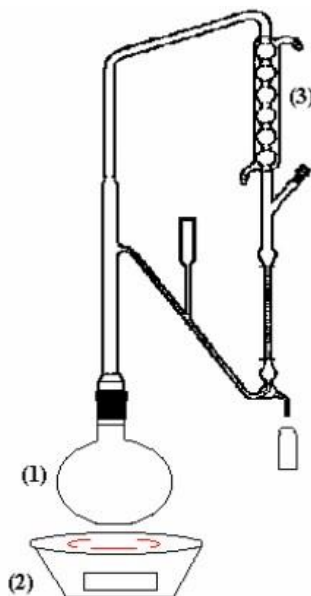


Figura 2: Aparelho Clevenger (GOMES, 2003).

O óleo essencial que se deseja extrair, em contato com a água aquecida, receberá a pressão das moléculas de vapor d'água em ebulição, sendo arrastados até um resfriador onde serão condensados, e assim, separados da água [9].

2.3. Cromatografia Gasosa Acoplada a o Espectômetro de Massa

A cromatografia gasosa é um processo de separação em que a fase móvel é um gás, e a fase estacionária é um sólido (cromatografia gás-sólido) ou um líquido (cromatografia gás-líquido) [10]. Dentre as inúmeras técnicas de análise instrumental, a cromatografia gasosa (CG) destaca-se com excelência para separação, detecção e identificação de compostos voláteis e semivoláteis em misturas complexas [11].

SEQUINEL (2010) afirma que na cromatografia gasosa, a eficiência do processo de separação é influenciada por uma série de fatores, dentre os quais se pode citar: tempo de retenção, comprimento da coluna, temperatura da coluna, pressão do gás de arraste, complexidade da amostra, técnica de injeção, entre outros [12].

Inicialmente a amostra é introduzida no injetor aquecido (com o auxílio de uma micro-seringa), onde é vaporizada e transferida com o auxílio do gás de arraste para a coluna cromatográfica colocada dentro de um forno pré-aquecido. Os componentes da amostras são eluídos e conduzidos para o detector conectado na saída da coluna. O detector emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de picos [13].

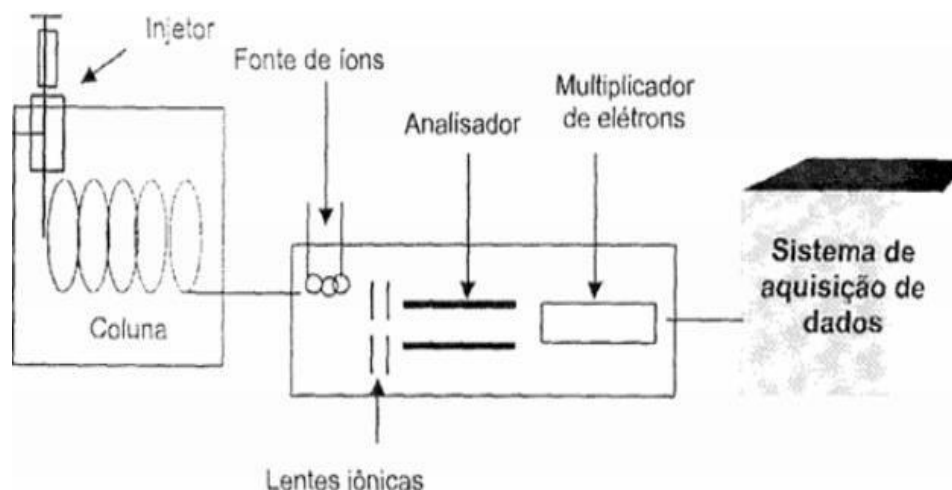


Figura 3: Esquema geral de Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (SILVA, 2010) [14].

As análises de GC-MS foram realizadas em um Agilent Instrumento 7890B-GC / 5977A-MS equipado com uma coluna capilar de sílica fundida VF-5MS não polar (30 m × 0,25 mm DI, espessura de filme de 0,25 µm) utilizando uma proporção de divisão de 1:30 e hélio a 1,5 mL min⁻¹ como o gás portador. A temperatura do injetor e a temperatura do detector foram fixadas em 250 °C. A temperatura do forno foi elevada de 70 para 180 °C a 4 °C min⁻¹ e depois para 250 °C a 10 °C min⁻¹. Os espectros de massa foram registrados em uma faixa de razão massa-carga (m / z) entre 30 e 450.

2.4. Índice de Kovats

Devido à presença de estruturas similares, homogeneidade heteroatômica e graus de saturação similares, o uso de índices de retenção, (RI) como ferramentas auxiliares na identificação de compostos, é bastante usual, especialmente no campo de óleos essenciais [15]. O índice de Kovats é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono [16].

O índice de Kovats pode ser calculado pela equação 1:

$$RI = 100n + 100(m - n) \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(m)} - \log t'_{R(n)}} \right) \quad (1)$$

t'_R= tempo de retenção ajustado (tempo de retenção do pico – tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna de cromatografia).

i= analito.

n= número de carbonos do padrão adjacente menos retido.

m= número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção do óleo essencial das folhas de *Croton* sp (OECS)

A amostra das folhas do *Croton* sp (OECS) foi colocada em um balão de fundo redondo de 5L, onde foi adicionada água suficiente para deixar o material imerso. O balão sofreu um processo de aquecimento fornecido pela manta aquecedora modelo Q321A28 (Quimis). O aparelho clevenger foi acoplado ao balão e conectou-se o condensador ao banho termostático modelo TE-2005 (Tecnal). Após isso o aquecimento foi iniciado até a água entrar em evaporação. O vapor da água juntamente com óleo essencial foi devidamente condensado e separado, isolando o óleo essencial do *Eucalyptus* sp. Para o tratamento do óleo volátil utilizou-se sulfato de sódio e clorofórmio, posteriormente, foi utilizado nitrogênio gasoso para evaporação completa do clorofórmio.

3.2. Teste de citotoxicidade *in vitro* – Ensaio do MTT

A avaliação do efeito citotóxico das frações obtidas foi realizada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio – MTT após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* usado para estimar a proliferação e sobrevivência celular. Baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio, que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Neste trabalho, o ensaio do MTT foi utilizado para biomonitorar o efeito citotóxico das frações obtidas com o objetivo de selecioná-las para prosseguimento do fracionamento [17].

3.3. Procedimento experimental do ensaio MTT

As células em suspensão ou em monocamadas foram plaqueadas em placas de multicavidades de 96 poços. Após 24 horas de incubação, 100 µL das substâncias testes foram incubadas com a suspensão de células. Após 69 horas de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 minutos) e o sobrenadante, descartado. Cada poço, recebeu 150 µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL, tendo sido incubadas por 3 horas, em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante é desprezado e o precipitado ressuspensionado em 150 µL de DMSO. Para quantificação do formazan obtido pela redução do MTT nas células viáveis, as absorbâncias foram lidas com auxílio de espectrofotômetro de placa empregando o software Multimode Detection, onde o comprimento de onda foi ajustado para 595 nm. A doxorrubicina e/ou rotenona foram utilizadas como controle positivo dos experimentos [17].

3.4. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O valor das absorbâncias encontrado para as frações analisadas em dose única de 25 µg/ml foi transformado em porcentagem de inibição, relativo ao controle negativo. Para as frações testadas em diluição seriada, foi determinado a concentração inibitória média (CI50) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos a partir de regressão não-linear usando o programa GraphPad Prism (Versão 5.0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas frescas do *Croton* sp pelo processo de hidrodestilação e foi designado OECS. O óleo volátil apresentou uma coloração amarelo pálido e sua composição química foi caracterizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Após a análise dos espectros de CG-EM foram identificados 25 compostos totalizando um percentual da composição química em cerca de 84,69%. Os compostos majoritários do OECS foram o β -copaeno-4-ol (32,45%) e o α -pineno (12,81%). A figura 04, abaixo, mostra o cromatograma do óleo essencial das folhas frescas do *Croton* sp coletadas em março de 2019.

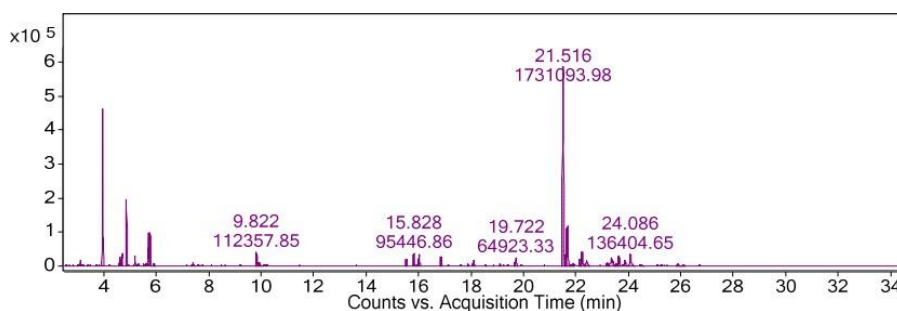


Figura 04: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial das folhas de *Croton* sp (OECS).
(Autoria própria)

A caracterização dos componentes, resolvidos por cromatografia gasosa, foi baseada na análise crítica dos espectros de massas obtidos por alta ionização gerados pelo impacto eletrônico no espectrômetro de massa em comparação com dados coletados na literatura [18]. Os valores dos tempos de retenção foram corrigidos pelo índice de Kováts (IK) e, juntamente com a composição química em percentual, foram registrados no Quadro 1.

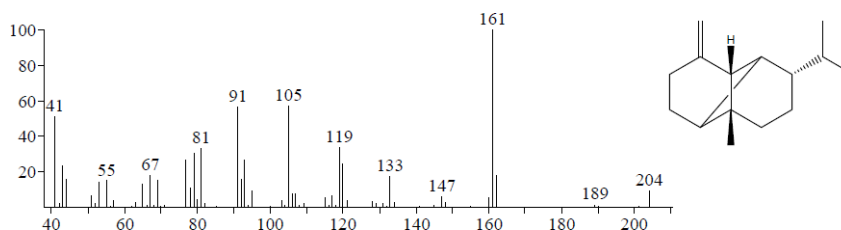


Figura 05: Espectro de massa e estrutura química do β -copaeno-4-ol, composto majoritário do OECS (ADAMS, 2017) [18].

Para a atividade citotóxica do óleo essencial de *Croton* sp foram realizados testes em MTT. No teste foi avaliada a concentração inibitória em 50% das células (CI50) com IC95%. Foram realizados testes em linhagens de células de câncer humano da próstata (PC-3), do cérebro (SNB-19) e do cólon (HCT-116). O quadro 2 apresenta os resultados dos testes da atividade citotóxica para as linhagens de células cancerígenas PC-3, SNB-19 e HCT-116 com valores expressos na concentração de mg.mL^{-1} . Serão considerados promissores, para que haja seguimento do estudo com a realização dos testes *in vivo*, valores abaixo de 50 mg.mL^{-1} . Os resultados demonstraram uma inibição promissora para as células cancerígenas

HCT-116 e SNB-19, o que indica uma potencial atividade citotóxica do óleo essencial obtido a partir das folhas frescas de *Croton* sp. Os resultados da análise inibitória para o PC-3 não apresentaram relevância significativa para o OECS testados no presente estudo.

Quadro 1: Variação da composição química sazonal do óleo essencial de *Croton* sp.

Componentes	IK literatura	IK corrigido	OECS Área (%)
α -pineno	939	940	12,81
β - pineno	979	978	0,76
Mirceno	990	992	6,11
<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno	1004	1008	0,97
δ -3-careno	1011	1015	0,23
<i>o</i> -cimeno	1026	1029	0,23
<u>silvestreno</u>	1030	1033	4,51
1,8-cineol	1031	1036	3,58
acetato de 2-heptila	1043	1042	0,21
6-canfenona	1096	1102	0,52
criptona	1185	1190	2,11
α -terpineol	1188	1193	0,56
α -copaeno	1376	1378	0,90
β -bourboneno	1388	1387	1,79
β -elemeno	1390	1393	1,76
<i>E</i> -cariofileno	1419	1422	1,37
α -humuleno	1454	1456	0,29
<i>allo</i> -aromadendreno	1460	1464	0,81
γ -muuroleno	1479	1479	0,21
t-muurola-4(14),5-dieno	1493	1496	0,31
γ -cadineno	1513	1517	1,22
β -copaen-4-ol	1590	1579	32,45
fokienol	1596	1585	7,73
<i>cis</i> -guaia-3,9-dien-11-ol	1649	1640	0,69
kusilol	1676	1672	2,56
Total		-	84,69

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Quadro 2: Atividade citotóxica (CI₅₀) com IC₉₅% do OECS para as células de câncer humano HCT-116, PC-3 e SNB-19.

	PC-3	SNB-19	HCT-116
<i>Croton</i> sp (OECS) CI ₅₀ mg.L ⁻¹ (IC ₉₅ %)	77,27 (70,75-84,40)	40,06 (33,36-48,10)	31,24 (25,86-37,74)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas frescas do *Croton* sp pelo processo de hidrodestilação. Apresenta uma cor amarelo claro e foi designado do OECS. A identificação dos

componentes químicos dos óleos voláteis foi realizada por análise em CG-EM e foi observado que o composto majoritário do OECS foi o β -copaeno-4-ol com teor de 32,45%.

No teste de atividade citotóxica em MTT foi averiguado um potencial inibidor (CI-50) promissor do óleo essencial das folhas frescas do *Croton* sp para células cancerígenas humanas de glioblastoma (SNB-19) com concentração 40 mg.mL⁻¹ e de cólon (HCT-116) com concentração 31 mg.mL⁻¹.

Os resultados achados neste trabalho apresentam uma justifica para a preservação e exploração sustentável do bioma caatinga tão negligenciado e degradado em nossa região, que é o uso do óleo essencial na terapêutica do câncer obtido a partir das folhas frescas de *Croton* sp, uma espécie do gênero *Croton* ainda não identificada.

Os próximos passos da pesquisa será a identificação da espécie por um botânico e o teste *in vivo* do óleo essencial de *Croton* sp visando confirmar a eficácia e averiguar a segurança em um organismo complexo.

Baseado no aroma do óleo essencial do *Croton* sp uma outra aplicação possível seria no desenvolvimento de cosméticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MORAIS, Lilia Aparecida Salgado de. INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS. Horticultura Brasileira, v. 27, n. 2, Agosto 2009.
- [2] CRAVEIRO, Afrânio Aragão; QUEIROZ, Danilo Caldas. Óleos essenciais e química fina. Química Nova. 1993. 16(3)
- [3] PORTE, Alexandre; GODOY, Ronoel Luiz de Oliveira. ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.): PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL. B. CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001.
- [4] BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M.. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Química Nova, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p.588-594, 02 abr. 2009.
- [5] BRAGA, Renato. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3ª ed. Fortaleza. 1976.
- [6] RADULOVIĆ, N., MANANJARASOA, E., HARINANTENAINA, L., YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy, Biochem. Syst. Ecol., v. 34, pp. 648-653, 2006.
- [7] BUSATO, N. V. et al. Estratégias de Modelagem da Extração de Óleos Essenciais por Hidrodestilação e Destilação a Vapor. 2014.
- [8] GOMES, F. Estudos dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (SFE). Porto Alegre, 2003.

- [9] LEÃO, M. Análise do óleo essencial da laranja doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck obtido das cascas secas e frescas através do método de extração por hidrodestilação. Universidade de Santa Cruz do Sul, 2013.
- [10] NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do et al. CROMATOGRAFIA GASOSA ASPECTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS. São Carlos: Nunca, 2015. 179 p.
- [11] HANTAO, Leandro W., TOLEDO, Bruna R. e AUGUSTO, Fabio. FASES ESTACIONÁRIAS DE LÍQUIDOS IÔNICOS EM CROMATOGRAFIA GASOSA: FUNDAMENTOS, AVANÇOS RECENTES E PERSPECTIVAS. *Química Nova* [online]. 2016, v. 39, n. 1, pp. 81-93.
- [12] SEQUINEL, Rodrigo et al. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. *Química Nova* [online]. 2010, v. 33, n. 10, pp. 2226-2232.
- [13] PENTEADO, José Carlos P., MAGALHÃES, Dulce e MASINI, Jorge C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Química Nova* [online]. 2008, v. 31, n. 8, pp. 2190-2193.
- [14] SILVA, J. C. C. da. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de microcistina-LR e agrotóxicos em águas superficiais, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas. 2010. 176 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.
- [15] MÜHLEN, Carin Von. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*. 2009, v. 1, n.3.
- [16] ROMIO, Cristiane. Influência da Composição Química de Óleos Essenciais de Folhas na Seleção da Dieta de Bugios-Ruivos (*Alouatta guariba clamitans*). *Revista da Graduação*. 2012, v. 5, n.2.
- [17] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivor: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63, 1983.
- [18] ADAMS, Robert P. IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY. Ed. 4.1, 2017.