



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



JOSEILTON FRANCO FRANÇA

ANÁLISE SAZONAL E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *Croton*
urticifolius LAM. (EUPHORBIACEAE)

CAMPINA GRANDE-PB
2023

JOSEILTON FRANCO FRANÇA

**ANÁLISE SAZONAL E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *Croton
urticifolius* LAM. (EUPHORBIACEAE)**

Trabalho de 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: Profa. Dra. Maria da Conceição de Menezes Torres.

**CAMPINA GRANDE-PB
2023**

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.

F814a França, Joseilton Franco.

Análise sazonal e atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *croton adamantinus* müll. arg. e *croton urticifolius* lam. (euphorbiaceae) [manuscrito] / Joseilton Franco França. - 2023.

97 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Maria da Conceição de Menezes Torres, Departamento de Química - CCT."

1. Óleos essenciais. 2. Velame. 3. Terpenos. 4. Marmelo.

I. Título

21. ed. CDD 542

JOSEILTON FRANCO FRANÇA

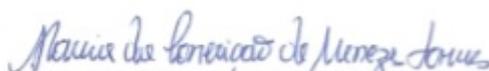
**ANÁLISE SAZONAL E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. E *Croton
urticifolius* LAM. (EUPHORBIACEAE)**

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

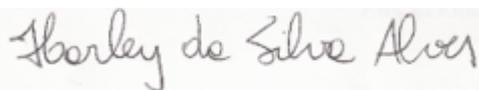
Área de concentração: Química Medicinal.

Aprovada em: 31/07/2023

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Harley da Silva Alves
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. José Arimatéia Nóbrega
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A minha mãe, pelo amor, dedicação, carinho,
companheirismo e amizade, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir a realização de um sonho de criança e por estar presente em todos os dias da minha vida se fazendo presente como meu instrumento de fé e meu porto seguro dando forças para nunca desistir independente dos obstáculos da vida.

Agradeço aos meus pais, Joselito dos Santos França e Ozanir Franco França, ao meu irmão, Gustavo Franco França, que com muito amor sempre acreditaram em mim e sempre apoiaram e estiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha Vida, tudo que eu me tornei hoje é reflexo de todo esforço que vocês fizeram sempre por mim, esse sonho não é apenas meu, principalmente é um sonho de vocês a quem dedico essa realização.

Aos meus familiares em especial minha tia Olinete, meus padrinhos, Assis e Dalva, e a todos meus primos que sempre me ajudaram de alguma forma e são presentes na minha vida.

A minha namorada Cynthia Cavalcante, por toda paciência e incentivo que tem dado na minha vida e carreira profissional.

Ao meu amigo em especial Ayrton Bessa, que me ajudou a realizar todas as coletas na cidade de Areia-PB.

Aos meus amigos de infância em especial, Thiago Vitor, Filipe Gabriel, Everton Duarte, Sidney Pimentel, Matheus Candido, Ismael Bento, Pedro Emanuel, Jocélio Fernandes, que mais que amigos são considerados como irmãos, pois além de sempre se fazer presente, foram as pessoas com que eu cresci junto e me espelhei como homens e profissionais.

Aos meus amigos da pós-graduação e da universidade em especial, Edielson Miranda, Palloma Soares, Shirlene Albuquerque, Cristiane Aragão, Kevla Araújo, Larissa Cristine, e Isabelle Félix, Maria Eloisa, Ana Carolina, Raiane Brito e aos demais que fizeram parte indiretamente, a ajuda, apoio e toda torcida de vocês foram fundamentais para essa conquista.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria da Conceição de Menezes Torres, por ser essa pessoa tão maravilhosa que sempre foi um exemplo de profissional e foi a pessoa que me incentivou a gostar tanto da Química Orgânica, agradeço também por todos os conselhos, paciência, e atenção nas orientações.

As professoras Zilka Nanes de Lima e Patrícia Maria de Freitas e Silva, pela orientação para a realização das atividades microbiológicas.

Ao Augusto, técnico do laboratório de microbiologia básica da Universidade Estadual da Paraíba que não mediu esforços para ajudar nas realizações dos experimentos.

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 todos os mestres de ensino, do fundamental, médio e da graduação que fizeram parte da minha vida e que contribuíram para meu aprendizado e por essa realização do meu sonho.

Aos integrantes da banca examinadora da defesa: Prof. Dr. Harley da Silva Alves e o Prof. Dr. José Arimatéia Nóbrega, por aceitar o convite de participar e dar sugestões e considerações, para o aperfeiçoamento deste trabalho.

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

Ao coordenador da Pós-Graduação em Química, Prof. Dr. José Germano Veras pela sua competência tanto em seu ensino como na coordenação e pelo incentivo.

A FAPESQ pela contribuição e pelo investimento para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

A todos minha gratidão e obrigado!

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”

Paulo Freire.

RESUMO

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Croton* são ricos em monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides e são conhecidos por suas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, entre outras. A produção de compostos bioativos pode variar em decorrência das diferentes estações do ano em resposta a mudanças nas condições ambientais. *Croton adamantinus* é conhecida popularmente como “velame” ou “marmeleiro roxo”. Já o *Croton urticifolius*, conhecido como “marmeleiro branco” ou “velame”. O objetivo desse trabalho foi investigar a variação sazonal dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) e *Croton urticifolius* (OCU). O material foi coletado durante todos os meses de junho de 2022 a maio de 2023, no município de Areia–PB. Os óleos essenciais das folhas frescas das espécies de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius* foram extraídos pela técnica de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para identificar os constituintes químicos. A atividade antibacteriana dos óleos foi testada frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), pelo método de microdiluição em caldo através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em placas de 96 poços. As análises por CG/EM permitiram a identificação de 20 compostos (87,0%), para cada uma das espécies, sendo sua maioria sesquiterpenoides. Os principais compostos em todas as amostras do óleo de *C. adamantinus* foram biciclogermacreno (média 28,34%), D-germacreno (média 13,94%) e (E)-cariofileno (média 12,36%). Para o *C. urticifolius* foram α -pineno (média, 38,50%), seguido por biciclogermacreno (média, 16,96%), (E)-cariofileno (média, 14,76). Na análise sazonal os rendimentos dos óleos de *C. adamantinus* variaram de 0,05% a 0,08%, sendo o maior rendimento obtido na primavera (0,08%). Para o *C. urticifolius* variaram de 0,08 a 0,26% sendo o maior rendimento obtido também na primavera (0,26%). O OCA apresentou atividade moderada frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, com CIM de 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos meses de abril e maio de 2023, enquanto o OCU não apresentou atividade frente a nenhuma cepa testada. Este trabalho mostrou que o período de colheita influencia no percentual dos constituintes químicos dos óleos das espécies estudadas e que o melhor período para extração é a primavera. É importante ressaltar que este é o primeiro estudo envolvendo a sazonalidade dos óleos essenciais das folhas de *C. adamantinus* e *C. urticifolius* do brejo paraibano.

Palavras-chave: Óleos essenciais; Marmeleiro; Velame; Terpenoides.

ABSTRACT

The essential oils of species from the *Croton* genus are rich in monoterpenes, sesquiterpenes, and phenylpropanoids and are known for their biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, among others. The production of bioactive compounds can vary due to different seasons in response to environmental changes. *Croton adamantinus* is popularly known as "velame" or "purple marmeleiro," while *Croton urticifolius* is known as "white marmeleiro" or "velame." The aim of this study was to investigate the seasonal variation of the chemical constituents of the essential oils from the leaves of *Croton adamantinus* (OCA) and *Croton urticifolius* (OCU). The material was collected every month from June 2022 to May 2023 in the municipality of Areia-PB. The essential oils from the fresh leaves of both *Croton adamantinus* and *Croton urticifolius* species were extracted using the Clevenger-type hydrodistillation technique and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) to identify the chemical constituents. The antibacterial activity of the oils was tested against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) strains using the broth microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in 96-well plates. GC/MS analysis identified 20 compounds (87.0%) for each species, with the majority being sesquiterpenoids. The main compounds in all *C. adamantinus* oil samples were bicyclogermacrene (average 28.34%), D-germacrene (average 13.94%), and (E)-caryophyllene (average 12.36%). For *C. urticifolius*, the main compounds were α -pinene (average 38.50%), followed by bicyclogermacrene (average 16.96%), and (E)-caryophyllene (average 14.76%). In the seasonal analysis, the yields of *C. adamantinus* oils ranged from 0.05% to 0.08%, with the highest yield obtained in spring (0.08%). For *C. urticifolius*, the yields ranged from 0.08% to 0.26%, with the highest yield also obtained in spring (0.26%). OCA showed moderate activity against *Staphylococcus aureus* strains, with MIC of 128 μ g/mL in April and May 2023, while OCU did not show activity against any tested strain. This study demonstrated that the harvesting period influences the percentage of chemical constituents in the oils of the studied species, and the best period for extraction is spring. It is important to note that this is the first study involving the seasonality of essential oils from the leaves of *C. adamantinus* and *C. urticifolius* from the Paraíba swamp region.

Keywords: Essential oils; Marmeleiro; Velame; Terpenoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais hidrocarbonetos lineares que originam os terpenoides encontrados nos óleos essenciais.....	21
Figura 2 –	Exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos: acíclico, monocíclico e bicíclico.....	22
Figura 3 –	<i>Croton adamantinus</i> em seu habitat natural.....	27
Figura 4 –	Estruturas dos compostos majoritários do óleo essencial de folhas de <i>Croton adamantinus</i>	28
Figura 5 –	<i>Croton urticifolius</i> em seu habitat natural.....	29
Figura 6 –	Estruturas dos compostos majoritários do óleo essencial de folhas de <i>Croton urticifolius</i>	30
Figura 7 –	Localização das coletas das espécies de <i>Croton adamantinus</i> e <i>Croton urticifolius</i> no município de Areia-PB.....	36
Figura 8 –	Placa de 96 poços para técnica de microdiluição.....	41
Figura 9 –	Estrutura dos constituintes identificados nos óleos essenciais de <i>Croton adamantinus</i> e (OCA) e <i>Croton urticifolius</i> (OCU).....	51
Figura 10 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (junho de 2022).....	68
Figura 11 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (julho de 2022).....	69
Figura 12 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (agosto de 2022).....	70
Figura 13 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (setembro de 2022).....	71
Figura 14 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (outubro de 2022).....	72
Figura 15 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (novembro de 2022).....	73
Figura 16 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (dezembro de 2022).....	74
Figura 17 –	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (janeiro de 2023).....	75

Figura 18 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (fevereiro de 2023).....	76
Figura 19 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (março de 2023).....	77
Figura 20 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (abril de 2023).....	78
Figura 21 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. adamantinus</i> (OCA) (maio de 2023).....	79
Figura 22 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (junho de 2022).....	80
Figura 23 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (julho de 2022).....	81
Figura 24 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (agosto de 2022).....	82
Figura 25 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (setembro de 2022).....	83
Figura 26 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (outubro de 2022).....	84
Figura 27 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (novembro de 2022).....	85
Figura 28 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (dezembro de 2022).....	86
Figura 29 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (janeiro de 2023).....	87
Figura 30 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) fevereiro de 2023.....	88
Figura 31 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (março de 2023).....	89
Figura 32 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (abril de 2023).....	90
Figura 33 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. urticifolius</i> (OCU) (maio de 2023).....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Massa das folhas e volumes de água utilizados nas extrações.....	37
Tabela 2 –	Composição química e teor de óleos essenciais das folhas de <i>Croton adamantinus</i> (OCA) no estudo sazonal.....	46
Tabela 3–	Composição química e teor de óleos essenciais das folhas de <i>Croton urticifolius</i> (OCU) no estudo sazonal.....	47
Tabela 4–	Classificação da atividade antibacteriana de acordo com os valores obtidos de (CIM).....	53
Tabela 5–	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de <i>Croton adamantinus</i> e <i>Croton urticifolius</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
OCA	Óleo essencial das folhas de <i>Croton adamantinus</i>
OCU	Óleo essencial das folhas de <i>Croton urticifolius</i>
OE	Óleo essencial
DCM	Diclorometano
AESA	Agência Executiva de Gestão das Águas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO LITERÁRIA	18
3.1 Óleos Essenciais	18
3.1.1 <i>Terpenoides: Principais Compostos de Óleos Essenciais</i>	20
3.2 Métodos de Extrações dos Óleos Essenciais	22
3.2.1 <i>Enfloração</i>	23
3.2.2 <i>Destilação</i>	23
3.2.3 <i>Hidrodestilação</i>	23
3.2.4 <i>Arraste por vapor d'água</i>	24
3.2.5 <i>Prensagem a frio ou espremedura</i>	24
3.2.6 <i>Extração com Solventes Orgânicos</i>	24
3.3 Métodos de Análise do Óleos Essenciais	25
3.3.1 <i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM)</i>	25
3.4 Gênero Croton	26
3.4.1 <i>Croton adamantinus MÜLL. ARG.</i>	27
3.4.2 <i>Croton urticifolius LAM.</i>	29
3.5 Compostos Majoritários e Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais das Espécies do Gênero Croton	31
3.5.1 <i>Principais Terpenoides Encontrados nos Óleos essenciais das folhas de Croton adamantinus e Croton urticifolius e suas aplicações</i>	32
3.6 Atividade Antibacteriana	33
3.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.6.2 <i>Escherichia coli</i>	34
4 METODOLOGIA	36
4.1 Coleta do material	36
4.2 Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação	37
4.3 Cálculo do rendimento	38
4.4 Análise dos óleos essenciais em CG/EM	38
4.5 Avaliação de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	38

4.5.1 Cepas Bacterianas.....	39
4.5.2 Antibióticos.....	39
4.5.3 Meio de Cultura.....	39
4.5.4 Preparação do Inóculo.....	39
4.5.5 Diluições dos Óleos Essenciais.....	40
4.5.6 Determinação da CIM.....	40
4.5.7 Pipetagem na Placa de Microdiluição.....	40
5 RESULTADOS E DISCURSÕES.....	42
5.1 Identificação dos Constituintes	44
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	53
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES.....	67
APÊNDICE A: CROMATOGRAMAS DO CG/EM DE OCA E OCU.....	68
APÊNDICE B: ESPECTROS DE MASSAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade da flora brasileira é bem distribuída em toda a extensão do território nacional, sendo considerada como umas das maiores do planeta. A flora é rica por suas variedades de ecossistemas diferentes, principalmente em relação a diversidade de plantas medicinais de diferentes espécies existentes. A Caatinga é a vegetação predominante do nordeste brasileiro, correspondendo a um terço do território em todo país, sendo considerada uma região semiárida com uma flora rica em plantas aromáticas, tóxicas e medicinais (MATHE et al., 2018).

A família Euphorbiaceae é uma das mais abrangentes em número de fanerógamos abrangendo cerca de 300 gêneros e 7600 espécies, com comportamentos cosmopolitas, porém tem mais afinidade com áreas tropicais e subtropicais (CAVALCANTI; SILVEIRA; SILVA, 2020). É uma família rica em espécies aromáticas, com destaque para as plantas pertencentes ao gênero *Croton*.

O gênero *Croton* é um dos maiores da família (Euphorbiaceae) que consiste em cerca de 1200 espécies dos quais 350 estão situados no Brasil, predominantemente na região da Caatinga (ALVES et al., 2017). Dentre as propriedades farmacológicas experimentalmente comprovadas, destaca-se: anti-inflamatória, antioxidante, antiulcerogênica, antidiabética, inibidores da enzima acetilcolinesterase e antimicrobiana, antialérgica, anticarcinogênica e cicatrizante entre outras (PALMEIRA, et al., 2006; ALVES et al., 2017; FIRMINO et al., 2018; YANG et al., 2019).

As plantas do gênero *Croton*, popularmente conhecidas como marmeleiros ou velames são ricas em óleos essenciais, que são uma mistura de compostos químicos voláteis que podem ser produzidos e armazenados em estrutura secretoras ou tricomas localizados em várias partes das plantas, tais como ramos, flores e frutos. Esses óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundário dos vegetais, sendo compostos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, que possuem características organolépticas (RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018).

Os óleos essenciais são comumente utilizados em função de sua capacidade aromatizante, mas também descrito na literatura por suas propriedades biológicas, sendo utilizados pela indústria alimentícia e farmacêutica, pois alguns dos constituintes químicos dos óleos podem ser utilizados como princípios ativos de fitoterápicos/droga, fixadores, fragrâncias e/ou aromas.

Os óleos essenciais sintetizados por espécies de *Croton* vêm sendo amplamente estudados, devido a sua vasta quantidade de substâncias voláteis, as quais apresentam atividades biológicas como: antimicrobiana, acaricida, antitumoral, inseticida, anti-inflamatória, antifúngica entre outras (ALVES et al., 2016; CÂMARA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2017; RESTREPO et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2020; PORTO et al., 2021;).

O *Croton adamantinus* Müll. Arg., é uma espécie conhecida popularmente como carrasco, canela de urubu, velame bravo e marmeleiro (SILVA, 2016). Na literatura foi relatado que a planta é utilizada para tratar doenças inflamatórias e feridas da pele (XIMENES et al., 2013; SILVA, 2016). Os constituintes em maiores quantidades identificados para o óleo das folhas de *Croton adamantinus* foram: biciclogermagreno, γ -amorfeno e (E)-cariofileno (BARBOSA, 2021).

A espécie *Croton urticifolius* LAM, conhecido popularmente como marmeleiro branco ou velame apresenta apenas poucos estudos químicos em relação a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas dessa espécie. Os principais compostos identificados para o óleo das folhas de *Croton urticifolius* foram: α -pineno, biciclogermacreno e (E)-cariofileno (BARBOSA, 2021).

A composição química dos metabólitos secundários presente nos óleos essenciais pode sofrer influência da sazonalidade, uma vez que os constituintes ativos pode ser variar durante as estações ano (FERREIRA, 2020). A diferença na composição se deve a vários como umidade relativa, regime de ventos, umidade do solo, variações geográficas, estágio do ciclo vegetativo, técnicas de cultivo e variações sazonais (ALKAN, 2020).

Vários estudos mostraram a influência das estações do ano não apenas no teor de constituintes químicos dos óleos essenciais, mas também em suas atividades biológicas (ALENCAR, 2017). O estudo da interferência dos horários que a espécie é coletada durante o dia, influência na composição química dos óleos essenciais, que é um fator crucial para o desenvolvimento de fitoterápicos (RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018).

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). Assim, a busca por novos agentes antibacterianos derivados de metabólitos secundários tem se mostrado uma alternativa promissora.

Neste contexto, e dando continuidade ao estudo das espécies, foi realizado um estudo químico sazonal com os óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius*, visando a avaliação da composição química e atividade antibacteriana desses óleos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a variação sazonal dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius*, assim como avaliar o potencial antibacteriano das espécies.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a extração dos óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e do *Croton urticifolius*, coletadas ao longo de 12 meses para análise da sazonalidade;
- ✓ Identificar os compostos químicos dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM);
- ✓ Reconhecer e analisar a variação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais;
- ✓ Testar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e do *Croton urticifolius* frente as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922);

3 REVISÃO LITERÁRIA

3.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são definidos como misturas de metabólitos secundários produzidos por plantas naturais, normalmente derivados de plantas inteiras ou partes específicas, incluindo flores, raízes, cascas, folhas, sementes, cascas, frutas (FERRENTINO et al., 2020). São classificados segundo a sua estrutura molecular em monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (NASCIMENTO; PRADE, 2020). Os óleos também podem apresentar em sua composição química grupos funcionais como: alcanos e alquenos lineares e constituintes contendo heteroátomos de nitrogênio e enxofre (SIMÕES et al., 2017).

Os óleos essenciais apresentam características como: aparência oleosa, cheiro agradável, solubilidade em solventes orgânicos apolares e baixa solubilidade em água e, quando recentemente extraídos, são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados (ARAÚJO et al., 2020).

Os óleos essenciais geralmente têm um odor agradável e, às vezes, um sabor distinto e, portanto, são usados em quantidades significativas nas indústrias de aromas e perfumes (CALO et al., 2015). O olfato capta as informações a partir dele, produzindo sensação de bem-estar, tonificando, harmonizando e relaxando, estimulando memórias e emoções (BAUDOUX, 2018). Outra questão interessante nos óleos essenciais é que fatores como o solo, horário de colheita, região de origem e os métodos de extração podem interferir na quantidade percentual de compostos encontrados e diferentes propriedades terapêuticas em uma espécie de planta (NASCIMENTO; PRADE, 2020).

A composição química do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. A ocorrência de quimiotipos ou raças químicas é frequente em plantas ricas em óleos essenciais; seria aqueles vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente (SIMÕES et al., 2010).

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 das 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; HAMBERGER, 2018).

Durante o desenvolvimento das plantas a síntese dos compostos químicos podem ser afetados por uma variedade de fatores, que interferem na sua produção e concentração (ESTELL et al., 2016). Vários fatores exercem influência na composição química dos OE, tais como: rendimento, fatores climáticos, solo, poluição atmosférica, ciclo vegetativo, idade e órgão vegetal (SCHINDLER; SILVA; HEINZMANN, 2018).

A composição química dos metabólitos secundários pode sofrer influência da sazonalidade, uma vez que os constituintes ativos não são constantes durante o ano (FERREIRA et al., 2020). O horário de coleta das plantas configura-se um ponto significativo nas alterações ambientais geradas durante o dia (DIAS, 2017). A influência dessa variação interfere potencialmente na concentração dos princípios ativos e nas atividades biológicas das plantas medicinais (ALMEIDA et al., 2017).

Segundo Neto (2021), embora as variações sazonais de uma espécie seja uma das principais técnicas de coletar informações de uma determinada espécie na área etnobiológica, são poucos investigados em diferentes contextos sociocológicos. O entendimento da ecologia das plantas é essencial, pois fornecem informações sobre a melhor época de colheita, período com maior rendimento de substâncias essenciais para o tratamento medicinal e posteriormente utilizações farmacológicas (MACÊDO, 2018).

A coleta torna-se um ponto crítico para obter maior quantidade de óleo essencial e do princípio ativo desejado, visto que não apenas fatores climáticos, mas também o desenvolvimento da planta interfere na produção dos metabólitos secundários (RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018).

Alencar (2017), realizou um estudo sazonal com a espécie de *Croton heliotropiifolius*. Nesse estudo foi possível identificar os constituintes majoritários presente nas amostras de óleos essenciais para essa espécie, que foram: β -cariofileno, biciclogermacreno, germacreno-D, limoneno e 1,8-cineol. O β -cariofileno foi o composto majoritário em todas as amostras do estudo sazonal. As cepas utilizadas para testar a atividade antimicrobiana desses óleos essenciais foram: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella* entérica (ATCC 10708), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os resultados das atividades antibacterianas mostraram atividade fraca a moderada contra as cepas analisadas. Em todas as análises

observou-se que a amostra de óleo essencial coletada no verão se destaca das demais, apresentando atividade mais forte tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.

3.1.1 *Terpenoides: Principais Compostos de Óleos Essenciais*

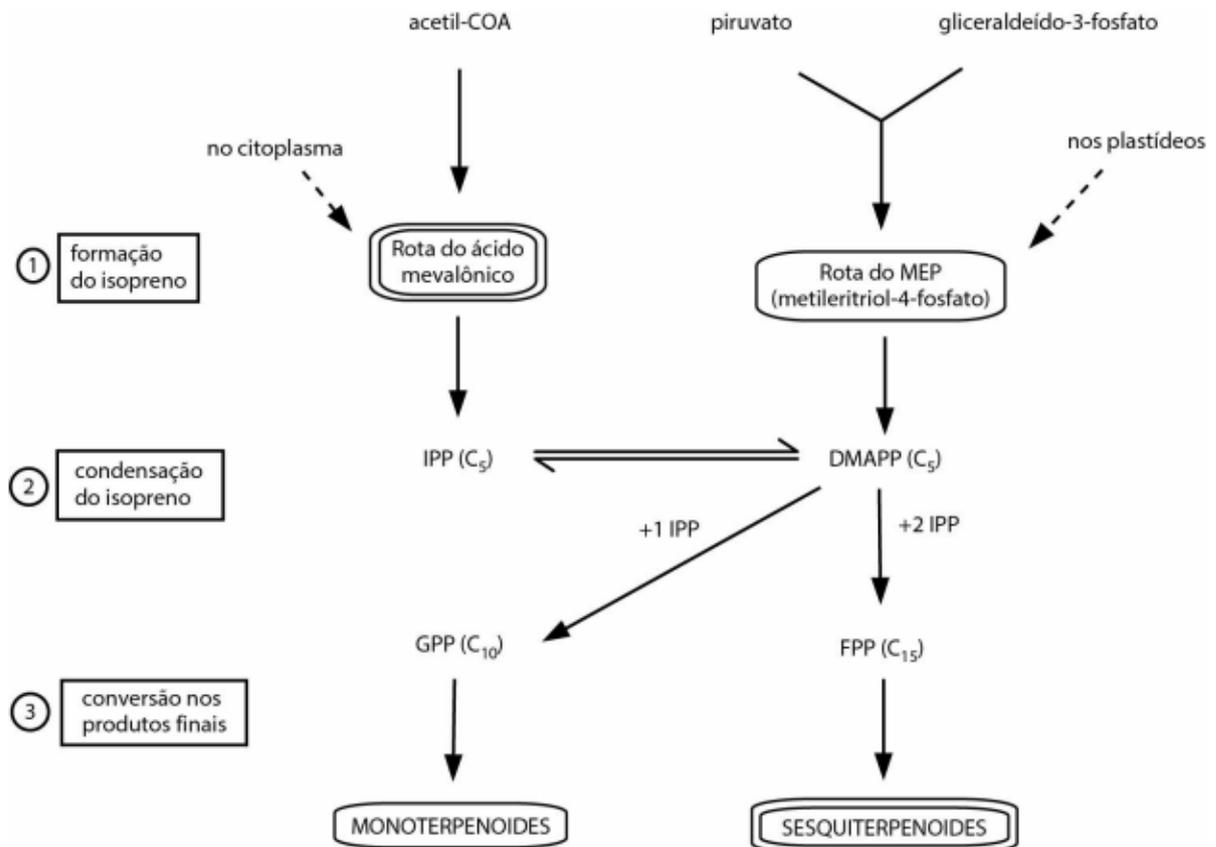
Quimicamente, a grande maioria dos constituintes químicos dos óleos essenciais apresenta estrutura terpenoide ou fenilpropanoide. Os terpenos podem ser definidos como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (MC MURRY, 2011; FELIPE, et al., 2017). Os terpenóides, são derivados dos terpenos que possui como característica principal a introdução de grupos oxigenados em sua estrutura química, como: Hidroxilas, carbonilas, carboxilas (GOLD, 2008; AQUINO, 2021).

Os terpenóides são constituintes predominantes dos óleos essenciais de plantas, e acúmulo de terpenóides voláteis em plantas está relacionado com o desenvolvimento e estágio da própria planta (GENG et al., 2022). Os terpenóides constituem a maior classe de metabólitos em plantas e estima-se que contenham mais de 80.000 estruturas (YANG; MARILLONNET; TISSIER, 2021). Eles são classificados de acordo com o número de átomos de carbono no núcleo esqueleto, temos: hemiterpenóides (5 carbonos), monoterpenóides (10 carbonos), sesquiterpenóides (15 carbonos), diterpenóides (20 carbonos), sesterterpenóides (25 carbonos) e triterpenóides (30 carbonos) (CHRISTIANSON, 2017).

Vários estudos indicam que a diversidade de terpenos que existem nos vegetais funciona em várias interações planta-ambiente, como atrair insetos polinizadores, para participar de respostas indiretas de defesa, e proteger as plantas de herbívoros e patógenos (CAO et al., 2022).

Para as plantas de origem vegetal, existem duas rotas biossintéticas distintas que levam à biossíntese dos terpenoides: A primeira rota ocorre no citoplasma através do ácido mevalônico, e a outra, nos plastídios pela rota do metileritritol-4-fosfato (MEP) como representa a Figura 1 a seguir:

Figura 1- Principais hidrocarbonetos lineares que originam os terpenoides encontrados nos óleos essenciais.



IPP: difosfato de isopentina

DMAPP: difosfato de dimetilalila

GPP: difosfato de geranila

FPP: difosfato de farnesila

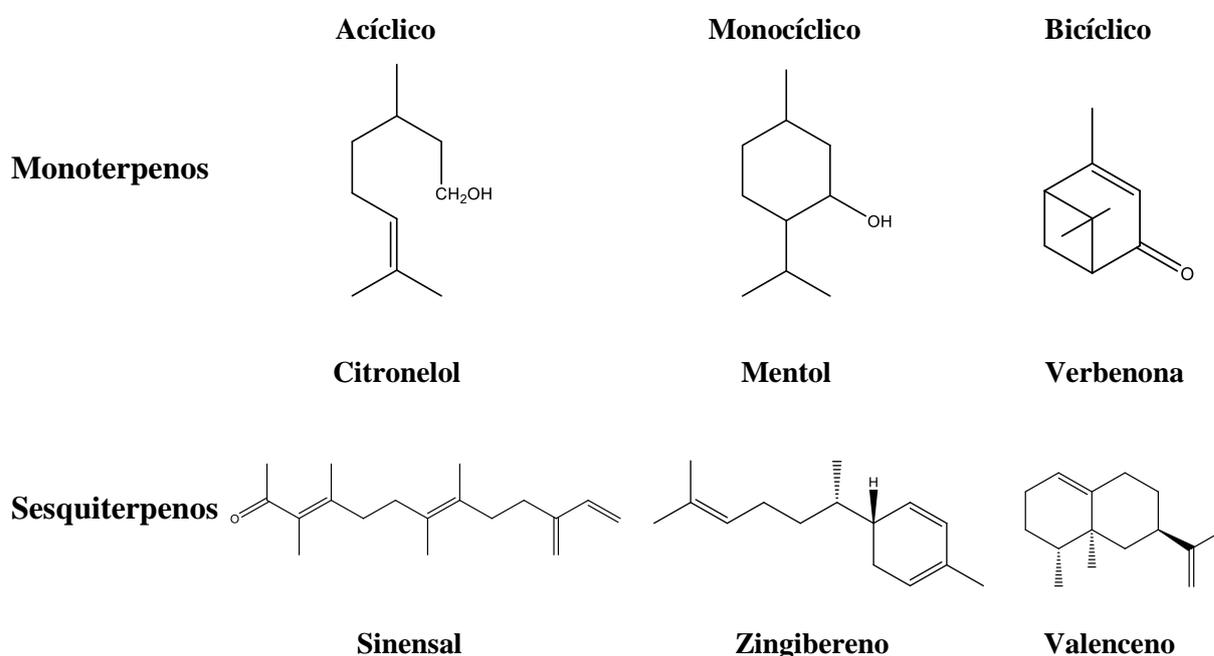
Fonte: adaptada de (SIMÕES et al., 2017).

Segundo Simões (2017) a molécula do 2-metilbutadieno (isopreno), após a ligação com radicais fosfato, origina duas unidades de C₅ básicas, o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), a partir dessa etapa os terpenoides são biossintetizados. Esses dois precursores ativados irão sofrer condensação, originando inicialmente hidrocarbonetos acíclicos, que podem dobrar-se de diferentes maneiras sobre a superfície das enzimas, de forma a preencher os pré-requisitos espaciais para sua ciclização. Dessa forma, originam-se as diferentes classes de terpenoides, que costumam apresentar um número de

carbonos múltiplo de 5. Para monoterpenoides (10 carbonos) e sesquiterpenoides (15 carbonos) e assim sucessivamente.

Considerando todo o grupo de terpenoides, os monoterpenos e sesquiterpenos, são os que mais se destacam nos óleos essenciais, devido ter a menor massa molecular, assim, apresentando volatilidade acentuada compreendendo em cerca de 90% em sua composição, e em cada possuindo diferentes subgrupos (SIMÕES et al. 2017). Monoterpenos e sesquiterpenos foram representados na Figura 2 a seguir:

Figura 2 – Exemplos de monoterpenos e sesquiterpenos: acíclico, monocíclico e bicíclico.



Fonte: adaptada de (FELIPE et al. 2017).

3.2 Métodos de Extrações dos Óleos Essenciais

Para realizar a extração de óleos essenciais utilizam-se diferentes métodos de extração, que são modificados conforme a localização na planta, assim como sua utilização final (VIANA et al., 2017). Os tipos de métodos de extração mais comuns são: Enfleurage, arraste por vapor d'água, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos e entre outros.

3.2.1 Enfloração

Esse método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas empresas da área de perfumaria, no caso de determinadas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair o óleo essencial de pétalas de flores (laranjeira, rosas) no qual as pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo período de tempo. Em seguida, essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura, o produto assim possui alto valor comercial. Esse método já foi mais utilizado, mas atualmente ele é empregado apenas por indústrias de perfumes (SIMÕES et al., 2017; SILVA, 2006).

3.2.2 Destilação

Os processos que envolvem destilação são técnicas convencionais para obtenção de óleos voláteis. Embora existam pequenas variações entre a hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor d'água, ambas se baseiam na alta pressão de vapor dos óleos voláteis e são relativamente simples, mas apresentam desvantagens. Entre elas, merecem destaque a possibilidade de degradação térmica de componentes termolábeis, em consequência da utilização de temperaturas elevadas; a ocorrência de reações de hidratação e hidrólise; além da solubilização de alguns componentes na água, o que leva à alteração no perfil odorífero e no sabor dos óleos (SIMÕES et al., 2017).

3.2.3 Hidrodestilação

O material vegetal é transferido para um aparelho/balão e totalmente imerso em água, meio no qual a matéria-prima vegetal é aquecida. Os componentes voláteis são, então, arrastados pelo vapor d'água até chegar a um condensador, onde a mistura retorna ao estado líquido. A separação do óleo volátil e da água costuma ocorrer por diferença de densidade. Nesse método há um contato direto entre a água fervente e a matéria-prima vegetal, o que favorece os processos hidrolíticos e demais eventos indesejáveis dos processos de destilação antes descritos. É bastante indicado para extrair óleos de plantas frescas. Na hidrodestilação também se obtém o hidrolato, que é a parte aquosa com a presença de uma porcentagem do óleo essencial que é solúvel nesta (SIMÕES et al., 2017; SILVA, 2006).

3.2.4 Arraste por vapor d'água

Embora o princípio deste método seja equivalente ao do método citado antes, sua vantagem é que o material vegetal não entra em contato direto com a água fervente. O vapor é produzido em uma caldeira e flui até a parte superior do extrator, onde o material vegetal encontra-se armazenado no interior de uma cesta perfurada. Da mesma forma que descrito para a hidrodestilação, a mistura óleo volátil-água também é separada por diferença de densidade, após a condensação (SIMÕES et al., 2017).

3.2.5 Prensagem a frio ou espremedura

Esse é considerado o método de escolha para a obtenção dos óleos dos pericarpos de frutos cítricos, devido à relativa instabilidade térmica dos aldeídos neles contidos. O óleo é separado da emulsão formada com a água por meio de decantação, centrifugação ou destilação fracionada. Entretanto, os óleos obtidos por prensagem não são constituídos apenas de substâncias voláteis, podendo também conter cumarinas, pigmentos vegetais, entre outros. Portanto, quando o objetivo é obter óleo volátil puro, é necessário utilizar um processo de purificação posterior (SIMÕES et al., 2017).

3.2.6 Extração com Solventes Orgânicos

A extração de óleos voláteis com solventes orgânicos pode ocorrer utilizando-se técnicas convencionais, como percolação a frio, mas também pode ser associada a técnicas mais atuais, como ocorre na extração assistida por micro-ondas ou ultrassom. O caráter lipofílico e pouco polar dos óleos voláteis permite sua extração com solventes orgânicos, em especial éter de petróleo, hexano, éter etílico, etanol e diclorometano, ou misturas deles. O uso deste tipo de extração tem como uma das principais desvantagens a presença de resíduos de solvente no óleo. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial (SIMÕES et al., 2017; SILVA, 2006).

3.3 Métodos de Análise do Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser analisados através de técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas. Para as análises e identificação dos constituintes químicos presentes nas amostras de OCA e OCU foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

3.3.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM)

A cromatografia é uma técnica que permite separar e identificar componentes em uma mistura. Na cromatografia gasosa a fase móvel é um gás e a fase estacionária é um sólido ou um líquido. Na cromatografia gás-líquido, temos um gás passando por uma coluna com um líquido de alta viscosidade revestindo as suas paredes internas (NASCIMENTO et al., 2018).

A cromatografia gasosa permite separar substâncias no estado gasoso ou compostos orgânicos voláteis. Os compostos introduzidos na coluna que não têm muita interação com a fase estacionária são primeiramente eluídos pelo gás de arraste até o detector, sendo eluídos, em seguida, os que têm mais afinidade com a fase estacionária. A análise é rápida, podendo ser efetuada em minutos (NASCIMENTO et al., 2018).

O espectrômetro de massas é um sistema muito utilizado nas análises de amostras. Quando este sistema é acoplado a um cromatógrafo a gás, este funciona como um detector. Nesta técnica conhecida como CG/EM, o gás de arraste emergente do cromatógrafo é transferido através de uma válvula dentro de um tubo, onde ele passa por uma espécie de fenda molecular. Uma parte do fluxo de gás é então transferida para dentro da câmara de ionização do espectrômetro de massas. Assim, cada pico eluído da coluna cromatográfica é bombardeado com uma fonte ionizante, capaz de provocar a fragmentação do composto em uma grande diversidade de íons que são separados e registrados de acordo com suas razões massa/carga (m/z) (SILVA, 2006; VILEGAS, 1997).

Utilizando um sistema CG/EM também é possível analisar uma mistura e conduzir uma busca em uma biblioteca de dados já existentes no sistema, podendo desta maneira procurar cada componente da mistura por tentativas e comparações (SILVA, 2006).

3.4 Gênero *Croton*

Dentre a infinidade de plantas medicinais, destaca-se o gênero *Croton*, segundo maior da família Euphorbiaceae, com 1200 espécies aproximadamente distribuídas predominantemente no continente americano, no Brasil está um dos principais centros de diversidade do gênero cerca de 300 espécies (SILVA et al., 2010).

Espécies desse gênero são encontradas como árvores, arbustos, subarbustos, ervas e raramente lianas. As folhas apresentam revestimento piloso, inteiras ou raramente trilobadas, com estípulas, principalmente nos ramos novos (ANGÉLICO, 2011).

As plantas de espécie *Croton* caracteriza-se como arbustos que medem cerca de 1 metro de altura, possuem um látex transparente ou alaranjado, apresenta cobertura tomentosa, ramos de cor verde-cinza, folhas pilosas que variam de alternada a oposta nas extremidades dos ramos, exalam cheiro agradável devido os óleos essenciais nelas encontradas, inflorescência solitária encurvada na cor branca variando de flores estaminadas a pistiladas, sendo as estaminadas geralmente elípticas coberta de pelos na sua parte externa e glabra internamente (CAVALCANTI; SILVEIRA; SILVA, 2020).

Na região Nordeste ocorre uma extensa variedade de espécies, tais como: *C. argyrophyloides*, *C. betulast*, *C. brasiliensis*, *C. celtidifolius*, *C. cajucara*, *C. heliotropiifolius*, *C. lobatos*, *C. muscicapa*, *C. nepetaefolius*, *C. sellowii*, *C. sonderianus*, *C. urucurana*, *C. zehntneri*, *C. cajucara*, *C. grewioides*, *C. rhamnifolioides*, entre outras. As espécies de *C. cajucara*, *C. campestris*, *C. heliotropiifolius*, *C. rhamnifolioides*, *C. grewioides*, *C. sellowii* e *C. zehntneri* são usadas popularmente como inseticidas naturais, purgantes, antiespasmódicos, anti-inflamatórios e antibióticos (FERNANDES, 2016).

A maioria dos constituintes presentes nos óleos essenciais das espécies de *Croton* são pertencentes às classes dos monoterpenoides e sesquiterpenoides (RAJASEKARAN; 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).

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).

3.4.1 *Croton adamantinus* MÜLL. ARG.

Croton adamantinus Müll. Arg. (Figura 3) 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 e Pernambuco (SANTOS, 2015). Na região do brejo paraibano, essa espécie é conhecida como marmeleiro roxo ou velame. Em outras regiões esta espécie também é conhecida como carrasco, canela de urubu, velame bravo e marmeleiro (SILVA, 2016).

Na região as folhas da planta são utilizadas para o tratamento de dores abdominais, gastrite e refluxo. Também é utilizada no tratamento contra impotência sexual, cicatrização de ferimentos (BARBOSA, 2021). Na literatura foi relatado que o uso popular dessa espécie é utilizado para tratar doenças inflamatórias e feridas da pele (XIMENES et al., 2013; SILVA, 2016).

Figura 3 – *Croton adamantinus* em seu habitat natural.



Fonte: Dados do autor (2023).

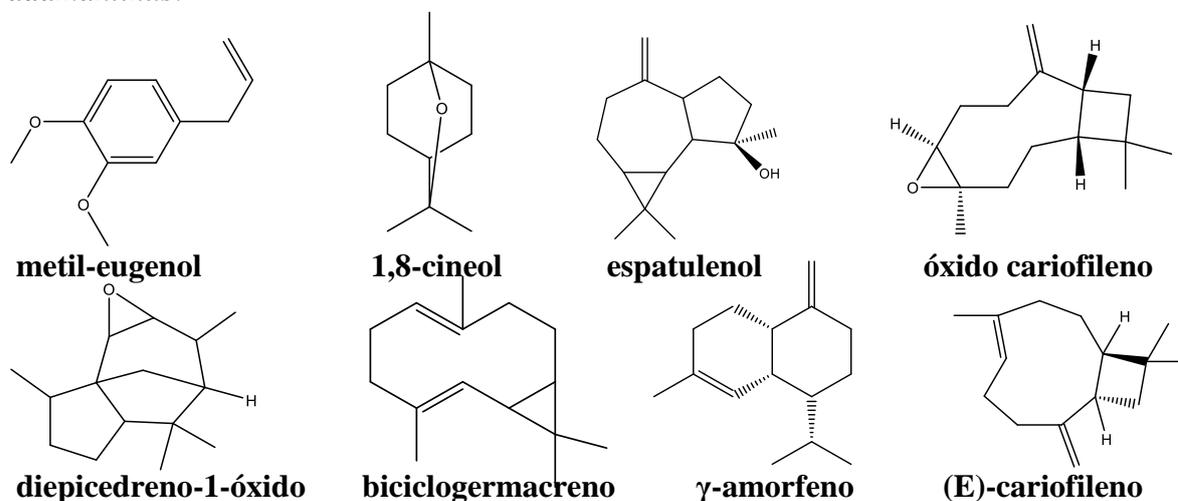
Para *Croton adamantinus*, há poucos relatos sobre estudos dos óleos essenciais dessa espécie, os estudos referentes a composição química do óleo essencial das folhas dessa espécie são encontrados no trabalho de Ximenes (2013), Silva (2020) e Barbosa (2021).

No trabalho de Ximenes (2013), pelo método de CG/EM, 20 constituintes químicos foram identificados nos óleos essenciais do *Croton adamantinus*, sendo os compostos majoritários o metil-eugenol (14,81%) e 1,8-cineol (13,74%). Em relação a atividade antimicrobiana os óleos do *C. adamantinus* mostrou atividade frente a cepa de *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em disco.

No trabalho de Silva (2020) foram identificados como compostos majoritário nos óleos de *C. adamantinus* os constituintes químicos: (-)-espatulenol (28,34%), óxido de cariofileno (20,21%) e diepicedreno-1-óxido (18,16%); Os óleos de *C. adamantinus* apresentou atividade ação bactericida contra cepas resistente de *Staphylococcus aureus* na técnica de microdiluição.

O trabalho de Barbosa (2021) é o estudo mais recente para o *Croton adamantinus* mostra que foram identificados 17 compostos no óleo essencial, sendo 1 monoterpene e 16 como sesquiterpenos. Tendo como compostos majoritários os sesquiterpenos, biciclogermacreno (36,47%) γ -amorfeno (22,91%) e (E)-cariofileno (9,22%) (Figura 2). A atividade antibacteriana desse óleo essencial foi testada frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), pelo método de microdiluição através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), no entanto, o óleo não apresentou atividade frente as cepas testadas.

Figura 4 – Estruturas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus*.



Fonte: (XIMENES, et al., 2013; SILVA, 2020; BARBOSA, 2021).

3.4.2 *Croton urticifolius* LAM.

Croton urticifolius (Figura 5) essa espécie é conhecida como marmeleiro branco ou velame na região do brejo paraibano e possui como característica marcante sua aromaticidade agradável. Geralmente é encontrada como subarbustos e arbustos, 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 encontrada em alguns biomas característicos como: caatinga, cerrado e mata atlântica (CORDEIRO *et al.* 2015).

Figura 5 – *Croton urticifolius* em seu habitat natural.



Fonte: Dados do autor (2023).

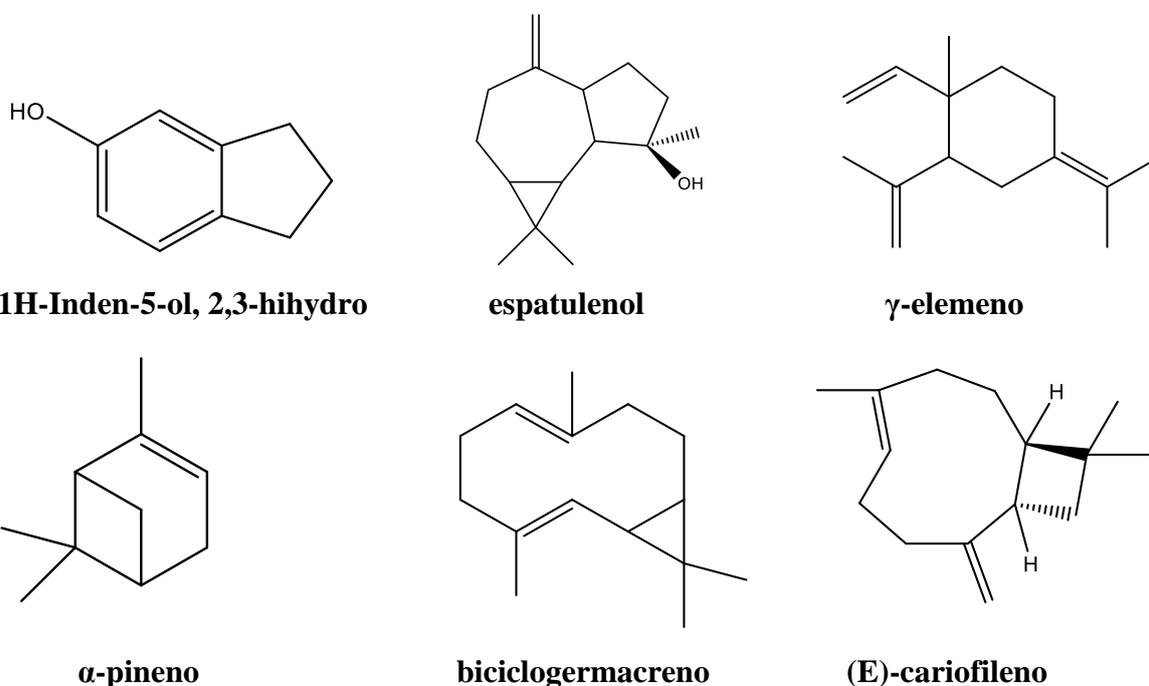
A espécie *Croton urticifolius*, apesar de ser usada na medicina popular e, tem sido pouco estudada, existe apenas dois estudos referente a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas dessa espécie. Silva (2020) e Barbosa (2021).

No trabalho de Silva (2020) para os óleos essenciais das folhas de *C. urticifolius* na estação seca teve como compostos majoritários: 1H-Inden-5-ol, 2,3-hihydro- (83%), (-)-

espatulenol (7,63%) e γ -elemeno (2,79%). Os óleos de *C. urticifolius* apresentou atividade ação bactericida contra cepas resistente de *Staphylococcus aureus* na técnica de microdiluição.

A outra pesquisa encontrada na literatura foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com autoria do discente Antônio Júnior Costa Barbosa. Esse estudo mostra que foram identificados 18 compostos no óleo essencial, sendo 2 como monoterpenos e 16 como sesquiterpenos, tendo como compostos majoritários o monoterpeno α -pineno (21,70%) e os sesquiterpenos, biciclogermacreno (21,46%) e (E)-cariofileno (17,34%) (Figura 6). A atividade antibacteriana desse óleo essencial foi testada frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), avaliando-se Concentração Inibitória Mínima (CIM), no entanto, o óleo apresentou apenas atividade frente à *E. coli*, com CIM de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Foi avaliado também o efeito modulador do óleo frente à cepa de *S. aureus* multidroga resistente (UFPEDA 802) e os resultados obtidos demonstram que a associação do óleo com o antibiótico ciprofloxacino foi positiva, pois levou à potencialização do efeito antibiótico (BARBOSA, 2021).

Figura 6 – Estruturas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius*.



Fonte: (SILVA, 2020; BARBOSA, 2021).

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

A busca por novas moléculas com potencial antimicrobiano derivados de plantas medicinais surge como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções bacterianas (BARROS, 2022). Esse fato tem contribuído com o aumento de pesquisas com produtos naturais, levando em consideração que o uso de plantas medicinais é uma prática milenar e bastante frequente entre as comunidades (SHIN et al., 2018). Vários estudos e pesquisas farmacológicas tem sido realizada com plantas do gênero *Croton* entre elas algumas atividades biológicas como: atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-inflamatória, antitumoral entre outras (CARMEM, 2016; VASCONCELOS, 2022; NOGUEIRA, 2015).

No trabalho realizado por Araújo (2017), foi com o óleo essencial das folhas do *Croton heliotropiifolius*, obtendo-se como componente químico majoritário os sesquiterpenos, (E)-cariofileno (23,85%), γ -muroleno (10,52%) e viridifloreno (8,08). O teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM) apresentou ações inibitórias em duas cepas bacterianas, testadas, sendo os valores de CIM para *Bacillus subtilis* ($62,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e *Staphylococcus aureus* ($500,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$).

O trabalho de Vasconcelos (2022) a espécie de análise foi o *Croton blanchetianus* os compostos majoritários encontrados foram os terpenos eucaliptol (32,94%) e α -pineno (29,43%). Os resultados mostraram relevante atividade antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* contra as duas bactérias estudadas. O efeito bactericida foi observado para uma concentração de óleo de 0,32 g/mL e 0,57 g/mL para *W. viridescense* e *L. mesenteroides*, respectivamente. O óleo essencial apresentou efeito bacteriostático apenas para *L. mesenteroides* com solução de 0,57 g/mL.

O estudo de Fernandes (2016) analisou à composição química do óleo essencial das partes aéreas do *Croton tetradenius*, entre os compostos identificados, teve como constituinte majoritário a cânfora (24,81%), seguida do p-cimol (13,11%), α -pineno (5,57%), canfeno (4,27%), limoneno (4,49%), β -mirceno (4,23%) e o γ -terpineno (3,19%). Na atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes cepas: *Escherichia coli* (ATCC 35288), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pneumoniae* (ATCC 700603), *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Enterococcus faecalis* (ATCC 292012). Não foi possível determinar a CIM do óleo essencial de *Croton tetradenius*, uma vez que este não mostrou atividade frente aos microrganismos testados.

Outro estudo na literatura é descrito por Araújo (2019) com a espécie de *Croton argyrophyllus* e o composto majoritário para todos os óleos foi o biciclogermacreno (média de 38,42%), seguido por (Z)-cariofileno (média de 14,06%), *epi*-longipinanol (média de 9,78%) e germacreno B (média de 9,10%). Os óleos submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* apresentou forte atividade bactericida.

3.5.1 Principais Terpenoides Encontrados nos Óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius* e suas aplicações

Biciclogermacreno é um bicíclico tenso que faz parte do grupo dos sesquiterpenos, que são comumente encontrados em óleos essenciais (TRAN; CRAMER, 2014). O biciclogermacreno em vários óleos essenciais de plantas exibe ação antibacteriana, inseticida e anti-inflamatória e também é o principal composto para o desenvolvimento de drogas terapia para tratar o desequilíbrio hormonal (MARCIEL et al., 2019; SATYAL et al., 2019; TREVIZAN et al., 2016; YAN et al., 2022).

O monoterpeneo α -pineno é um hidrocarboneto bicíclico que consiste em duas unidades de isopreno, resultando na fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. α -pineno é de grande interesse para uso médico e também de alto valor industrial e comercial (ALLENSPACH; STEUER, 2021). O α -pineno, possui propriedades voláteis e hidrofóbicas, tem aroma fresco de pinho e sabor amadeirado. (VESPERMANN et al., 2017). O α -pineno pode ser uma alternativa no combate a bactérias, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento da espécie *Escherichia coli* ATCC 25922, demonstrando a possibilidade de sua utilização como antimicrobiano isolado ou associado a outros fármacos (AMARAL et al., 2020).

O composto β -cariofileno, conhecido como (E)-cariofileno ou (-)-trans-cariofileno, é um sesquiterpeno bicíclico encontrado em óleos essenciais de fontes vegetais biorrenováveis (SILVA; VIEIRA; & SILVA, 2023). O β -cariofileno possui odor amadeirado e picante e é utilizado na medicina popular, devido às suas propriedades terapêuticas como antitumoral, anti-inflamatório, e agente antisséptico (SILVA; VIEIRA; & SILVA, 2023). Utilizado na indústria de cosméticos (creme dental, perfumes e sabonetes) devido ao aroma amadeirado, e também como aditivo alimentar, por apresentar baixa toxicidade de risco (ADAMS et al., 2011; BAHÍ et al., 2014; ROSA et al., 2023).

Germacreno D é um sesquiterpeno monocíclico que possui uma fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ (LIU et al., 2022). O sesquiterpeno germacreno D é um produto altamente promissor devido à sua grande variedade de atividades inseticidas e sua capacidade de servir como precursor de muitos outros sesquiterpenos (LIU et al., 2022).

3.6 Atividade Antibacteriana

Nos últimos anos pesquisas sobre atividade antimicrobiana têm sido realizadas contra a variedade de microrganismos existentes. No entanto, o surgimento de bactérias multirresistentes representa um desafio para o tratamento de infecções, por isso a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para uso no combate a esses microrganismos (PERREIRA et al., 2004; HEMAISWARYA et al., 2008; ANDRADE et al., 2014).

Os biomas brasileiros são ricos em plantas medicinais atuando como fontes biológicas de novas moléculas com potencial terapêutico (MALVEIRA, 2022). 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).

O método de microdiluição é uma técnica utilizada para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir o crescimento de um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ALVES, 2008).

O meio de cultura mais utilizado na literatura para a técnica de microdiluição é o caldo Mueller-Hinton (AMPARO et al., 2018). O caldo Mueller-Hinton permite crescimento elevado da maioria dos patógenos e, além disso, pode ser suplementado, por exemplo sangue animal, sais e açúcares, para promover o crescimento de bactérias fastidiosas (CLSI, 2012.)

As pesquisas em busca de encontrar novos agentes antimicrobianos é necessária, pois microrganismos resistentes estão cada vez mais surgindo e causar infecções oportunistas fatais. Assim, entre as cepas bacteriana, existem o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SILVA, 2012).

3.6.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma espécie bacteriana Gram-positiva caracterizada por cocos agrupados e aglomerados de cocos que são encontrados principalmente na microbiota nasal (OLIVEIRA, et al., 2022). A *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos bacterianos mais disseminados do mundo, causando várias doenças infecciosas, e, provavelmente, centenas de milhares a milhões de infecções graves e invasivas globalmente por ano (CHEUNG et al., 2021). Quando a pele e barreiras mucosas são rompidas, por exemplo, devido a condições crônicas da pele, feridas ou intervenção cirúrgica, *Staphylococcus aureus* pode ter acesso aos tecidos subjacentes ou a corrente sanguínea e causar infecção (LEE, 2018).

As infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) estão relacionadas com maior dificuldade de tratamento, morbidade, mortalidade e altos custos para os serviços de saúde (MERGHNI, et al., 2018; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, et al., 2022).

Devido à resistência generalizada aos antibióticos b-lactâmicos em *Staphylococcus aureus*, o glicopeptídeo vancomicina permanece como a base do tratamento em uso clínico contra infecção por MRSA infecção (KUMAR; CHOPRA, 2013; AGRAWAL, et al., 2015; KRISHNASAMY et al., 2023). Portanto, muita atenção deve ser dada aos produtos naturais, que podem ser usados como drogas eficazes para tratar doenças humanas, com alta eficácia contra patógenos e efeitos colaterais quase insignificantes (LIU, 2017).

3.6.2 *Escherichia coli*

Escherichia Coli, consiste em bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, onde é o principal anaeróbio facultativo que habita é em intestino de humanos (GOMES, 2016). *Escherichia coli* ocupa um lugar especial no mundo microbiológico, pois pode causar infecções graves em humanos e animais, mas também representa uma parte significativa da microbiota autóctone de hospedeiros diferentes (POIREL, 2018). Essas bactérias normalmente ocupam um nicho na microbiota intestinal de humanos (e outros animais), e é desse reservatório que emergem para causar infecções extras intestinais (YAMAMOTO,1997; MANGES, 2019).

Essas cepas são uma das principais causas de doenças infecciosas humanas, contendo alguns patótipos como: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) como diarreiogênica e

ainda hoje estão associadas a casos esporádicos e surtos de diarreia infantil (SOUZA et al., 2016); *Escherichia coli* de Toxina Shiga (STEC) que desenvolve uma sequela com risco de vida como diarreia e colite hemorrágica (TORPHE et al., 2017); e *Escherichia 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).

Os antibióticos utilizados para o tratamento de doença causadas pelas infecções da *E. coli* são β -lactâmicos e as fluoroquinolonas (LUJÁN, 2012). O grupo dos β -lactâmicos inclui os antimicrobianos pertencentes às subclasses: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactam e os inibidores de beta-lactamases (FARIA, 2022). Begier et al. (2021) em seu trabalho verificou resistência de cepas de *Escherichia coli* frente a alguns antibióticos em 3 classes de antibióticos avaliadas, para cefalosporinas (cefepima, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona); Fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino e moxifloxacina); e Carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem).

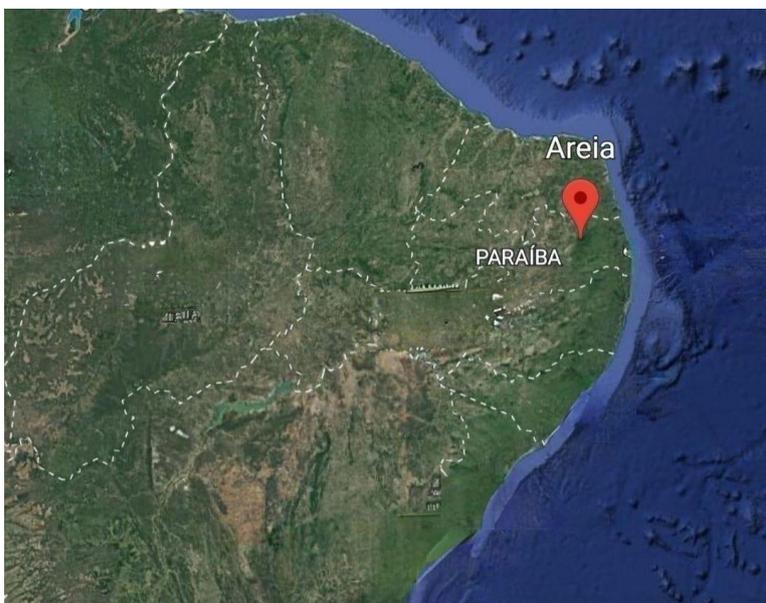
4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

As coletas foram realizadas no local conhecido na região como Pista de Pouso, próximo à cidade de Areia-PB. Os materiais vegetais foram identificados pelo professor Dr. Leonardo Pessoa Félix e o material botânico encontra-se depositado no Herbário Jayme Coêlho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, sob o número de (OCU1259 e OCU1362). A pesquisa foi cadastrada no sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sobre código A5D5689, que foram registradas para as mesmas.

Para o estudo da sazonalidade os materiais vegetais das espécies de *Croton Adamantinus* e *Croton urticifolius* foram coletados nos meses de junho de 2022 a maio de 2023, sempre entre os dias 20 e 30 de cada mês. Todas as coletas foram feitas por volta das 6 h. Para realizar as extrações dos óleos essenciais, foram utilizadas apenas as folhas frescas.

Figura 7 – Localização das coletas das espécies de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius* no município de Areia-PB.



Fonte: adaptada do google earth, 2023.

4.2 Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação

As folhas foram coletadas com alguns galhos, no laboratório foi feito o processo de separação e recorte das folhas e das partes aéreas e foram cortadas em pedaços bem pequenos, para serem pesadas e colocadas no balão de destilação de 5 litros.

Pelo método de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger, foram obtidos os óleos essenciais das folhas frescas de *Croton Adamantinus* e *Croton urticifolius*, por aproximadamente 2:30 h.

Os óleos obtidos foram retirados com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril e posteriormente foram tratados sobre sulfato de sódio anidrido, e, em seguida acondicionados em frasco de Eppendorfs, acomodados em papel alumínio e mantidos sob refrigeração, a fim de evitar perdas de possíveis constituintes provenientes dos óleos essenciais de *Croton Adamantinus* e *Croton urticifolius*.

As quantidades específicas de material vegetal de cada extração da espécie, assim como o volume de água destilada utilizado, estão dispostas na tabela a seguir.

Tabela 1: Massas das folhas e volume de água destilada utilizadas nas extrações.

Extrações dos óleos	Massa das folhas frescas (g) <i>Croton adamantinus</i>	Massa das folhas frescas (g) <i>Croton urticifolius</i>	Quantidade de água destilada (L)
Jun/2022	606,29 g	606,35 g	2 L
Jul/2022	613,71 g	603,89 g	2 L
Ago/2022	513,29 g	604,37 g	2 L
Set/2022	618,09 g	604,50 g	2 L
Out/2022	606,64 g	546,98 g	2 L
Nov/2022	467,81 g	461,10 g	2 L
Dez/2022	602,86 g	603,90 g	2 L
Jan/2023	607,62 g	606,92 g	2 L
Fev/2023	611,67 g	609,05 g	2 L
Mar/2023	600,59 g	615,24 g	2 L
Abr/2023	614,32 g	617,74 g	2 L
Mai/2023	605,54 g	620,36 g	2 L

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

4.3 Cálculo do rendimento

O cálculo do rendimento foi determinado pela relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal (massa das folhas frescas) conforme descrita na equação a seguir.

Equação 1. Cálculo de rendimento dos óleos essenciais.

$$T_o = \frac{V_o}{B_v} \times 100$$

Onde:

T_o = teor de óleo essencial (%)

V_o = volume de óleo essencial extraído (mL)

B_v = biomassa vegetal (g)

4.4 Análise dos óleos essenciais em CG/EM

As análises dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. As análises serão realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise - LMCA, na Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa-PB.

O equipamento que foi utilizado nas análises é um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, modelo GCMS-QP2010, Shimadzu, coluna RTX-5MS capilar (5% Diphenyl/95% dimethyl polysiloxane). tamanho 30 m (comprimento) / 0.25 mm de diâmetro interno / 0,25 μ m). Temperatura máxima da coluna permitida 220 °C, equipado com fonte de ionização por elétrons a 70 eV. Como fase móvel foi utilizado gás hélio com fluxo contínuo de 1 mL/min.

As amostras foram solubilizadas em diclorometano (DCM), grau HPLC, numa proporção de 10 μ L de amostra para 1000 μ L de solvente (DCM).

4.5 Avaliação de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius* foram submetidos a avaliação da atividade antibacteriana. Os testes foram realizados pela técnica de

microdiluição em caldo, avaliando-se a concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas padrão de bactérias.

4.5.1 Cepas Bacterianas

As cepas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Todas provenientes do Departamento de Farmácia/UEPB do Laboratório de Microbiologia Básica.

4.5.2 Antibióticos

Foram usados como controles positivos à vancomicina, para cepas Gram positivas e o Cloridrato de Cefepima para cepas Gram negativas.

Para cada um dos antibióticos utilizados, pesou-se 0,0248g e foram diluídos em 10 mL de água destilada estéril.

4.5.3 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para o cultivo das cepas foi o caldo Mueller-Hinton (MHI).

Foram pesados 36g de caldo Mueller-Hinton e dissolvidos em 1L de água destilada e posteriormente esterilizados em autoclave a 150 °C por 45 min.

4.5.4 Preparação do Inóculo

No 1º dia, as cepas foram incubadas a 37 °C na estufa por 24 h em placas de Petri, e foi preparado o caldo Mueller-Hinton, onde pesou-se 11,1 g do meio de cultura para o preparo de 300 mL de caldo.

No 2º dia, o inóculo foi preparado a partir da escala de McFarland: zerou -se o espectrofotômetro com uma solução fisiológica a 0,9 %, e ajustou o comprimento de onda do aparelho em 625 nm. Logo após foi feita a suspensão direta das colônias em solução fisiológica estéril. A faixa de absorbância estimada foi entre 0,080 - 0,100%. O inóculo padrão de McFarland contém cerca de 10^8 UFC/mL.

Em um tubo médio estéril adicionou-se 400 μL do inoculo padrão de McFarland e 3,6 mL de caldo Mueller-Hinton. O inoculo teste passou a conter cerca de 10^7 UFC/mL.

Logo em seguida, realizou-se outra diluição do inóculo. Em outro tubo estéril foi adicionado 400 μL do inoculo teste de McFarland diluído anteriormente em 3,6 mL de caldo Mueller-Hinton. O inoculo passou a conter cerca de 10^6 UFC/mL.

Na placa de microdiluição em cada um dos 96 poços estava com 100 μL do caldo Mueller-Hinton, quando o inóculo teste na concentração 10^6 UFC/mL foi inserido na placa, a concentração diminuiu para 10^5 UFC/mL, o preparo do inoculo teste recomendado para a concentração de bactérias é que na placa de microdiluição tenham 10^5 UFC/mL de inoculo. A redução é necessária pelo pouco volume de meio de cultura que se utiliza na técnica de microdiluição (LIMA, 2018).

4.5.5 Diluições dos Óleos Essenciais

No preparo da solução mãe, para cada amostra de OE foram pesados 0,05 g, e diluído em 0,5 mL de solução de DMSO a 10 % e 0,5 mL de solução de Tween 80 a 4% e agitado no vórtex.

Para o preparo da solução estoque, retirou-se 0,65 mL da solução mãe e adicionou-se 0,35 mL de água destilada estéril.

Para a solução teste, foi feita outra diluição das amostras, retirando-se 0,5 mL da solução estoque e adicionando-se 0,5 mL de caldo Mueller-Hinton estéril.

4.5.6 Determinação da CIM

As análises foram realizadas em placas de 96 poços de fundo chato e o meio de cultura utilizado foi o MHI (Mueller-Hinton). As amostras dos OE foram inseridas na placa nas seguintes concentrações: 8,192, 4,096, 2,048, 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os antibióticos nas concentrações de: 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o inóculo bacteriano.

4.5.7 Pipetagem na Placa de Microdiluição

Inicialmente utilizando uma pipeta multicanal colocou-se 100 μL do meio de cultura em todos os poços, da coluna 1 até a coluna 12 em todas as linhas (de A a H).

Foram pipetados 100 μL de amostras contendo a solução teste. Logo em seguida, 100 μL da solução teste na concentração de $16,384 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram depositados no primeiro poço (Linha A). Como já havia 100 μL de meio de cultura, a concentração da amostra passou a ter cerca de $8,192 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Depois foi realizada a microdiluição seriada até a penúltima coluna (coluna 11). Os testes de todas as amostras foram feitos em triplicatas, os primeiros poços das Linhas B e C também tinham a mesma solução teste com a mesma quantidade utilizada no poço da linha A.

As Linhas D, E, e F possuíam outra amostra de óleo sob as mesmas condições de preparo e microdiluições.

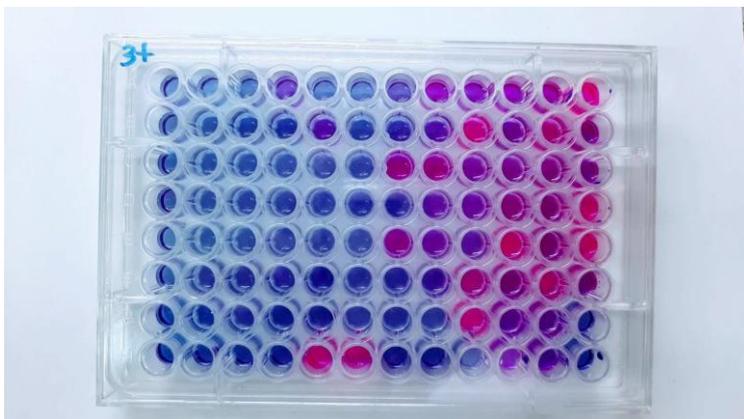
Foram pipetados 100 μL contendo a solução do antibiótico controle em uma concentração de $2,048 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e foram depositados no penúltimo e último poço (Linhas G e H) até a coluna 9. Como já havia 100 μL de meio de cultura, a concentração do antibiótico ficou em cerca de $1,024 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para o controle de DMSO, pegou-se 100 μL da solução a 10% e adicionou-se nos poços das colunas 10 e 11, das linhas G e H. A Coluna 12, das linhas A até H da placa de microdiluição, recebeu apenas o meio de cultura.

Por último adicionou-se 20 μL da suspensão bacteriana em todos os poços, exceto os poços da coluna 12 das linhas G e H onde possuíam apenas o meio de cultura, sem suspensão bacteriana.

As placas foram colocadas para incubar em estufa a 36°C por 24h. A leitura do resultado foi feita adicionando 20 μL do corante resazurina a 0,01% em cada poço, e incubou novamente as placas na estufa por cerca de 4 h. Ao realizar a leitura da placa, na qual a cor azul representa a ausência do crescimento bacteriano e a cor rosa o crescimento bacteriano (LIMA, 2018).

Figura 8 – Placa de 96 poços para técnica de microdiluição.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse trabalho foi realizado o estudo sazonal dos óleos essenciais das folhas frescas do *Croton adamantinus* (OCA) e *Croton urticifolius* (OCU) coletadas na cidade de Areia, no Brejo Paraibano – Brasil, visando avaliar as possíveis variações da composição química dos OE em diferentes estações durante 12 meses (inverno, primavera, verão e outono) Para o estudo sazonal das duas espécies foram analisadas 12 amostras de OCA, e outras 12 amostras para OCU referentes a cada um dos meses entre junho de 2022 a maio de 2023. Todas as coletas foram realizadas as 6h da manhã. Os OE foram extraídos pelo método de hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger, e apresentaram as seguintes características: o OCA possui uma coloração amarelada, cheiro forte, bastante denso e muito viscoso, e o OCU, possui uma coloração esbranquiçada, cheiro bastante aromático e agradável, de pouca densidade e viscosidade.

Os OEs foram obtidos com rendimentos que variaram entre os valores de 0,05% a 0,08% para o OCA e de 0,08% a 0,26% para o OCU.

Para o óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus*, extraído por destilação a vapor, a literatura mostra rendimentos de aproximadamente 0,6%, (XIMENES et al., 2013), 0,68%, extraído por hidrodestilação (SILVA, 2020) e 0,1 %, extraído por hidrodestilação (BARBOSA, 2021), valores superiores ao encontrado nesse trabalho, evidenciando que houve uma variação no rendimento do óleo essencial da espécie em estudo. 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 e entre outros (MADHUMITA; GUHA; NAG, 2019).

Já para o óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius*, foi obtido rendimentos com valor de 1,86 %, extraídos entre os meses de fevereiro e maio de 2016, (SILVA, 2020) e 0,1%, foram extraídos durante o outono de 2019 (BARBOSA, 2021). Ambos obtidos pelo método de hidrodestilação. Os rendimentos obtidos neste estudo são semelhantes aos obtidos por Barbosa (2021).

No estudo sazonal dos OCA os teores de óleos (%) obtidos nas 12 amostras investigadas variou entre 0,05% a 0,08%, apresentando uma média geral de 0,06% em relação ao rendimento dos óleos analisados. Observou-se que no mês de novembro (nov) o rendimento de óleo foi maior em comparação com os demais meses, justamente o mês que é o final da primavera e próximo ao início do verão. Para o OCA nos meses da primavera

obtiveram as melhores médias em relações as outras estações com (média 0,07%), seguido do verão (média 0,06%), outono (média 0,05%) e inverno (média 0,05%).

Os meses de menores rendimentos foram obtidos nos meses de junho (jun), julho (jul) e agosto (ago), que corresponde ao inverno. Esse fato pode estar relacionado a influência de temperatura ambiente, já que os meses de junho e julho são característicos de serem chuvosos e frios na região do brejo paraibano – Brasil, e as espécie de *Croton* se mostraram com um maior rendimento dos seus óleos à medida que a temperatura elevava e o clima se torna mais quente. Em geral, a produção de óleos essenciais tende a aumentar em temperaturas mais elevadas, o que pode levar ao crescimento e desenvolvimento para a planta, pois está diretamente relacionado à fotossíntese e outros processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (CASTRO et.al., 2018).

Para o estudo sazonal dos OCU os teores de óleos (%) obtidos nas amostras, nos meses de junho de 2022 a maio de 2023, variou entre 0,08% a 0,26%, apresentando uma média geral de 0,12% da composição dos óleos analisados. Observa-se que nos meses de janeiro (Jan), fevereiro (fev) e março (mar) o rendimento de óleo foi um pouco menor obtendo um percentual de apenas 0,08% do teor de óleo, em relação ao mês de novembro (nov) que obteve o melhor rendimento de todas as amostras com um teor de 0,26 %. De modo geral para OCU a estação da primavera também teve as melhores médias em relações as outras estações com (média 0,19%), seguido do inverno (média 0,13%), outono (média 0,11%) e verão (média 0,10%). As variações interanuais e sazonais são responsáveis diretas pelas variações na população de *Croton*, entretanto é possível que características da própria espécie ou condicionada a outros fatores ambientais sejam responsáveis pelas variações na sua dinâmica (NASCIMENTO et al., 2017).

No estado da paraíba, a estação da primavera coincide com o período de estiagem, onde as chuvas são bastante reduzidas, acarretando uma maior intensidade luminosa. Segundo a Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba (AESAs) (<http://www.aesa.pb.gov.br>) nos meses de setembro, outubro e novembro de 2022 (primavera), não houve ocorrência de chuva registrada, acarretando em uma maior incidência de raios solares que estimula a atividade fotossintética e crescimento da planta, o que pode gerar aumento na síntese de metabólitos secundários. O aumento das temperaturas cria um efeito de estresse térmico nas plantas aromáticas e favorece a produção de óleo essencial (SANTOS et al., 2023).

5.1 Identificação dos constituintes

As amostras dos óleos essenciais das folhas frescas de *Croton adamantinus* (OCA) e *Croton urticifolius* (OCU) foram analisados por CG/EM e um total de 20 compostos foram identificados para cada uma das espécies, (Tabela 2 e 3) a partir dos dados obtidos nos cromatogramas (Figuras 10 a 33). Os compostos foram organizados por ordem de eluição na coluna, o índice de retenção com dados na literatura (ADAMS, 2009) e a porcentagem de cada constituinte de cada amostra estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 cujas estruturas estão dispostas na Figura – 9.

A identificação das substâncias foi feita pela comparação dos espectros de massas obtidos com os da literatura adotada (ADAMS, 2009). Foi então realizada 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) de alguns constituintes químicos presentes nos óleos essenciais. Os constituintes químicos, seus respectivos índices de Kovats e as respectivas porcentagens estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. As análises dos espectros de massas foram comparadas com dados na literatura (ADAMS, 2009), e confirmou a identificação acima de 87,0% de todos os compostos presentes em todas as amostras de óleos essenciais de *Croton adamantinus* (OCA) e acima de 90% para o *Croton urticifolius* (OCU).

A classe de compostos predominantes nos óleos OCA foi sesquiterpeno, já que dos 20 compostos identificados, através do CG/EM, 19 pertencem a essa classe (95%) seguida por monoterpenos (5%). A presença de sesquiterpenos em porcentagens elevadas é comum nos óleos das espécies de *Croton*, conforme tem sido relatado na literatura (OLIVEIRA et al., 2020). Já em relação as amostras do OCU, 20 compostos foram identificados, a classe de compostos predominantes nos óleos também foram os sesquiterpenos (80%), seguidos por monoterpenos (20%).

De forma geral foram identificados os constituintes que apresentavam valores atribuídos acima de 0,1% ou que havia presença em outras amostras, afim de fazer uma comparação geral entre as variações entre o estudo sazonal das duas espécies.

Tabela 2- Composição química e teor de óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) no estudo sazonal.

Constituintes químicos ^a	IK ^b	IK ^c	Composição (%) OCA												
			Inverno			Primavera			Verão			Outono			
			Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	
α -pineno	939	931	-	1,01	-	-	-	-	-	-	-	-	3,05	-	1,60
α -copaeno	1376	1372	0,72	-	-	0,69	0,65	0,69	-	1,38	-	-	-	-	-
β -elemeno	1390	1386	4,40	3,40	2,83	2,50	3,68	3,99	1,49	5,00	3,21	4,07	2,05	1,73	
(E)-cariofileno	1419	1422	10,42	11,36	9,50	17,12	13,74	9,19	15,65	7,02	13,50	6,50	19,83	14,46	
α -trans-bergamoteno	1434	1430	2,01	2,19	2,02	3,29	2,44	1,77	2,90	2,22	1,98	2,22	1,85	2,40	
aromadendreno	1441	1442	-	-	2,56	2,37	3,54	1,54	3,09	2,40	-	6,53	2,86	3,47	
α -humuleno	1454	1457	1,19	1,73	0,98	1,63	1,36	1,05	1,66	0,79	1,52	2,13	2,18	1,76	
9-epi-(E)-cariofileno	1466	1466	0,90	-	-	0,68	0,67	-	-	-	-	-	-	-	
D-germacreno	1481	1485	16,97	4,08	16,60	14,20	11,54	17,12	15,41	25,64	16,56	2,80	11,62	14,72	
biciclogermacreno	1500	1502	35,20	18,68	33,08	30,26	30,56	36,07	28,40	26,95	30,14	19,03	26,56	25,20	
β -sesquifelandreno	1522	1517	1,39	-	2,10	2,67	2,08	1,93	2,71	2,25	2,78	-	2,38	2,89	
δ -cadineno	1523	1521	1,35	0,95	2,06	1,49	1,91	1,55	2,10	3,37	1,68	1,82	1,71	2,29	
γ -(E)-bisaboleno	1531	1533	6,47	3,87	7,97	11,49	10,72	7,66	10,68	6,14	11,37	5,81	12,05	12,30	
espatulenol	1578	1581	4,29	16,94	2,48	1,90	3,43	2,49	1,56	1,79	1,30	8,82	1,55	2,08	
óxido cariofileno	1583	1588	3,46	9,53	-	1,90	2,58	-	2,37	-	-	-	-	3,65	
globulol	1590	1589	-	-	2,68	-	-	2,04	-	1,86	1,92	3,96	3,01	-	
viridiflorol	1592	1596	1,55	3,17	1,96	0,94	1,24	1,52	-	1,74	-	2,34	1,36	1,19	
α -murolol	1646	1640	4,57	11,69	5,82	-	-	5,99	2,95	3,76	2,38	9,37	2,39	2,43	
α -cadinol	1654	1649	1,39	3,07	1,72	0,62	1,05	1,63	0,93	1,58	0,95	5,32	1,08	1,22	
α -bisabolol	1685	1670	1,23	2,49	-	-	-	-	-	-	-	3,30	-	-	
Total			97,51	94,16	94,36	93,75	91,19	96,23	93,89	93,89	90,29	87,07	92,48	93,39	
Teor de óleo (%)			0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,08	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	

* Constituintes químicos^a = Nomes dos constituintes listados em ordem de eluição na coluna cromatográfica; IK^b = índice de Kovat da literatura (ADAMS, 2009); IK^c = índice de Kovat corrigido.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Tabela 3- Composição química e teor de óleos essenciais das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) no estudo sazonal.

Constituintes químicos ^a	IK ^b	IK ^c	Composição (%) OCU											
			Inverno			Primavera			Verão			Outono		
			Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai
α -pineno	939	926	53,72	56,01	42,07	62,97	52,71	37,99	41,12	19,71	32,51	11,60	24,67	26,99
canfeno	954	943	0,37	0,35	0,23	0,41	0,32	-	1,05	-	-	-	-	-
β -pineno	979	975	0,69	0,70	0,53	0,79	0,70	1,04	1,54	-	1,05	-	0,84	0,75
limoneno	1029	1032	0,36	0,43	0,29	0,47	0,43	0,72	0,83	-	-	-	-	-
δ -elemeno	1338	1351	0,37	0,37	0,50	0,24	0,55	-	-	1,46	1,12	-	0,87	1,02
α -copaeno	1376	1389	1,94	1,56	1,97	1,40	1,31	2,53	2,35	2,90	4,08	5,14	4,25	5,20
β -elemeno	1390	1396	2,00	2,72	3,00	1,41	3,21	3,25	3,55	4,96	3,92	6,21	3,91	3,06
(E)-cariofileno	1419	1432	14,65	11,09	15,93	9,78	11,40	13,51	14,21	15,57	13,87	19,46	18,76	18,96
α -humuleno	1454	1462	3,20	2,44	3,59	2,53	2,41	3,97	3,76	4,88	3,54	6,08	5,50	5,70
9-epi-(E)-cariofileno	1466	1469	0,45	0,40	0,55	0,37	0,70	1,11	0,69	-	0,82	1,65	1,17	0,96
γ -muroleno	1479	1478	0,66	1,44	0,70	0,50	0,94	1,68	0,71	2,13	1,59	1,77	1,49	1,93
D-germacreno	1481	1485	3,36	2,96	5,23	2,53	4,93	5,18	4,20	11,55	7,99	4,20	5,36	6,04
biciclogermacreno	1500	1499	13,49	15,06	18,15	13,12	14,40	18,50	18,05	17,72	17,14	21,98	18,20	17,76
δ -cadineno	1523	1517	0,37	-	0,45	0,44	0,48	1,07	0,49	1,21	1,09	1,54	1,12	1,11
(Z)-nerolidol	1532	1542	1,30	1,45	1,38	0,31	0,75	1,09	1,01	1,80	1,45	2,32	2,37	2,54
B-germacreno	1561	1552	0,87	1,25	1,76	1,58	0,96	1,85	1,14	1,32	1,36	4,69	2,83	1,03
espatulenol	1578	1568	0,80	0,61	0,73	0,09	0,52	2,14	1,99	4,56	2,31	2,82	2,00	1,63
globulol	1590	1574	0,10	0,40	0,70	0,07	0,47	1,31	0,96	-	1,18	2,12	1,53	1,50
viridiflorol	1592	1580	0,30	-	0,35	0,20	0,35	0,85	-	-	0,70	1,34	1,08	1,08
α -murolol	1646	1619	0,38	0,34	0,57	0,12	0,42	0,95	-	1,98	1,20	1,93	1,83	1,10
Total			99,39	99,58	98,68	99,33	97,96	98,74	97,65	91,75	96,92	94,85	97,78	98,36
Teor de óleo (%)			0,12	0,12	0,15	0,15	0,16	0,26	0,14	0,08	0,08	0,08	0,13	0,11

*Constituintes químicos^a=Nomes dos constituintes listados em ordem de eluição na coluna cromatográfica; IK^b = índice de Kovat da literatura (ADAMS, 2009); IK^c= índice de Kovat corrigido.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nas amostras do OCA foram identificados 20 compostos, dentre eles 1 monoterpene (5%) e 19 sesquiterpenos (95%). Os constituintes químicos majoritários identificados foram os mesmos em todas as amostras com diferença apenas em relação a quantidade percentual de suas composições químicas. Os compostos majoritários em todas as amostras foram os sesquiterpenos: **biciclogermacreno**, **(E)-cariofileno** e **D-germacreno**.

As substâncias identificadas em cada amostra do OCA variou entre 15 a 20, sendo que em todas as 12 amostras do estudo da análise sazonal, apresentaram como composto majoritário o **biciclogermacreno**, concordando com os dados obtidos por Barbosa (2021). No entanto, este estudo apresenta um quimiotipo diferente do apresentado no trabalho Silva (2020), onde foram identificados como compostos majoritário nos óleos de *C. adamantinus* o (-)-espatulenol (28,34%), óxido de cariofileno (20,21%) e diepicedreno-1-óxido (18,16%).

O teor em porcentagem do composto **biciclogermacreno** nos OCA variou entre 18,68% a 36,07%, apresentando uma média geral de 28,34% da composição dos óleos analisados desse constituinte. Destacam-se os meses de julho (**jul**) (18,68%) e novembro (**nov**) (36,07%) com a menor e maior percentual de **biciclogermacreno**, respectivamente. As médias do teor de **biciclogermacreno** nos meses da primavera obtiveram as melhores médias em relações as outras estações com (média 32,29%), seguido do inverno (média 28,98%), verão (média 28,48) e outono (média 23,59%). O fato do **biciclogermacreno** ser majoritários em todas amostras do OCA, pode estar atribuído as temperaturas mais altas das estações (primavera e verão), este composto é um sesquiterpeno, e sua perda para o ambiente de forma natural ocorre mais lentamente do que os monoterpenos, que são compostos de menor peso molecular que evaporam mais rápido (ALENCAR et al., 2017).

Os percentuais encontrados para o **biciclogermacreno** em termo de média foi inferior ao encontrado na literatura para o óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (36,47%) (BARBOSA, 2021). Comparando o mesmo mês de extração (**mar**) entre os OCA, o trabalho de Barbosa (2021), obteve um percentual bem mais relevante 36,47%, enquanto essa análise teve 19,03%. A produção de metabólitos secundários pode alterar conforme o estágio de desenvolvimento da planta, outro fator é o estresse da planta com relação a sazonalidade ocorrida no período, ano/mês, e até mesmo o dia da coleta do material botânico (FERREIRA et.al., 2020).

Dentre as 12 amostras analisadas para OCA, 6 tiveram como o segundo composto com maior percentagem na composição o **(E)-cariofileno**, nos respectivos meses de julho, setembro, outubro, dezembro, março e abril, apresentando uma média de 12,36% da

composição dos óleos analisados. Esses valores estão acima da literatura de referência, que obteve um valor de 9,22% para o mesmo composto (BARBOSA, 2021). Já as outras 6 amostras tiveram o **D-germacreno** como o segundo composto em maior proporção nas amostras de junho, agosto, novembro, janeiro, fevereiro e maio, apresentando uma média de 13,94% e indicando uma variação em relação as demais amostras. No trabalho de Barbosa (2021), não foi identificada a presença do composto **D-germacreno** em sua análise.

Para as amostras do OCU foram identificados 20 compostos, dentre eles 4 monoterpenos (20%) e 16 sesquiterpenos (80%). Os constituintes químicos majoritários identificados foram os mesmos em todas as amostras com diferença apenas em relação a quantidade percentual de suas composições químicas. Os compostos majoritários em todas as mostras foi o monoterpeno **α -pineno**, seguido pelos sesquiterpenos, **biciclogermacreno** e **(E)-cariofileno**. Os sesquiterpenos estavam em maiores proporções em todas as amostras.

O número de substâncias identificadas em cada amostra do OCU variou de 14 a 20, sendo que das 12 amostras da análise sazonal, 11 amostras apresentaram como composto majoritário o **α -pineno**, concordando com os dados obtidos por Barbosa (2021). A exceção foi o mês de janeiro (**jan**), onde o composto majoritário da amostra foi o **biciclogermacreno**.

A porcentagem de **α -pineno** nos OCU variou entre 11,60% a 62,97%, apresentando uma média geral de 38,50% da composição dos óleos analisados desse constituinte. Destacam-se os meses de março (**mar**) (11,60%) e setembro (**Set**) (62,97%) com a menor e maior quantidade de α -pineno, respectivamente. As médias do teor de **α -pineno** nos meses da primavera obtiveram as melhores médias em relações as outras estações com (média 51,22%), seguido do inverno (média 50,60%), verão (média 31,11%) e outono (média 21,08%). Os percentuais encontrados para o α -pineno foram bem mais elevados que o encontrado na literatura para o óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (21,70%) (BARBOSA, 2021). No entanto, este estudo apresenta um quimiotipo diferente do apresentado no trabalho Silva (2020), onde foram identificados como compostos majoritário nos óleos de *C. urticifolius* que teve o 1H-Inden-5-ol, 2,3-dihidro- como composto majoritário (83%).

A produção elevada ou baixa de **α -pineno** em uma planta pode estar atribuída a formação do intermediário (cátion terpenil) formado nos monoterpenos cíclico, e quando o cátion terpenil sofre rearranjo, por exemplo, o fechamento do anel nas posições 2,7 forma o cátion pinil que forma α - e β -pineno (XU et al., 2021).

Dentre as 12 amostras analisadas para OCU, 9 tiveram como o segundo composto com maior percentagem na composição o **biciclogermacreno**, apresentando uma média de 16,96% da composição dos óleos analisados. Esses valores para o **biciclogermacreno** estão um pouco

distantes da literatura de referência, que obteve um valor de 21,46% para esse composto (BARBOSA, 2021). Já para as amostras junho de 2022, abril e maio de 2023 o segundo composto mais abundante foi o **(E)-cariofileno**, indicando uma variação em relação as demais amostras.

O terceiro constituinte de maior porcentagem em 9 das 12 amostras para o OCU foi o **(E)-cariofileno**, que apresentou uma média de 14,76% dos OCU da composição dos óleos analisados. O **(E)-cariofileno**, estão próximos da literatura de referência, que obteve um valor de 17,34% para esse composto (BARBOSA, 2021).

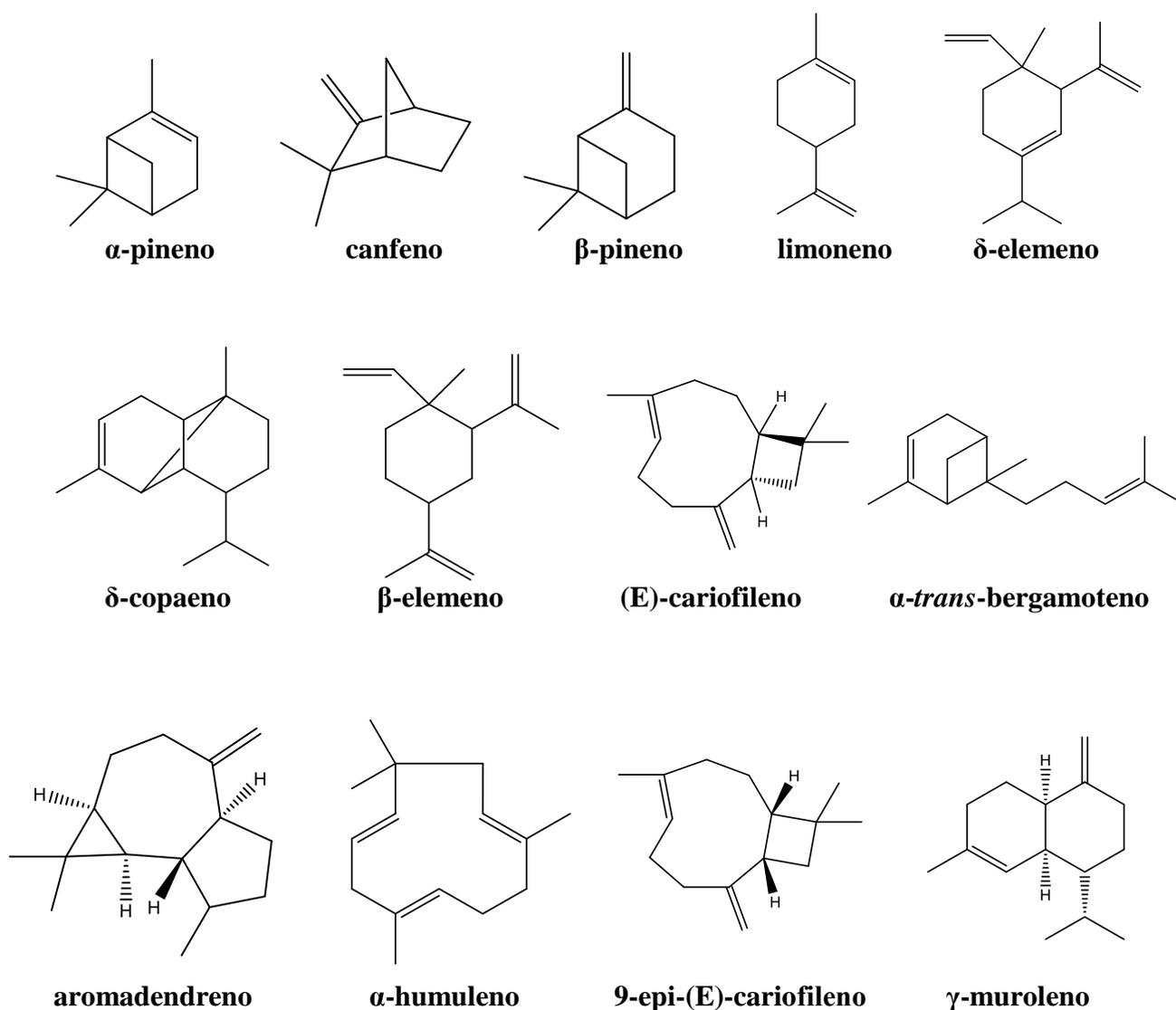
O α -pineno que foi o composto majoritário nos OCU, foi identificado em apenas 3 das 12 amostras do OCA, enquanto compostos como **biciclogermacreno**, **(E)-cariofileno** e **D-germacreno** tiveram quantidades percentuais relativas nos OCA e OCU.

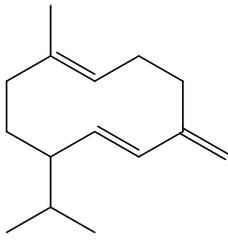
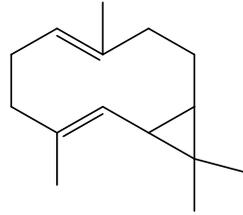
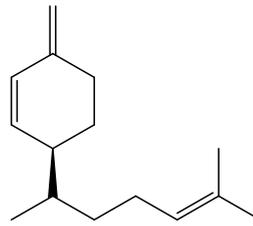
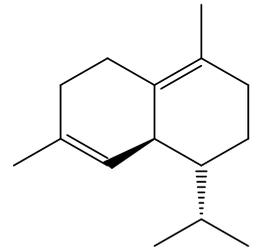
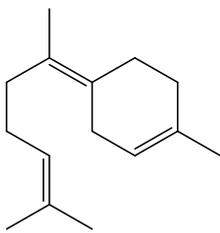
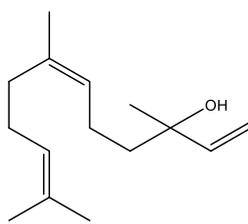
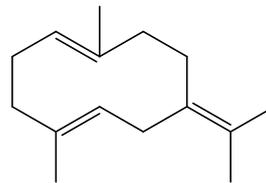
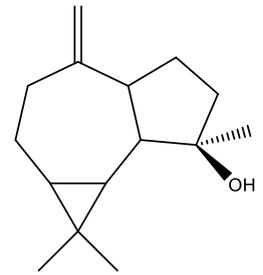
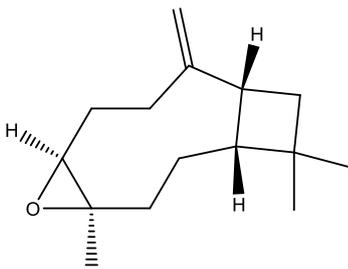
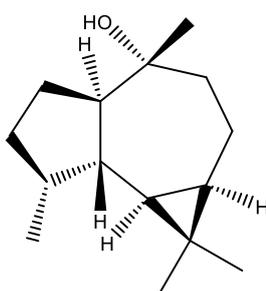
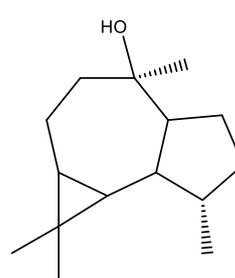
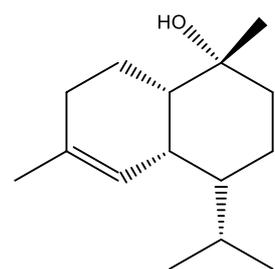
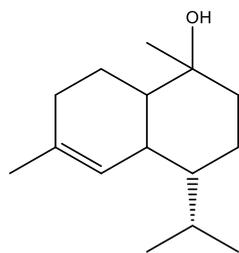
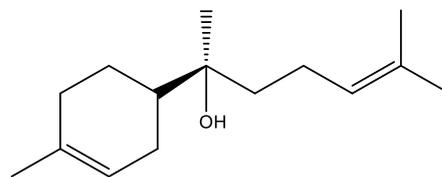
O estudo sazonal das espécies de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius* teve como objetivo investigar as variações que podem ocorrer nos constituintes químicos da espécie ao decorrer de vários meses em diferentes climas das estações do ano. De acordo os resultados obtidos a melhor estação do ano para realização da extração dos OCA e OCU foi na primavera com médias de 0,07% e 0,19% respectivamente, e conseqüentemente nessa estação obtiveram os maiores valores entre os compostos majoritário dessas especie. Para o OCA em novembro o **biciclogermacreno** (36,07%) e para o OCU, setembro o **α -pineno** (62,97%). Os resultados obtidos podem estar relacionados a concentração de terpenoides nos óleos essenciais, geralmente aumenta em estações que possui temperaturas mais elevadas (primavera e verão), por outro lado, estações chuvosas (outono e inverno) podem resultar na perda de substâncias presentes principalmente nas folhas e conseqüentemente causar uma diminuição na concentração de compostos voláteis (SILVA et.al., 2019).

Variações nos teores dos óleos essenciais assim como nos constituintes químicos, provavelmente podem estarem associadas aos efeitos de diversos fatores ambientais que estimularam a biossíntese desse terpenoides. Nesse sentido as condições climáticas da cidade de Areia-Paraíba no período das coletas (junho de 2022 a maio de 2023) registraram o índice de precipitação de chuvas em todas as estações sendo: a primavera registrou o menor índice de chuva registrado (média 39,5 mm) característico do período de estiagem e mais seco da região, em seguida verão (média 85,5 mm), outono (média 126,5 mm) e inverno (média 216,6 mm) período mais chuvoso. De acordo com Santos et al (2023), isso pode estar relacionado aos componentes hidrofóbicos presentes nos óleos essenciais, que tendem a aumentar durante os períodos quentes e sem chuva, para proteger a planta contra a dessecação e as flutuações na intensidade de luz.

Para as 12 amostras do OCA e as 12 amostras do OCU foram identificados no total 27 constituintes químicos diferentes e a sequência numeral inserida das estruturas dos constituintes identificados está em ordem de eluição na coluna cromatográfica pelo índice de Kovats da literatura (ADAMS, 2009). As estruturas de todos esses compostos estão apresentadas na Figura 9, a seguir:

Figura 9- Estrutura dos constituintes identificados nos óleos essenciais de *Croton adamantinus* e (OCA) e *Croton urticifolius* (OCU).



**D-germacreno****biciclogermacreno** **β -sesquifelandreno** **δ -cadineno** **γ -(E)-bisaboleno****(Z)-nerolidol****B-germacreno****espatulenol****óxido cariofileno****globulol****viridiflorol** **α -murolol** **α -cadinol** **α -bisabolol**

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Todas as amostras dos OCA e OCU foram submetidas a avaliação do seu potencial antibacteriano, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

Para a análise de resultados considerou-se, boa atividade inibitória, quando o valor de CIM foi menor que 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, atividade inibitória moderada, entre 101–500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, atividade inibitória fraca, entre 501– 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e ausência de atividade inibitória, quando a concentração indicar valores maiores que 1001 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (HOLETZ *et al.*, 2002; AYRES *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2014). De acordo com a Tabela 4 a seguir:

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

Atividade Antibacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM) [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]
Boa	<100
Moderada	101-500
Fraca	501-1000
Inativa	>1001

Fonte: HOLETZ *et al.* (2002); AYRES *et al.* (2008); SOUZA *et al.* (2014); CHAUL (2015).

Os resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas frescas do *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius*, contra as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius*.

Amostras	Cepas bacterianas			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	OCA	OCU	OCA	OCU
	CIM [$\mu\text{g.mL}^{-1}$]			
Jun/2022	512	ND	8192	ND
Jul/2022	4096	ND	8192	ND
Ago/2022	4096	ND	8192	ND

Set/2022	4096	ND	8192	ND
Out/2022	512	ND	8192	ND
Nov/2022	4096	ND	8192	ND
Dez/2022	256	ND	8192	ND
Jan/2023	512	ND	8192	ND
Fev/2023	512	ND	4096	ND
Mar/2023	1024	ND	8192	ND
Abr/2023	128	ND	8192	ND
Mai/2023	128	ND	8192	ND

Obs: Nd: não houve atividade antimicrobiana; Controle positivo: Para *Staphylococcus aureus* utilizou-se Vancomicina; Para *Escherichia coli* utilizou-se Cloridrato de Cefepima. Todos os antibióticos tiveram CIM de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

A análise comparativa dos resultados obtidos na Tabela 5 com os da Tabela 4 mostram que as 12 amostras dos OCA apresentaram-se ativas contra as cepas de *Staphylococcus aureus* na maioria das concentrações utilizadas, as concentrações viáveis variaram entre 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que as amostras do mês de abril e maio foram mais efetivas, com uma concentração de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esse resultado pode estar atribuído a similaridade dos principais constituintes químicos identificado durante o outono e aumento considerável do constituinte químico **γ -(E)-bisaboleno**, que teve os maiores valores encontrados, coincidentemente nos meses de abril e maio com uma porcentagem de 12,05% e 12,30 % respectivamente. Na literatura não foi encontrado registros de atividades antibacteriana sobre o composto. Outra possibilidade para justificar a atividade antibacteriana dos OCA, é a presença de **(E)-cariofileno**, ou também conhecido como β -cariofileno, que no mês de abril, registrou a maior quantidade percentual para esse composto com 19,83%. No trabalho de Yoo e Jwa (2019) constatou que o cariofileno pode melhorar a saúde periodontal através da atividade antimicrobiana contra periodontopatógenos, reduzindo a inflamação causada pelo lipopolissacarídeo. Vários trabalhos mostram que **(E)-cariofileno** ou óleos essenciais de espécie do gênero *Croton* contendo esse composto exibiram potencial antimicrobiano frente as cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (DAOUDA, et al., 2014; BRITO et al., 2018).

As análises de OCA frente a cepa *Escherichia coli*, mostraram que nenhuma das amostras teve atividade antibacteriana conforme mostra a Tabela 5.

O óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* já teve sua atividade antimicrobiana testada em outros trabalhos (XIMENES et al., 2013), (SILVA, 2021) e (BARBOSA, 2021). No trabalho de Ximenes (2013) houve a comprovação seu efeito bactericida, frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, através do método de difusão em disco. No trabalho de Silva (2021), os OCA também teve atividade antibacteriana detectada frente a *Staphylococcus aureus* multirresistente. Porém no trabalho de Barbosa (2021), não houve evidência de atividade em nenhuma das cepas testadas. Portanto o presente trabalho apresentou um resultado relevante, visto que nas análises foram obtidos resultados diferentes, relacionado a variação na composição química desses óleos.

Como pode ser observado na Tabela 5 o OCU, não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das 12 amostras frente as duas cepas testadas. O composto majoritário nas amostras OCU foi o α -pineno, que na literatura mostra ser uma alternativa no combate às bactérias, sendo capaz de inibir o crescimento da espécie *Escherichia coli*, demonstrando a possibilidade de seu uso como antimicrobiano isolado ou associado a outras drogas (AMARAL et al., 2020). A ausência de atividade no óleo pode ser justificada pela interação dos componentes do óleo entre si, formando um complexo inativo que acabam interferindo na inibição da atividade antimicrobiana.

É importante destacar que esses efeitos antibactericidas não dependem exclusivamente dos compostos majoritários, mas também pode estar atribuído a sensibilidade das cepas bacterianas, métodos de extrações, ano e período da coleta da planta (inverno, primavera, verão e outono), entre outros fatores que podem interferir nos resultados em relação a composição química e atividade antibacteriana.

6 CONCLUSÃO

Esse trabalho contribuiu com o estudo da variação sazonal dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas frescas de *Croton adamantinus* e *Croton urticifolius*, coletadas na cidade de Areia, no brejo paraibano – Brasil.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa identificou 20 constituintes químicos para o OCA e 20 constituintes para o OCU. Em relação aos OCA os compostos majoritários foram biciclogermacreno, (E)-cariofileno e D-germacreno. A média de percentagem dos constituintes teve para biciclogermacreno (28,34%), (E)-cariofileno (12,36%) e D-germacreno (13,94%). Já para o OCU os compostos com maior percentagem em todas as amostras foram o α -pineno, biciclogermacreno e (E)-cariofileno. A média de percentagem dos constituintes teve para o α -pineno (38,50%), biciclogermacreno (16,96%), (E)-cariofileno (14,76%).

De acordo com os resultados obtidos a melhor estação do ano em relação a rendimento para realização da extração dos OCA e OCU foi na primavera com médias de 0,07% e 0,19% respectivamente, e, conseqüentemente, nessa estação foram obtidos os maiores valores entre os compostos majoritário dessas espécie. Para o OCA, em novembro, o biciclogermacreno (36,07%) e para o OCU em setembro, o α -pineno (62,97%).

Oito das 12 amostras dos OCA apresentaram atividade antibacteriana frente a cepa de *Staphylococcus aureus*, com variações entre 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que as amostras do mês de abril e maio tiveram as melhores atividades encontradas com uma CIM de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. OCA não apresentou atividade frente a *Escherichia coli*.

Para OCU não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das 12 amostras frente as duas cepas testadas na microdiluição.

Os quimiotipos neste estudo são diferentes dos encontrados na literatura para OCA e OCU, a influência da sazonalidade e as condições ambientais são capazes de ocasionar variações significativas em relação aos rendimentos em seus constituintes químicos.

É possível concluir que o estudo sazonal dessas espécies nativas do nordeste brasileiro com amplo conhecimento popular, contribuiu para a comunidade local e científica, a fim de evidenciar o melhor período de coleta dessas espécies, assim como, a descoberta de novas propriedades biológicas, que poderão ser exploradas pela indústria alimentícia, aromatizantes e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Illinois, United States. 2009.
- ADAMS, T. B. et al. The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2471-2494, 2011.
- AESA. Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. 2023. Meteorologia - Chuvas. Disponível em: <http://www.aesa.pb.gov.br> . Acesso em: 05 set. 2023.
- AGRAWAL, C. et al. Methicillin resistant Staphylococcus aureus: inconsistencies in vancomycin susceptibility testing methods, limitations and advantages of each method. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 9, n. 10, p. DC01, 2015.
- ALLENSPACH, Martina; STEUER, Christian. α -Pinene: A never-ending story. **Phytochemistry**, v. 190, p. 112857, 2021.
- 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.
- ALENCAR, F.J. M. T. 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.
- ALMEIDA, C. L. et al. Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 162-172, 2017.
- ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
- 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, B.F.M.T, et al. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 34-40, 2014.

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

ARAÚJO, L. G. et al. Avaliação intraespecífica da composição química dos óleos essenciais das folhas de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae). 2019.

ARAÚJO, L. G. et al. Chemodiversity and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Leaves of *Croton argyrophyllus*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 10, p. e2000575, 2020.

ARAUJO, M. P.; ARAUJO, M. P.; MACCARI, Z. I. A.; O. S. I. M.; VENDRAMINI-COSTA D. B.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO J. E. Chemical composition and antiproliferative activity of *Croton campestris* A.St.-Hil. essential oil. **Natural product research**, p. 1-4, 2017.

ALVES, I. A. B. S.; SANTOS, S. M.; MENDES, R. F. V.; SILVA, J. W.; RODRIGUES, M. F.; RAMOS, B. A.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; TENORIO, F. C. A. M.; JORGE, R. J. B.; Martins, R. D.; Albuquerque, J. F. C.; Randau, K. P.; Ximenes, R. M. Chemical composition, antioxidant and topical antiinflammatory activities of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae). **J. Med. Plants Res.**, v. 11, p. 22-33, 2017.

ALVES, J. A. B.; NUNES, M. S.; FAKHOURI, R.; MARTINS-FILHO, P. R. S.; RIBEIRO, M. C. O.; de VASCONCELLOS, A. C.; SANTOS, P. O.; MARCHIORO, M.; TRINDADE, R. C.; FRAZAO, G. G. SANTOS; et al. Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant mycobacterium tuberculosis strains by essential oil from *Croton argyrophyllodes* Mull. Arg. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-7, 2016.

ANGÉLICO, E.C. Avaliação das atividades antibacterianas e antioxidantes de *Croton heliotropiifolius* Kuntze e *Croton blanchetianus* Baill. 86 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba.2011.

AQUINO, L.M. Xantofilas Marinhas Bioativas: fucoxantina e astaxantina, uma revisão das suas atividades biológicas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.2021.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BAHI, A. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & behavior**, v. 135, p. 119-124, 2014.

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

BARBOSA, A. J. C. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Croton urticifolius* LAM. e *Croton adamantinus* MÜLL. ARG.(EUPHORBIACEAE). 2021.

BARROS, S. C. L. Avaliação da atividade antibacteriana em espécies do gênero *Croton*: uma revisão integrativa. 2022.

BAUDOUX, D. **O Grande Manual de Aromaterapia de Dominique Baudoux**. 1. ed. Belo Horizonte: Editora Lazslo, 2018.

BEGIER, E. et al. Epidemiology of invasive *Escherichia coli* infection and antibiotic resistance status among patients treated in US hospitals: 2009–2016. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 4, p. 565-574, 2021.

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.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAO, Y. et al. The jasmonate-induced bHLH gene SIJIG functions in terpene biosynthesis and resistance to insects and fungus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, n. 5, p. 1102-1115, 2022.

CAMARA, C. A. G.; MORAES, M. M.; MELO, J. P. R.; SILVA, M. 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. **J. Essent. Oil-Bear. Plants**, v. 20, p. 1434-144, 2017.

CARMEN, R.O.J. et al. Antinociceptive effect of aqueous extracts from the bark of *Croton guatemalensis* Lott in mice. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 15, 2016.

CASTRO, J.A.M.; MONTEIRO, O.; COUTINHO, D.; RODRIGUES, A.; DA SILVA, J.; MAIA, J.G.S. Seasonal and Circadian Study of a Thymol/ γ -Terpinene/p-Cymene Type Oil of *Ocimum gratissimum* L. and its Antioxidant and Antifungal Effects. **J. Braz. Chem. Soc.** 30, 930–938, 2019.

CAVALCANTI, D. F. G.; SILVEIRA, D. M.; SILVA, G. C.; Biological aspects and potentialities of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 45931-45946 jul. 2020.

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.

CHEUNG, G. Y .C; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

CHRISTIANSON, D. W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. **Chemical reviews**, v. 117, n. 17, p. 11570-11648, 2017.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute, Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline, 5th ed. CLSI publication M23-A5., in .2018.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012a.

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.

ESTELL, R. E.; FREDRICKSON, E. L.; JAMES, D. K. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 65, p. 108-114, 2016.

FARIA, R. et al. Perfil de resistência à antimicrobianos da classe dos Beta-lactâmicos e Aminoglicosídeos em cepas de *Escherichia coli* isoladas entre janeiro de 2015 e dezembro de 2018/Antimicrobial resistance profile of the Beta-lactams and Aminoglycosides class in *Escherichia coli* strains isolated between january 2015 and december 2018. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 7, p. 51673-51691, 2022.

FERNANDES, D. N. M. Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Croton tetradenius* baill (euphorbiaceae). Dissertação (mestrado em ciências ambientais) – Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Ambientais – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

FERREIRA, G. K. D. S. et al. Avaliação sazonal e circadiana do óleo essencial das folhas de *Piper divaricatum* G. Mey.(Piperaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 41356-41369, 2020.

FERRENTINO, G. et al. Extração de óleos essenciais de plantas medicinais e sua utilização como antioxidantes alimentares. **Concepção farmacêutica atual**, v. 26, n. 5, pág. 519-541, 2020.

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

FIRMINO, N. C. S.; ALEXANDRE, F. O.; VASCONCELOS, M. A.; CONRADO, A. J. S.; ARRUDA, F. V. S.; SILVEIRA, E. R.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial activity of 3,4-seco-diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus parasanguinis*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 29, p. 814-822, 2018.

GENG, X. et al. Mining, expression, and phylogenetic analysis of volatile terpenoid biosynthesis-related genes in different tissues of ten *Elsholtzia* species based on transcriptomic analysis. **Phytochemistry**, v. 203, p. 113419, 2022.

GOLD, V. Terpenes. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triagle Park, NC: IUPAC. v. 1307. p. 6278. 2008.

GOMES, T. A.T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

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**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

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.

KRISHNASAMY, G. et al. Activity of aurisin A isolated from *Neonothopanus nambi* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 31, n. 5, p. 617-625, 2023.

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

KUMAR, K.; CHOPRA, S. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 7, p. 1465-1470, 2013.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LIU, J. et al. Identification of the sesquiterpene synthase AcTPS1 and high production of (-)-germacrene D in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2022.

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

LIMA, Z. N. et al. Determinação de concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição. 2018. Procedimento operacional padrão (POP PIBIC 2016-2019) – Laboratório de resistência microbiana clínica e contemporânea, universidade estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.

LUJÁN, D. A; LUJÁN, L. M; MAMANI, E. Resistência a antibióticos de cepas *Escherichia coli* isoladas de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade-cidade de Lima, Peru. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 1, 2012.

MACÊDO, D. G. Estudo químico e atividade antifúngica dos óleos essenciais de duas espécies de *Psidium L.*, em função da sazonalidade e em diferentes fases fenológicas. 2018.

- 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.
- MATHE, Á.; SILVA, J. C. S. Introduction to medicinal and aromatic plants in Brazil. In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer, Dordrecht, p: 47-69, 2018.
- MALVEIRA, E. A. et al. Essential oil from *Croton blanchetianus* leaves: Anticandidal potential and mechanisms of action. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1147, 2022.
- MANGES, A. R. et al. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. 10.1128/cmr.00135-18, 2019.
- MACIEL, A. J. et al. Antichemotactic and antifungal action of the essential oils from *Cryptocarya aschersoniana*, *Schinus terebinthifolia*, and *Cinnamomum amoenum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 8, p. e1900204, 2019.
- MCMURRY, J. 7^o Ed. Química Orgânica - Combo. São Paulo: Cengage Learning. p.1344. 2011.
- MERGHNI, A. et al. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1, 8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 74-80, 2018.
- MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022.
- NASCIMENTO, A.; PRADE, A. C. K. Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais. Recife: Fiocruz-PE; ObservaPICS, 2020.
- NASCIMENTO, I. S. et al. Variação sazonal e interanual na dinâmica populacional de *Croton blanchetianus* em uma floresta tropical seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 437-446, 2017.
- NASCIMENTO, R. F. et al. Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018.
- NOGUEIRA, L. M. et al. Antinociceptive effect of the essential oil obtained from the leaves of *Croton cordiifolius* Baill.(Euphorbiaceae) in mice. Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- OLIVEIRA, G.D. et al. Synergistic and antibiofilm effects of the essential oil from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 1, p. 55, 2022.
- OLIVEIRA, L. F.; et al. Chemical composition of the volatile oil of *Croton glandulosus* Linnaeus and its allelopathic activity. **Natural Product Research**, p:1-4, 2020.

PALMEIRA, J.S. F. et al. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 397-401, 2006.

PEREIRA, R. S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 326-328, 2004.

POIREL, L. et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6.4. 14, 2018.

PORTO, J. C. S. et al. Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. **Revista Interdisciplinar**, v. 14, n. 1, p. 3, 2021.

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.

RESTREPO, E. D. et al. Insect antifeedant properties of the essential oil from Colombian *Croton trinitatis* Millsp against *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, and *Rhopalosiphum padi*. In: ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC, 2014.

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*, Porto Alegre, 73(1):31-38, 2018.

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

ROSA, E. V. F. et al. beta-caryophyllene mitigates the cognitive impairment caused by repeated exposure to aspartame in rats: putative role of bdnf-trkb signaling pathway and acetylcholinesterase activity. *Behavioural Brain Research*, p. 114615, 2023.

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.

SANTOS, S. M. et al. Seasonal and geographical variation in the chemical composition of essential oil from *Allophylus edulis* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 154, p. 41-45, 2023.

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

SATYAL, P. et al. Chemical composition, *Aedes* mosquito larvicidal activity, and repellent activity against *Triatoma rubrofasciata* of *Severinia monophylla* leaf essential oil. **Parasitology research**, v. 118, p. 733-742, 2019.

- SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 263-273, 2018.
- SHIN, J. et al. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. *Microbial pathogenesis*, n.116, p. 209-214. 2018.
- SILVA, E. A. S. Estudos dos óleos essenciais de resinas de espécies *Protium ssp.* 2006. 159 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- SILVA, I. F. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novos compostos triazólicos. 2012.
- SILVA, M. H. D. M. Influência da sazonalidade sobre a composição química e bioatividade de óleos essenciais em cinco espécies de *Croton L.* (Euphorbiaceae), 2020.
- SILVA, J. S. et al. Sinopse das espécies de *Croton L.* (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.
- SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 22, p. 193-207, 2012.
- SILVA, M. H. M. Óleos essenciais de *Croton adamantinus* Müll. Arg. e *Croton. grewioides* Baill.(Euphorbiaceae): composição química e atividades antibacteriana e antioxidante. Dissertações (Mestrado em Ciências Biológicas). UFPE - Pernambuco, 2016.
- SILVA, M. M., VIEIRA, C. G., & SILVA, K. A. R. Heteropoly acid-catalyzed β -caryophyllene chemical transformations: Synthesis route of value-added commercial products from components found in biorenewable resources. **Molecular Catalysis**, 547, 113302. 2023.
- SILVA, P. T. et al. Seasonal variation in the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 329-332, 2019.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: UFSC, 2010.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: Ed.09. UFSC, 2017.
- 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.

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.

TRAN, D. N.; CRAMER, N. Biomimetic Synthesis of (+)-Ledene, (+)-Viridiflorol, (-)-Palustrol, (+)-Spathulenol, and Psiguadial A, C, and D via the Platform Terpene (+)-Bicyclogermacrene. *Chemistry—A European Journal*, v. 20, n. 34, p. 10654-10660, 2014.

TREVIZAN, L.N. F. et al. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 510-515, 2016.

VASCONCELOS, E. C., et al. Ação antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 1. 2022.

VESPERMANN, K. AC. et al. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 1805-1817, 2017.

VIANA, T. J. M. S. et al. Métodos de Extração do Óleo Essencial de *Lippia Origanoides* Kunth. In: **Congresso Internacional de Enfermagem**. 2017.

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

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. Essential oil. **Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p: 758-764, 2013.

XU, J. et al. Probing of the plasticity of the active site in pinene synthase elucidates its potential evolutionary mechanism. **Phytochemistry**, v. 181, p. 112573, 2021.

YAMAMOTO, S. et al. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. **The Journal of urology**, v. 157, n. 3, p. 1127-1129, 1997.

YAN, X. et al. Computer-Informed Engineering: A New Class I Sesquiterpene Synthase JeSTS4 for the Synthesis of an Unusual C10-(S)-Bicyclogermacrene. **ACS Catalysis**, v. 12, n. 7, p. 4037-4045, 2022.

YANG, C., MARILLONNET, S., & TISSIER, A. The scarecrow-like transcription factor SISCL3 regulates volatile terpene biosynthesis and glandular trichome size in tomato (*Solanum lycopersicum*). **The Plant Journal**, 107(4), 1102-1118, 2021.

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.

YOO, H. J; JWA, S. K. Efficacy of β -caryophyllene for periodontal disease related factors. **Archives of oral biology**, v. 100, p. 113-118, 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A: CROMATOGRAMAS CG/EM OCA E OCU

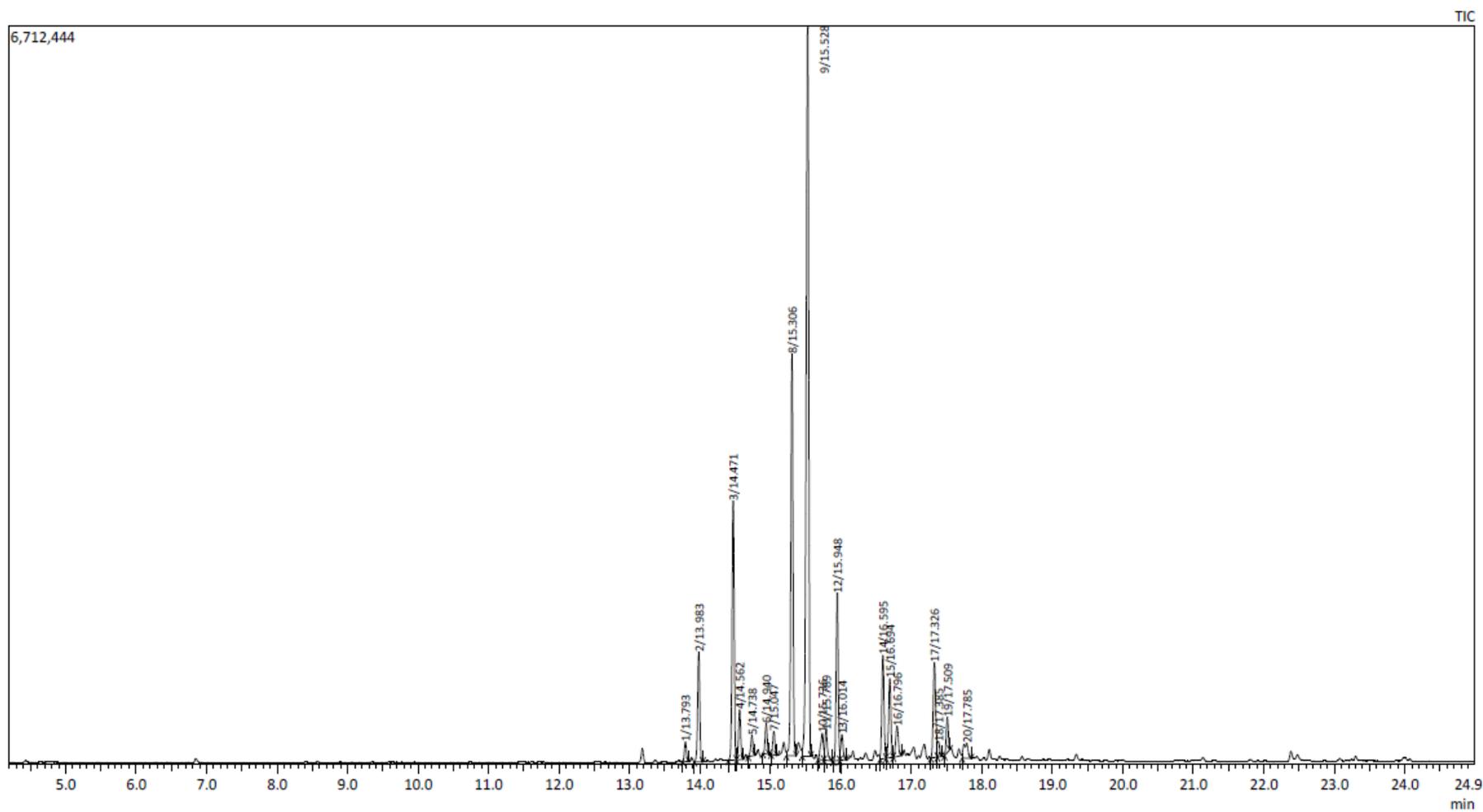
Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (junho de 2022).

Figura 11 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (julho de 2022).

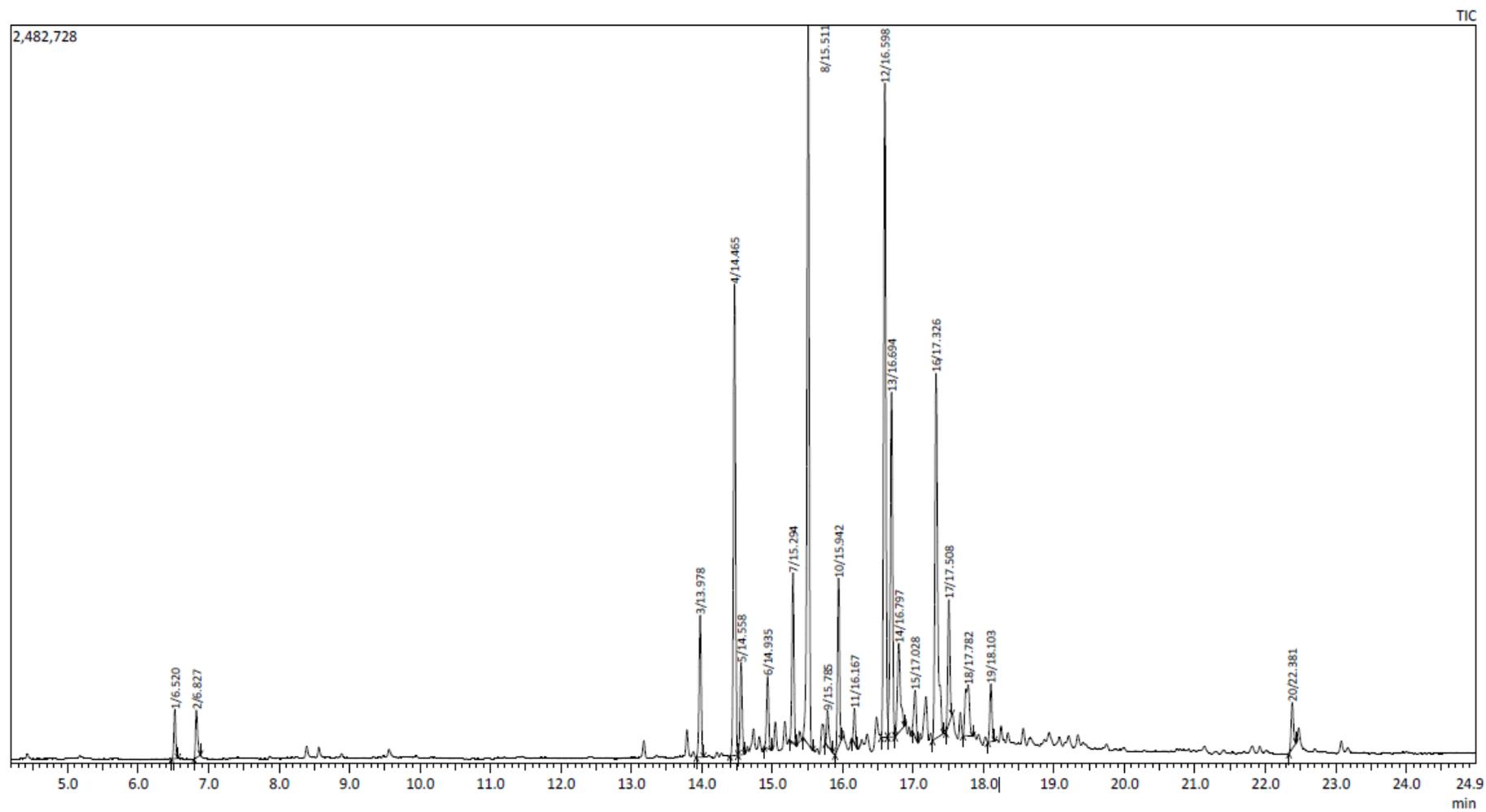


Figura 12 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (agosto de 2022).

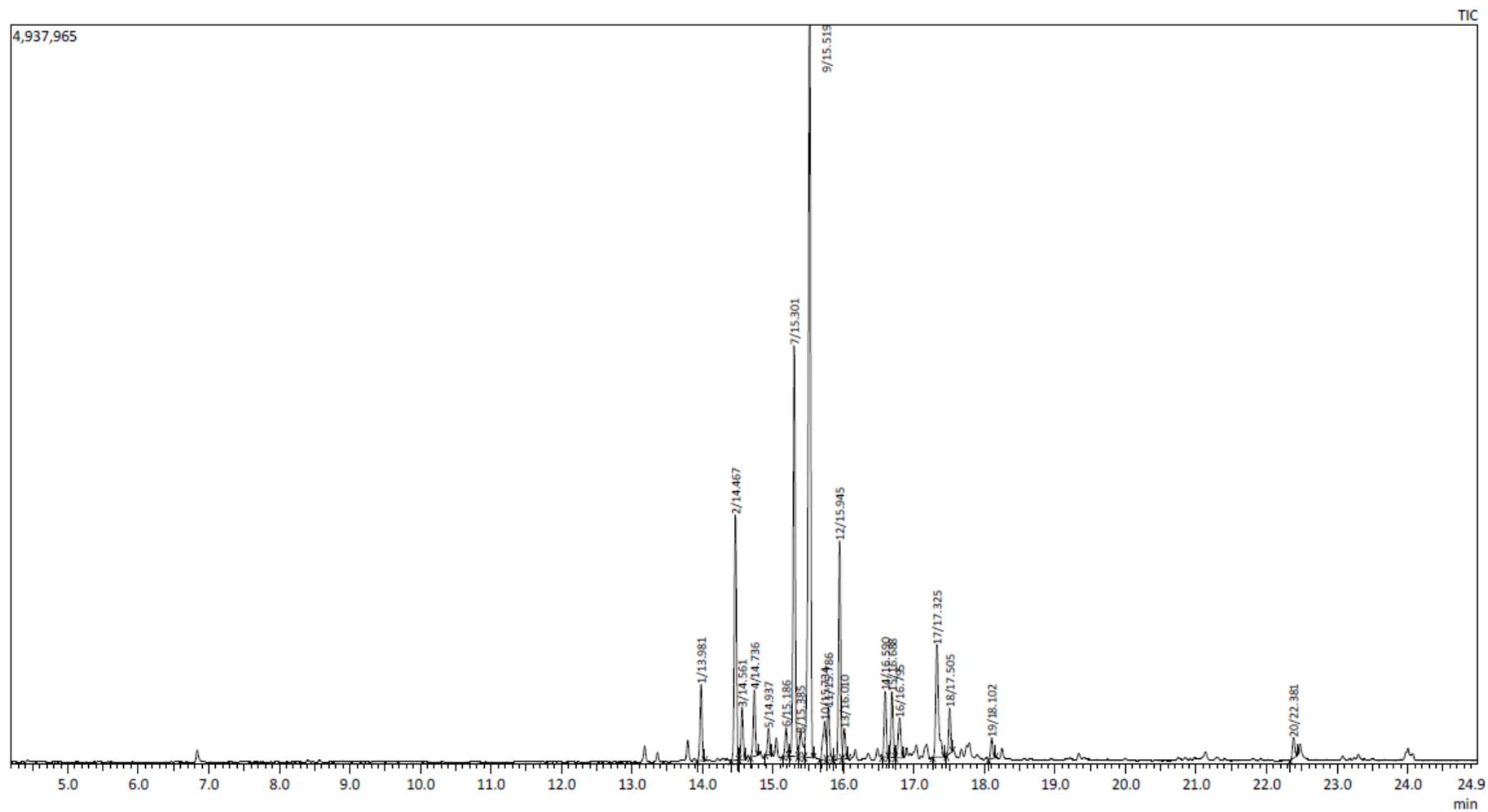


Figura 13 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (setembro de 2022).

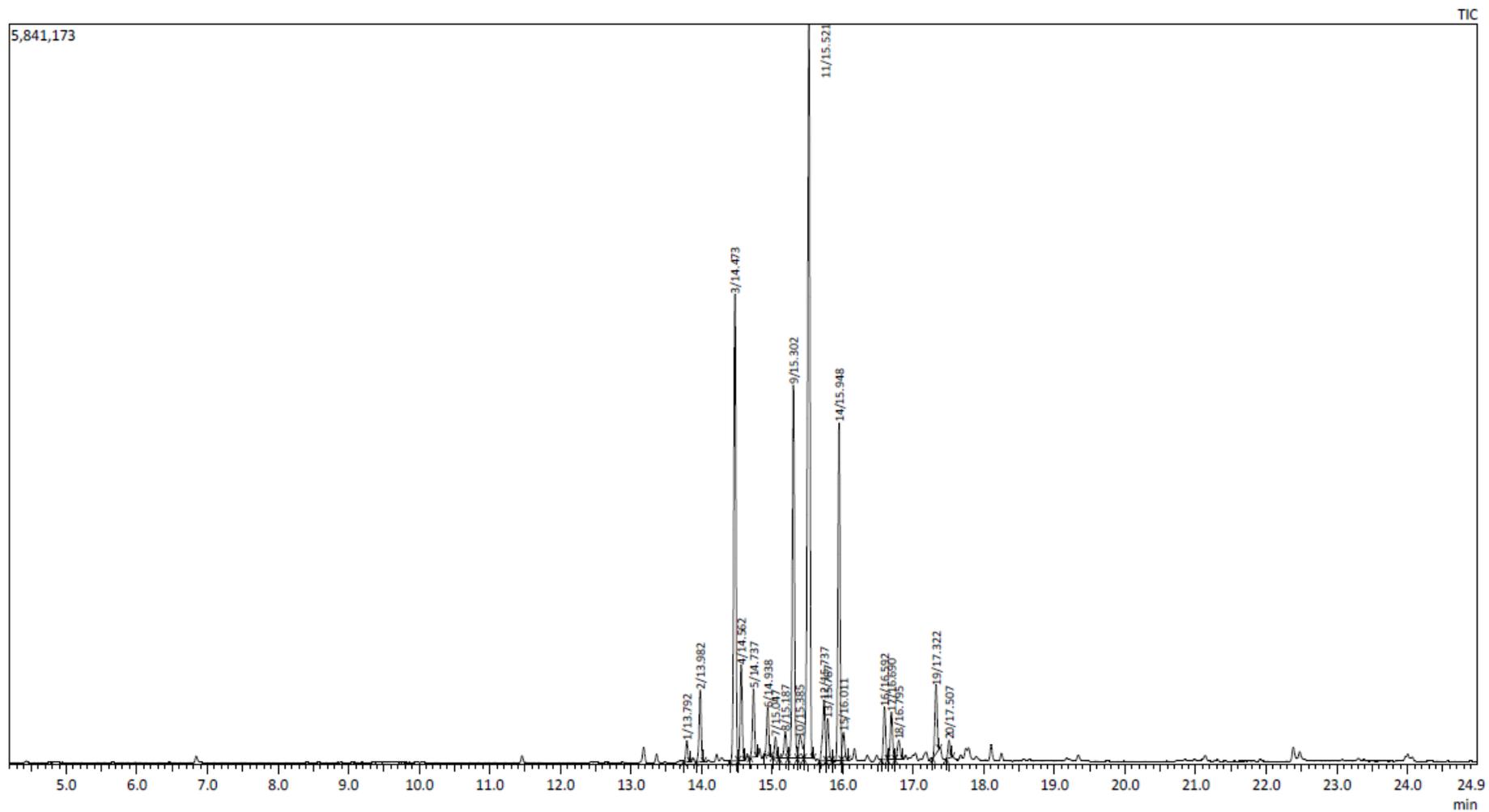


Figura 14 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (outubro de 2022).

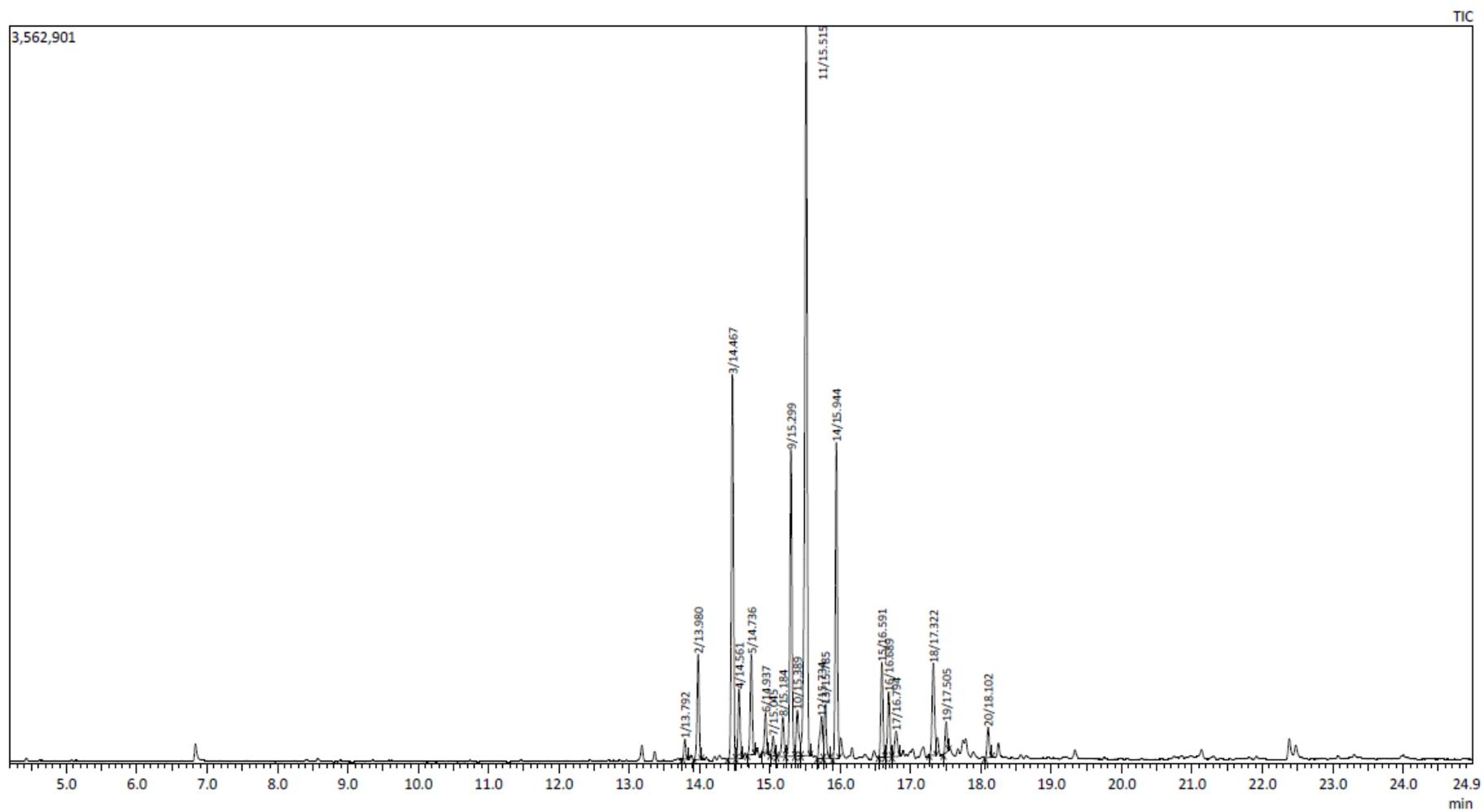


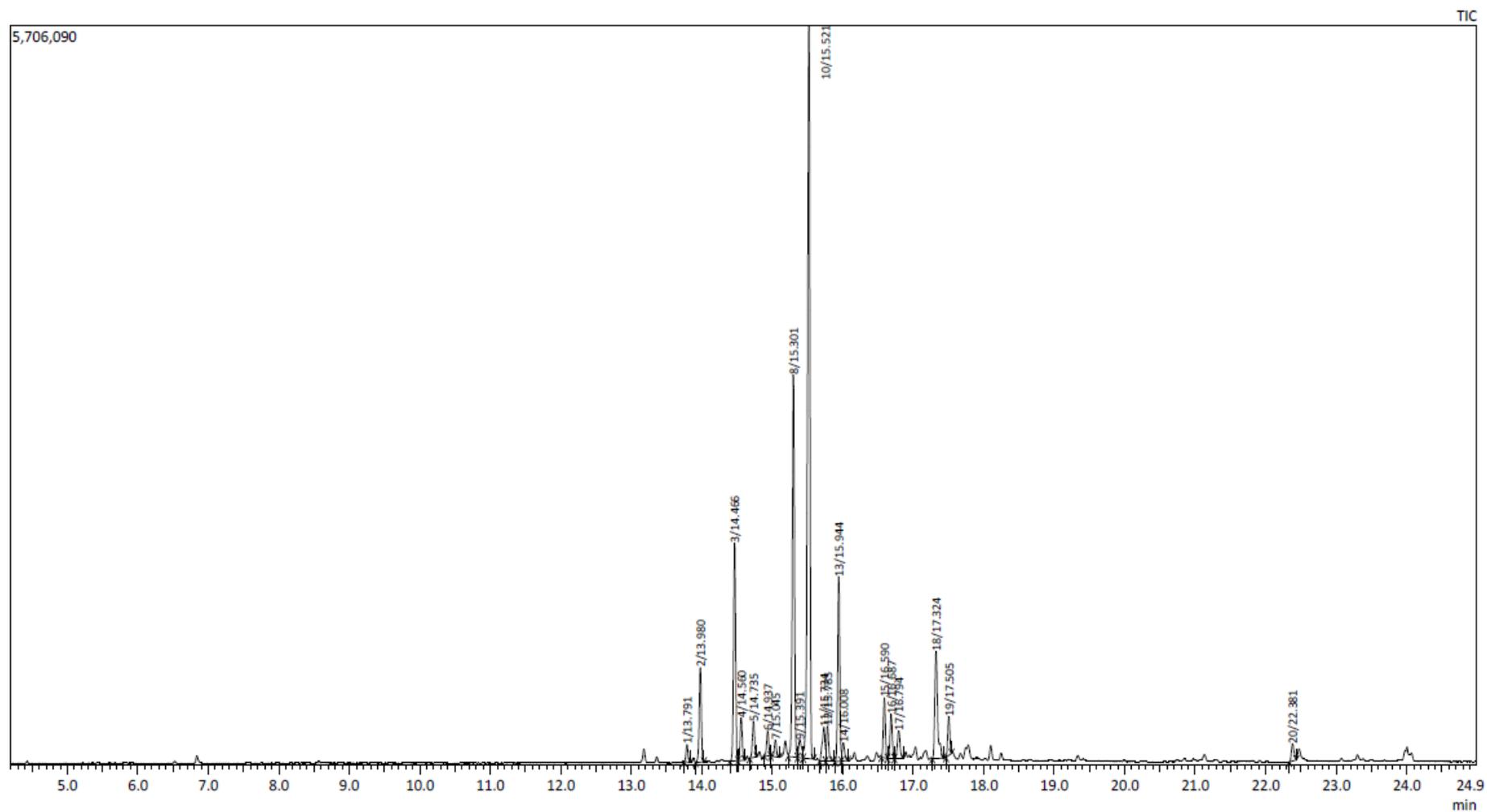
Figura 15 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (novembro de 2022).

Figura 16 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (dezembro de 2022).

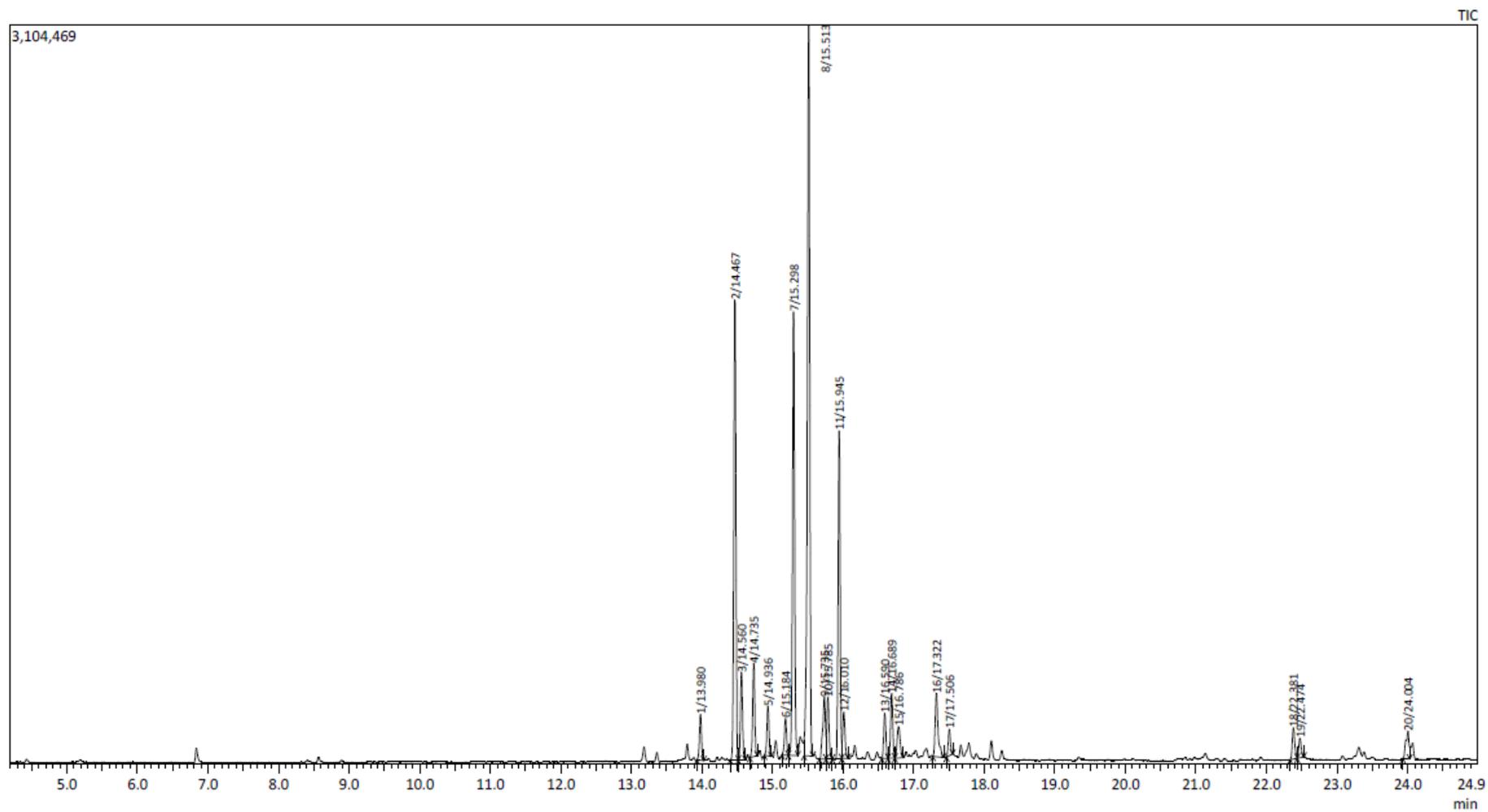


Figura 17 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (janeiro de 2023).

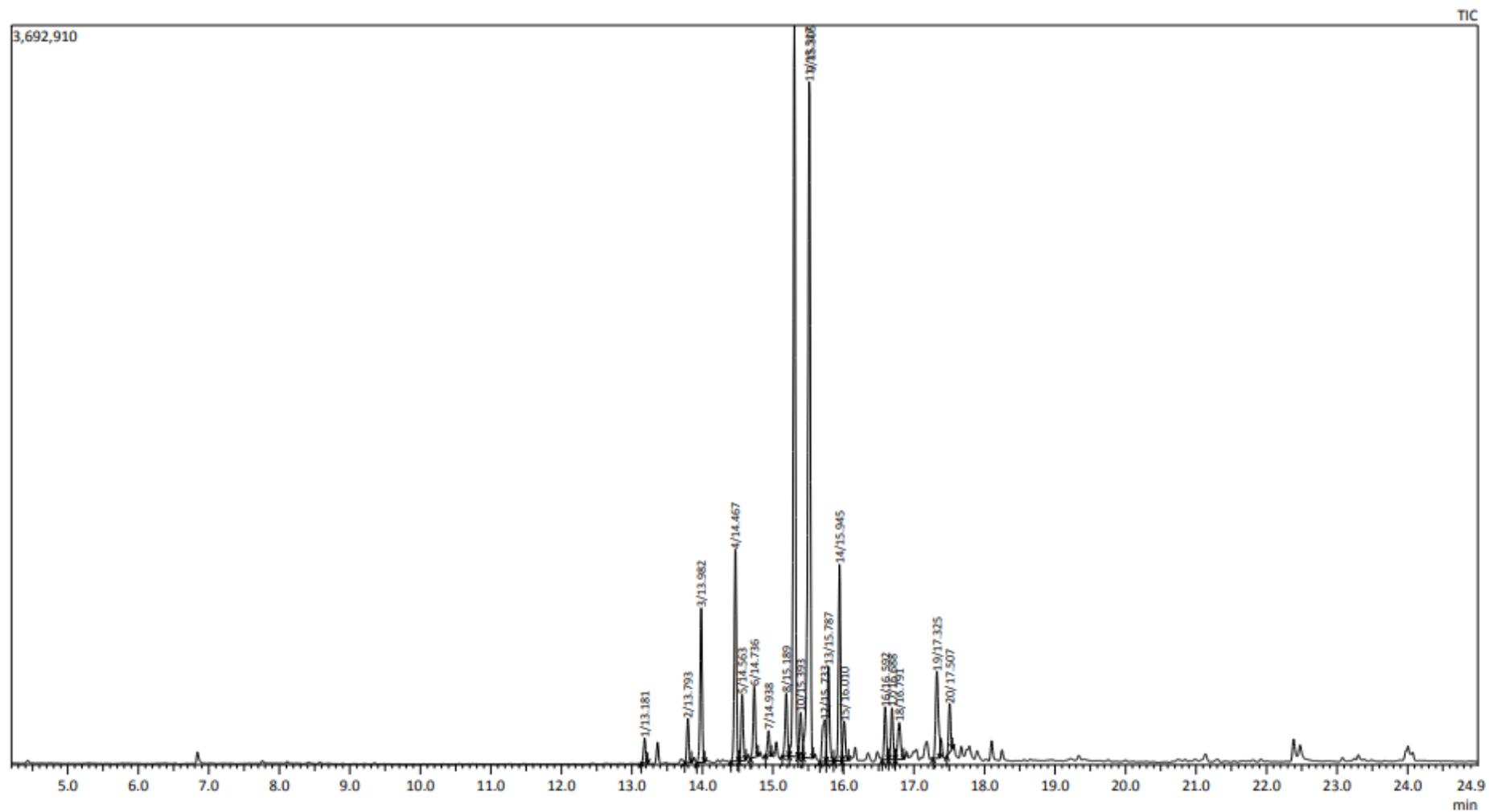


Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (fevereiro de 2023).

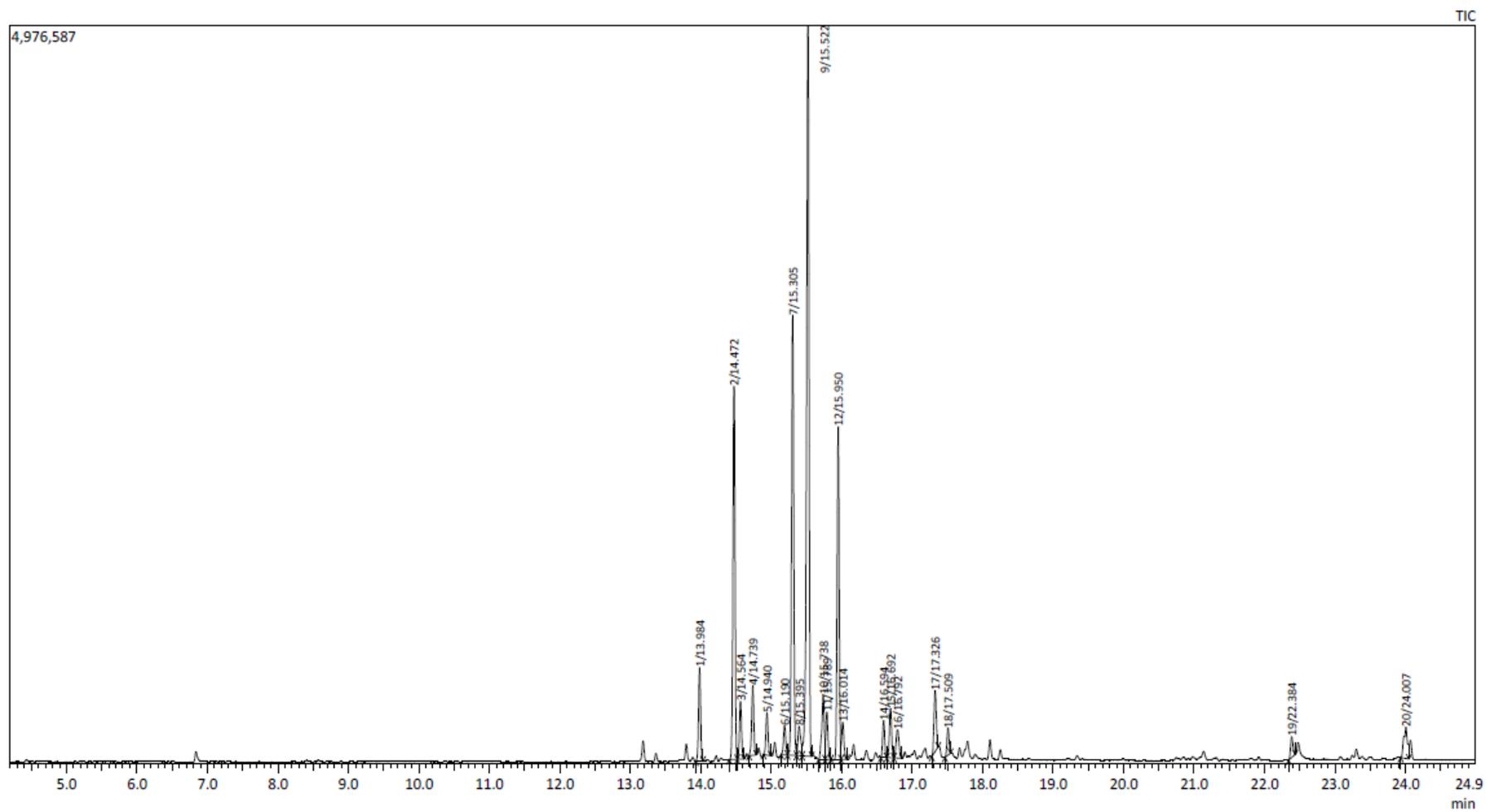


Figura 19 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (março de 2023).

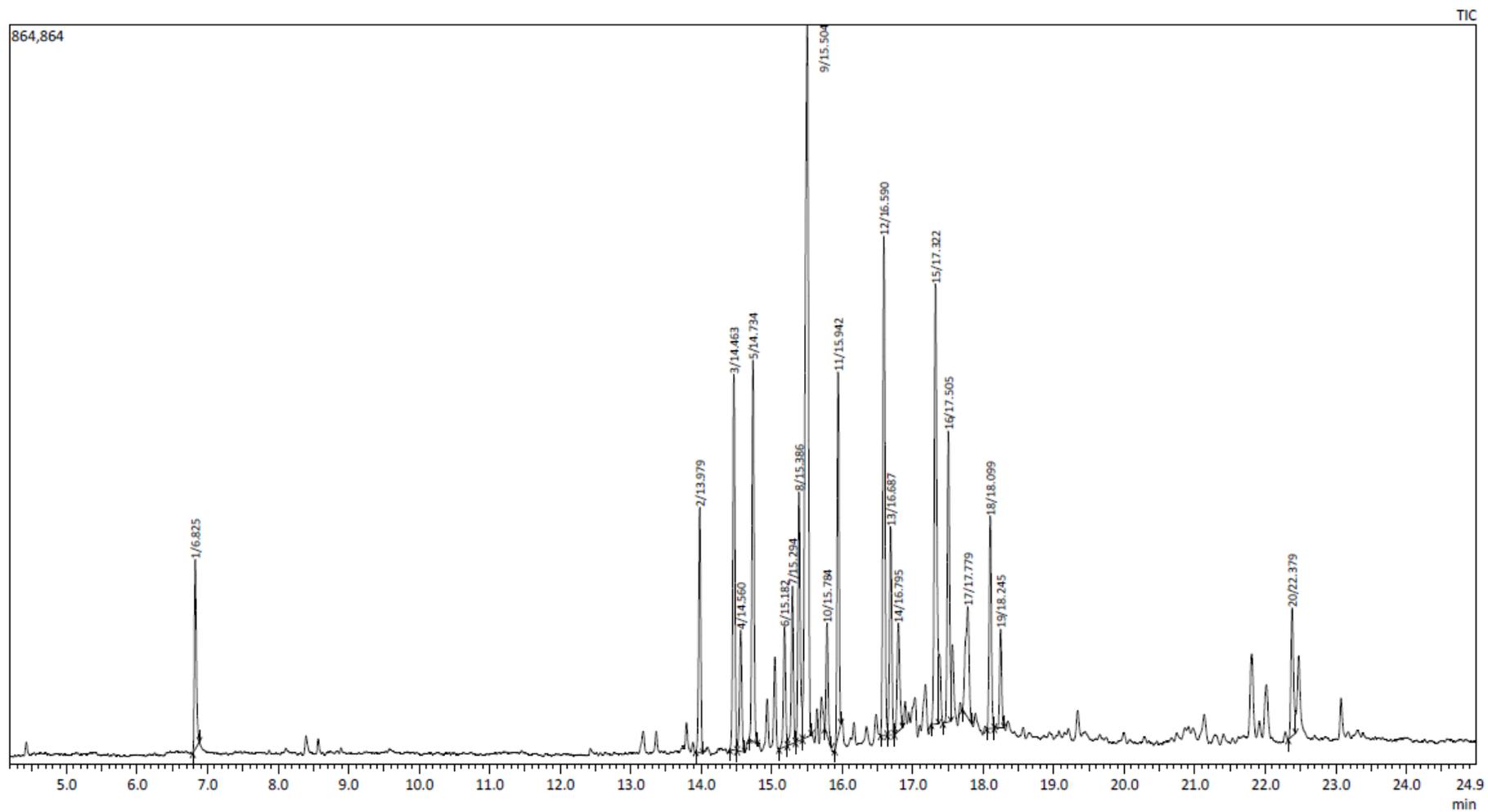


Figura 20 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (abril de 2023).

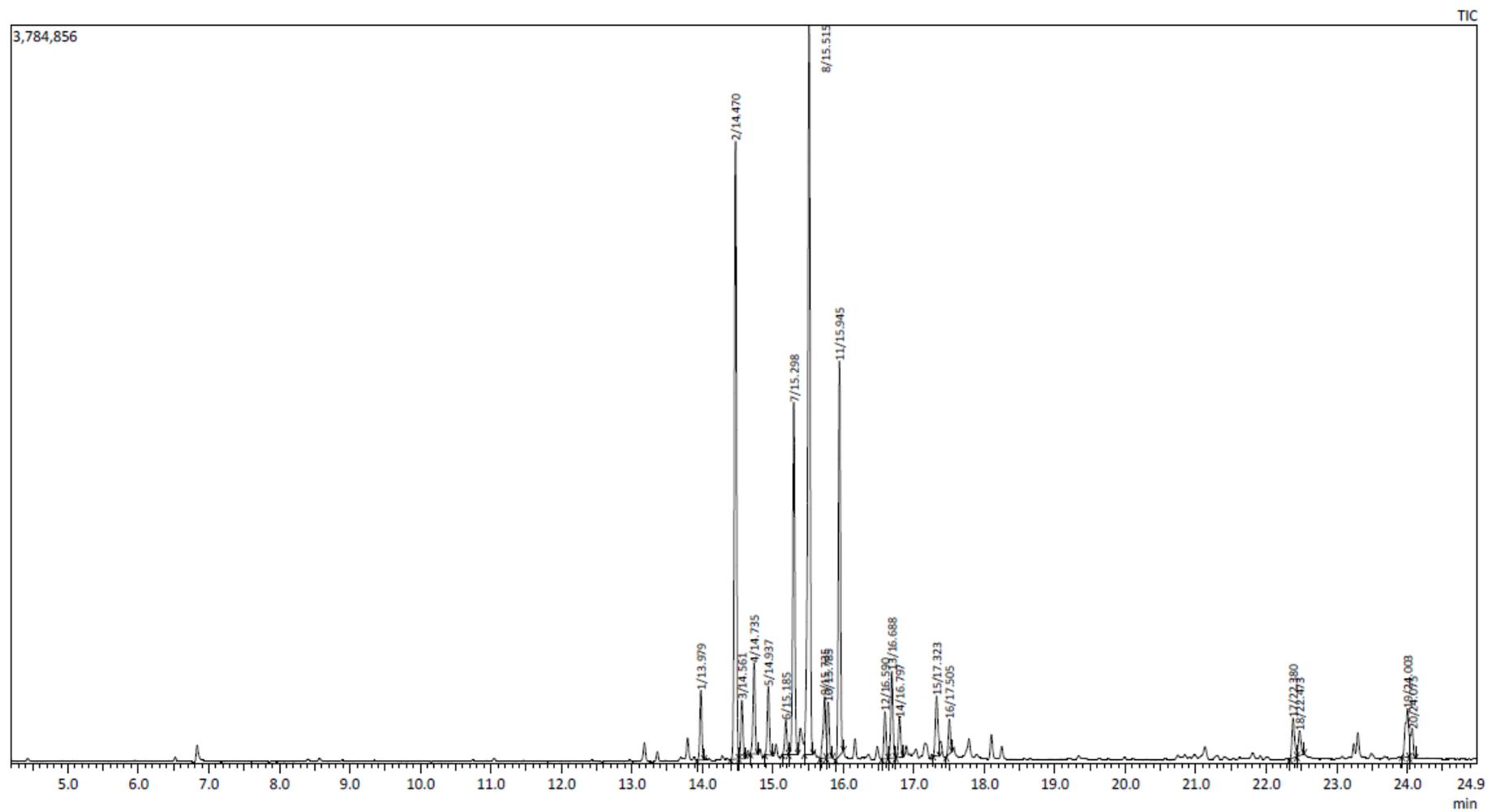


Figura 21 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton adamantinus* (OCA) (maio de 2023).

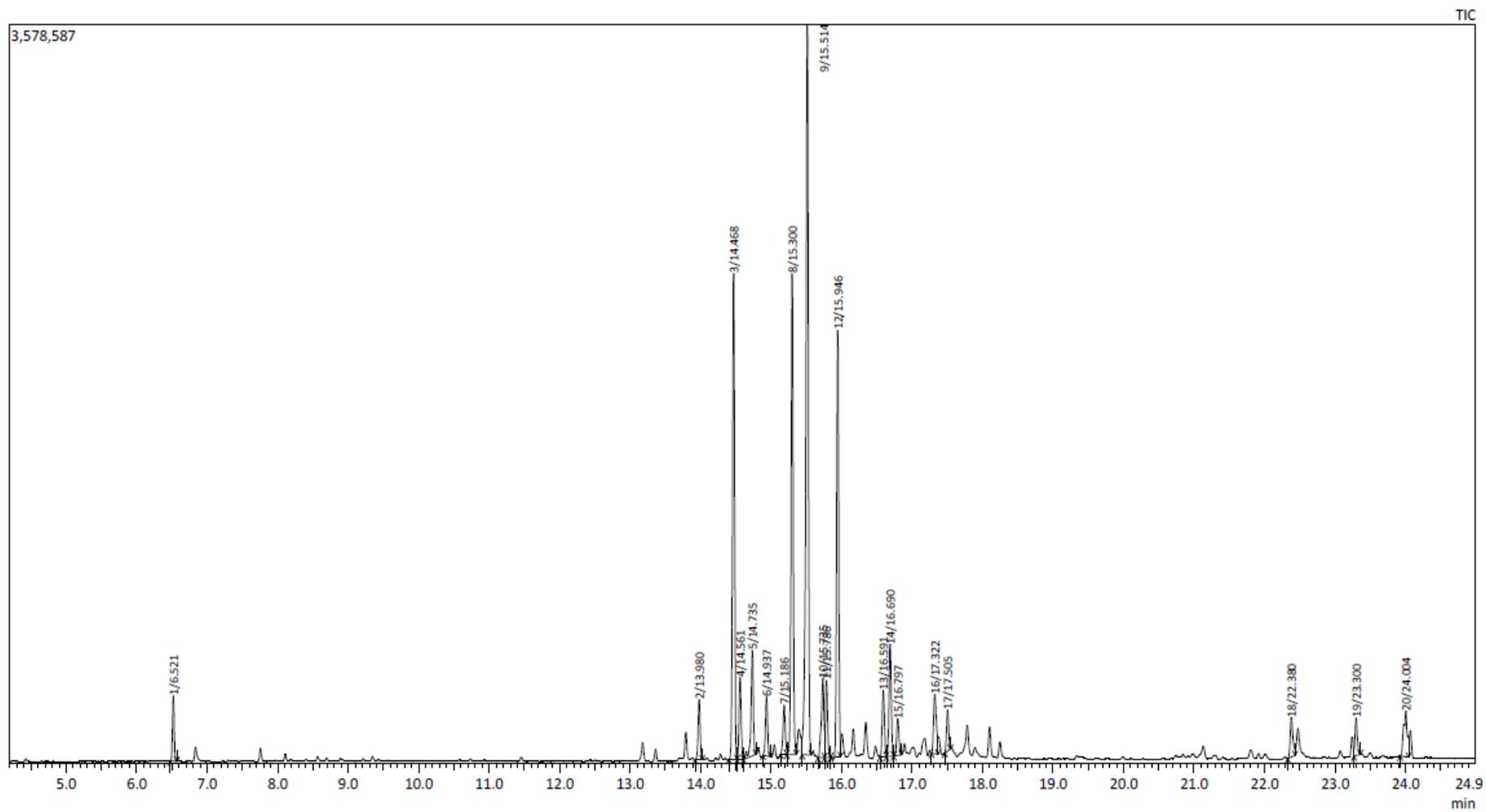


Figura 22 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (junho de 2022).

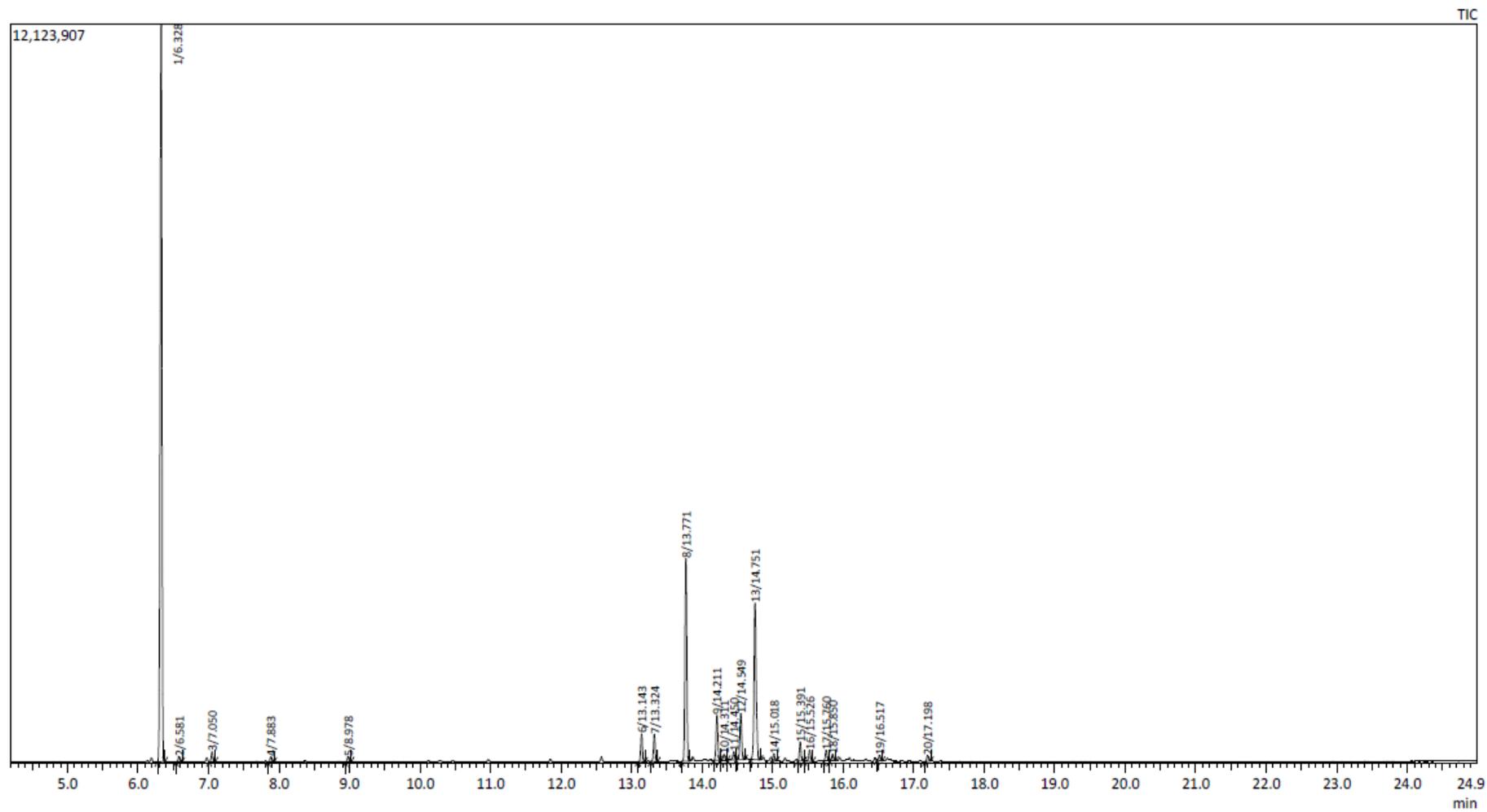


Figura 23 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (julho de 2022).

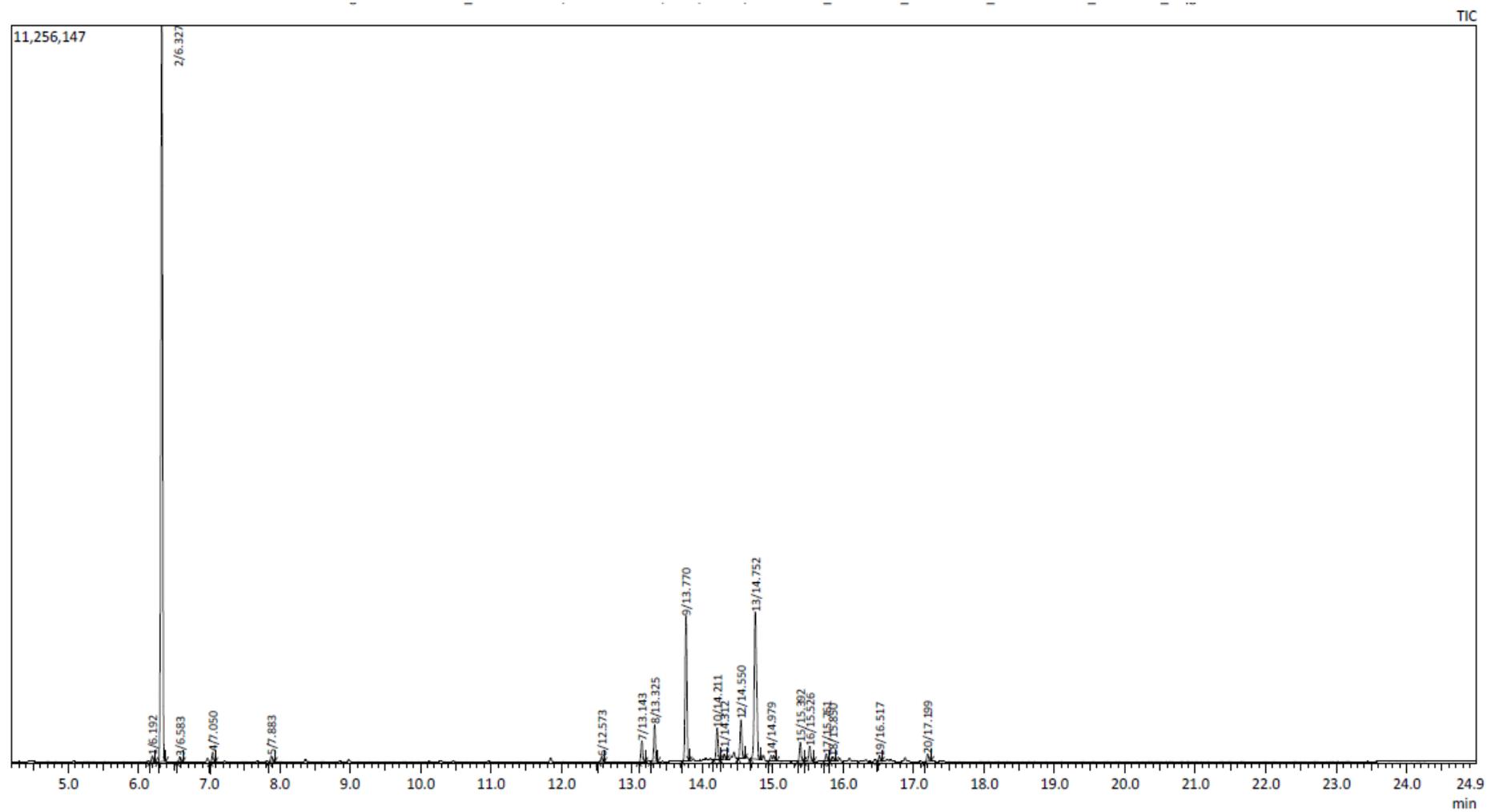


Figura 24 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (agosto de 2022).

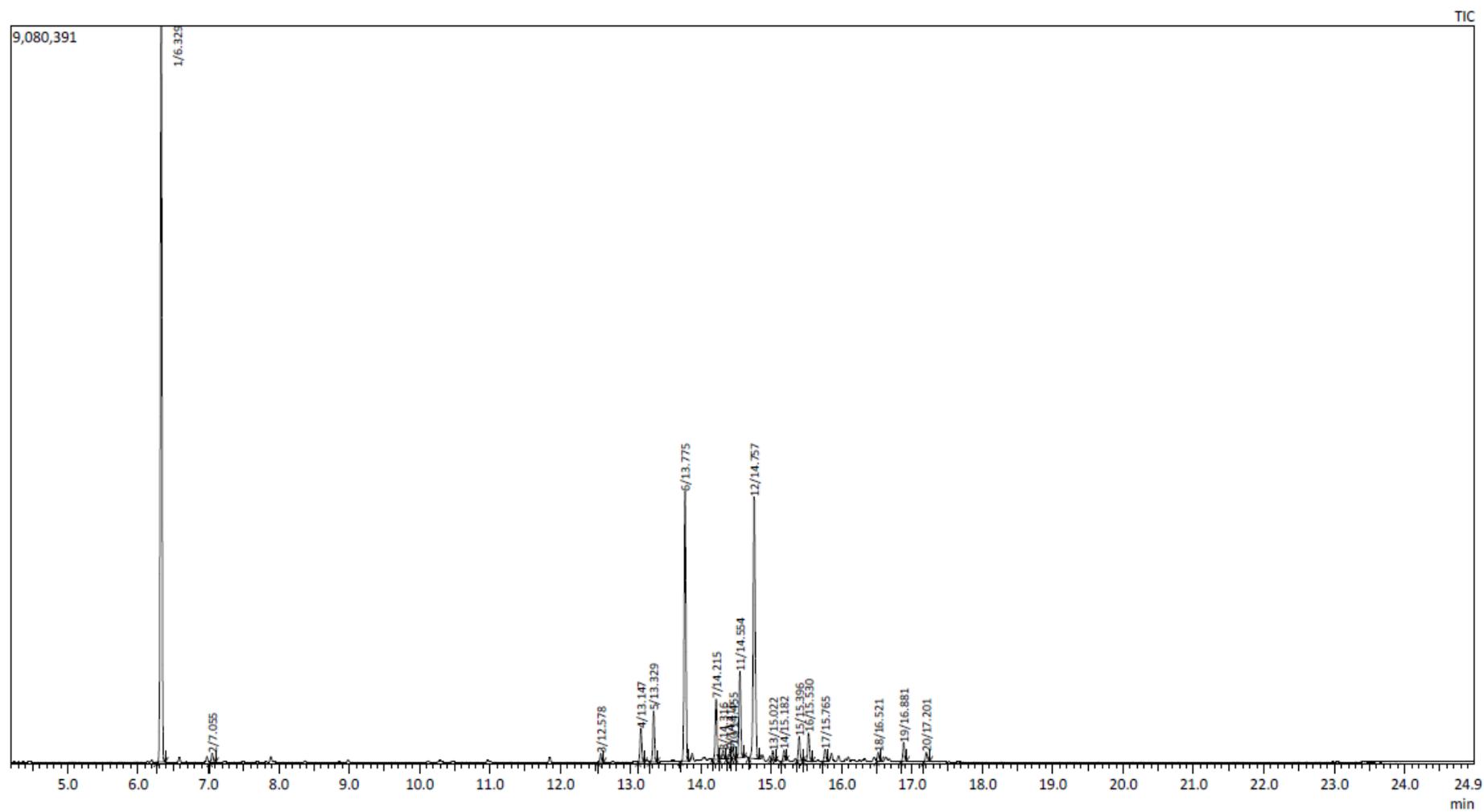


Figura 25 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (setembro de 2022).

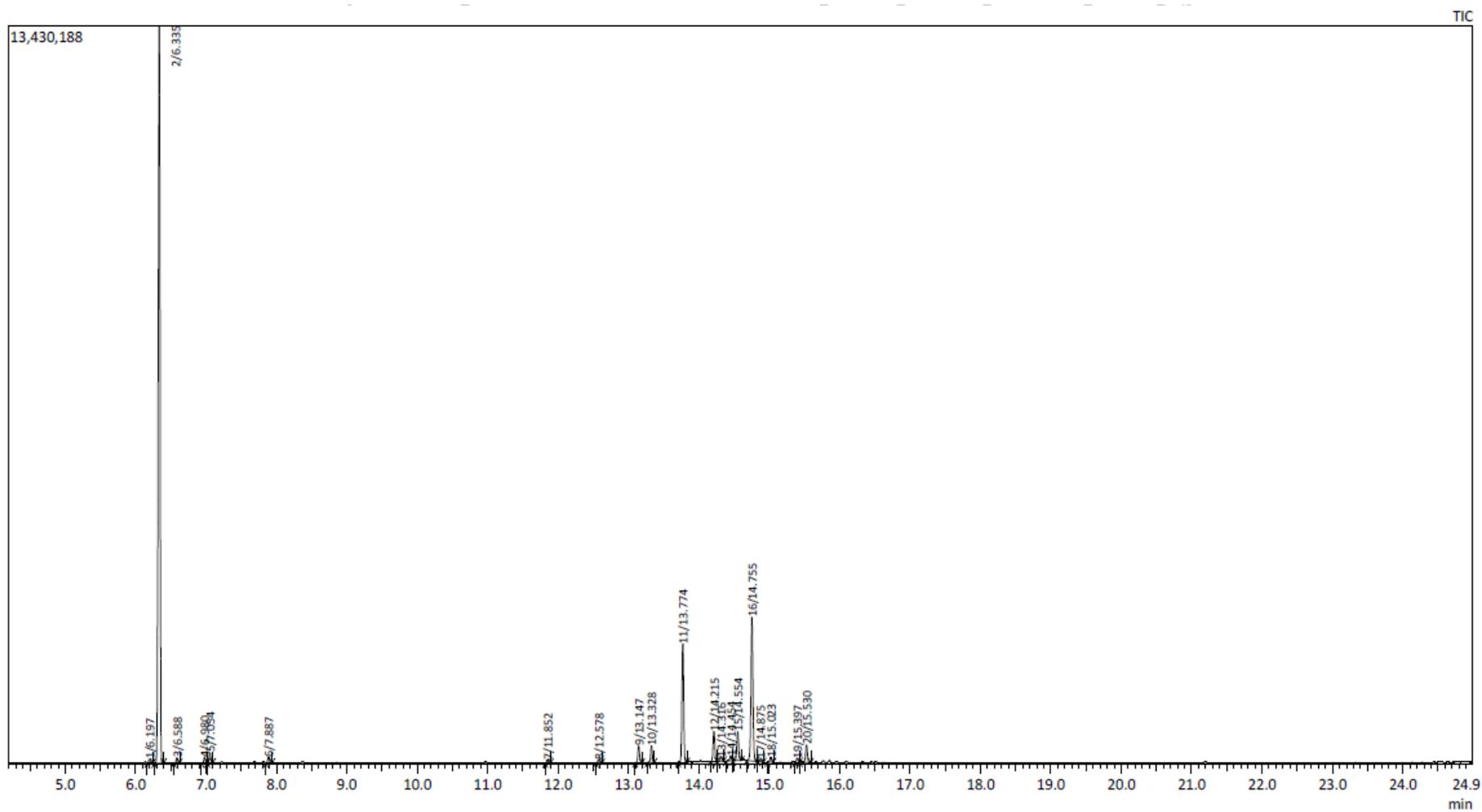


Figura 26 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (outubro de 2022).

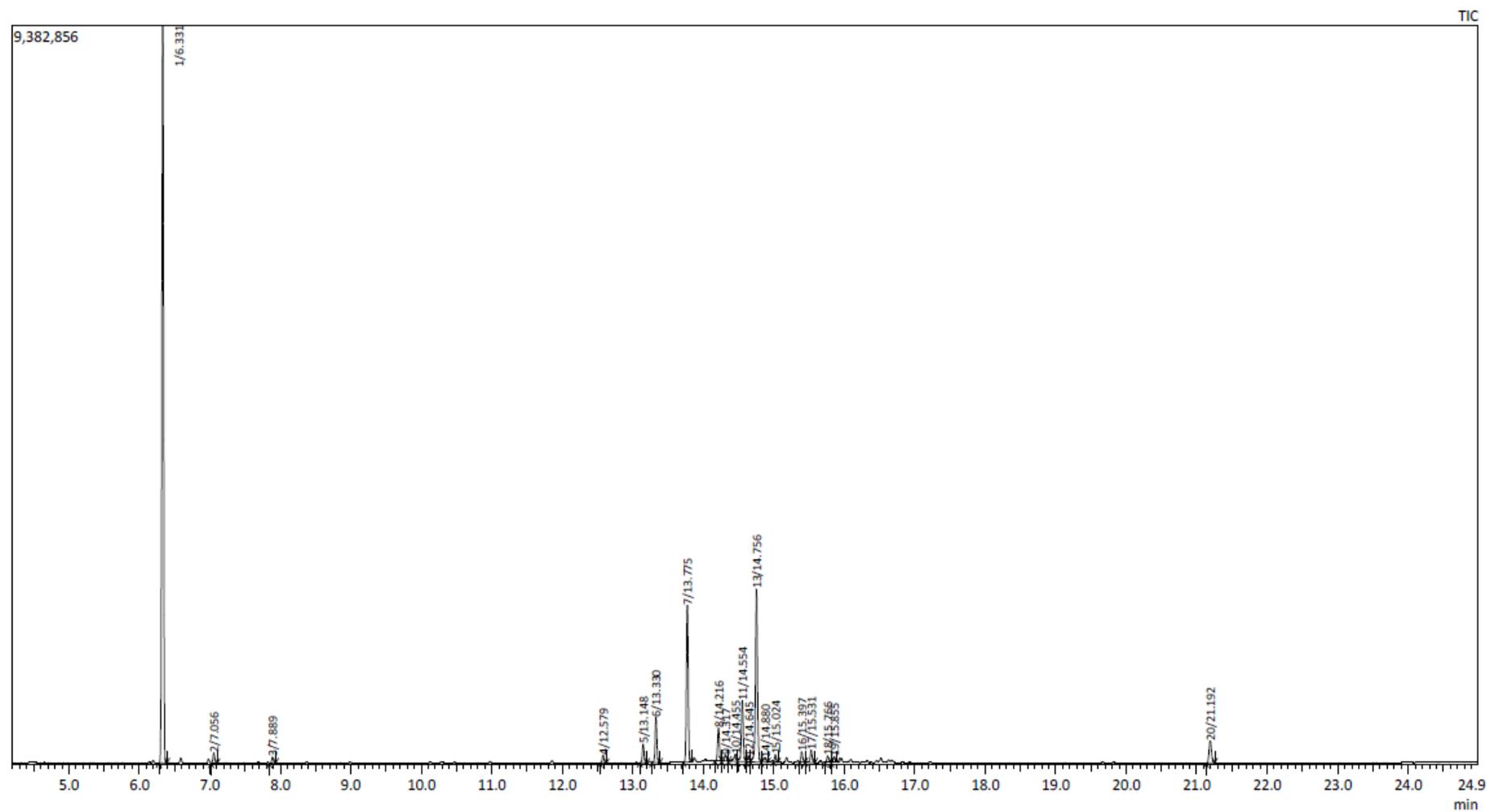


Figura 27 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (novembro de 2022).

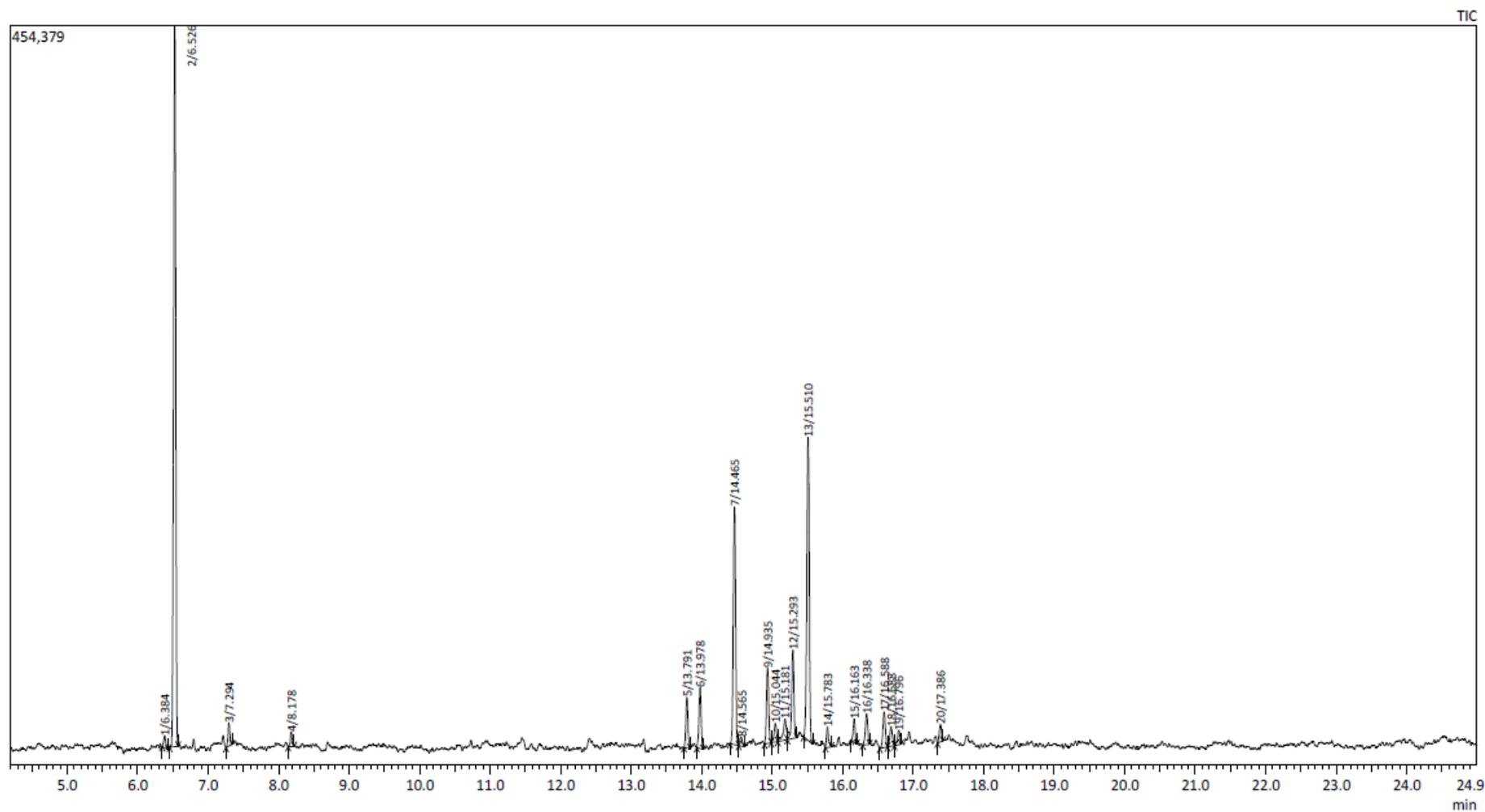


Figura 28 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (dezembro de 2022).

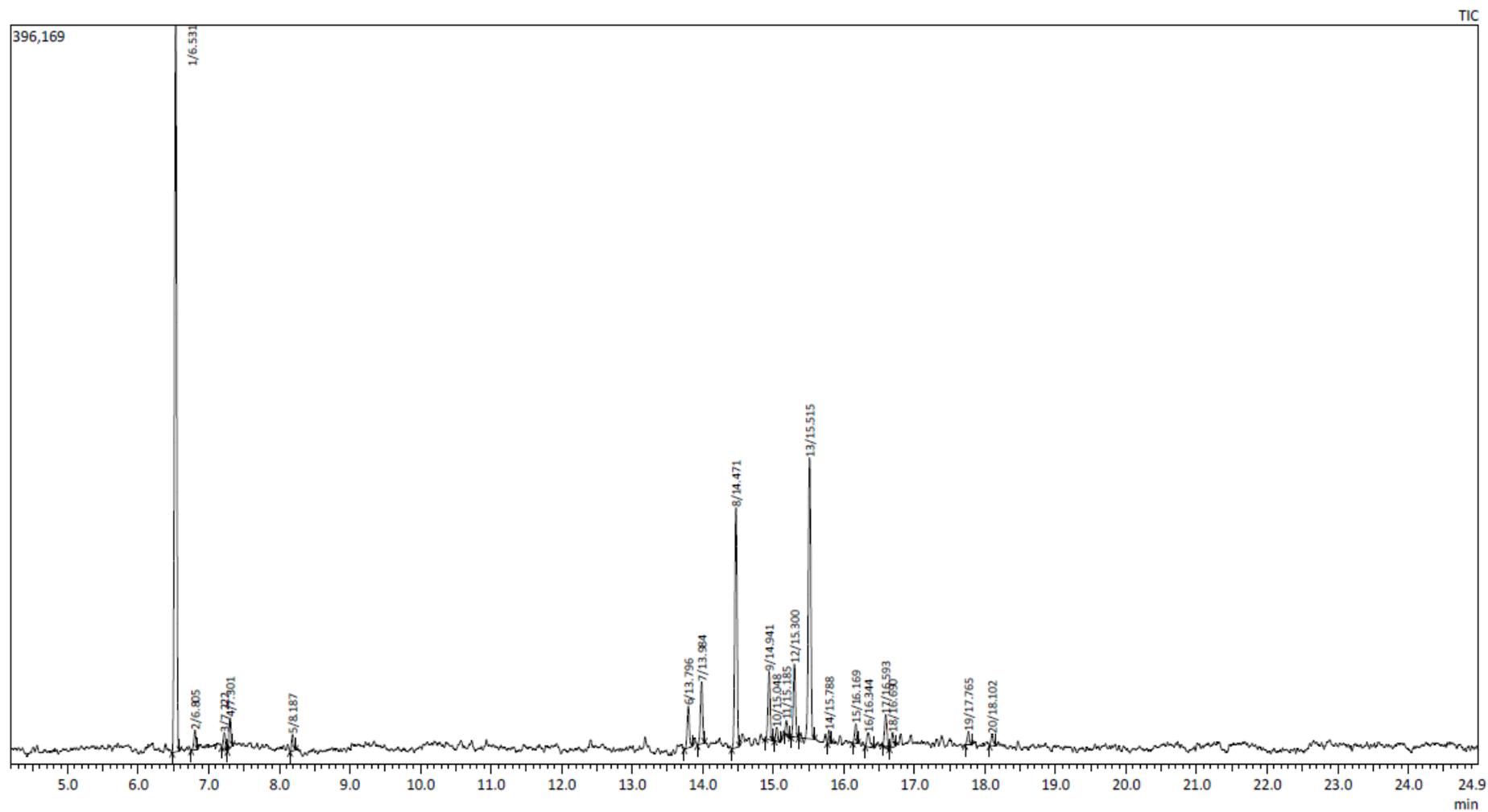


Figura 29 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (janeiro de 2023).

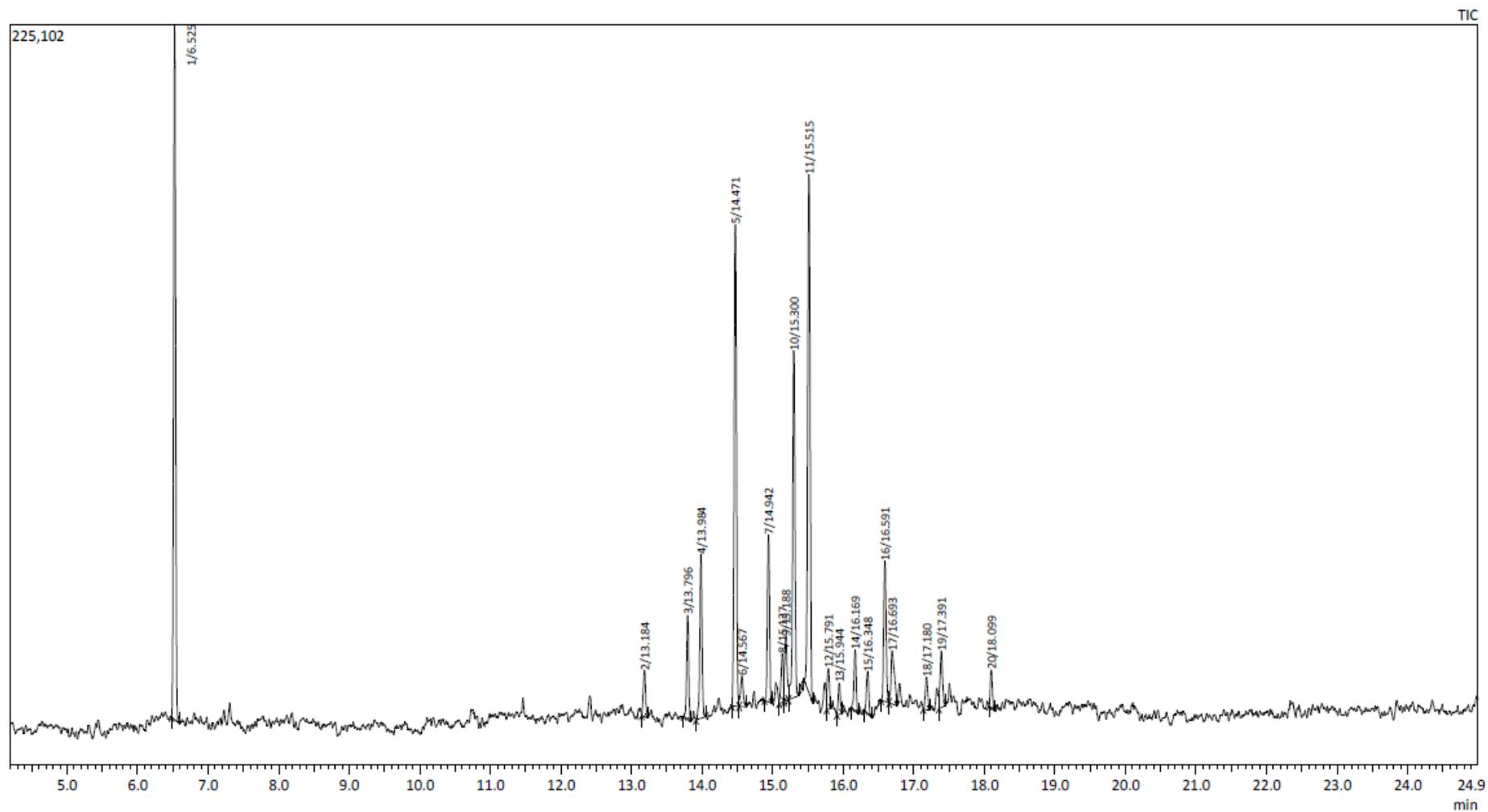


Figura 30 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (fevereiro de 2023).

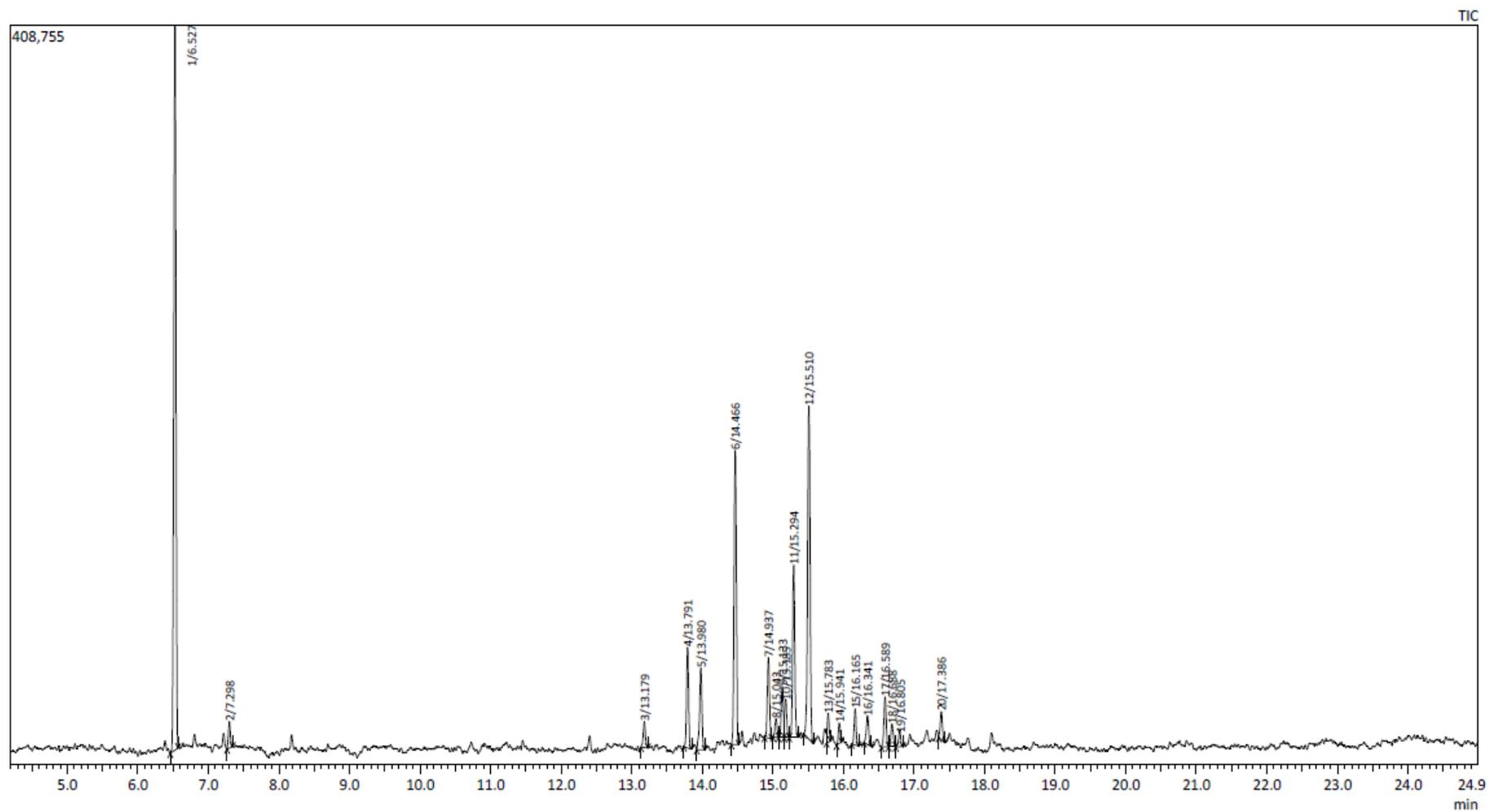


Figura 31 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (março de 2023).

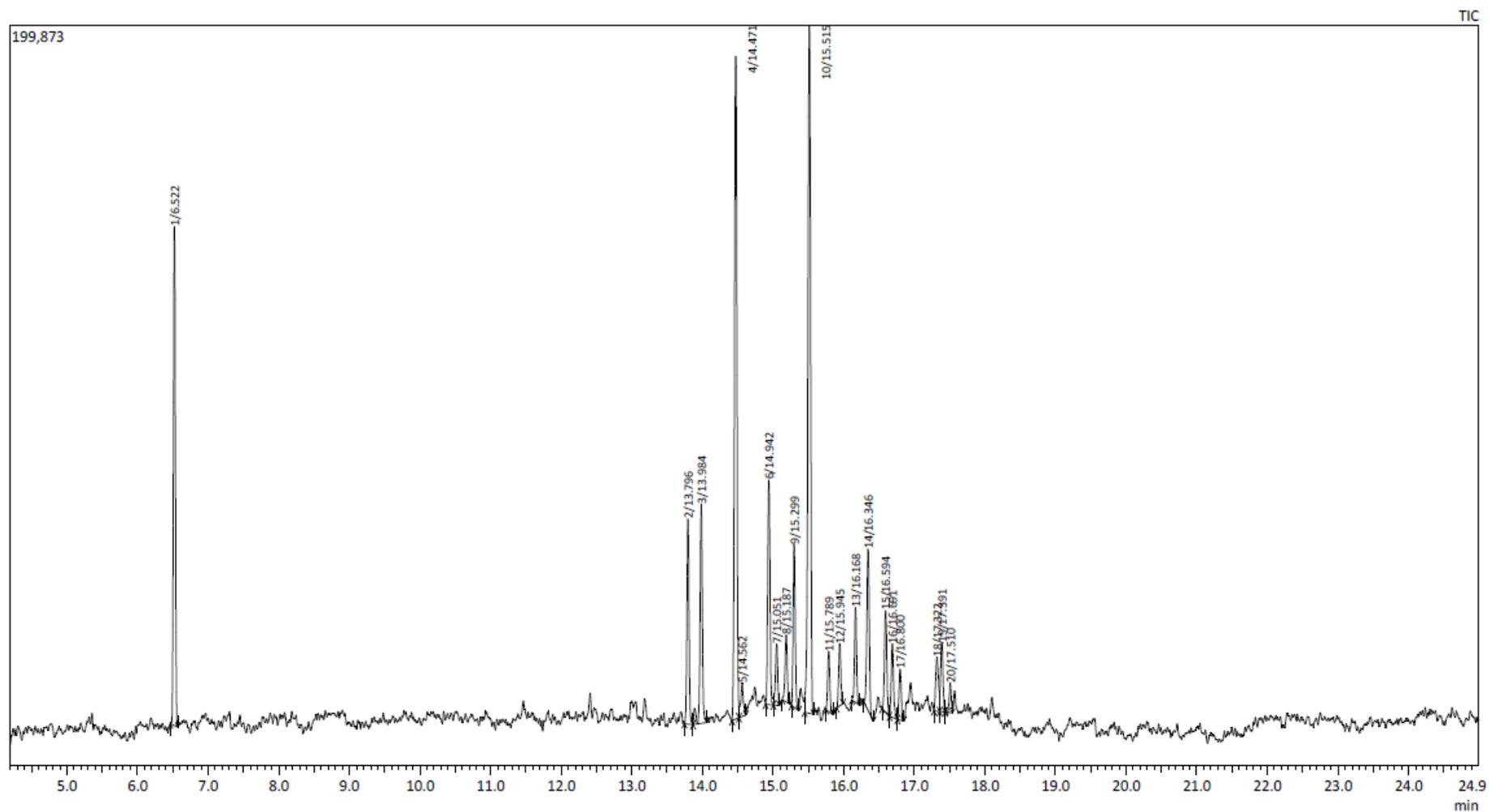


Figura 32 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (abril de 2023).

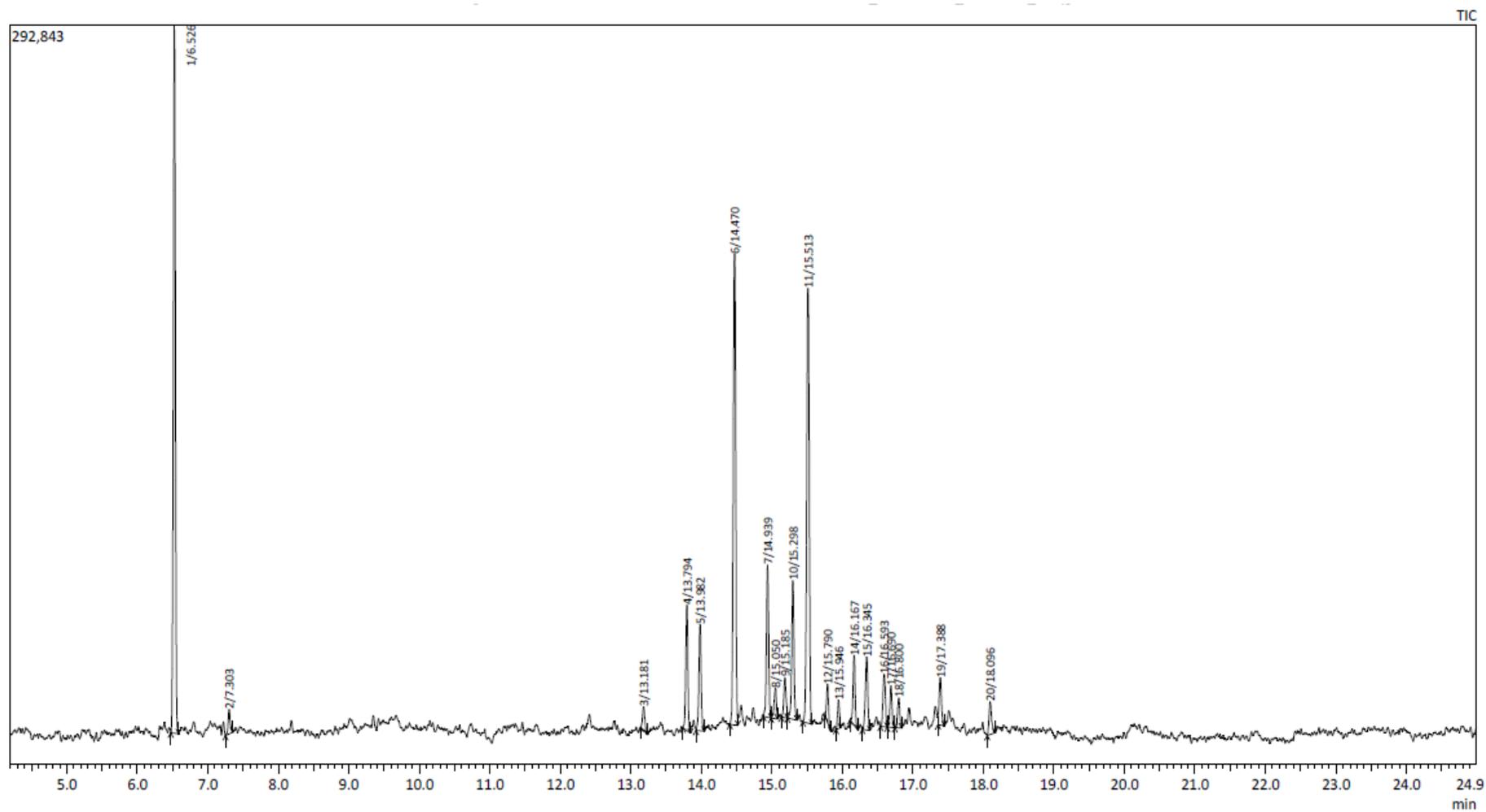
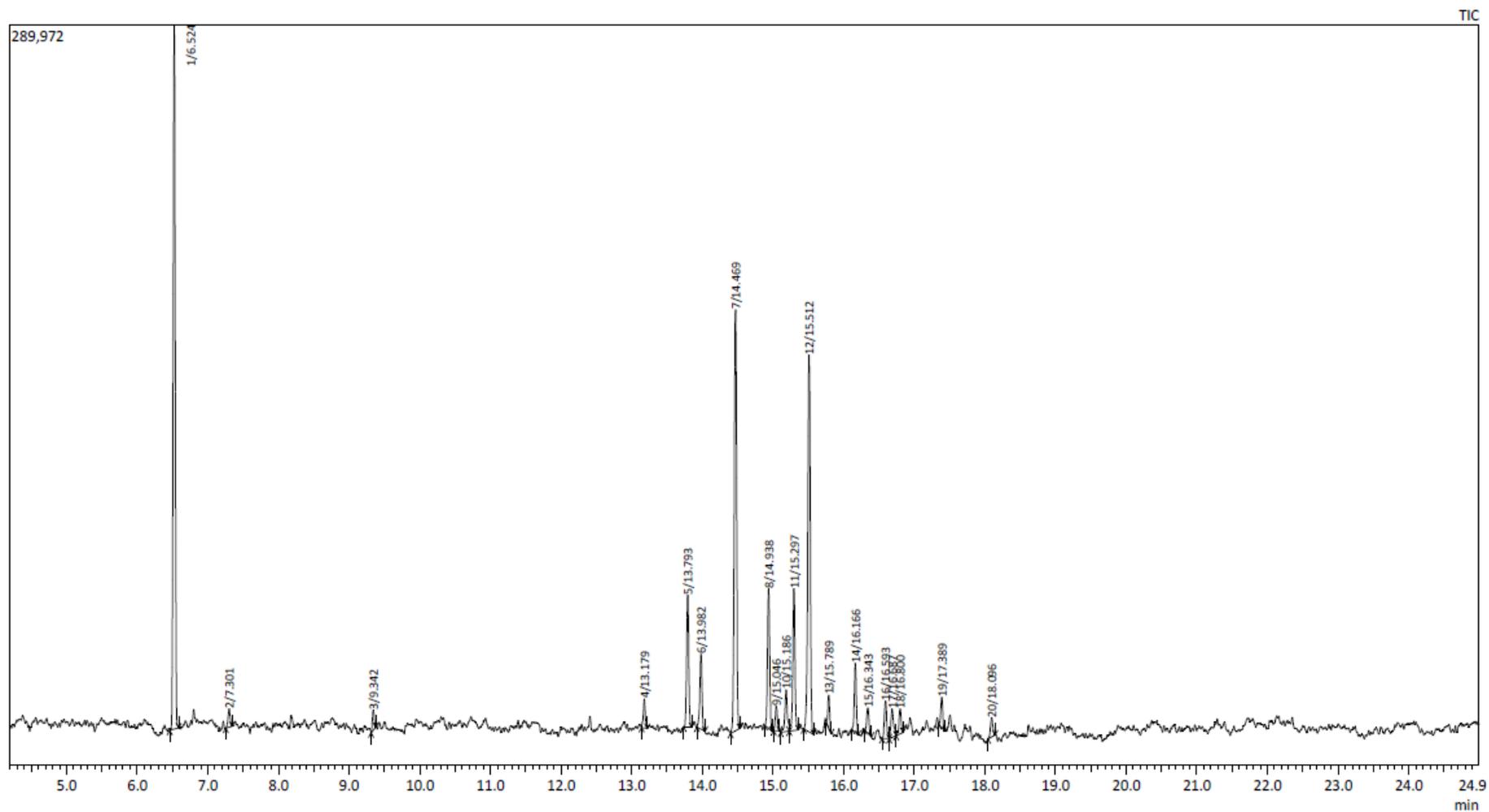
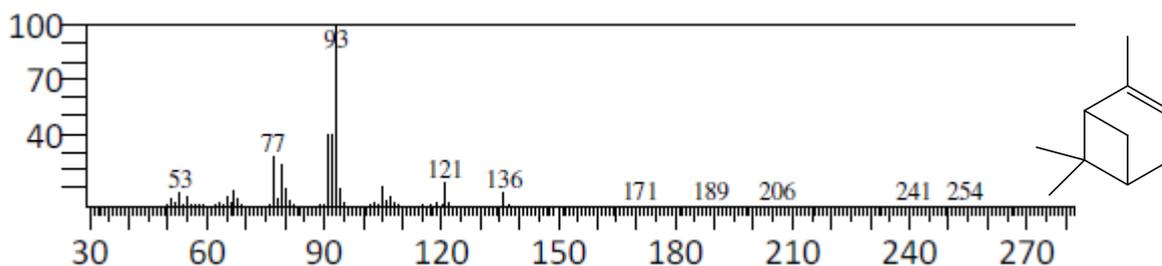


Figura 33 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Croton urticifolius* (OCU) (maio de 2023).

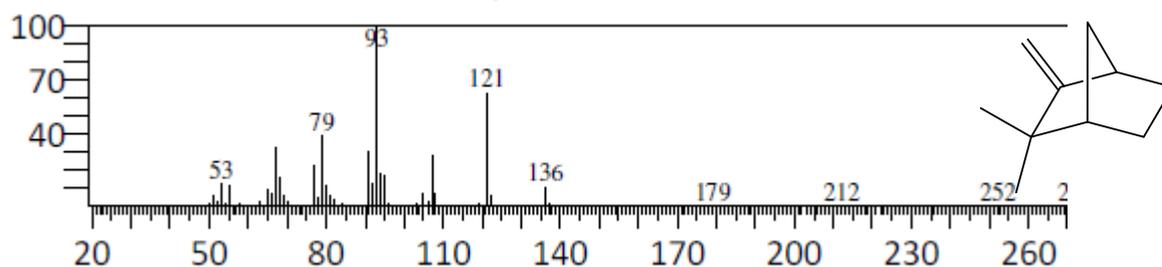


APÊNDICE B: ESPECTROS DE MASSAS

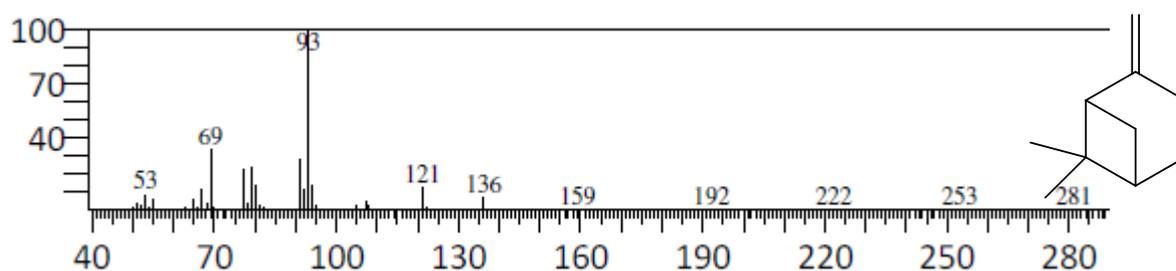
APÊNDICE B1: Espectro de massa do α -pineno (1).



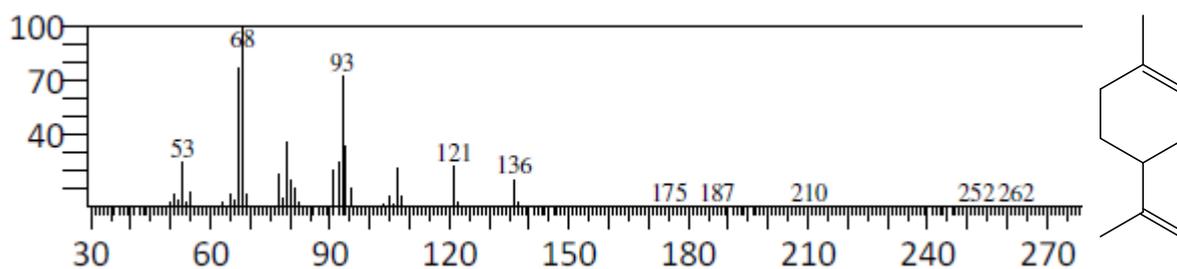
APÊNDICE B2: Espectro de massa do canfeno (2).



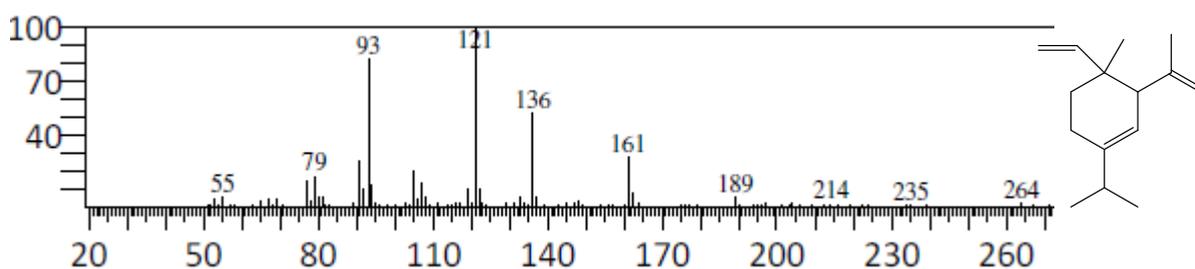
APÊNDICE B3: Espectro de massa do β -pineno (3).



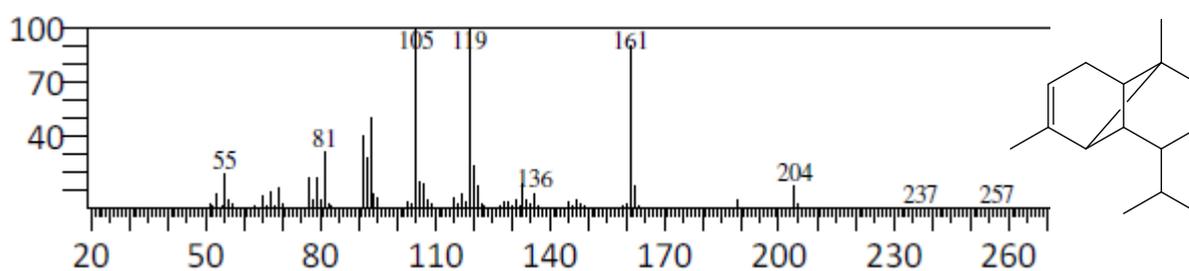
APÊNDICE B4: Espectro de massa do limoneno (4).



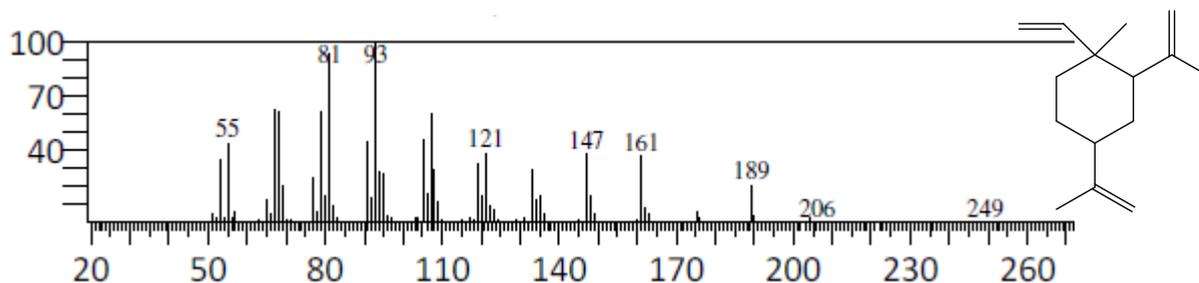
APÊNDICE B5: Espectro de massa do δ -elemeno (5).



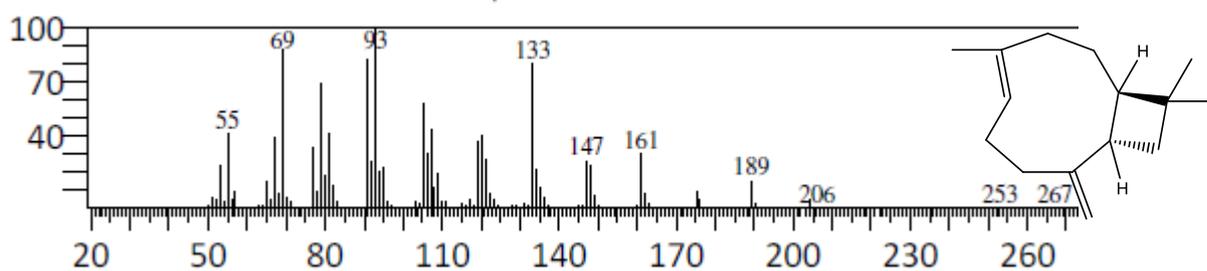
APÊNDICE B6: Espectro de massa do α -copaeno (6).



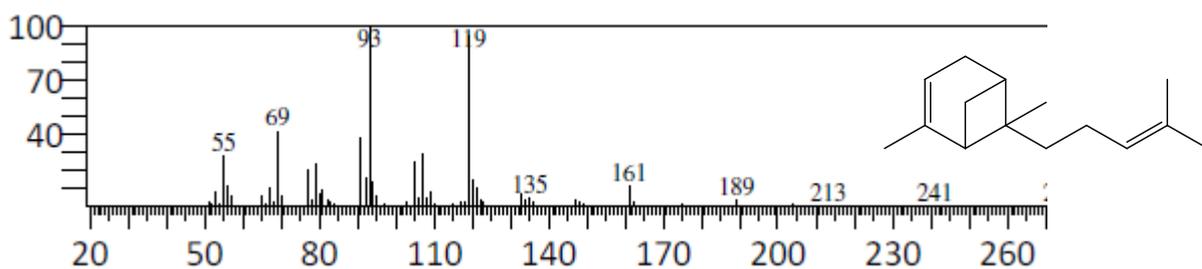
APÊNDICE B7: Espectro de massa do β -elemeno (7).



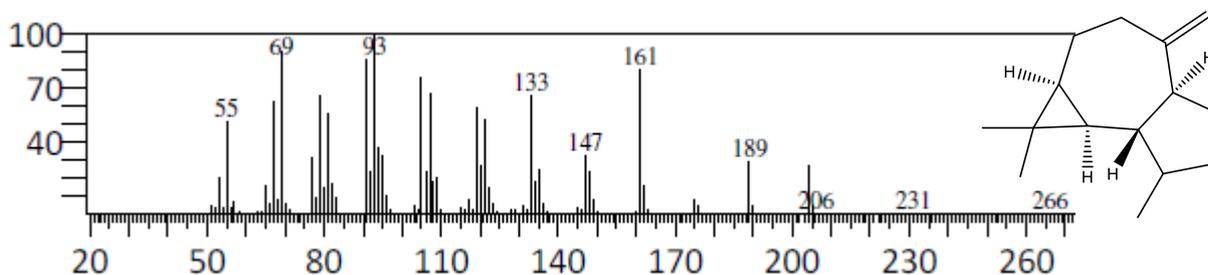
APÊNDICE B8: Espectro de massa do (E)-cariofileno (8).



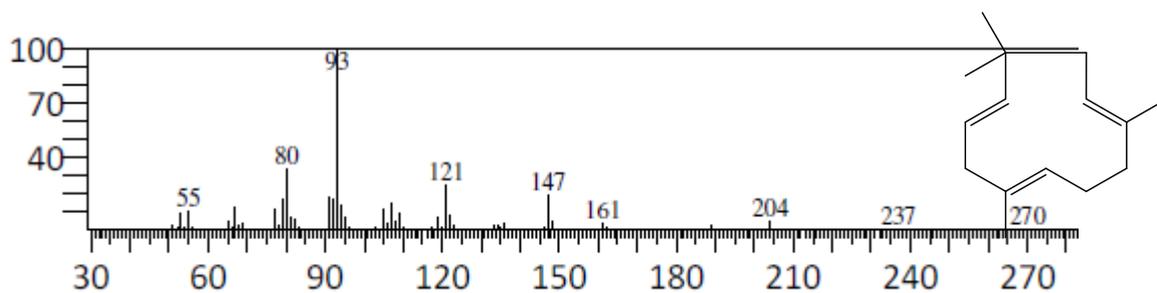
APÊNDICE B9: Espectro de massa do α -*trans*-bergamoteno (9).



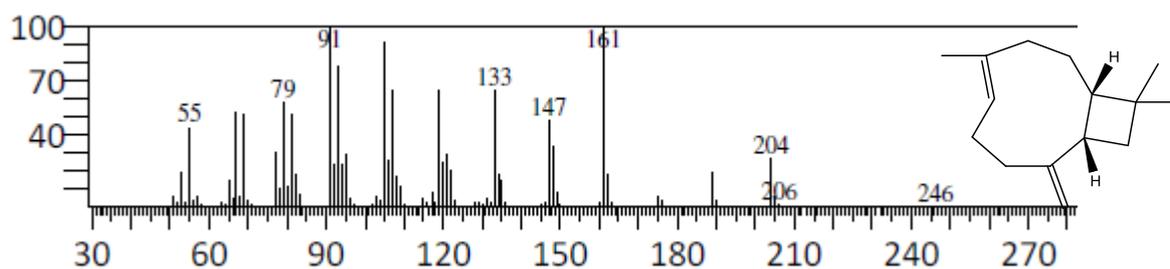
APÊNDICE B10: Espectro de massa do aromadendreno (10).



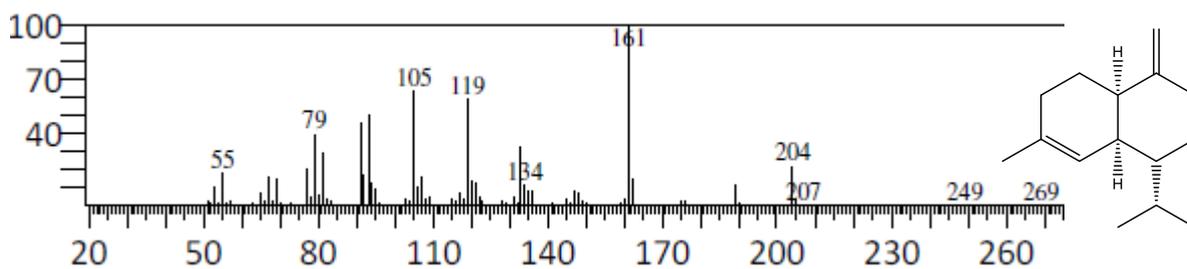
APÊNDICE B11: Espectro de massa do α -humuleno (11).



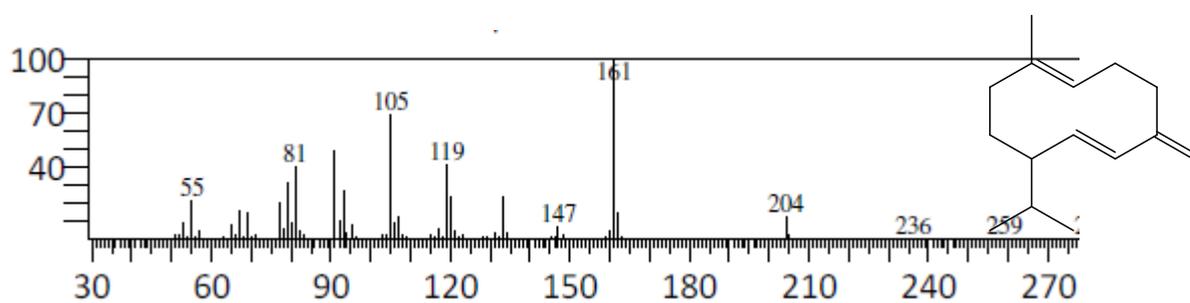
APÊNDICE B12: Espectro de massa do 9-epi-(E)-cariofileno (12).



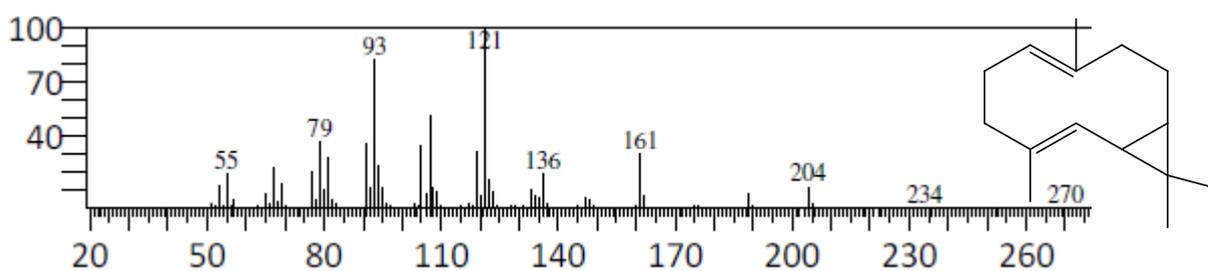
APÊNDICE B13: Espectro de massa do γ -muraleno (**13**).



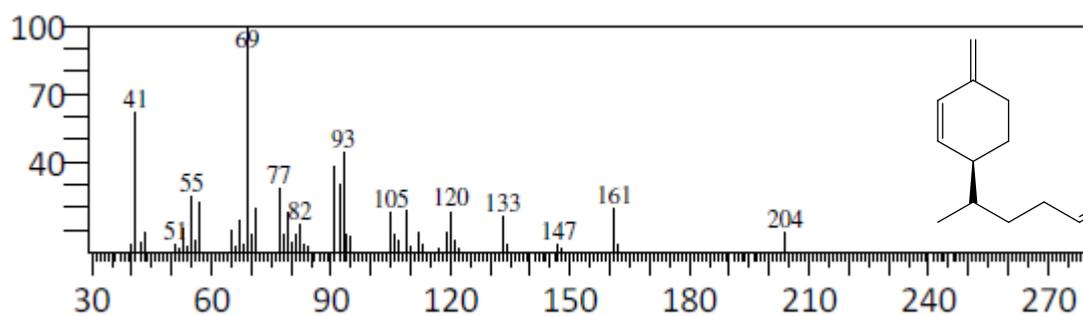
APÊNDICE B14: Espectro de massa do D-germacreno (**14**).

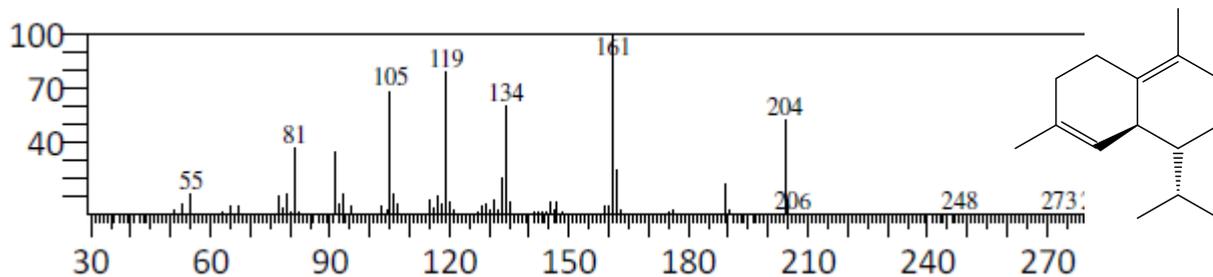
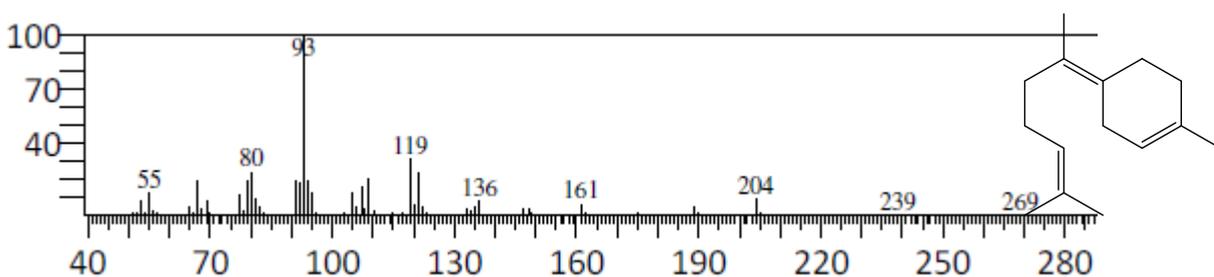
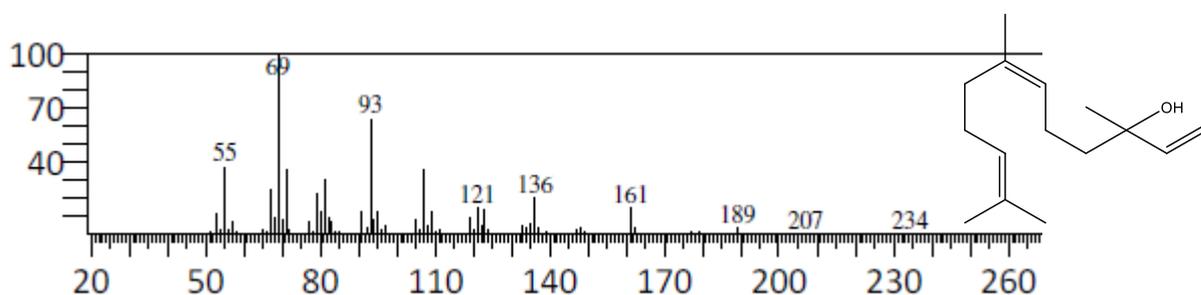
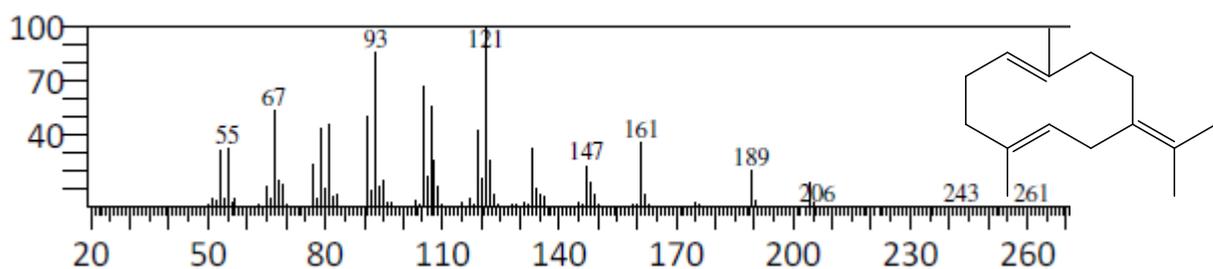


APÊNDICE B15: Espectro de massa do biciclogermacreno (**15**).

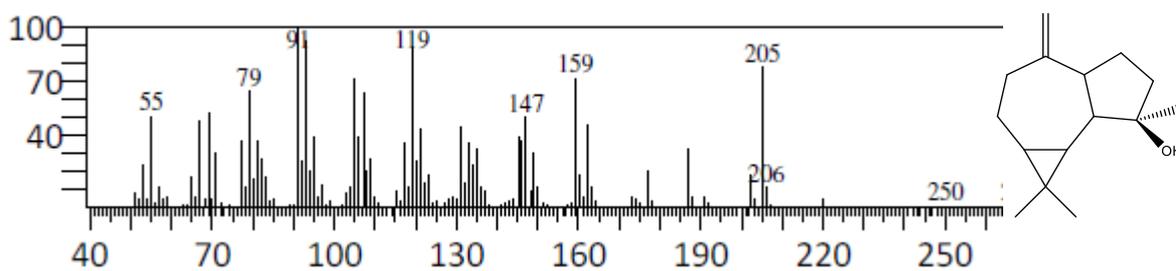


APÊNDICE B16: Espectro de massa do β -sesquifelandreno (**16**).

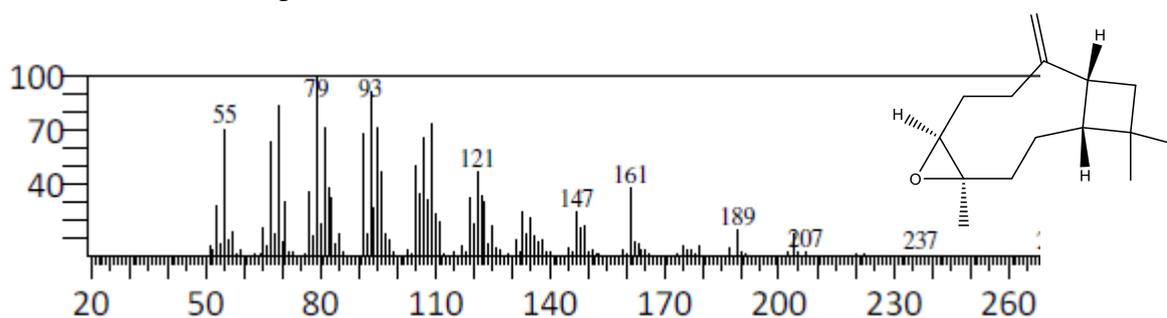


APÊNDICE B17: Espectro de massa do δ -cadineno (**17**).**APÊNDICE B18:** Espectro de massa do γ -(E)-bisaboleno (**18**).**APÊNDICE B19:** Espectro de massa do (Z)-neridol (**19**).**APÊNDICE B20:** Espectro de massa do B-germacreno (**20**).

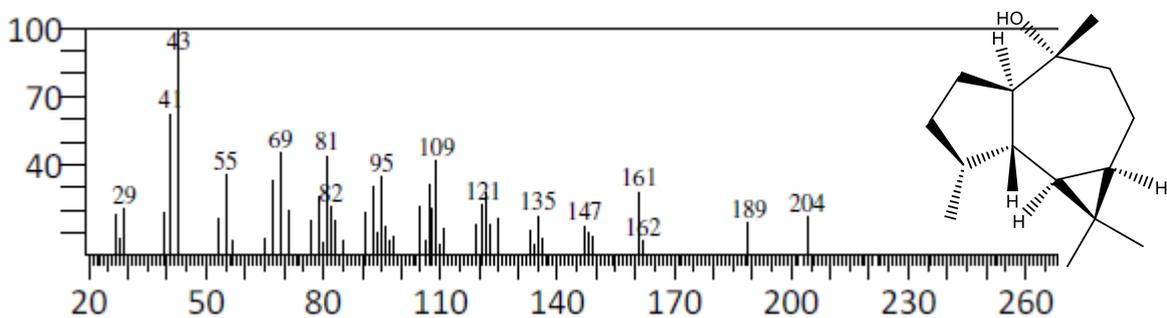
APÊNDICE B21: Espectro de massa do espatulenol (**21**).



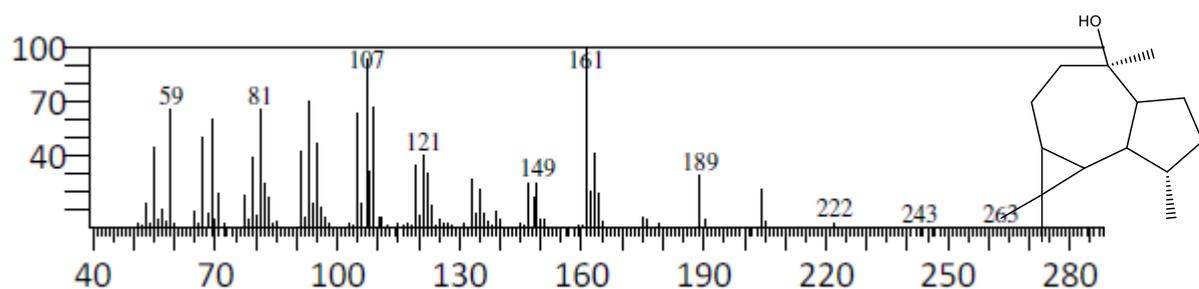
APÊNDICE B22: Espectro de massa do óxido cariofileno (**22**).



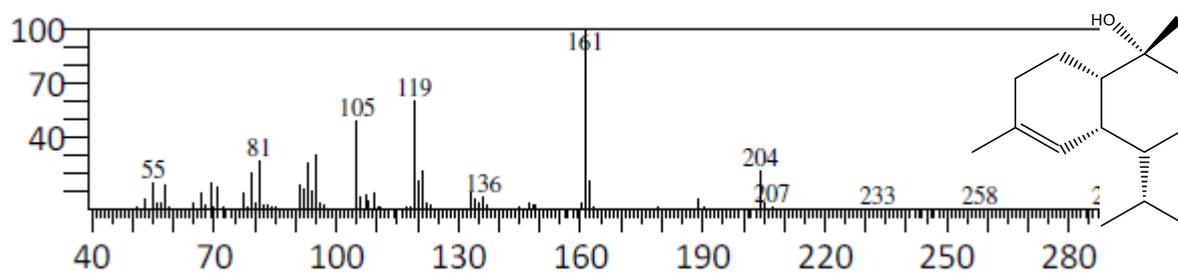
APÊNDICE B23: Espectro de massa do globulol (**23**).



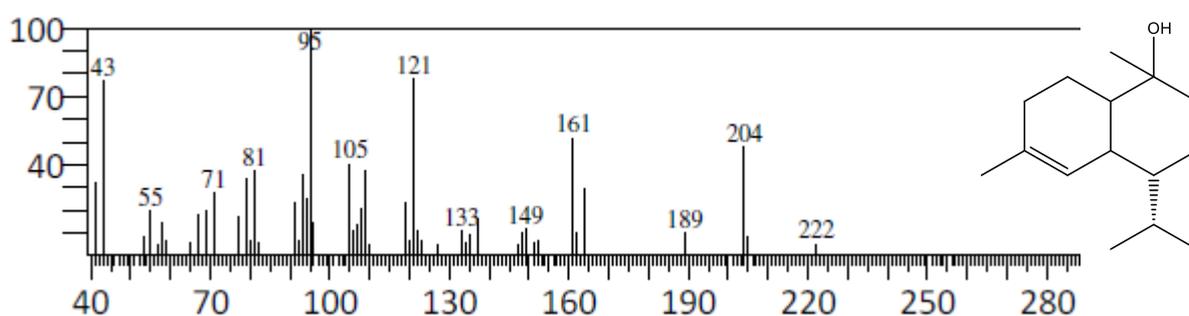
APÊNDICE B24: Espectro de massa do viridiflorol (**24**).



APÊNDICE B25: Espectro de massa do α -murolol (**25**).



APÊNDICE B26: Espectro de massa do α -cadinol (**26**).



APÊNDICE B27: Espectro de massa do α -bisabolol (**27**).

