



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANTONIO JUNIOR COSTA BARBOSA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Croton urticifolius* LAM. E *Croton adamantinus* MÜLL. ARG.
(EUPHORBIACEAE)**

**CAMPINA GRANDE - PB
2021**

ANTONIO JUNIOR COSTA BARBOSA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Croton urticifolius* LAM. E *Croton adamantinus* MÜLL. ARG.
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Medicinal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria da Conceição de Menezes Torres.

**CAMPINA GRANDE - PB
2021**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

- B238c Barbosa, Antonio Junior Costa.
Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Croton urticifolius* Lam. e *Croton adamantinus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) [manuscrito] / Antonio Junior Costa Barbosa. - 2021.
70 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Química - Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2021.
"Orientação : Profa. Dra. Maria da Conceição de Menezes Torres, Departamento de Química - CCT."
1. Marmeleiro. 2. Hidrodestilação. 3. Química medicinal. 4. Atividade antibacteriana. I. Título
21. ed. CDD 615.19

ANTONIO JUNIOR COSTA BARBOSA

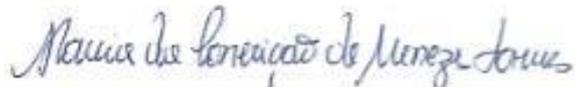
**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Croton urticifolius* LAM. E *Croton adamantinus* MÜLL. ARG.
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

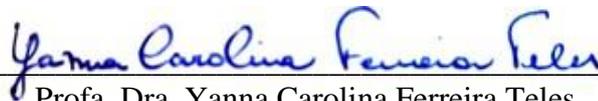
Área de concentração: Química Medicinal.

Aprovada em: 10 / 02 / 2021.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria da Conceição de Menezes Torres. (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Yanna Carolina Ferreira Teles
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda bondade, bênçãos que tem derramado sobre a minha vida.

A minha família, em especial aos meus pais Antonio Araújo e Marinalva Costa e aos meus irmãos João Pedro Costa, Ângela Cristina, Isabel Cristina, Juscelino Costa e Joelma Costa, que sempre me apoiaram e pela compreensão por minha ausência nas reuniões familiares.

A minha orientadora, professora Maria da Conceição de Menezes Torres, pelas leituras sugeridas ao longo desta orientação e pela dedicação do seu ensino, e sua paciência e carisma.

A mestra Lidiane Gomes por ter me ajudado no desenvolvimento desse trabalho com sua paciência incrível de ensinar passo a passo dos instrumentos e demais processos.

Ao Dr. Leonardo Félix e aos colaboradores, da Universidade Federal da Paraíba, campus II, pela identificação do material.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba, pela realização das análises em CG/EM.

A Profa Dra. Márcia Vanusa da Silva e aos doutorandos Maisa F. S. Barbosa e Bruno O. Veras, do laboratório de produtos naturais da Universidade Federal de Pernambuco pela parceria para realização das atividades antibacterianas. Como também pelos ensinamentos da mesma.

Aos integrantes da banca examinadora: Prof. Dr. Ricardo Olinpio, Profa. Dra. Yana Teles, Profa. Dra. Márcia Vanusa, pelas sugestões e considerações, para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao secretário da Pós-Graduação em Química, que sempre mostrou disponível nos momentos que sempre precisei.

À coordenadora da Pós-Graduação em Química, Mary Cristina pela sua competência tanto em seu ensino como na coordenação.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, e estiveram ao meu lado, durante a realização deste trabalho, agradeço.

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

Antoine Lavoisier

RESUMO

O gênero *Croton*, um dos maiores da família Euphorbiaceae, possui espécies aromáticas produtoras de óleos essenciais que são caracterizadas por apresentarem atividades biológicas: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, entre outras. O objetivo deste trabalho foi investigar a composição química e a atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) e *Croton adamantinus* (OCA) coletadas no município de Areia – PB. Os óleos essenciais das folhas frescas das espécies de *Croton* foram extraídos por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para identificar a composição química. A análise por CG/EM permitiu a identificação de 22 compostos (95,0%), com a sua maioria sendo sesquiterpenoides. Os principais compostos para o óleo de *C. urticifolius* foram α -pineno (21,70%), biciclogermacreno (21,46%) e (E)-cariofileno (17,34%), e para o óleo de *C. adamantinus* foram o biciclogermacreno (36,47%), γ -amorfenos (22,91%) e (E)-cariofileno (9,22%). A atividade antibacteriana dos óleos foi testada frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em placas de 96 poços (microdiluição). O OCU apresentou atividade fraca frente à *E. coli*, com CIM de 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Enquanto o OCA não apresentou atividade frente a nenhuma cepa testada. O efeito modulador dos óleos foi avaliado frente à cepa de *S. aureus* multidroga resistente (UFPEDA 802) e os resultados obtidos demonstram que a associação para o OCU e para o OCA com o antibiótico Ciprofloxacino são positivas, pois leva à potencialização do efeito antibiótico. É necessário obter dados mais concretos para o uso seguro dessas combinações, atentando-se para a existência de algum tipo de reação de toxicidade existente relacionada ao fitoterápico e entender os mecanismos de resistência adquiridos pelo microrganismo.

Palavras-Chave: Marmeleiro. Velame. Hidrodestilação. CG/EM. Efeito Modulador.

ABSTRACT

The genus *Croton*, one of the largest in the Euphorbiaceae family, has aromatic species that produce essential oils that are characterized by their biological activities: anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, among others. The objective of this work was to investigate the chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of the leaves from *Croton urticifolius* (OCU) and *Croton adamantinus* (OCA) collected in the municipality from Areia - PB. The essential oils from the fresh leaves of the *Croton* species were extracted by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) to identify the chemical composition. The analysis by GC/MS allowed the identification of 22 compounds (95.0%), with the majority being sesquiterpenoids. The main compounds for *C. urticifolius* oil were α -pinene (21.70%), bicyclogermacrene (21.46%) and (E)-cariophyllene (17.34%), and from *C. adamantinus* oil were bicyclogermacrene (36.47%), γ -amorphene (22.91%) and (E)-cariophyllene (9.22%). The antibacterial activity of the oils was tested against the strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Escherichia coli* (ATCC 8739), using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method in 96-well plates (microdilution). OCU showed weak activity against *E. coli*, with MIC of 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. While the OCA showed no activity against any tested strain. The modulating effect of the oils was evaluated against the resistant *S. aureus* multidroga strain (UFPEDA 802) and the results obtained demonstrate that the association for OCU and OCA with the antibiotic Ciprofloxacin is positive, since it leads to the potentiation of the antibiotic effect. It is necessary to obtain more concrete data for the safe use of these combinations, paying attention to the existence of some type of existing toxicity reaction related to the herbal medicine and to understand the resistance mechanisms acquired by the microorganism.

Keywords: Marmeleiro. Velame. Hydrodistillation. GC/MS. Modulating effect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Croton urticifolius</i> em seu habitat natural.....	19
Figura 2 – <i>Croton adamantinus</i> em seu habitat natural.....	20
Figura 3 – Esquema da biossíntese de terpenoides.....	23
Figura 4 - Exemplos de compostos monoterpenos e sesquiterpenos de ocorrência em óleos voláteis.....	24
Figura 5 - Destaque da localização de coleta dos indivíduos de <i>C. urticifolius</i> e de <i>C. adamantinus</i> no município de Areias-PB.....	35
Figura 6 - Esquema de pipetagem.....	39
Figura 7 - Estrutura dos constituintes identificados nos óleos essenciais de OCA e OCU	44
Figura 8 - Cromatograma CG/EM do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU).....	45
Figura 9 - Cromatograma CG/EM do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA).....	46

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 – Modulação da resistência de <i>S. aureus</i> (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de <i>Croton urticifolius</i> OCU com Ciprofloxacino.....	49
Gráfico 2 – Modulação da resistência de <i>S. aureus</i> (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de <i>Croton urticifolius</i> OCU com Cefoxitina.....	50
Gráfico 3 – Modulação da resistência de <i>S. aureus</i> (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de <i>Croton urticifolius</i> OCU com Eritromicina.....	50
Gráfico 4 – Modulação da resistência de <i>S. aureus</i> (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de <i>Croton adamantinus</i> OCA com Ciprofloxacino.....	51
Gráfico 5 – Modulação da resistência de <i>S. aureus</i> (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de <i>Croton adamantinus</i> OCA com Cefoxitina.....	52
Gráfico 6 – Modulação da resistência de <i>S. aureus</i> (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de <i>Croton adamantinus</i> OCA com Eritromicina.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo de óleos essenciais de <i>Crotons</i> com atividades Antibacterianas em periódicos.....	26
Tabela 2 - Massa das folhas e volumes de água utilizados nas extrações.....	36
Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais das folhas de <i>Croton urticifolius</i> (OCU) e de <i>Croton adamantinus</i> (OCA).....	42
Tabela 4 – Classificação da atividade antibacteriana de acordo com os valores obtidos de (CIM).....	47
Tabela 5 - Investigação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de <i>Croton urticifolius</i> (OCU), e de <i>Croton adamantinus</i> (OCA).....	47
Tabela 6 - Perfil de resistência a antibióticos da cepa utilizada.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
NIST	<i>Nacional Institute of Standarts and Technology</i>
OCA	Óleo essencial das folhas de <i>Croton adamantinus</i>
OCU	Óleo essencial das inflorescências de <i>Croton urticifolius</i>
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
DMSO	Dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO LITERÁRIA	17
3.1 Família Euphorbiaceae	17
3.2 O gênero <i>Croton</i>	18
3.2.1 <i>Croton urticifolius</i>	19
3.2.2 <i>Croton adamantinus</i>	20
3.3 Óleos Essenciais	21
3.3.1 <i>Terpenoides: principais compostos de óleos essenciais</i>	22
3.4 Compostos Majoritários e Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais das Espécies do Gênero <i>Croton</i>	25
3.5 Atividade Antibacteriana	32
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.5.2 <i>Escherichia coli</i>	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Levantamento Bibliográfico	35
4.2 Material Botânico	35
4.3 Extração do Óleo Essencial por Hidrodestilação	36
4.4 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas	36
4.5 Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais	37
4.5.1 <i>Cepas Bacterianas</i>	37
4.5.2 <i>Drogas</i>	37
4.5.3 <i>Meios de Cultura</i>	37
4.5.4 <i>Preparação do Inóculo</i>	38
4.5.5 <i>Diluição dos Óleos Essenciais</i>	38
4.5.6 <i>Preparação dos Eppendorffs</i>	38
4.5.7 <i>Determinação da CIM</i>	38
4.5.8 <i>Pipetagem da Placa</i>	38
4.5.9 <i>Investigação do efeito modulador</i>	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Identificação dos Constituintes	41
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	47
5.3 Efeito Modulador da Resistência Bacteriana	48

6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS	66

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins curativos é uma das práticas mais antigas da humanidade e vem se acumulando durante séculos, sendo baseado no conhecimento empírico que representa muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos (BASTO, 2013). Esse interesse vem de suas propriedades de tratamento, ou até mesmo de cura de enfermidades, a utilização dessas plantas medicinais vem sendo estudadas devido aos seus constituintes químicos presentes (LOKKO, 2018).

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de doenças (KHAN e AHMAD, 2019). Isso se dá devido ao baixo custo e à acessibilidade das plantas com propriedades medicinais, aumentando a procura e o interesse nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento (SUNTAR, 2019). Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que se pode utilizar no potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitoterápicos (YEUNG *et al.* 2018).

Embora, com toda importância conferida às plantas, o seu potencial terapêutico é ainda muito pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (MAMEDOV, 2012). Com isso, pesquisas com plantas medicinais tem sido e continuam a ser considerada uma opção importante na busca de novas drogas (HEINRICH e ANAGNOSTOU, 2017; REDDY, 2017).

A região Nordeste do Brasil abriga em sua área cerca de 80% de região semiárida e uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas que não são encontradas em outras regiões do globo (MATHE *et al.* 2018). Plantas da família Euphorbiaceae fazem parte do elenco de plantas do sistema de medicina tradicional do semiárido (ALVES *et al.* 2017). O gênero *Croton*, o segundo maior da família Euphorbiaceae, apresenta ampla distribuição no Nordeste brasileiro e suas espécies são utilizadas na medicina popular para os mais variados fins (CÂMARA *et al.* 2017).

Apesar da ampla ocorrência de estudos envolvendo a identificação dos constituintes químicos e atividades biológicas de óleos essenciais das espécies de *Croton*, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Croton urticifolius* LAM. e de *Croton adamantinus*

MÜLL. ARG. ainda permanecem inexploradas. Para o *C. urticifolius*, a literatura não apresenta registro de estudos químicos para essa espécie. Já o *C. adamantinus* se encontra na literatura com identificação de seus constituintes presentes nos óleos essenciais das folhas, e apresentando atividade antibacteriana, em que relata que vem sendo utilizado pela população com o uso medicinal: contra impotência sexual, cicatrização, no tratamento de inflamações, feridas na pele, problemas gastrointestinais e hepáticos (XIMENES *et al.* 2013).

O perfil químico do gênero *Croton* é diversificado em relação aos seus metabólitos secundários e possui significativo leque de atividades biológicas e uso popular, tornando-se fonte de estudos prospectivos sobre compostos naturais biologicamente ativos (NANDI *et al.* 2019). Várias espécies de *Croton* são produtoras de óleos essenciais (OEs), ricos em terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanoides, conhecidos por apresentarem atividades biológicas, tais como antinociceptiva, miorelaxante, larvicida, gastroprotetora, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiana, citotóxico, entre outras (ANGELICO *et al.* 2011; DEVAPPA, 2015).

Estudos recentes mostraram que os óleos essenciais ricos em biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno e α -pineno, para as espécies de *Croton ceanothifolius* Baill. (ARAUJO *et al.* 2020), *C. campestris* A. St. Hil. (ALMEIDA *et al.* 2013), *C. hirtus* L'Hér. (DAOUDA *et al.* 2014), *C. limae* A. P. S. Gomes, M. F. Sales & P. E. Berry (LEITE *et al.* 2019), *C. urucurana* Baill. (SIMIONATTO *et al.* 2007), *C. tetradeniuss* Baill. (ALMEIDA-PEREIRA *et al.* 2019), *C. heliotropifolius* Kunth e *C. argyrophyllus* Kunth (BRITO *et al.* 2018), possuindo estudos de atividade antibacteriana.

Nos últimos anos, entre as atividades farmacológicas estudadas, a antimicrobiana tem se destacado, devido ao agravamento da resistência aos antimicrobianos em populações bacterianas (AMINOV, 2017). Devido ao aumento progressivo da resistência, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de metabólitos secundários poderia ser uma alternativa, por terem uma diversidade molecular maior que os derivados de produtos sintéticos (SHIN *et al.* 2018). É importante ressaltar, que nos últimos anos, muitas plantas têm sido avaliadas não somente pela atividade antibacteriana, mas também como agente modulador de resistência antibiótica, inclusive espécies do *Croton* (ROCHA, 2020; VIMBELA *et al.* 2017).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Croton urticifolius* e de *Croton adamantinus*, bem como avaliar o potencial antibacteriano.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair os óleos essenciais de *C. urticifolius* e *C. adamantinus*;
- Fazer análises dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM);
- Testar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *C. urticifolius* e *C. adamantinus*, frente às cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- Avaliar a capacidade dos óleos essenciais de *C. urticifolius* e *C. adamantinus* de modificar a resistência antibacteriana de *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 802) resistente a múltiplas drogas.

3 REVISÃO LITERÁRIA

3.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é uma das maiores e mais variadas famílias de dicotiledôneas, possuindo em cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies distribuídas, principalmente, nos trópicos e subtropicais de ambos os hemisférios (RAMALHO *et al.* 2018). É conhecida como uma importante fonte de medicamentos e toxinas por apresentar metabólitos secundários importantes em atividades anti-inflamatória, antialérgica, anticarcinogênica e cicatrizante entre outras (SIMÕES, 2017; YANG *et al.* 2019).

No Brasil, ocorrem 66 gêneros e 973 espécies, de hábitos e habitats diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação, como ervas, subarbustos, árvores, trepadeiras, entre outras (DO BRASIL *et al.* 2020). A região Nordeste comporta cerca de 200 espécies e 45 gêneros, destacando-se o bioma Caatinga com 17 espécies endêmicas (DO BRASIL *et al.* 2020; OLIVEIRA 2013; JUNIOR *et al.* 2018).

As espécies da família Euphorbiaceae são conhecidas pelo potencial econômico e medicinal, com sua ação antiulcerogênica, anti-inflamatória, antiproliferativos, multirresistentes a drogas, antimicrobianos, vasoativos, imunomoduladores, anti-inflamatórios, neuroprotetores e pró-inflamatórios (JUNIOR *et al.* 2018; WANG *et al.* 2018). Isso se dá pela grande variabilidade morfológica, por estarem entre uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, complexas e diversas do grupo das Angiospermas (SECCO *et al.* 2018).

Euphorbiaceae se associa a uma grande capacidade adaptativa, suas espécies estão presentes em todos os tipos de habitats e dessa forma sendo expostas em diferentes fatores estressantes como salinidade, temperatura, estresse hídrico e entre outros (LOMBARDIN *et al.* 2019). Na literatura etnofarmacológica, essa família se encontra dividida em quatro subfamílias (Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae), compreendendo 29 tribos (ZARDINI *et al.* 2019). Em que se destaca a *Phyllanthus niruri* L. (quebra-quebra), *Jatropha gossypifolia* L. (pinhão-roxo), *Ricinus communis* L. (mamona), entre as tribos, o grupo de maior destaque em toda região Neotropical é Crotoneae, na qual está o gênero *Croton* L. (MATOS, 2011).

3.2 O gênero *Croton*

Croton L. é considerado um dos maiores da família Euphorbiaceae, compreende cerca de 1.300 espécies, as quais, em sua maioria, se caracterizam pela presença de látex em seus caules, sendo popularmente conhecido como “velames” e “marmeleiros” (TINTINO, *et al.* 2018; FEIO, MEIRA, MAS, RIINA, 2018). Seus componentes variam de ervas a trepadeiras e árvores de grande porte, várias espécies desempenham papel importante nos usos tradicionais de plantas medicinais na África, Ásia e América do Sul (SILVA, 2016).

É o quarto maior gênero de angiospermas em número de espécies no Brasil (SOUZA *et al.* 2017). Destaca-se entre os países da América do Sul por possuir mais de 300 espécies de *Croton* difundidas em diferentes tipos de vegetação (OLIVEIRA *et al.* 2020). Grande parte das espécies de *Croton* no Brasil são encontradas na região Nordeste pela sua geográfica e considerável diversidade morfológica (ALMIEDA *et al.* 2018; ARAÚJO *et al.* 2017).

As espécies desse gênero se denominam em habitats principalmente com condições extremas, como no bioma caatinga, que é o principal ecossistema do nordeste brasileiro (RAMALHO *et al.* 2018). Que se caracteriza por uma seca e espinhosa vegetação (LIMA, 2008).

Os efeitos farmacológicos relatados para espécies de *Croton* foram atribuídos a diferentes tipos de compostos, principalmente a alcaloides e terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos), flavonoides e outros compostos fenólicos (DÍAZ *et al.* 2019).

Esses constituintes químicos do gênero *Croton* já são relatados por atribuírem a maioria de suas atividades terapêuticas, tais como: infecções fúngicas, bacterianas, doenças gastrointestinais, hipertensão, febre, malária, inflamação, diabetes, dor, doenças do trato respiratório (ALVES *et al.* 2016; BRITO *et al.* 2018; RAMOS *et al.* 2013).

Entre as espécies de *Croton* se destacam em uso medicinal o *C. zehntneri* Pax *et Hoffm.* (DONATI *et al.* 2015), *C. rhamnifolioides* Pax *et Hoffm.* (CÂMARA *et al.* 2017), *C. heliotropiifolius* Kunth (ROCHA, 2016), e *C. campestris* St. Hill (BRITO *et al.* 2018). Todas com atividades antibacterianas, antioxidantes e citotóxicas. Além dessas, existem outras espécies que ainda possuem poucos ou nenhuns estudos encontrados na literatura, tais como as espécies *Croton urticifolius* e *Croton adamantinus*.

3.2.1 *Croton urticifolius*

O *Croton urticifolius* LAM. (Figura 1), é conhecido como “marmeleiro branco” ou “velame”, a sua forma de vida é encontrada como subarbusto e arbusto, a sua ocorrência confirmada no Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) e no Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), sendo o seu domínio fitogeográfico a Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (CORDEIRO *et al.* 2015).

Figura 1 – *Croton urticifolius* em seu habitat natural



Fonte: Dados do autor (2020).

Tem como sinônimo heterotípico *Berhamia multispicata* Vell., *Berhamia urticifolia* Lam., *Calypteriopetalon brasiliensis*, *Oxydectes bahiensis* Müll.Arg. e homotípico *Oxydectes urticifolia* Lam. não sendo endêmica do Brasil (CARNEIRO-TORRES, 2009).

3.2.2 *Croton adamantinus*

O *Croton adamantinus* Müll. Arg. (Figura 2), é uma espécie endêmica da Caatinga, ocorrendo principalmente na região do semiárido dos estados da Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, norte de Minas Gerais, Pernambuco e Paraíba (SANTOS, 2015). Esta espécie é conhecida popularmente como carrasco, canela de urubu, velame bravo e marmeleiro (SILVA, 2016).

É utilizado contra impotência sexual, cicatrização, no tratamento de inflamações e feridas na pele, problemas gastrointestinais e hepáticos. Na literatura, há relato de que o óleo essencial das folhas dessa espécie apresenta atividade antinociceptiva, cicatrizante e antimicrobiana (XIMENES, *et al.* 2013; SILVA, 2016).

Figura 2 – *Croton adamantinus* em seu habitat natural



Fonte: Dados do autor (2020).

Tem como sinônimo heterotípico *Oxydectes adamantina* Müll. Arg. Kuntze, sua forma de vida é encontrada como arbusto e subarbusto, sendo endêmica do Brasil (CARNEIRO-TORRES, 2009).

3.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis ou óleos etéreos, têm aspectos de oleosidade em temperatura ambiente vindo daí a denominação *óleo*, são insolúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos (NAZIZ, 2017). São vistos quimicamente como misturas complexas de compostos que são produzidos no metabolismo secundário das plantas (SANTOS, 2019).

São estocados nas flores, inflorescências, sementes, folhas, gravetos, cascas, frutos e raízes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (DÍAZ *et al.* 2018; ABD-EL-KHAIR, 2020). Sendo de grande importância para o benefício e equilíbrio homeostático do vegetal, que conseguem desenvolver mecanismos de defesa para sua sobrevivência, e alguns também atuando de maneira oposta, como atrativos de insetos, pássaros e morcegos que fazem a polinização de muitas plantas (VARGAS-HERNANDEZ *et al.* 2017; BARTH *et al.* 2018).

Os componentes dos óleos essenciais consistem em misturas complexas com centenas de substâncias químicas constituintes com baixas massas moleculares (LEE e DING, 2016). Encontra-se em estruturas especializadas, como pelos glandulares e bolsas secretoras, principalmente de gotas entre as células das plantas, onde agem como hormônios reguladores e catalisadores (BHAGAVAN, 2011).

São dotados de aroma quase sempre agradável, incolores quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados de aparência oleosa, tem como característica principal a volatilidade, que os difere dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes (ROSA *et al.* 2018; SIMÕES *et al.* 2017).

Os fatores ambientais podem causar alterações nas plantas ao longo do dia, ao mês ou à estação do ano, em que essas variações podem incluir nas medidas dos aromas de todas as espécies se tornando mais acentuadas ou não (ARCHIBOLD 2012). O que sugere que a concentração de óleo essencial provavelmente é influenciada pelo tempo diário e sazonalidade, portanto, demonstrando que pode ser um fator importante para a produção de óleos essenciais (DEPRÁ e GAGLIANONE, 2018). Os fatores ambientais tais como solo, clima, pressão atmosférica, altitude, sazonalidade, estresse hídrico, entre outros, também pode causar alterações na composição química dos óleos essenciais (PEREIRA, 2013; ALKAN, 2020).

Os óleos essenciais têm sido utilizados medicinalmente na história, devido suas atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante,

antitumorais, e entre outras (SALEM *et al.* 2017; SHARIFI-RAD *et al.* 2017). Sendo assim, pesquisas com óleos essenciais de plantas tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas (SHARIFI-RAD *et al.* 2017).

Os processos de extração do OE são definidos pela Organização Internacional de Padrões (ISO) como sendo os produtos obtidos de partes de plantas por meio: CO₂ supercrítico, prensagem, destilação por arraste a vapor, extração com solventes e hidrodestilação (ZENG *et al.* 2016).

Os óleos essenciais tem a sua constituição desde compostos muito voláteis (menos de 100 unidades de massa atômica) até compostos semi-voláteis (300 unidades de massa atômica), podem ser identificados por aparelhos com avanços na técnica de separação e melhorias na detecção (MIRZAE; LEONARDI; NERI, 2020). Sendo a técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) a mais comumente utilizada na análise da composição química de óleos essenciais (KHAN *et al.* 2020).

3.3.1 Terpenoides: principais compostos de óleos essenciais

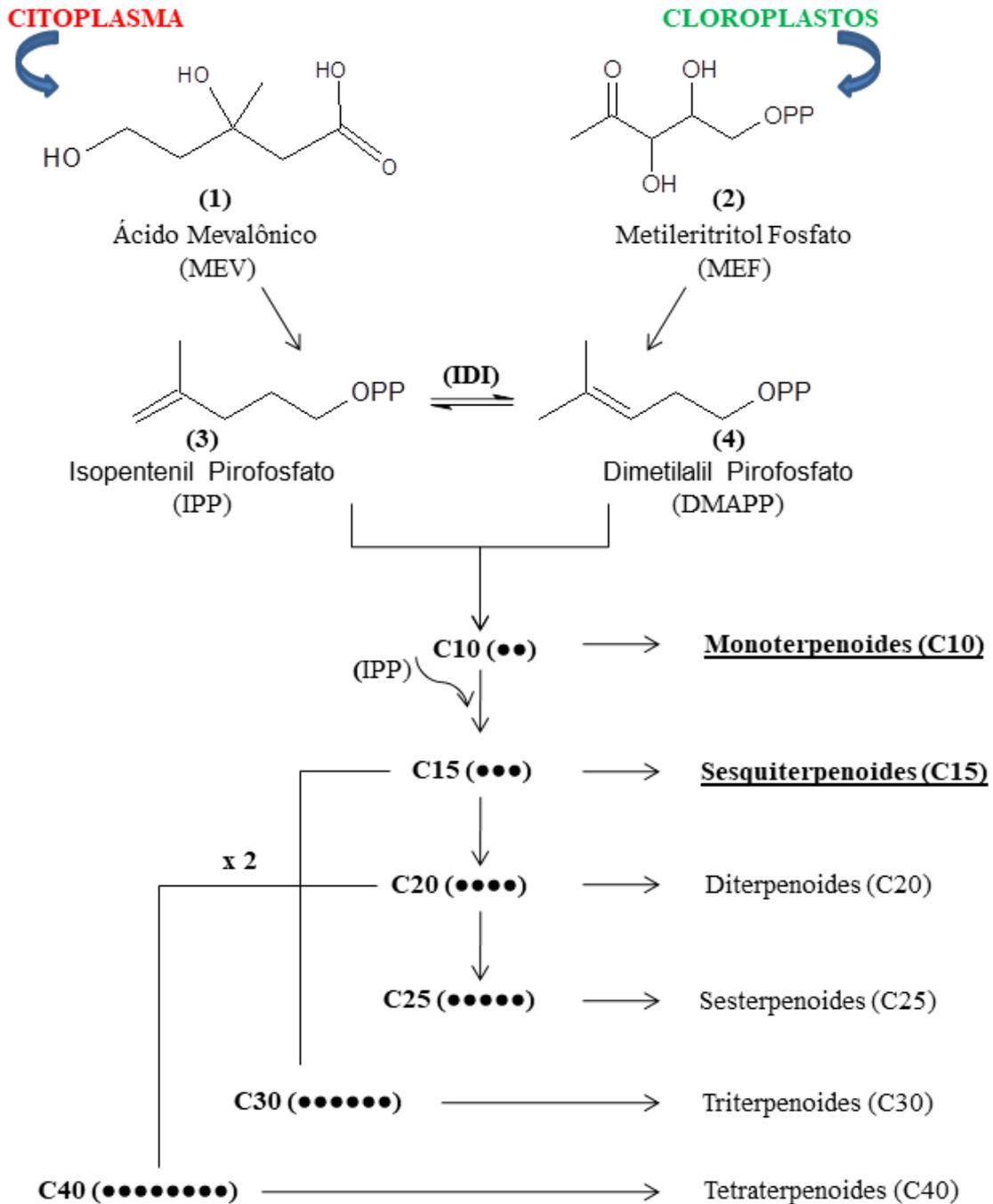
Os terpenoides, também conhecidos como terpenos ou isoprenoides, são uma das principais classes químicas que constituem os óleos essenciais, seguido por fenilpropanoides (SIMÕES *et al.* 2017; XIAO, ZHANG, WANG, 2019). Os compostos terpênicos mais frequentes em óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos, especialmente em óleos essenciais de espécies de *Croton*.

Esses terpenos são compostos que representam importantes interações das plantas com o meio ambiente, tais como: defesa de muitas espécies, estão implicados na atração de polinizadores e predadores de herbívoros, na proteção contra o estresse foto oxidativo, na mediação da termotolerância e na defesa direta contra patógenos (BANERJEE e HAMBERGER, 2018).

As unidades básicas da estrutura química dos terpenoides são formadas por meio de duas rotas metabólicas distintas – via do Ácido Mevalônico (MEV) **1**, proveniente da união de unidades de acetil coenzima A (ou acetil-CoA), e via do Metileritritol Fosfato (MEF) **2** – originam os diferentes terpenos representados na Figura 3. Normalmente, se encontram ligadas entre si pela ordem da reação “regra do isopreno”, onde a ligação se encontra da forma “cabeça-a-cauda”, pelos blocos de construção sequencial de uma unidade de cinco átomos de

carbono, representadas pelo isopentenil-pirofosfato (IPP) **3**, e outra de seu isômero (IDI) dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) **4** (VOGL *et al.* 2018).

Figura 3 – Esquema da biossíntese de terpenoides.



● → Número de unidades isoprênicas

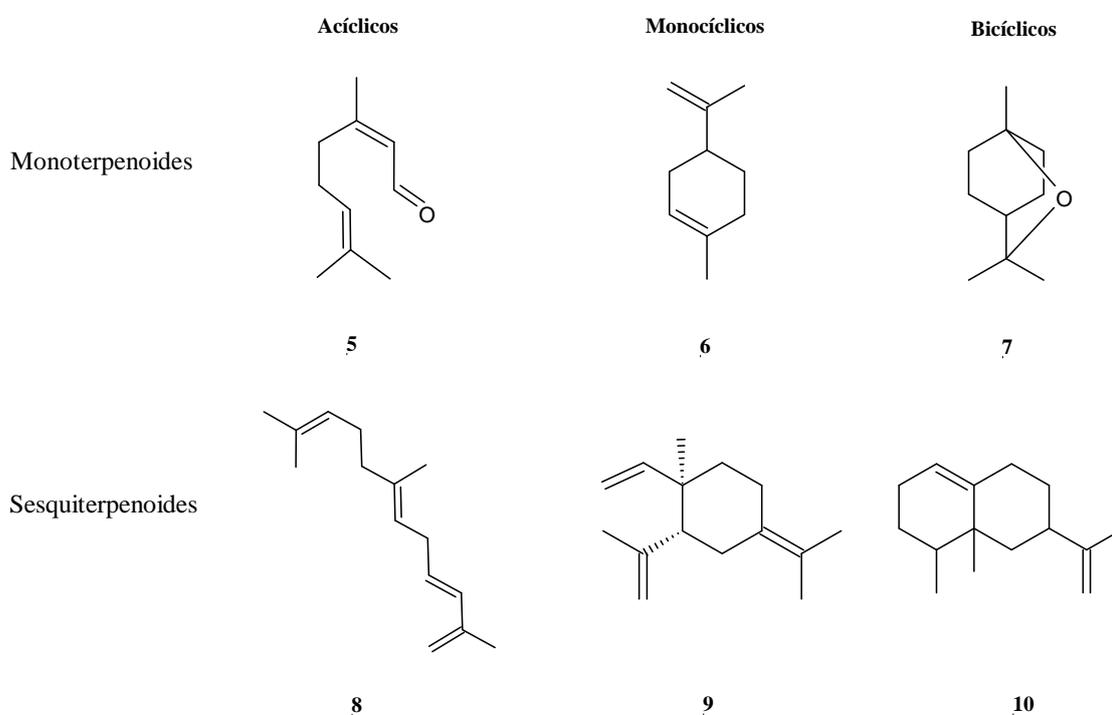
Fonte: adaptada de SIMÕES *et al.* 2017; SANTOS *et al.* 2018; FELIPE *et al.* 2017.

Nos dois precursores MEV e MEF, levam à biossíntese das duas unidades isoprênicas IPP e DMAPP. O equilíbrio de IPP e DMAPP são controlados pela IPP Delta-isomerase (IDI), que converte reversivelmente IPP em DMAPP (FELIPE *et al.* 2017; SIMÕES *et al.* 2017).

Para a formação dos terpenos é gerada uma condensação cabeça-a-cauda de IPP e DMAPP que produz difosfato de geranyl (GPP), o precursor monoterpênico, com uma estrutura de dez átomos de carbono (C₁₀). Em seguida, a adição sucessiva de IPP resulta no precursor de sesquiterpenoide, resultando em um total de 15 átomos de carbono (C₁₅) (SIMÕES *et al.* 2017; SANTOS *et al.* 2018).

Considerando todo o grupo de terpenoides, esses dois tipos (mono- e sesquiterpenoides), são as que mais se destacam nos óleos essenciais, devido a menor massa molecular, assim, apresentando volatilidade acentuada compreendendo em cerca de 90% em sua composição, e em cada possuindo diferentes subgrupos, representados na figura 4 (SIMÕES *et al.* 2017).

Figura 4 - Exemplos de compostos monoterpênicos e sesquiterpênicos de ocorrência em óleos voláteis.



Fonte: adaptada de SIMÕES *et al.* 2017; FELIPE *et al.* 2017.

Monoterpenos em sua maioria são divididos em três subgrupos: acíclicos (Ex.: Citral **5**), monocíclicos (Ex.: Limoneno **6**), e bicíclicos (Ex.:1,8 Cineol **7**). As variações estruturais dos sesquiterpenos são da mesma natureza que as precedentes, podendo ser acíclicos (Ex.: Farneceno **8**), monocíclicos (Ex.: γ -Elemeno **9**), e bicíclicos (Ex.: Valenceno **10**) (SIMÕES *et al.* 2017).

3.4 Compostos Majoritários e Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais das Espécies do Gênero *Croton*

Estudos químicos e biológicos têm sido realizados em espécies do gênero *Croton*, dentre as atividades biológicas observadas, podem-se citar as atividades: antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, atividade citotóxica, anticoagulante, antiúlcera, antidiarréia, anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética (SALATINO *et al.* 2007).

Na tabela 1 estão sumarizadas as atividades antibacterianas de óleos essenciais de diferentes partes de espécies do gênero *Croton* e seus constituintes majoritários. Como pode ser observado são reportados na literatura trinta e oito trabalhos sobre atividades antibacterianas das espécies do gênero *Croton*. As folhas são as partes mais estudadas, e seus óleos essenciais apresentam variações na composição química em relação aos compostos majoritários.

A maioria dos constituintes presentes nos óleos essenciais das espécies de *Croton* são pertencentes às classes dos monoterpenoides e sesquiterpenoides (RAJASEKARAN e GEBREKIDAN, 2018). E esses compostos tem seus possíveis mecanismos de ação, como já relatado na literatura, inibindo as bombas de efluxo antimicrobiano, que por sua vez, é considerado um dos principais mecanismos que contribuem para a resistências das bactérias (KOVAC *et al.* 2015).

Tabela 1 - Estudo de óleos essenciais de espécies de *Crotons* com atividades antibacterianas em periódicos

<i>ESPÉCIE</i>	<i>PARTE DA PLANTA</i>	<i>COMPOSTOS MAJORITÁRIOS</i>	<i>ATIVIDADE BIOLÓGICA</i>	<i>CEPAS</i>	<i>REFERÊNCIAS</i>
<i>C. adamantinus</i>	Folhas	Metil-eugenol, 1,8-Cineol e Bicyclogermacreno	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>	XIMENES <i>et al.</i> 2013
<i>C. argyrophylloides</i>	Partes aéreas	Mirceno e α -pineno	Antibacteriana	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ALVES <i>et al.</i> 2016
<i>C. argyrophyllus</i>	Folhas	Bicyclogermacreno, β -pineno e espatulenol	Antioxidante e antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BRITO <i>et al.</i> 2018
<i>C. borarium</i>	Folhas	β -felandreno, α -terpineol	Antibacteriana	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. Aeruginosa</i>	RUPHIN <i>et al.</i> 2016
<i>C. blanchetianus</i>	Folhas	cedrol, eucaliptol e α -pineno	Antibacteriana ^o	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	ANGÉLICO <i>et al.</i> 2014
<i>C. cajucara</i>	Folhas e cascas	7-hidroxicalameneno	Antibacteriana, Leishmanicida e Antioxidante	<i>Rhizopus oryzae</i>	AZEVEDO <i>et al.</i> 2014
	Folhas	Linalol	Antibacteriana	<i>Candida albicans</i> , <i>Lactobacill</i>	ALVIANO <i>et al.</i> 2005

				<i>us casei</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>sobrinus</i> , <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	
<i>C. campestris</i>	Folhas	β -cariofileno e biciclogermacreno	Antibacteriana ^o	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	ALMEIDA <i>et al.</i> 2013
	Folhas	óxido cariofileno, e óxido de humeleno II	Antibacteriana	<i>S. aureus</i> e <i>Enterococcus hirae</i>	BABILI <i>et al.</i> 2009
<i>C. ceanothifolius</i>	Folhas	Biciclogermacreno, germacreno D e (E)-cariofileno	Antibacteriana	<i>S. aureus</i> , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , e <i>E. coli</i> .	ARAÚJO <i>et al.</i> 2020
<i>C. gratissimus</i>	Folhas	β -cariofileno, p- cimoneno, α - copaeno	Antibacteriana	<i>Brevibacillus agri</i> , <i>B. epidermidis</i> , e <i>B.</i> <i>linens</i>	VAN VUUREN <i>et al.</i> 2019
	Folhas	sabineno, α - felandreno e β - felandreno	Antibacteriana, e citotóxica	<i>S. aureus</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>E. coli</i> e <i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	LAWAL <i>et al.</i> 2017

<i>C. geayi</i>	Folhas	β -pineno e limoneno	Antibacteriana	<i>B. cereus</i> e <i>S. Aureus</i>	RUPHIN <i>et al.</i> 2016
<i>C. grewioides</i>	Folhas	α -pineno	Antibacteriana ^o	<i>S. aureus</i>	MEDEIROS <i>et al.</i> 2017
<i>C. greveanus</i>	Folhas	1,8-cineol e linalol	Antibacteriana	<i>B. cereus</i> e <i>S. Aureus</i>	RUPHIN <i>et al.</i> 2016
	Partes aéreas	*	Antibacteriana	<i>S. aureus</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> 2019
	Folhas	Eucaliptol, β -cariofeleno e germacreno D	Antibacteriana ^o	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	ANGÉLICO <i>et al.</i> 2014
<i>C. heliotropiifolius</i>	Folhas	β -cariofeleno, biciclogermacreno, germacreno D,	Antibacteriana	<i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Shigella flexneri</i> e <i>E. coli</i>	ALENCAR-FILHO <i>et al.</i> 2017
	Partes aéreas (folhas e caule)	(<i>E</i>)-cariofileno, γ -muroleno e viridifloreno	Antibacteriana	<i>Staphylococcus ssp.</i> e <i>Bacillus ssp</i>	ARAÚJO <i>et al.</i> 2017

	Folhas	Biciclogermacreno, β -pineno e espatulenol	Antioxidante e antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	BRITO <i>et al.</i> 2018
<i>C. heterocalyx</i>	Folhas	germacreno D, biciclogermacreno, δ -elemeno e β -elemeno	Antimicrobiana	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. Aeruginosa</i>	MORENO <i>et al.</i> 2009
	Folhas	Cânfora	Antimicrobiana	<i>E. coli</i> , e <i>K. pneumoniae</i>	HELUANI <i>et al.</i> 2005
<i>C. hieronymi</i>	Raízes	γ -asarona, borneol, (<i>E</i>)-asarona e cânfora	Antimicrobiana	<i>E. coli</i> , e <i>K. pneumoniae</i>	HELUANI <i>et al.</i> 2005
<i>C. hirtus</i>	Partes aéreas	(<i>E</i>)-cariofileno, germacreno-D e α -humuleno	Antibacteriana ^o	<i>E. coli</i> , e <i>S. aureus</i>	DAOUDA <i>et al.</i> 2014
<i>C. lechleri</i>	Cascas do caule	Sesquicineol e α -calacoreno	Antibacteriana, antioxidante e antimutagênica	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	ROSSI <i>et al.</i> 2011
<i>C. limae</i>	Folhas	Cedrol, eucaliptol e α -pineno	Antimicrobiana ^o	<i>S. aureus</i> e <i>E. Coli</i>	LEITE <i>et al.</i> 2017

<i>C. linearis</i>	Folhas	Guaiol, eudesma-4 e 7-dien-1 β -ol	Antileishmanial e Antibacteriana	<i>S.aureus, E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	DÍAZ <i>et al.</i> 2018
<i>C. malambo</i>	Folhas	Metil eugenol	Antibacteriana e citotóxica	<i>S. aureus, B. cereus, P. aeruginosa, E. coli</i> e <i>C. tropicalis</i>	SUAREZ <i>et al.</i> 2008
<i>C. oblongifolius</i>	Cascas do caule	Terpinen-4-ol, α -guaieno, (<i>E</i>)-cariofileno e mirceno	Antibacteriana	<i>Propionibacterium acnes</i>	ATHIKOMKULCHA I <i>et al.</i> 2015
<i>C. pullei</i>	Folhas e partes aéreas	Linalol	Antimicrobiana	<i>S. aureus</i>	PEIXOTO <i>et al.</i> 2013
<i>Croton rhamnifolioides</i>	Folhas	1.8-cineol e 1-felandreno	Antibacteriana	<i>Aeromonas hydrophila, E. coli, L.monocytogenes, Salmonella</i> e <i>S. aureus</i>	COSTA, <i>et al.</i> 2013
<i>C. stellulifer</i>	Cascas	α -felandreno, <i>p</i> -cimeno, linalol e α -pineno	Antimicrobiana	<i>S. aureus, S. epidermidis, E. coli, Bacillus, C. albicans</i>	MARTINS <i>et al.</i> 2000
<i>C. urucurana</i>	Cascas e Folhas	germacreno-D e biciclogermacreno	Citotóxica, antimicrobiana e	<i>S. epidermidis, E. coli, B. subtilis</i> e <i>C.</i>	SIMIONATTO <i>et al.</i> 2009

			antioxidante	<i>albicans</i>	
		Borneol e 1- isopropil-7-metil-4- metileno- 1,3,4,5,6,8-hexa- hidro-2H-naftalen- 4a-ol (I)	Antioxidante e Antibacteriana	<i>S. epidermidis, E. coli, Bsubtilis e C.albicans</i>	SIMIONATTO <i>et al.</i> 2007
<i>C. tetradenius</i>	Folhas	α -pineno, α - terpineno, p- cimeno, 1,8-cineole	Antibacteriana	<i>B. cereus, S. aureus, L. monocytogenes, S. thyphimurium, e E. coli</i>	ALMEIDA-PEREIRA <i>et al.</i> 2019
	Folhas	Estragol, eucaliptol e espatulenol	Antibacteriana e citotóxica	<i>S. aureus</i>	ANDRADE, 2015
<i>C. zehntneri</i>	Folhas	estragol, <i>trans</i> - anetol, β -cariofileno e mirceno	Antibacteriana e antioxidante	<i>E. coli e S. aureus</i>	DONATI, 2015
	Folhas	Estragol	Antibacteriana ^o	<i>S. aureus</i>	COUTINHO, 2010

^o E modulação; * Não discutida no artigo

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

3.5 Atividade Antibacteriana

As infecções bacterianas vêm preocupando a saúde pública ao longo dos anos (FREITAS *et al.* 2020). O surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TAVARES, 2000). Isso se deve aos fatores do conhecimento inadequado das propriedades dos fármacos para escolha terapêutica como: baixa penetração do fármaco no local de infecção, doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada, além de fatores relacionados ao paciente, como idade, sistema imunológico (BROWN e WRIGHT, 2016). Com isso, existe o interesse em investigar o uso de plantas medicinais como fonte alternativa, uma vez que os seus metabólitos secundários gerados em processos metabólicos têm aplicações importantes (WRIGHT, 2019; ROCHA *et al.* 2020).

Para teste de atividade antimicrobiana de produtos naturais estão disponíveis na literatura, incluindo avaliações qualitativas (triagens) e/ou quantitativas, com determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (concentração inibitória mínima – CIM) (AMPARO *et al.* 2018).

Os métodos de avaliação de susceptibilidade de antibióticos utilizados na clínica são padronizados por normas estabelecidas por órgãos como o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), o mais adotado internacionalmente (TANNOUS *et al.* 2020; AMPARO *et al.* 2018). Dessa, é utilizado o CIM, que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento, assim como da mínima quantidade da substância que causa a morte bacteriana (KAHLMETER *et al.* 2019).

Como controle desses testes antimicrobianos, são geralmente utilizados os glicopeptídeos e as penicilinas, esses sendo estudados também juntos de produtos naturais de origem vegetal, alterando a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO *et al.* 2015).

Nos últimos anos, uma estratégia utilizada para vencer os mecanismos de resistência das bactérias é o uso de associações de fármacos, como exemplo beta-lactâmicos, juntamente com inibidores de betalactamase (SILVA, 2020; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). Seguindo o mesmo princípio, muitas plantas têm sido avaliadas como agente modificador de resistência antibiótica, principalmente de origem hospitalar, de bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido apresentarem baixo risco, e superaram esses mecanismos de resistência bacteriana (SHAKOOR *et al.* 2020; MEDEIROS *et al.* 2017).

O processo da modulação é conhecido como sinergismo: fenômeno no qual dois compostos diferentes são combinados para aprimorar sua atividade individual. E o antagonismo: combinação resultada com a piora do efeito (SHARMA *et al.* 2016; RANI *et al.* 2009).

A escolha das cepas bacterianas utilizadas para este trabalho foi baseada na sua relevância clínica médica e na sua resistência a diversos antibióticos utilizados em terapias atuais.

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria de Gram-Positivo *Staphylococcus aureus*, é conhecida por permanecer em superfícies e utensílios devido à sua capacidade de interações intercelulares com a troca de material genético em biofilmes, que cresce relativamente bem em condições de alta pressão e baixa umidade e podendo tolerar até 60°C por 30 minutos (LIU *et al.* 2017).

Nos seres humanos as infecções mais comuns, estão ligadas à sobrevivência e disseminação de patógenos entre pacientes hospitalares e podem resultar em aumento da hospitalização do paciente em que envolvem a pele e feridas em sítios diversos como atrite bacteriana, furúnculo, meningite, carbúnculo, pneumonia, miocardite abcesso e endocardite (JAFRI *et al.* 2019; MAI-PROCHNOW, 2020).

S. aureus são produtoras de β -lactamases que são codificadas por plasmídios e hidrolisam a benzil-penicilina e muitas outras penicilinas, de acordo com Ranni *et al.* (2009), já vem encontrando um perfil de resistência para os antibióticos: oxacilina, gentamicina, tobramicina, amicacina, neomicina, paromomicina, butirosin, sisomicina, netilmicin.

3.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (Gram-negativo), é uma bactéria microbiótica intestinal bastante comum nos animais e seres humanos, são inofensivas e de importante comensal na microflora intestinal (LU *et al.* 2019). Seu papel é de proteger o organismo de invasão de outras bactérias e melhorar o funcionamento gastrointestinal que habitam o intestino sem prejudicar a saúde, no entanto, também existem cepas patogênicas (NOLAN *et al.* 2020; SMITH *et al.* 2017).

Essas cepas são uma das principais causas de doenças infecciosas humanas, contendo alguns patótipos como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) como diarreiogênica e ainda hoje estão associadas a casos esporádicos e surtos de diarreia infantil (SOUZA *et al.* 2016); a *E.*

coli de Toxina Shiga (STEC) que desenvolve uma seqüela com risco de vida como diarreia e colite hemorrágica (TORPHE *et al.* 2017); a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) associada a diarreia entre bebês e crianças que vivem em áreas endêmicas e viajantes (HARRO *et al.* 2019; BOURGEOIS *et al.* 2016); a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) provoca diarreia com muito sangue e muco, devido as lesões no epitélio intestinal (SMITH *et al.* 2017); a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) produção e secreção de enterotoxinas e citotoxinas, que resultam em diarreia secretora (DIAS *et al.* 2020); e por fim cepas de *E. coli* Extra-Intestinal (EXPEC) são causadoras de meningite em neonatais, indutores de infecções do trato urinário, sendo as mulheres são mais suscetíveis (FIBKE *et al.* 2019) .

Para Ranni *et al.* (2009), a *E. coli* já vem encontrando um perfil de resistência para os antibióticos: aztreonam, amoxicilina, ampicilina, amicacina, amoxicilina, cefadroxil, cefaclor; cefalotina, ceftazidima, ciprofloxacina, cloranfenicol, cmipenem, kanamicina, sulfametrim, , tetraciclina,tobramicina.

4 METODOLOGIA

4.1 Levantamento Bibliográfico

A presente pesquisa foi realizada através de uma investigação a partir de artigos científicos que abordam estudo sobre os óleos essenciais de atividades antibacterianas das espécies do gênero *Croton*, no período de 2000 a 2020, encontradas nas plataformas *Scifinder*, *SciELO* e o Portal de Periódicos CAPES, usando como palavras chaves: *Croton*, essential oil, antimicrobial activity.

4.2 Material Botânico

As folhas de *C. adamantinus* e *C. urticifolius*, foram coletadas em Abril de 2019, por volta das 8 horas da manhã, na Pista de Pouso do município Areia-PB (Figura 5). Os materiais vegetais foram identificados pelo Dr. Leonardo Félix e o material voucher encontra-se depositado no herbário Jayme Coêlho de Moraes da UFPB, campus II, sob o número de exsicata (OCU1362 e OCA1259). A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sobre o código A5D5689, que foram registradas para as mesmas.

Figura 5 - Destaque da localização de coleta dos indivíduos de *C. urticifolius* e *C. adamantinus* no município de Areias-PB.



Fonte: adaptada do IBGE, 2020.

4.3 Extração do Óleo Essencial por Hidrodestilação

As amostras de folhas frescas de *C. urticifolius* e *C. adamantinus* foram imediatamente trituradas e submetidas à hidrodestilação por 3 horas, em um aparelho do tipo Clevenger.

Os óleos obtidos foram posteriormente secos sobre sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração, a fim de se evitar possíveis perdas de constituintes voláteis provenientes dos óleos essenciais.

As quantidades de material de cada espécie, bem como o volume de água destilada utilizada em cada extração estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 - Massa das folhas e volumes de água utilizados nas extrações

<i>Espécies</i>	<i>Massa de folhas</i>	<i>Volume de água</i>
OCU	500 g	2 L
OCA	1.300 g	3,7 L

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Foram realizadas duas extrações para a espécie de *C. adamantinus* pela quantidade de material. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do óleo obtido com a massa de material vegetal fresco utilizado na extração.

4.4 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

As análises dos óleos essenciais foram realizadas, em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-EM), modelo: GCMS-QP2010 Ultra da Shimadzu; Coluna capilar da: marca: RTX-5MS com seguintes dimensões: 30 m / 0,25 mm / 0,25 µm, pertencente ao LMCA (Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise), da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

As amostras foram solubilizadas em diclorometano, grau *HPLC*, na concentração 200 ppm e submetida as análises de CG-EM utilizando o seguinte gradiente de aumento de temperatura: 4 °C/min. de 40 °C-180 °C e 10 °C/min de 180-250°C, permanecendo constante por 5 min em 250 °C. A energia de ionização foi de 70 eV (EI), com intervalo de massas de 20 – 400 Da.

Os compostos individuais foram identificados comparando seus espectros de massa com a pesquisa da biblioteca de espectros de referência interna (NIST / EPA / NIH versão 2.1 e registro Wiley de dados espectrais de massa, 7ª edição), bem como por comparação com os dados da literatura de espectros de massa (Adams, 2009), e banco de dados *NIST* (www.nist.gov).

Adicionalmente foi feita a correção dos índices de Kovats através de regressão linear usando o tempo de retenção experimental e o índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2009).

4.5 Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais

A avaliação da atividade antibacteriana foi conduzida seguindo as metodologias de Javadpour *et al.* (1996) e Saraiva *et al.* (2011), a partir da detecção da concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas padrão de bactérias. Onde o procedimento realizado no laboratório de Produtos Naturais, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.5.1 Cepas Bacterianas

Foram utilizadas as seguintes cepas: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *S. aureus* multidroga resistente (UFPEDA 802). Todas provindas do departamento de antibióticos da UFPE.

4.5.2 Drogas

Os antibióticos oxacilina e vancomicina, ambos obtidos comercialmente, foram dissolvidos em água destilada esterilizada. Os óleos essenciais foram diluídos em DMSO a 10% e água destilada, posteriormente filtrados em filtro PTFE 0,22 (μM).

4.5.3 Meios de Cultura

Foram utilizados os meios BHI (Brain Heart Infusion) e ágar Mueller-Hinton. Pesadas as quantidades adequadas, eles foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min.

4.5.4 Preparação do Inóculo

Antes do ensaio, as cepas foram incubadas a 37 °C por 24h em ágar Mueller-Hinton. Posteriormente as células bacterianas foram transferidas para uma solução salina a 0,9% até a solução atingir a concentração de 10^5 UFC/mL. A densidade celular foi ajustada em aparelho de espectrofotometria ELISA (Termoplate®).

4.5.5 Diluição dos Óleos Essenciais

Para cada amostra de OE 0,010 g foi diluído em 1 mL de DMSO e agitado no vórtex, sendo posteriormente adicionado em tubo falcon contendo 8.765 µL de água destilada. O OE de *C. adamantinus* foi denominado de P1 e o óleo essencial de *C. urticifolius* de P2.

4.5.6 Preparação dos Eppendorffs

Antes de iniciar a microdiluição foram colocados em Eppendorffs 1.350 µL do meio e 150 µL do inóculo. O controle esterilidade recebeu apenas 1.500 µL do meio de cultura.

4.5.7 Determinação da CIM

Na técnica de microdiluição, foram adicionados em placas de 96 poços de fundo chato: o meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion); as drogas nas seguintes concentrações: 0, 4, 8, 16, 32, 64, 132, 264 e 512 µg/mL; e o inóculo bacteriano.

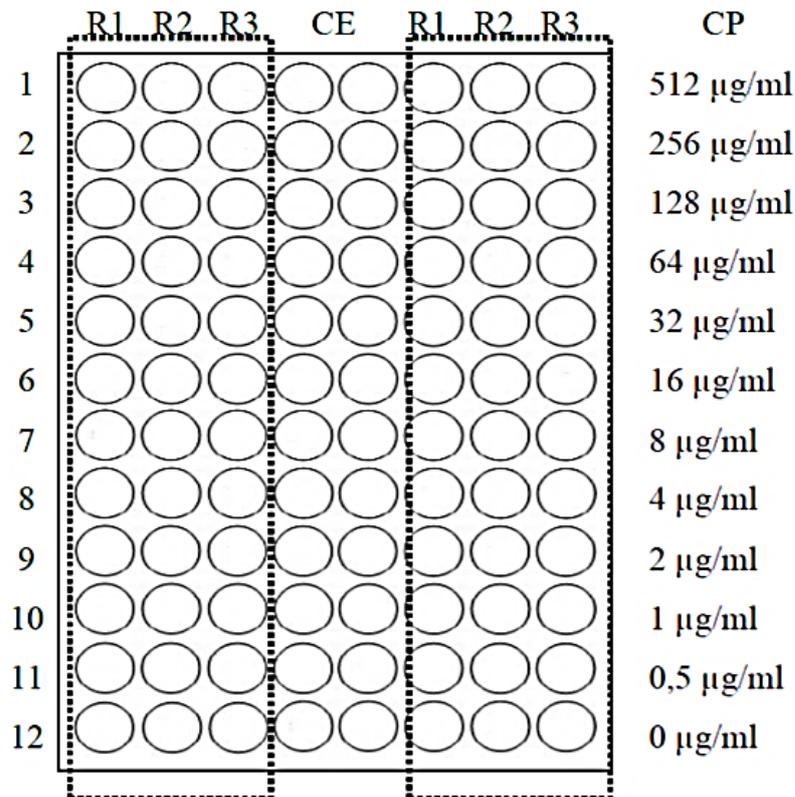
4.5.8 Pipetagem da Placa

Foram pipetados 100 µL do conteúdo de cada Eppendorff contendo o inóculo e o meio de cultura em todos os poços. Logo em seguida, 100 µL do produto na concentração de 1.024 µg/mL foram depositados no primeiro poço. Depois foi realizada a microdiluição seriada até o penúltimo. O controle de esterilidade recebeu apenas o meio de cultura.

O experimento foi realizado em triplicata e as placas foram colocadas para incubar em estufa a 36°C por 24h. A leitura do resultado foi feita adicionando 20 µL do reagente

resazurina em cada poço. Nos poços em que não houve mudança de coloração do reagente as bactérias foram consideradas sem crescimento microbiano.

Figura 6 – Esquema de pipetagem



CE = Controle de esterilidade do meio; R = Replicata; CP = Concentração do produto nos poços.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

4.5.9 Investigação do efeito modulador

Para determinar se os produtos possuíam algum efeito modulador da resistência bacteriana, utilizaram-se antibióticos amplamente utilizados no mercado (Ciprofloxacino, Cefoxitina e Eritromicina) contra as cepas multirresistentes e avaliados a sua CIM na presença e na ausência dos produtos em concentrações subinibitórias (CIM/16), seguindo a mesma metodologia citada anteriormente.

Contudo, o conteúdo dos Eppendorfs passa a ser 188 µL do produto na concentração subinibitória, 150 µL do inóculo e 1.162 µL do meio de cultura. Além do controle de esterilidade (1.500 µL do meio), também é feito o controle de modulação, cujo Eppendorf recebe apenas o inóculo (150 µL) e o meio (1.350 µL).

A microdiluição foi feita na placa de 96 poços de fundo chato com o antibiótico nas mesmas condições e concentrações da seção anterior.

A leitura da CIM foi através da absorbância dos poços em aparelho de espectrofotometria ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 600 nm. Os valores das absorbâncias foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular.

A construção da curva utilizou a seguinte fórmula:

Onde,

$$\text{Crescimento (\%)} = (\text{Asam} / \text{Acon}) * 100$$

Asam = absorbância da amostra (subtraída do branco);

Acon = absorbância do controle (subtraída do branco).

A CIM foi então considerada a menor concentração capaz de inibir a percentagem de crescimento das células bacterianas em pelo menos 20%.

Os valores das CIMs foram expressos em média \pm desvio padrão, para verificar se os grupos diferiam estatisticamente foi realizada a ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey, considerando $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa Graphpad prism versão 8.0.2 (JAVADPOUR *et al.* 1996; SARAIVA *et al.* 2011),.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais das folhas frescas de *C. urticifolius* e de *C. adamantinus* coletadas no brejo Paraibano – Brasil, extraídos por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger, foram obtidos com rendimentos iguais e com valor de 0,1%. Tal rendimento encontra-se no intervalo dos valores descritos na literatura para espécies de *Croton* (0,05% a 3,15%) (ANGÉLICO *et al.* 2011).

Na literatura consultada, não foram encontrados outros estudos que relatam a extração do óleo essencial de *C. urticifolius*. Já para o óleo essencial das folhas de *C. adamantinus*, extraído por destilação a vapor, a literatura mostra um rendimento de aproximadamente 0,6%, um pouco superior ao obtido neste trabalho (XIMENES *et al.* 2013). Mostrando que houve uma variação no rendimento do óleo essencial da espécie em estudo. Essas variações no rendimento podem ser atribuídas aos fatores de qualidade dos solos, unidade do ar, temperatura ambiente, período de extração, método e tempo de destilação, além da diversidade genética da espécie, e entre outros (MADHUMITA; GUHA; NAG, 2019).

5.1 Identificação dos Constituintes

Os óleos essenciais das folhas de *C. urticifolius* (OCU) e *C. adamantinus* (OCA) foram analisados por CG/EM e um total de 22 compostos foram identificados (Figura 6), a partir dos dados obtidos nos cromatogramas (Figuras 7 e 8), e espectros de massas (Apêndices A). Os 22 compostos organizados por ordem de eluição na coluna, o índice de retenção e a porcentagem de cada constituinte estão apresentados na Tabela 3.

As análises dos espectros de massas e comparação com dados na literatura (ADAMS, 2009), confirmou a identificação de aproximadamente 95,0% de todos os compostos presentes tanto no óleo essencial de *C. urticifolius* (OCU) quanto no de *C. adamantinus* (OCA) (Tabela 2). Os compostos predominantes nos óleos OCU e OCA foram sesquiterpenos (91%), seguidos por monoterpenos (9%).

A presença de sesquiterpenos em porcentagens elevadas é comum nos óleos das espécies de *Croton*, conforme tem sido relatado na literatura (SALATINO *et al.* 2007; VUNDA *et al.* 2012; OLIVEIRA *et al.* 2020).

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) e de *Croton adamantinus* (OCA).

Composto	Nome ^a	IK ^b	IK ^c	Composição (%)	
				OCA	OCU
C1	α -pineno	939	917	0,32	21,70
C2	β - pineno	979	938	ND	0,35
C3	δ -Elemeno	1335	1344	3,90	3,31
C4	α -Cubeno	1351	1384	0,49	3,67
C5	β -Elemeno	1390	1398	8,62	6,73
C6	(E)- Cariofileno	1419	1427	9,22	17,34
C7	α -trans-Bergamoteno	1434	1440	0,96	ND
C8	γ - Elemeno	1436	1444	ND	0,47
C9	α -Humoleno	1454	1460	1,23	3,53
C10	9-Epi-(E)-Cariofileno	1466	1474	ND	0,89
C11	γ -Mureleno	1479	1494	ND	6,12
C12	β -Selineno	1490	1499	ND	0,68
C13	γ -Amorfeno	1495	1500	22,91	ND
C14	Biciclogermacreno	1500	1501	36,47	21,46
C15	β -Bisaboleno	1505	1508	1,41	2,19
C16	δ -Cadineno	1523	1523	1,69	1,28
C17	B-Germanocreno	1561	1556	0,63	1,43
C18	Espatulenol	1577	1574	1,75	2,75
C19	Óxido de Cariofileno	1583	1580	1,78	ND
C20	Viridiflorol	1592	1588	0,62	0,92
C21	α -Murolol	1646	1628	2,08	0,61
C22	α -Cadinol	1654	1641	0,92	ND
Total				95	95

^aNomes dos constituintes listados em ordem de eluição na coluna cromatográfica; ND= não determinado; ^bIK= índice de Kovat da literatura (ADAMS, 2009);

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Para OCU foram identificados 19 compostos, dentre eles dois como monoterpenos e 17 como sesquiterpenos. Tendo como compostos majoritários o monoterpeno α -pineno (21,70%) **C1** e os sesquiterpenos, biciclogermacreno (21,46%) **C14**, e (E)-cariofileno (17,34%) **C6** (Figura 6).

É importante ressaltar que a composição química deste óleo está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

A presença do monoterpeno, α -pineno, como majoritário no OCU é de grande importância como uma alternativa para o combate de bactérias, uma vez que, a literatura

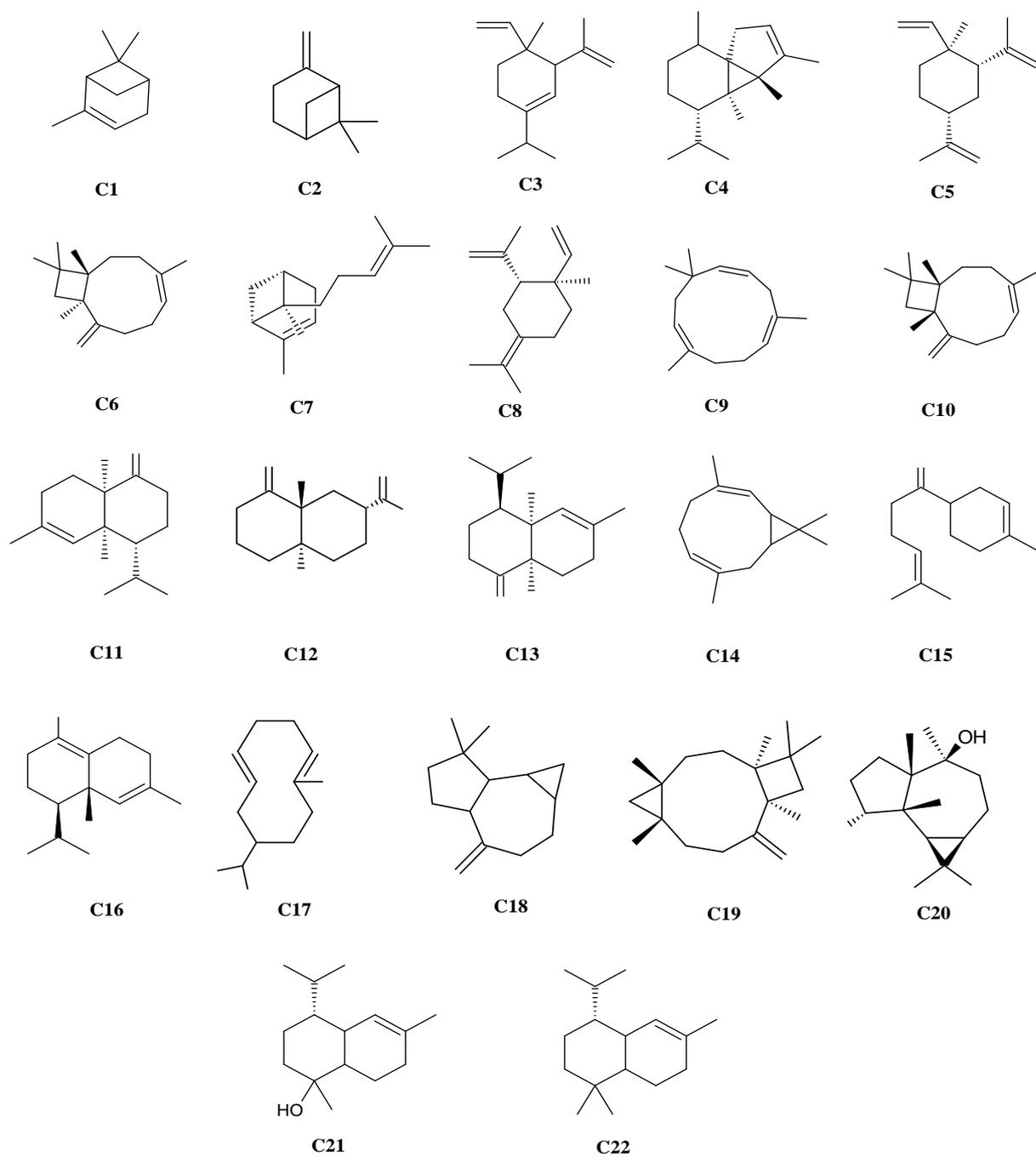
reporta que esse composto possui efeitos destrutivos na membrana citoplasmática bacteriana (DO AMARAL *et al.* 2020).

Para OCA foram identificados 17 compostos, sendo 01 monoterpene e 16 sesquiterpenos. Os constituintes majoritários foram os sesquiterpenos: biciclogermacreno (36,47%) **C14**, γ -amorfeno (22,91%) **C13** e (*E*)-cariofileno (9,22%) **C6** (Figura 6). Esses dados são diferentes da literatura já reportada para o óleo essencial das folhas de *C. adamantinus* que apresenta um percentual de monoterpenos (45%) e sesquiterpenos (55%) próximos, e como composto majoritário em comum apenas o biciclogermacreno (XIMENES *et al.*, 2013).

A diferença na composição se deve a vários fatores na produção de metabólitos secundários nas plantas como genética e morfologia, além de fatores extrínsecos como umidade relativa, regime de ventos, umidade do solo, variações geográficas, estágio do ciclo vegetativo, técnicas de cultivo e variações sazonais (ALKAN, 2020; SAMPAIO 2016).

Vários estudos realizados com óleos essenciais de espécies do gênero *Croton* ricos em α -pineno, biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno, e γ -amorfeno têm mostrado que esses óleos apresentam atividades antibacterianas contra as cepas *S. aureus* e *E. coli* em (BRITO 2018; ALMEIDA 2013; ARAÚJO *et al.* 2020; ALENCAR-FILHO *et al.* 2017; MORENO *et al.* 2009; DAOUDA *et al.* 2014; LEITE *et al.* 2019; MARTINS *et al.* 2000; ALMEIDA-PEREIRA *et al.*, 2019). De acordo com esses resultados, óleos essenciais contendo como constituintes majoritários os compostos citados acima são fontes potenciais de agentes antibacterianos.

Figura 7 - Estrutura dos constituintes identificados nos óleos essenciais de OCA e OCU.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Figura 8 - Cromatograma CG/EM do óleo essencial das folhas de *C. urticifolius* (OCU).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

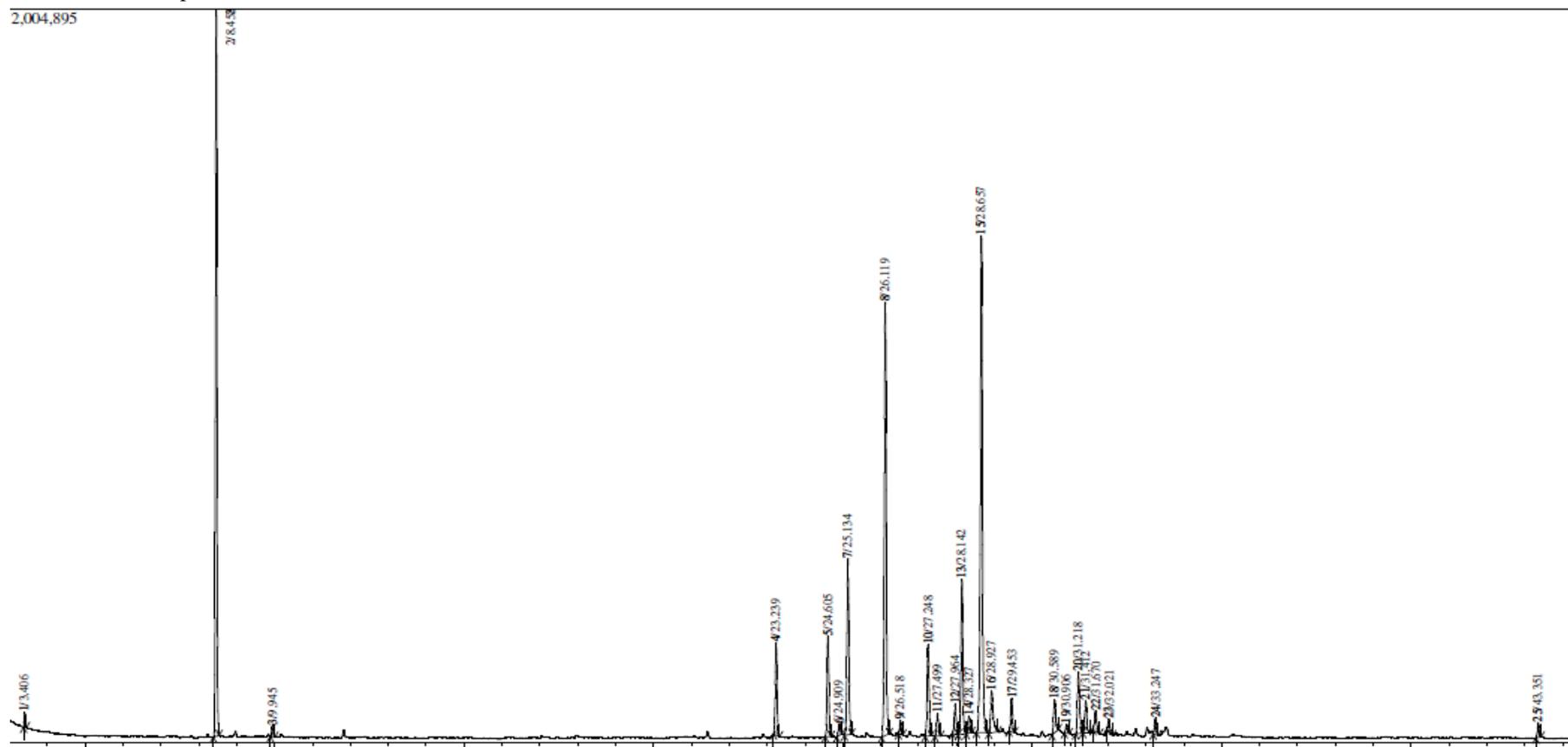
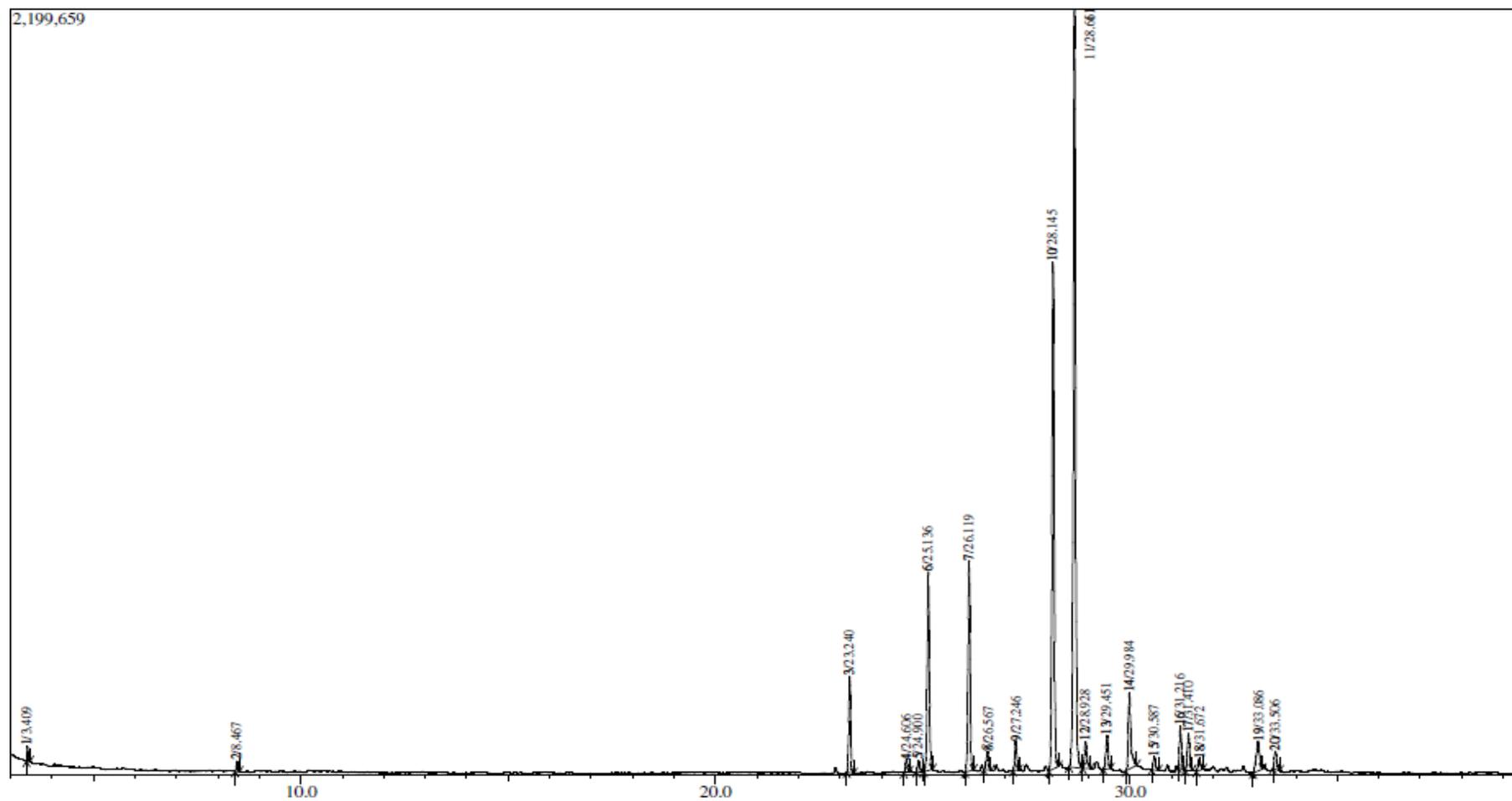


Figura 9 - Cromatograma CG/EM do óleo essencial das folhas de *C. adamantinus* (OCA).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para a análise dos resultados da atividade antibacteriana considerou-se a literatura que classifica uma atividade inibitória boa, quando o valor de CIM for menor que 100 µg/mL, atividade inibitória moderada, entre 100–500 µg/mL, atividade inibitória fraca, entre 500–1000 µg/mL, e ausência de atividade inibitória, quando maior que 1000 µg/mL de acordo com a Tabela 4 (Literatura).

Tabela 4 – Classificação da atividade antibacteriana de acordo com os valores obtidos de (CIM).

<i>Atividade Antibacteriana</i>	<i>Concentração inibitória mínima – CIM (µg/mL)</i>
Atividade boa	<100
Atividade moderada	101 – 500
Atividade fraca	501 – 1000
Inativo	1001

Fonte: HOLETZ *et al.* (2002); SOUZA *et al.* (2014); CHAUL, (2015).

Os resultados do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM), usado para a avaliação da atividade antimicrobiana direta dos óleos essenciais das folhas de *C. urticifolius* (OCU) e *C. adamantinus* (OCA) contra as cepas *S. aureus* e *E. coli* estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Investigação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *Croton urticifolius* (OCU), e de *Croton adamantinus* (OCA).

Cepas	CIM dos Produtos (µg/mL)			
	OCA	OCU	Vancomicina	Oxacilina
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	≥1024 ^a	≥1024 ^a	4	64
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	≥1024 ^a	512	256	ND*

^a = Cresceram bactérias em todas as concentrações testadas.

*ND = Não definida.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Levando em consideração a classificação da literatura citada acima (Tabela 4), o OCU apresentou uma atividade antimicrobiana fraca (CIM 512 µg/mL) frente à linhagem Gram-

negativa *E. coli*, e mostrou-se inativo frente a linhagem Gram-positiva *S. aureus*. Enquanto para o OCA não exibiu atividade antimicrobiana frente às cepas testadas.

As propriedades antibacterianas do OCU podem ser justificadas devido à presença e/ou sinergismo dos constituintes majoritário biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno e α -pineno, em consonância com os estudos realizados com óleos essenciais ricos nos sesquiterpenos: biciclogermacreno e (*E*)-cariofileno. Que mostram o potencial antimicrobiano desses óleos contra as cepas *S. aureus* e *E. coli* (BRITO *et al.* 2018; DAOUDA *et al.* 2014). Bem como os que apresentam o monoterpeneo α -pineno, entre os principais compostos (LEITE *et al.* 2019; MEDEIROS *et al.* 2017).

É importante ressaltar que o α -pineno, componente principal do óleo OCU (21,70%) e minoritário em OCA, podem também ser um dos responsáveis pela a atividade antimicrobiana do OCU. Uma vez que, a literatura reporta as propriedades antibacterianas e o mecanismo de ação para α -pineno isolado e mostra que ação foi descrita como uma destruição da integridade celular (BAKKALI *et al.* 2008; SILVA *et al.* 2012; MORA *et al.* 2015). Adicionalmente, Amaro *et al.* (2020), relata que o α -pineno puro é o uma alternativa no combate às bactérias, pois foi capaz de inibir o crescimento da espécie *E. coli*, demonstrando a possibilidade de seu uso como antimicrobiano isolado ou associado a outras drogas.

Embora existam estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais ricos em biciclogermacreno e (*E*)-cariofileno (BRITO *et al.* 2018; DAOUDA *et al.* 2014), é importante ressaltar que esta atividade depende não apenas dos componentes dos óleos essenciais, mas também da sensibilidade das cepas bacterianas. Além disso, os componentes do óleo podem interagir entre si, formando um complexo inativo.

5.3 Efeito Modulador da Resistência Bacteriana

Neste ensaio foi investigado o potencial dos óleos essenciais de *C. urticifolius* (OCU) e *C. adamantius* (OCA) como possíveis adjuvantes no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente a múltiplas drogas e o perfil de resistência aos antibióticos da cepa utilizada está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6- Perfil de resistência a antibióticos da cepa utilizada.

Estirpe bacteriana	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 802	Cef, Eri, Cli, Clo, Cip

Cefoxitina (Cef); Eritromicina (Eri), Clindamicina (Cli); Clorafenicol (Clo); Ciprofloxacino (Cip).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

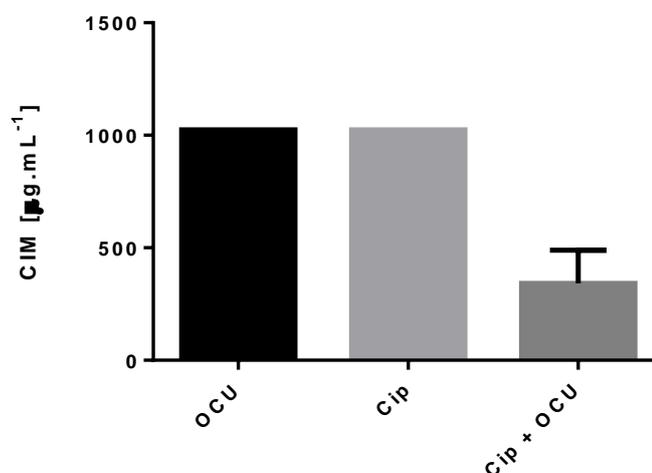
Os resultados da atividade modulatória avaliada pela CIM e observada através da absorvância dos poços em aparelho de espectrofotometria ELISA, revelaram uma atividade sinérgica entre os compostos voláteis de cada óleo (OCU e OCA), e os antibióticos avaliados (Gráficos 1-6).

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão dos valores de CIM de três repetições (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 e **** P <0,0001, ANOVA de duas vias e teste de Tukey).

Com relação ao OCU, o produto foi capaz modular a resistência de *S. aureus* quando combinado à Ciprofloxacino, reduzindo significativamente a CIM do antibiótico (p valor < 0,0001), representados no gráfico 1.

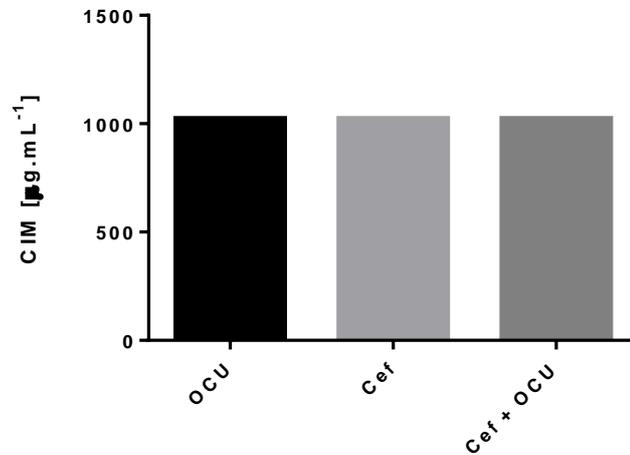
Já as outras combinações com cefoxitina (Gráfico 2), e eritromicina (Gráfico 3) não foram eficazes.

Gráfico 1 - Modulação da resistência de *S. aureus* (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de *C. urticifolius* OCU com Ciprofloxacino.



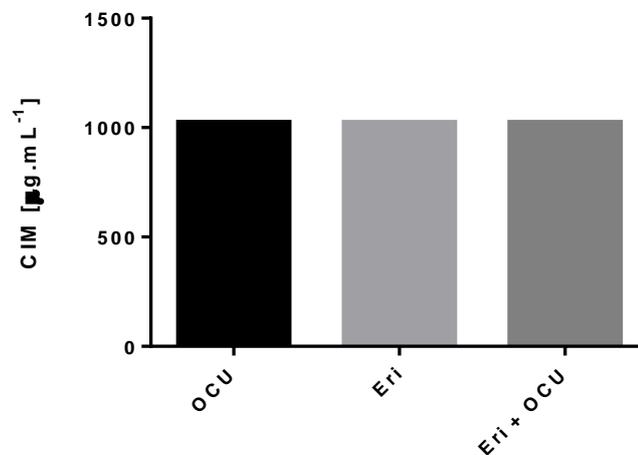
Fonte: Sistema Integrado pela ANOVA, 2020.

Gráfico 2 - Modulação da resistência de *S. aureus* (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de *C. urticifolius* OCU com Cefoxitina.



Fonte: Sistema Integrado pela ANOVA, 2020.

Gráfico 3 - Modulação da resistência de *S. aureus* (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de *C. urticifolius* OCU com Eritromicina.



Fonte: Sistema Integrado pela ANOVA, 2020.

Em relação aos componentes majoritários do OCU, Freitas *et al.* (2020) testou a atividade moduladora do α -pineno. Quando combinado com a norfloxacin, o terpeno potencializou a atividade contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Este mesmo monoterpene modulou a ação da gentamicina (apenas contra *S. aureus*) e não afetou a atividade da penicilina contra nenhuma das cepas testadas.

Em outro trabalho onde foi isolado o α -pineno, os resultados demonstram que a associação do monoterpene com os antimicrobianos ceftazidima, amoxicilina, cefepima,

cefexitina e amicacina é positiva, pois leva à potencialização do efeito antibiótico desses compostos (AMARAL *et al.*2020).Logo, a sua atividade moduladora varia de acordo com a cepa e com o antibiótico. Os outros componentes majoritários do OCU não foram testados isoladamente até o momento.

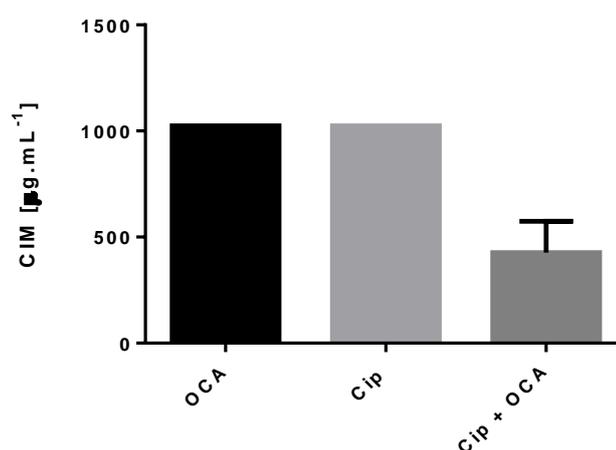
Logo, são necessários mais estudos, tanto dos terpenos isoladamente, como da ação deles em conjunto, que investiguem as interações físico-químicas entre eles e os constituintes das paredes e membranas bacterianas (como lipídeos de membrana, canais iônicos, bombas de efluxo, etc).

Com relação ao OCA, o produto também foi capaz modular a resistência de *S. aureus* quando combinado à Ciprofloxacino, reduzindo significativamente a CIM do antibiótico (p valor $< 0,001$) (Gráfico 4).

Semelhante com o OCU, o óleo essencial de *C. adamantinus* nas outras combinações cefoxitina (gráfico 5) e eritromicina (gráfico 6) não foram eficazes para a modulação.

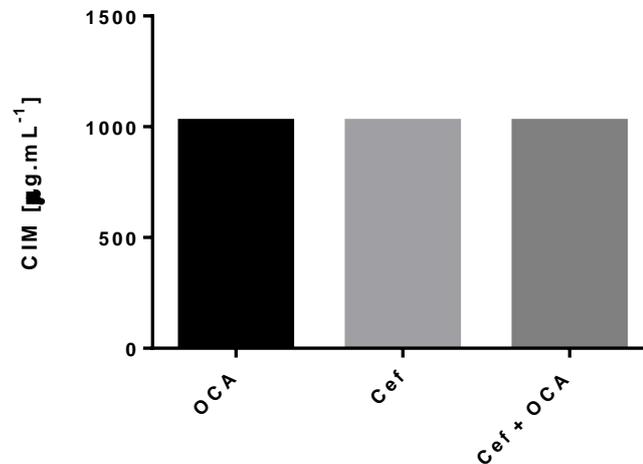
O potencial antimicrobiano do produto sozinho também não foi promissor, apresentando uma CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 4 - Modulação da resistência de *S. aureus* (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de *Croton adamantinuss* OCA com Ciprofloxacino.



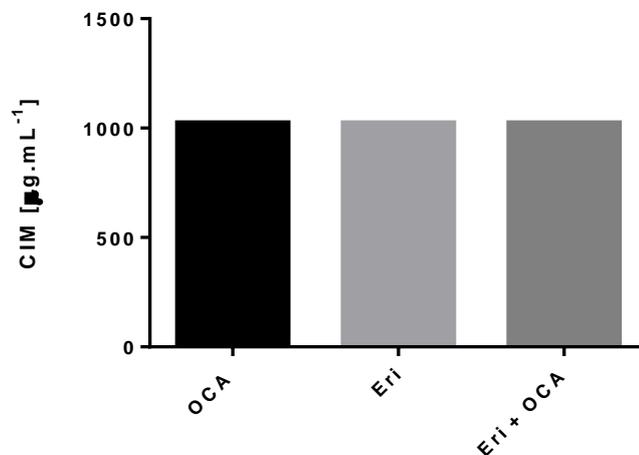
Fonte: Sistema Integrado pela ANOVA, 2020.

Gráfico 5 - Modulação da resistência de *S. aureus* (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de *Croton adamantinuss* OCA com Cefoxitina.



Fonte: Sistema Integrado pela ANOVA, 2020.

Gráfico 6 - Modulação da resistência de *S. aureus* (UFPEDA 802) pelo óleo essencial das folhas de *Croton adamantinuss* OCA com Eritromicina.



Fonte: Sistema Integrado pela ANOVA, 2020.

Para fins de comparação, consideramos uma $\text{CIM} \geq 1024$ para a ação do antibiótico sozinho. Sendo observado uma modulação da resistência bacteriana quando o antibiótico Ciprofloxacino foi combinado com ambos os óleos, OCA e OCU. A cepa foi inibida a uma concentração de $426 \mu\text{g/mL}$ para o Ciprofloxacino combinado com o OCA, o que representa uma redução de pelo menos 59% da CIM e $341 \mu\text{g/mL}$ para o antibiótico combinado com o OCU, uma redução de 67%.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu para a caracterização dos óleos essenciais das folhas de duas espécies de *C. urticifolius* e de *C. adamantinus*, coletadas no brejo Paraibano Brasileiro.

A análise por cromatografia acoplada à espectroscopia de massa CG/EM dos óleos permitiu a identificação de 19 compostos (95,0%) para o *C. urticifolius* e para o *C. adamantinus* 17 compostos (95,0%), totalizando 22 compostos diferentes. Para o *C. urticifolius*, que foi estudado pela primeira vez, os compostos majoritários foram o monoterpeno: α -pineno (21,70%) C1; e os sesquiterpenos: biciclogermacreno (21,46%) C14, e (*E*)-cariofileno C6 (17,34%). Para o *C. adamantinus* os compostos majoritários foram os sesquiterpenos: biciclogermacreno (36,47%) C14, γ -amorfeno (22,91%) C13 e (*E*)-cariofileno (9,22%) C6.

Os estudos antibacterianos *in vitro*, em ambos contra as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), provou ter sucesso para as cepas de Gram-negativa *E. coli* com o óleo essencial de *C. urticifolius*, identificado pela primeira vez, com concentração inibitória mínima (CIM) de 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O óleo essencial das folhas de *C. adamantinus* não exibiu atividade antibacteriana relevante frente a nenhuma cepa testada.

Na modulação da resistência, o OCU e OCA agiu como efeito sinérgico quando combinado à Ciprofloxacino, enquanto para as outras combinações de antibióticos (cefexitina e eritromicina) não apresentou atividade significativa para os mesmos.

Os dados obtidos para essas plantas são resultados que corroboram o uso etnobotânico dessas espécies pela população brasileira e são considerados extremamente importantes para a literatura, na qual, essas espécies vegetais são fontes potenciais de fitoquímicos com interesse nas indústrias farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-KHAIR, H. Biological Control of Phyto-pathogenic Bacteria. In: **Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications**. Springer, Cham. p: 299-336. 2020.
- ADAMS, Robert P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Illinois, United States. 2009.
- ALENCAR FILHO, J. MT de, *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n.4, p: 440-444. 2017.
- ALKAN, M. Chemical composition and insecticidal potential of different *Origanum spp.* (Lamiaceae) essential oils against four stored product pests. **Türkiye Entomoloji Dergisi**, v.44, n.2, p: 149-163. 2020.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S., *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n.5, p: 379-389. 2019.
- ALMEIDA J. R. G. S, *et al.* *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). In: Albuquerque U., Patil U., Máthé Á. (eds) **Medicinal and Aromatic Plants of South America.**, vol 5. Springer, Dordrecht, 2018.
- ALMEIDA, T. S. *et al.* Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.44, p: 630-633, 2013.
- ALVES, J. A. B.; NUNES, M. S.; FAKHOURI, R.; MARTINS-FILHO, P. R. S.; *et al* Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant mycobacterium tuberculosis strains by essential oil from *Croton Argyrophyloides* Mull. Arg. **International Archives of Medicine** v. 9, p. 1-7, 2016.
- ALVES, I. A. B. dos S., *et al.* Microscopic Characterization of *Croton cordifolius* Baill. (Euphorbiaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 3, p. 361-366, 2017.
- ALVIANO, W. S., *et al.* Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v.20, n.2, p: 101-105, 2015.
- AMARAL, F. L. E. *et al.* Effect of the Association and Evaluation of the Induction to Adaptation of the (+)- α -pinene with Commercial Antimicrobials against Strains of *Escherichia coli*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 25, p. 2300-2307, 2020.
- AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical pharmacology**, n.133, p: 4-19, 2017.
- AMPARO, T. R. *et al.* Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma**. 2018.

ANDRADE, T. C. B., *et al.* Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *croton zehntneri* (Euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.1, p: 173-182, 2015.

ANGÉLICO, E. C.; COSTA J. G. M.; RODRIGUES, O. G. *et al.* Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kunth e *Croton blanchetianus* Baill. Resultados preliminares. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.5, n.2, p: 44-49, 2011.

ARAÚJO, A. C. J. de, *et al.* Essential Oil of *Croton ceanothifolius* Baill. Potentiates the Effect of Antibiotics against Multiresistant Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n.1, p: 27, 2020.

ARAÚJO, F. M., *et al.* Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial crops and products**, v.105, p: 203-206. 2017.

ARCHIBOLD, O. W. **Ecology of world vegetation**. Springer Science & Business Media, 2012.

ATHIKOMKULCHAI, Sirivan, *et al.* Chemical Composition of the Essential Oil from *Croton oblongifolius* and its Antibacterial Activity against *Propionibacterium acnes*. **Natural product communications**, v.10, n.8, p: 1934578-1501000836, 2015.

AUGUSTIN, Jörg M. *et al.* Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435-457, 2011.

AZEVEDO, M. M. B, *et al.* Effects of 7-hydroxycalamenene isolated from *Croton cajucara* essential oil on growth, lipid content and ultrastructural aspects of *Rhizopus oryzae*. **Planta Medica**, v. 80, n.07, p: 550-556, 2014.

BABILI, F. El, *et al.* Essential oil of leaves of *Croton campestris* St. Hilaire, its secretory elements, and its biological activity. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.3, p: 272-275, 2009.

BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. Food and chemical toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BANERJEE, A.; HAMBERGER, B. P450s controlling metabolic bifurcations in plant terpene specialized metabolism. **Phytochemistry Reviews**, v.17, n.1, p: 81-111, 2018.

BARTH, E. F. *et al.* Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 601-608, 2018.

BASTO, S. R.L. *Croton nummularis* Baill. (Euphorbiaceae): composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais. 2013.

BHAGAVAN, N. V., Chung-Eun. **Essentials of medical biochemistry: with clinical cases**. Academic Press, 2011.

BOURGEOIS, A. L.; WIERZBA, T.F.; WALKER, R. I. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vaccine**, v.34, n.26, p: 2880-2886, 2016.

BRITO, S. S. S.; SILVA, F.; MALHEIRO, R. BAPTISTA, P. P.; ALBERTO, J. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive Properties. **Industrial Crops and Products**, v.113, p. 308-315, 2018.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v.529, n.7586, p: 336-343, 2016.

CÂMARA, C. A. G.; MORAES, M. M.; MELO, J. P. R.; SILVA, M. C. Chemical Composition and Acaricidal Activity of Essential Oils from *Croton rhamnifolioides* Pax and Hoffm. In Different Regions of a Caatinga Biome in Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 6, p. 1434-1449, 2017.

CARNEIRO-TORRES, D.S., **Diversidade de *Croton* L. Euphorbiaceae, no Bioma Caatinga**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2009.

CHAUL, L. T. *et al.* Caracterização e determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações de *Rosmarinus officinalis* Linn.(alecrim), *Origanum vulgare* Linn.(orégano) e *Capsicum chinense* Jacq.(pimenta habanero). 2015.

CORDEIRO, I.; S., R.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; L., L.R. de; CARUZO, M.B.R.; BERRY, P.; Riina, R.; Silva, O.L.M.; Silva, M.J. da; Sodré, R.C. 2015 ***Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17545>. Acesso em: 01 de mai. 2020.

COSTA, A. C. V., *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. Semina:**Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p: 2853-2863, 2013.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the norfloxacin antibiotic activity by gaseous contact with the essential oil of *Croton zehntneri*. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 4, p. 362-364, 2010.

COUTINHO, H. D. M. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* by *Turneraulmifolia* L. **BMC complementary and alternative medicine**, v.9, n.13, 2009.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Comparative Evaluation of the Modulation of Antibiotic-Activity against Strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Revista Ciências de la Salud**, v.13, n.3, p: 345-354, 2015.

CZELUSNIAK, K. E. *et al.* Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DAOUDA, T., *et al.* Terpenes, antibacterial and modulatory antibiotic activity of essential oils from *Croton hirtus* L'Hér.(Euphorbiaceae) from Ivory Coast. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.17, n.4, p: 607-616, 2014.

DEPRÁ, M. S.; GAGLIANONE, M. C. Interações entre plantas e polinizadores sob uma perspectiva temporal. **Oecologia Australis**, 22.1.2018.

DEVAPPA, R. K.; RAKSHIT, S.. K.; DEKKER, R. FH. Forest biorefinery: potential of poplar phytochemicals as value-added co-products. **Biotechnology advances**, v.33, n.6, p: 681-716. 2015.

DIAS, R. C. B, *et al.* Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Diarrheal Patients in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, p: 144, 2020.

DÍAZ, J. G., *et al.* Antileishmanial Potentialities of *Croton linearis* Leaf Essential Oil. **Natural Product Communications**, v.13, n.5, p: 1934578-1801300527, 2018.

DÍAZ, J. G. *et al.* Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 236, p. 250-257, 2019.

DO BRASIL, F. *et al.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>, acesso em 28 de agosto, 2020.

DONATI, M., *et al.* Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β -caryophyllene and myrcene. **Natural product research**, v.29, n.10 p: 939-946. 2015.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol.** , v.88, p:30–316. 2000.

ENYIUKWU, D. N.; AWURUM, A. N.; ONONUJU, C. C.; NWANERI, J. A. Significance of characterization of secondary metabolites from extracts of higher plants in plant disease management. **International Journal of Advance Agricultural Research**, v. 2, p. 8 – 28, 2014.

FEIO, A. C; MEIRA, R. MSA; RIINA, R.. Leaf anatomical features and their implications for the systematics of dragon's blood, *Croton section Cyclostigma* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n. 4, p. 614-632, 2018.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v.39, n.2 p: 120-130, 2017.

FIBKE, Chad D., *et al.* Genomic epidemiology of major extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* lineages causing urinary tract infections in young women across Canada. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, p: ofz431, 2019.

FREITAS, P. R.*et al.*GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. **Industrial Crops and Products**,

v. 145, p: 1-5, 2020.

HARRO, C., *et al.* Live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine with dmLT adjuvant protects human volunteers against virulent experimental ETEC challenge. **Vaccine**, v.37, n.14, p: 1978-1986, 2019.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HEINRICH, M.; ANAGNOSTOU, S. From pharmacognosia to DNA-based medicinal plant authentication—pharmacognosy through the centuries. **Planta medica**, v.83, n.14 p: 1110-1116, 2017.

HELUANI, C. S. de, *et al.* Antimicrobial activity and chemical composition of the leaf and root oils from *Croton hieronymi* Griseb. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.3, p: 351-353, 2015

HERNÁNDEZ-ALVARADO, Jerelly *et al.* Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. **Abanico veterinario**, v. 8, n. 1, p. 14-27, 2018.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 1027-1031, 2002.

JÄNISCH, B. D. **Determinação multiresidual de agrotóxicos em camas biológicas empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2018.

JAFRI, H.; ANSARI, F. A.; AHMAD, Iqbal. Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm. In: **New Look to Phytomedicine**. Academic Press, p: 203-236, 2019.

JAVADPOUR, Maryam M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JÚNIOR, G. N. A. *et al.* Espécies da família Euphorbiaceae na alimentação animal. **PUBVET**, v. 12, p. 133, 2018.

KAHLMETER, G. *et al.* Point-Counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute Recommendations for Reporting Antimicrobial Susceptibility Results on . **Journal of clinical microbiology**, v.57, n.9, e01129-19, 2019.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Herbal Medicine: Current Trends and Future Prospects. In: **New Look to Phytomedicine**. Academic Press, p. 3-13, 2019.

KHAN, N. *et al.* Volatile Oil, Phytochemical, and Biological Activities Evaluation of *Trachyspermum ammi* Seeds by Chromatographic and Spectroscopic Methods. **Analytical Letters**, v.53, n.6, p: 984-1001, 2020.

KOVAČ, Jasna *et al.* Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)- α -pinene in *Campylobacter jejuni*. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122871, 2015.

LAWAL, O. A., *et al.* *Croton gratissimus* leaf essential oil composition, antibacterial, antiplatelet aggregation, and cytotoxic activities. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v.23, n.1, p: 77-87, 2017.

LEE, Y. L.; DING, P. Production of essential oil in plants: ontogeny, secretory structures and seasonal variations. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 2, n. 1, 2016.

LEITE, T. R., *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *Croton limae*. **Pharmaceutical biology**, v.55, n.1, p: 2015-2019, 2017.

LIMA, L. R. de; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton sect. Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, 2008.

LIU, Qi., *et al.* Antibacterial and antifungal activities of spices. **International journal of molecular sciences**, v.18, n.6, p: 1283, 2017.

LOKKO, Y., *et al.* Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. **New biotechnology**, Viena, v. 40, p. 5-10, jan. 2018.

LOMBARDINI, L.; ROSSI, L. Ecophysiology of plants in dry environments. In: **Dryland ecohydrology**. Springer, Cham. p. 71-100. 2019.

LU, Haoran, *et al.* Effect of feeding Chinese herb medicine ageratum-liquid on intestinal bacterial translocations induced by H9N2 AIV in mice. **Virology journal**, v.16, .1: 24, 2019.

MADHUMITA, M.; GUHA, P.; NAG, A. Extraction of betel leaves (*Piper betle* L.) essential oil and its bio-actives identification: Process optimization, GC-MS analysis and anti-microbial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111578, 2019.

MAI-PROCHNOW, A. Cold plasma to control biofilms on food and in the food-processing environment. In: **Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation**. Academic Press, p: 109-143, 2020.

MAMEDOV, N. Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 1, n. 8, p. 1-2, 2012.

MAPES, C.; BASURTO, F. Biodiversity and edible plants of Mexico. In: **Ethnobotany of Mexico**. Springer, New York, NY, p. 83-131, 2016.

MARTINS, A. P. *et al.* Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S. Tome e Principe. **Planta Medica**, v. 66, n. 07, p. 647-650, 2000.

MARTIUS, C.F.P. von & auct. suc. (eds.), **Flora do Brasil.**, v.11, n.2,p: 115, 1873.

- MATHE, Á.; DE SALES SILVA, J. C. Introduction to medicinal and aromatic plants in Brazil. In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer, Dordrecht, p: 47-69, 2018.
- MATOS, L. M. M. **Química de espécies nativas de *Croton* L.(Euphorbiaceae)**. PhD. Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- MEDEIROS, V. M., *et al.* Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. **Microbial pathogenesis**,v.11, n.1, p: 468-471,2017.
- MIRZAEI; LEONARDI; NERI, G. Detection of hazardous volatile organic compounds (VOCs) by metal oxide nanostructures-based gas sensors: A review. **Ceramics international**, v. 42, n. 14, p. 15119-15141, 2016.
- MORA, F. D. *et al.* Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Verbesina negrensis* from the Venezuelan Andes. **Natural product communications**, v. 10, n. 7, p. 1934578X1501000743, 2015.
- MORAIS OLIVEIRA-TINTINO DE, C. D., *et al.* Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton Campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in *in vivo* models. **Phytomedicine**, n. 41, p: 82-95, 2018.
- MORENO, P. R. H., *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Croton heterocalyx* Baill.(Euphorbiaceae ss) leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.2, p: 190-192, 2009.
- MUSA, D. D.; HAFIZ, S. S.; GARBA, S. M. Plants Used In Traditional Herbal Medicine In Dutsin-Ma Local Government Area Katsina, Nigeria. **International Journal of Pure & Applied Sciences**. v. 23, n.1, 2019.
- MUSTAFA, G., *et al.* Bioactive compounds from medicinal plants and their importance in drug discovery in Pakistan. **Matrix Science Pharma**. p: 17-26, 2017.
- NANDI, S.; SIKDER, R.; ACHARYA, K. Secondary Metabolites of Mushrooms: A Potential Source for Anticancer Therapeutics with Translational Opportunities. In: **Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology**. Springer, Singapore, p: 563-598, 2019.
- NAZIZ, P. S. **Modifying essential oils for altered fragrance and other beneficial properties**. PhD Thesis. Assam Bon Bosco University. 2017.
- NOLAN, L. K., *et al.* Colibacillosis. **Diseases of poultry**, p: 770-830, 2020.
- RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P.. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. Iheringia. **Série Botânica.**, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2018.
- ROSA, A., *et al.* Evaluation of the attractant effect and lipid profile modulation of natural fixed oils on the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v.99, n.4, p: 21508, 2018.

OLIVEIRA, A. P. D. de, *et al.* Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. **International Journal of Dairy Technology**, 2019.

OLIVEIRA, L. F. de, *et al.* Chemical composition of the volatile oil of *Croton glandulosus* Linnaeus and its allelopathic activity. **Natural Product Research**, p:1-4, 2020.

OTVOS, R. A., *et al.* Drug discovery on natural products: From ion channels to nAChRs, from nature to libraries, from analytics to assays. **SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D**, v. 24, n. 3, p. 362-385, 2019.

PEIXOTO, R. N. S, *et al.* Volatiles, a glutarimide alkaloid and antimicrobial effects of *Croton pullei* (Euphorbiaceae). **Molecules**, v.18, n.3, p: 3195-3205, 2013.

PEREIRA, M. do C. **Química e atividade biológica de *Microlicia crenulata* (DC.) Mart: atividade antioxidante e antimicrobiana para a conservação de alimentos.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

RAMALHO, Suelem D. *et al.* Biologically active orbitides from the Euphorbiaceae family. **Planta medica**, v. 84, n. 09/10, p. 558-56, 2018.

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton Argrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.23, n.4, p: 644-650, 2013.

RAJASEKARAN, R.; GEBREKIDAN, Yishak. A review on antibacterial phytochemical constitutions present in *Aerva lanata* and their mode of action against bacterial biofilm. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v.9, n.1, p: 16-30, 2018.

RANI, A., *et al.* Synergistic interaction between synthetic and natural products: a promising tool for the development of environmentally safe potent antimicrobial agents. **World Appl Sci J**, 5.Special Issue for Environment: 59-63, 2009.

REDDY, J. Important Medicinal Plant Families and Plant Based Drugs: A Review. In: **Proceeding 5th International Conference on Civil, Architecture, Environment and Waste Management (CAEWM-17) Singapore March**. p: 29-30, 2017.

ROCHA, R. R. Estudo comparativo sobre a composição química, atividade antibacteriana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Croton tetradenius* Baill. e *C. pulegioidorus* Baill. Contra isolados de *Staphylococcus aureus*. 2020.

ROCHA S., A. RF *et al.* Extracts and fractions of *Croton* L.(Euphorbiaceae) species with antimicrobial activity and antioxidant potential. **LWT**, p. 110521, 2020.

ROCHA, T. O. *et al.* Estimate of genetic diversity in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n.13, p. 518-523, 2016.

ROSA, A., *et al.* Evaluation of the attractant effect and lipid profile modulation of natural fixed oils on the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v.99, n.4, p: 21508, 2018.

ROSSI, Damiano, *et al.* Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg.(Euphorbiaceae) stem bark essential oil: a new functional food ingredient?. **Food chemistry**, v.126, n.3, p: 837-848, 2011.

RUPHIN, Fatiany Pierre, *et al.* GC-FID and GC/MS analyses and Antimicrobial activity of *Croton greveanus*, *C. borarium* and *C. geayi* (Euphorbiaceae) essential oils from Madagascar. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.5, n.4, p: 188, 2016.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.1, p: 11-33, 2007.

SALEM, M. Z. M *et al.* Medicinal and biological values of *Callistemon viminalis* extracts: History, current situation and prospects. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 3, p. 229-237, 2017.

SANTE. **Guidance documento n analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. Documento n° SANTE/11813/2017.

SANTOS, A. L. P, *et al.* Estudo do potencial do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* L. como antimicrobiano. **InterfaceHS**, v.14, n.1.2019.

SANTOS, S.M. **Estudo Etnofarmacológico de *Croton adamantinus* MÜLL. ARG.(EUPHORBIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas). Universidade Federal de Pernambuco. 2015.

SARAIVA, R A., *et al.* Synergistic action between *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed oil with aminoglycosides in vitro. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, n.8, p: 967-972, 2011.

SAVOIA, D. "Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics." **Future Microbiology**, vol. 7, n. 8, 2012, p. 979. **Gale Academic OneFile**, Disponível em: <https://link-gale.ez121.periodicos.capes.gov.br/apps/doc/A300488115/AONE?u=capex&sid=AONE&xid=bcbe19b0>. Acesso 1 junho 2020.

SCHIRATO, G.; PASTORE, P.; FROLDI, G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, *b*-caryophyllene and myrcene. **Natural Product Research**, v. 29, n. 10, p. 939-946, 2015.

SECCO, R. S. *et al.* Check-list de Euphorbiaceae s. str., Phyllanthaceae e Peraceae de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 73, p. 207-215, 2018.

SHAKOOR, S.; WARRAICH, H. J.; ZAIDI, A. K. M. Infection Prevention and Control in the Tropics. In: **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**. Content Repository Only!, p: 159-165, 2020.

SHARMA, N.; JANDAİK, S.; KUMAR, S. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, 2016, v.88, n.3, p: 1689-1698, 2016.

SHARIFI-RAD, J., *et al.* Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n.1, p: 70. 2017.

SHIN, J.; PRABHAKARAN, V.S.; KIM, K. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. **Microbial pathogenesis**, n.116, p: 209-214, 2018.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V. F. L.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C.; CANDIDO, A. C. S.; DIRAIMO, D. L. *et al.* Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.12, n.3, p: 250-261, 2009.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M. *Escherichia coli* as a Pathogen. In: **Foodborne Diseases**. Academic Press, p. 189-208, 2017.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: Ed.09. UFSC, 2017.

SILVA, A. C. R. *et al.* Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, B. L. R. **Ecofisiologia e morfoanatomia de herbáceas em florestas secas em regeneração**. Tese de Doutorado, UFPE- Pernambuco. 2016.

SILVA, J. S., *et al.* Synopsis of the species of *Croton* L.(Euphorbiaceae) in Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p: 441-453, 2010.

SILVA, M. H. M. **Óleos essenciais de *Croton adamantinus* Müll. Arg. e *C. grewoides* Baill.(Euphorbiaceae): composição química e atividades antibacteriana e antioxidante**. Dissertações (Mestrado em Ciências Biológicas). UFPE - Pernambuco, 2016.

SOUZA, A. M.; ARMSTRONG, L.; MERINO, F. J. Z.; COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Mirtaceae: antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **Africal Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862 – 867, 2014.

SOUZA, C. de O. *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.7, n.2, p: 79-91, 2016.

SOUZA, G. S. *et al.* Potencial alelopático de seis espécies do gênero *Croton* L. na germinação de alface e tomate. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 72, n. 2, p. 155-160, 2017.

SUÁREZ, A I., *et al.* Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.11, n.2, p: 208-213, 2008.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, p: 1-11, 2019.

TANNOUS, E., *et al.* Time above the minimum inhibitory concentration of piperacillin/tazobactam as a predictor of outcome in *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

THORPE, C.M. Alterations in Shiga Toxin-Producing *E. coli* Colonization and Virulence Following Dietary Modulation and Administration of Antimicrobials. In: **Foodborne Pathogens**. Springer, Cham, p: 209-228. 2017.

TINTINO M. O., *et al.* Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82-95, 2018.

VAN VUUREN, S., *et al.* Indigenous South African essential oils as potential antimicrobials to treat foot odour (bromodosis). **South African Journal of Botany**, v.12, n.6, p: 354-361, 2019.

VARGAS-HERNANDEZ, M. *et al.* Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1762, 2017.

VAN WYK, Ben-Erik; WINK, M. **Medicinal plants of the world**.1. Ed. Cabi, 2018.

VILEGAS, J. H. Y. **Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras**. 150 f. Tese (livre docência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.

VIMBELA, G. V., *et al.* Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International journal of nanomedicine**, n.12, p: 3941, 2017.

VOGL, T.; GLIEDER, A.; AJIKUMAR, P. K.. **Production of terpenes and terpenoids**. U.S. Patent Application No 15/281,152, 2018.

VUNDA, S. L. L., *et al.* Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Parasitology research**, v.111, n.3, p: 961-966, 2012.

WANG, Jia-Xi *et al.* Cytotoxic lathyrane-type diterpenes from seeds of *Euphorbia lathyris*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, p. c17-00946, 2018.

WRIGHT, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 55-57, 2019.

XIAO, H.; ZHANG, Y.; WANG, M. Discovery and engineering of cytochrome P450s for terpenoid biosynthesis. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 618-631, 2019.

XIMENES, R. M.; NOGUEIRA, L. M.; CASSUNDÉ, N. M. R.; JORGE, R. J. B.; SANTOS, S. M.; *et al.* Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. Essentialoil. **Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p: 758-764, 2013.

YANG, S., *et al.* Pollen atlas for selected subfamilies of Euphorbiaceae from Southern China: a complementary contribution to Quaternary pollen analysis. **Palynolog**, p: 1-15, 2019.

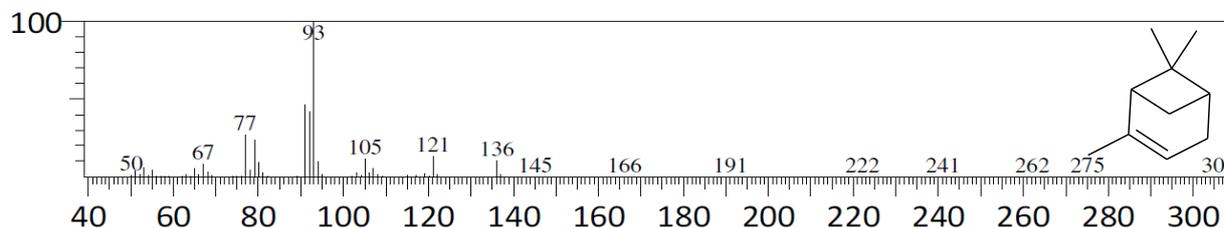
YEUNG, A. W. K.; HEINRICH, M.; ATANASOV, A.G. Ethnopharmacology—a bibliometric analysis of a field of research meandering between medicine and food science?. **Frontiers in pharmacology**, n.9, p: 215, 2018.

ZARDINI, A. B. V. *et al.* Anatomia floral de *Hevea brasiliensis* e *Manihot tripartita* (Euphorbiaceae, Malpighiales) com ênfase na homologia do nectário e perianto. 2019.

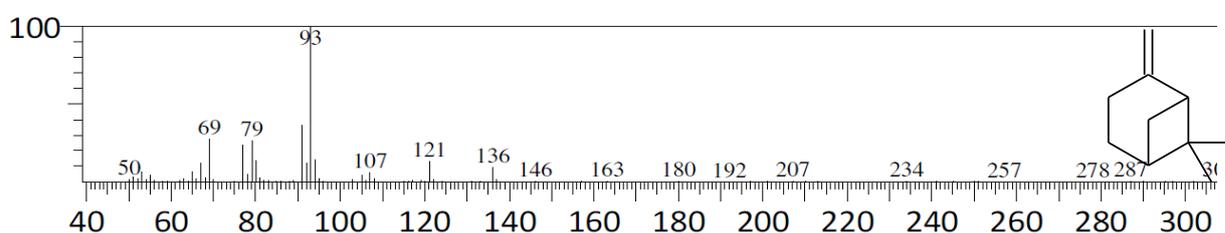
ZENG, Q. H., *et al.* Comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC and *Cirsium setosum* (Willd.) M. Bieb. **LWT-Food Science and Technology**, v.68, p: 595-605, 2016.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS

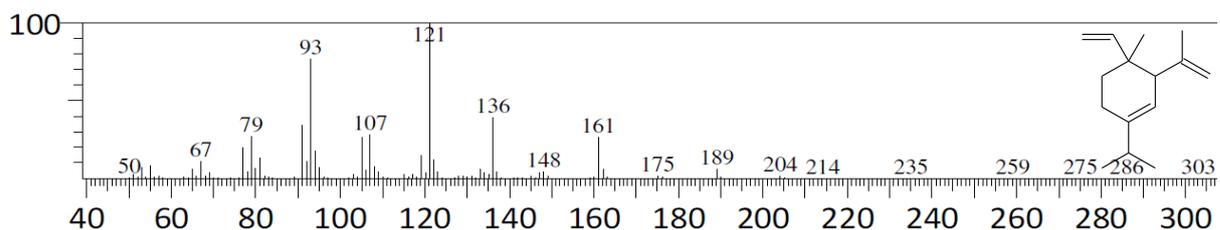
APÊNDICE A1: Espectro de massas do α -pineno (C1)



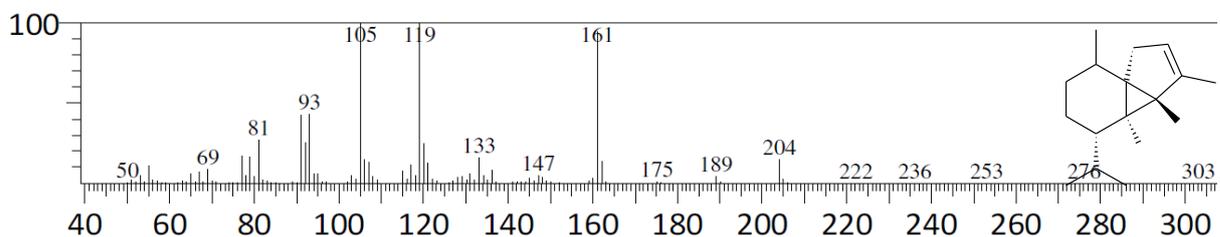
APÊNDICE A2: Espectro de massas do β -pineno (C2)



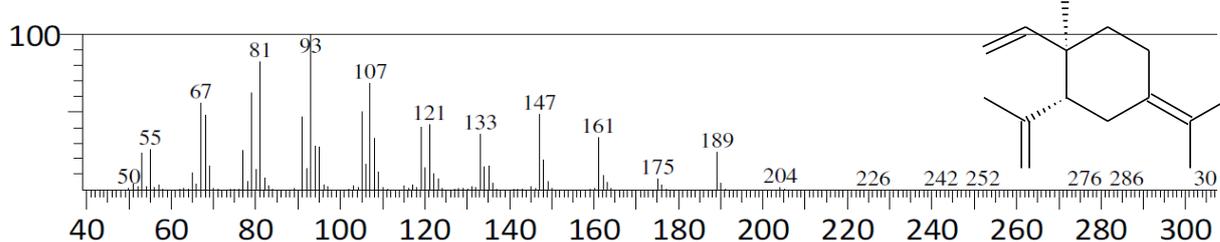
APÊNDICE A3: Espectro de massas do δ -Elemeno (C3)

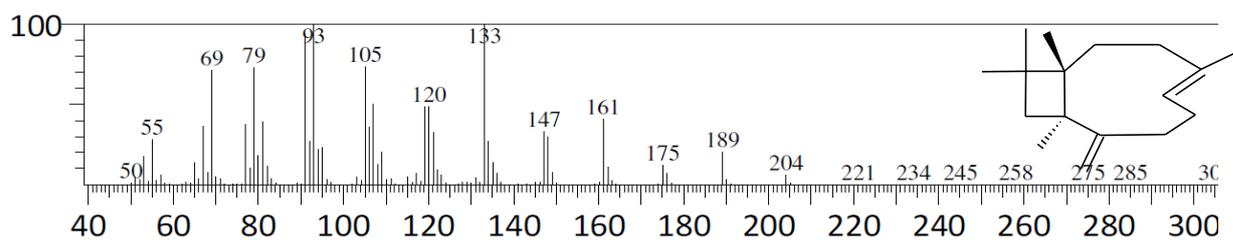
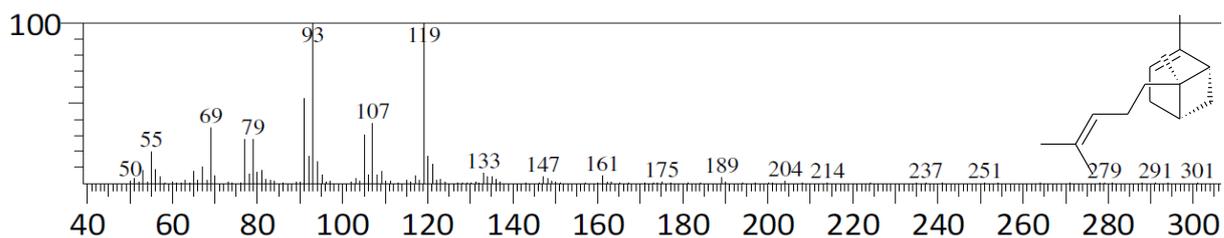
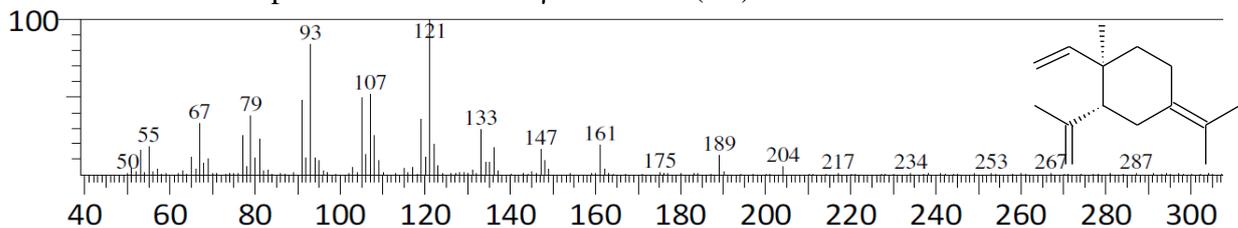
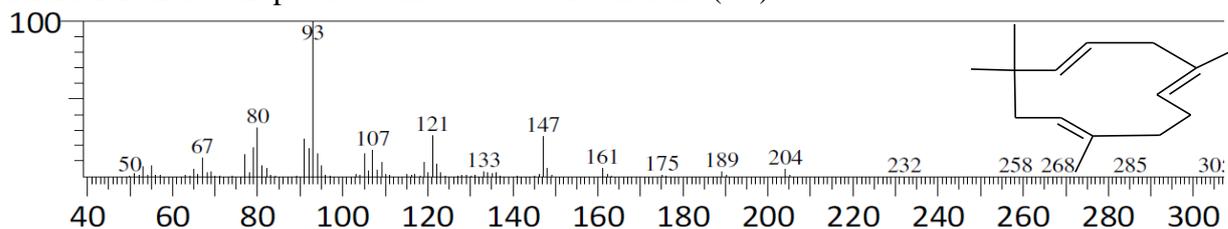
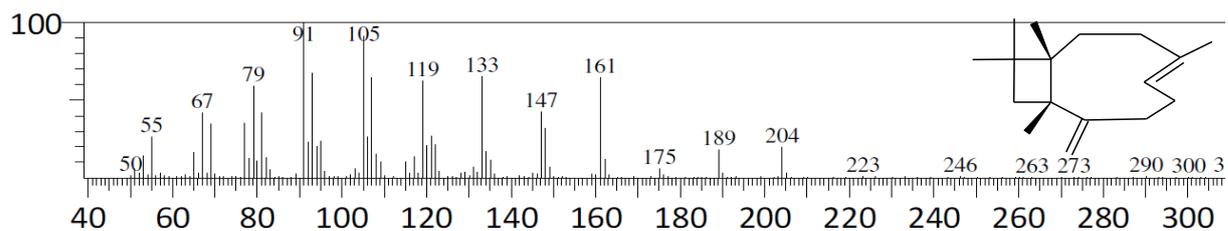


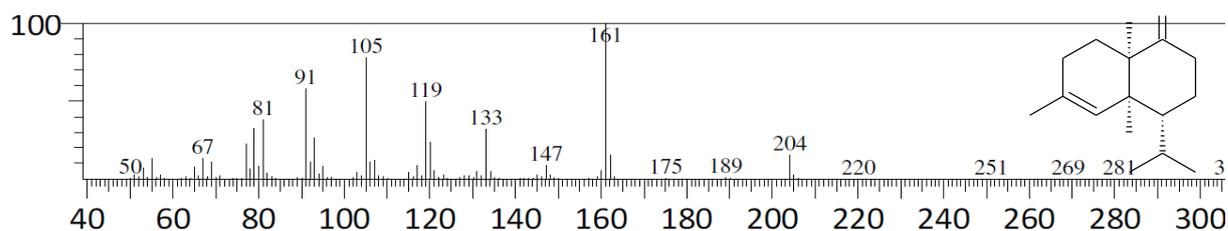
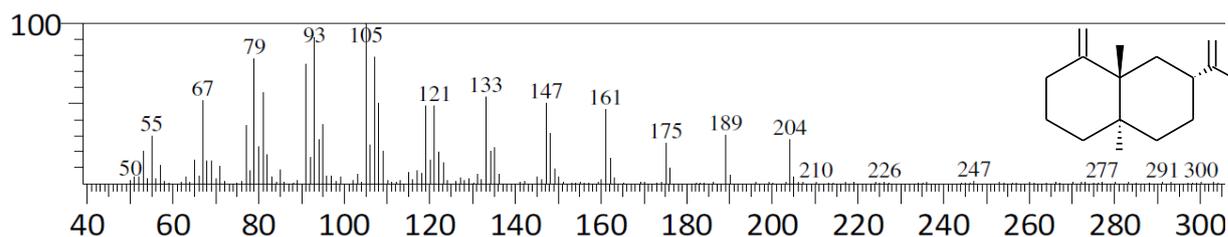
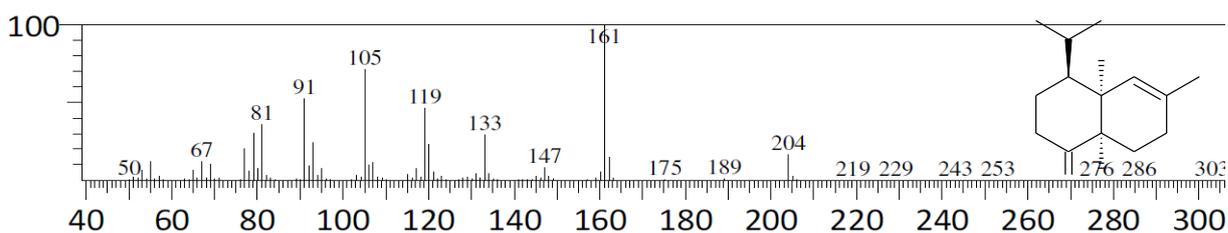
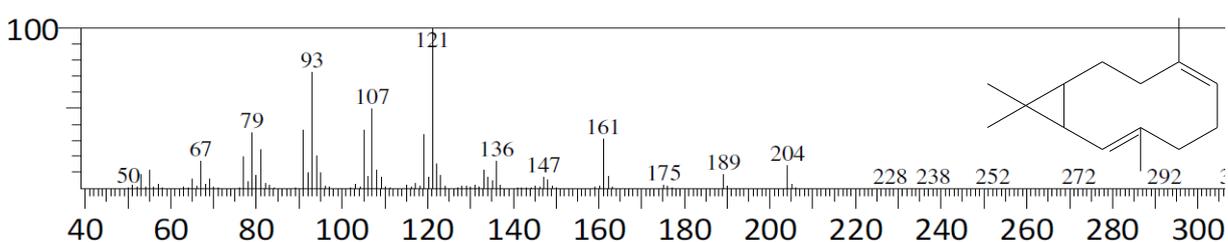
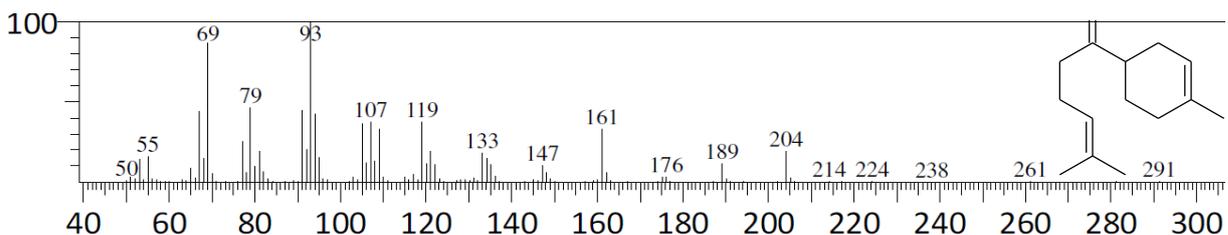
APÊNDICE A4: Espectro de massas do α -Cubeno (C4)

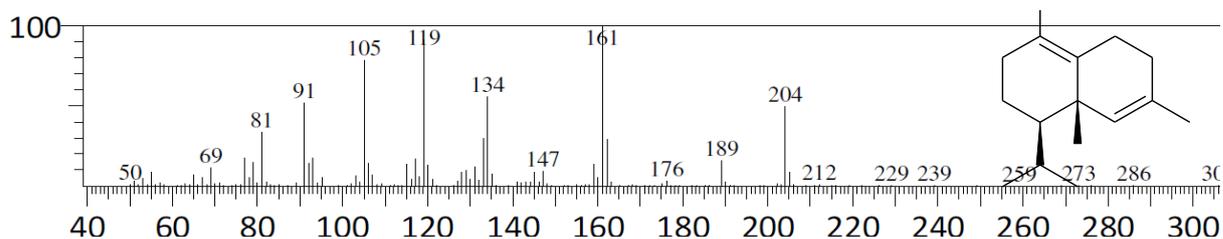
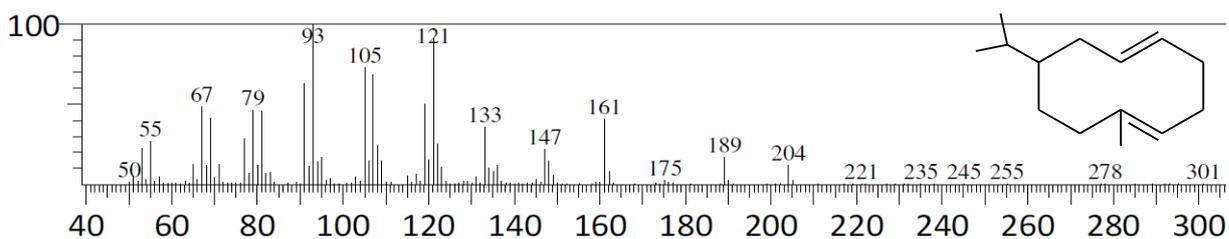
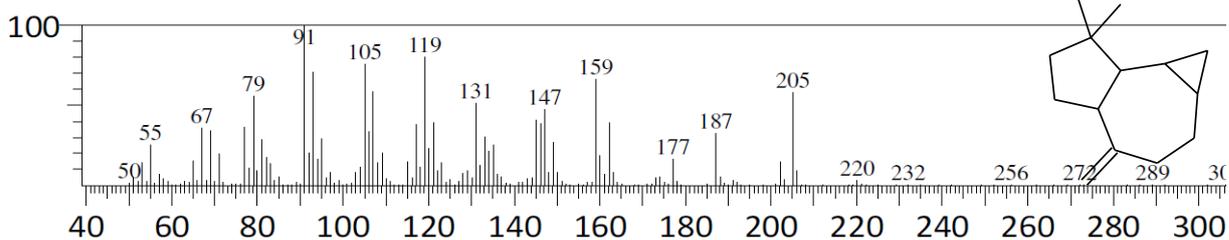
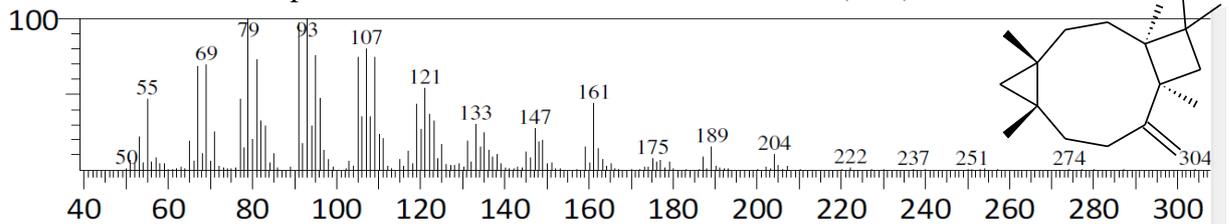
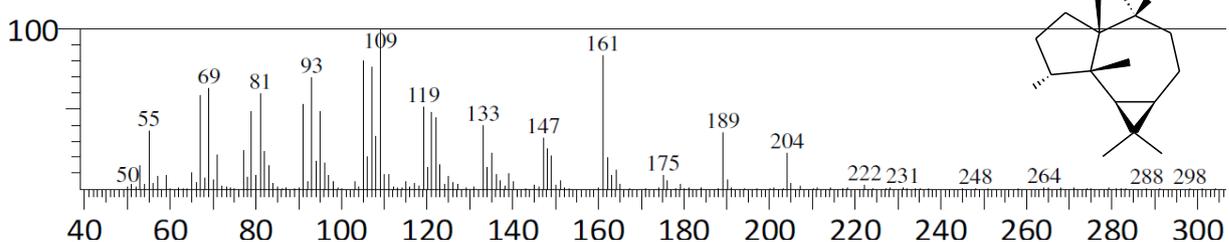


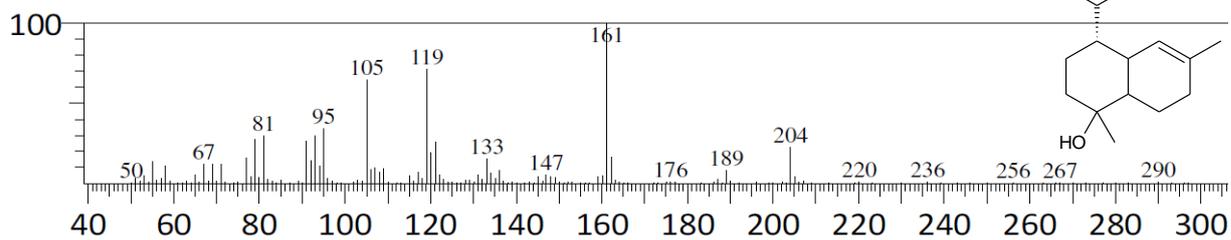
APÊNDICE A5: Espectro de massas do β -Elemeno (C5)



APÊNDICE A6: Espectro de massas do (E)-Cariofileno (C6)**APÊNDICE A7: Espectro de massas do α -trans-Bergamoteno (C7)****APÊNDICE A8: Espectro de massas do γ -Elemeno (C8)****APÊNDICE A9: Espectro de massas do α -Humoleno (C9)****APÊNDICE A10: Espectro de massas do 9-Epi-(E)-Cariofileno (C10)**

APÊNDICE A11: Espectro de massas do γ -Mureleno (C11)**APÊNDICE A12: Espectro de massas do β -Selineno (C12)****APÊNDICE A13: Espectro de massas do γ -Amorfeno (C13)****APÊNDICE A14: Espectro de massas do Biciclogermacreno (C14)****APÊNDICE A15: Espectro de massas do β -Bisaboleno (C15)**

APÊNDICE A16: Espectro de massas do δ -Cadineno (C16)**APÊNDICE A17:** Espectro de massas do *B*-Germanocreno (C17)**APÊNDICE A18:** Espectro de massas do Espatulenol (C18)**APÊNDICE A19:** Espectro de massas do Óxido de Cariofileno (C19)**APÊNDICE A20:** Espectro de massas do Viridiflorol (C20)

APÊNDICE A21: Espectro de massas do α Murolol (C21)**APÊNDICE A22: Espectro de massas do α -Cadinol (C22)**