



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA ALINY NATHALIA ALMEIDA SILVA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Croton tetradenius* Baill FRENTE A ESPÉCIES DE BACTÉRIAS**
PATOGÊNICAS

Serra Talhada-PE
2019

MARIA ALINY NATHALIA ALMEIDA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Croton tetradenius Baill FRENTE A ESPÉCIES DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito obrigatório à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Ana Luiza da Silva

Serra Talhada-PE
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Maria Aliny Nathalia Almeida
Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill frente a espécies de bactérias patogênicas / Maria Aliny Nathalia Almeida Silva. - 2019.
31 f. : il.
- Orientador: Ana Luiza da Silva.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2020.
1. Disco-difusão. 2. Hidrodestilação. 3. Metabólitos secundários. 4. Resistência microbiana. I. Silva, Ana Luiza da, orient. II. Título

MARIA ALINY NATHALIA ALMEIDA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Croton tetradenius Baill FRENTE A ESPÉCIES DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito obrigatório à obtenção do Grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Banca examinadora

Profa. Ma. Ana Luiza da Silva - UFRPE/UAST
(Orientadora)

Profa. Dra. Cassia Lima Silva Gusmão - UFRPE/UAST
(2º Titular)

Profa. Dra. Cynthia Maria Carneiro Costa UFRPE/UAST
(3º Titular)

RESUMO

Plantas medicinais da Caatinga nordestina são amplamente utilizadas na medicina popular pelas comunidades locais, devido ao potencial terapêutico que apresentam. A resistência bacteriana a múltiplas drogas tem aumentado nos últimos anos devido ao uso indiscriminado de antibióticos, gerando a necessidade de novos fármacos de amplo espectro. É sabido que os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, lipofílicas e odoríferas que apresentam inúmeros constituintes devido aos metabólitos secundários. Esse trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) coletado no município de Triunfo –PE. Obtido a partir das folhas pelo processo de hidrodestilação, a avaliação ocorreu pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri, contendo o meio Ágar Müller-Hinton, semeadas com suspensões bacterianas previamente ajustadas a 0,5 da escala de Mac Farland de três isolados. Discos contendo 10 µL e 15 µL do óleo essencial, sem qualquer diluição, foram adicionados às placas e incubadas a 36 °C, por 24 horas. Foi utilizado como controle positivo discos de papel com o antibiótico Amicacina 30 µg/disco. Os testes foram realizados em triplicatas e os halos de inibição estabelecidos na média da medição dos halos, para cada espécie de bactérias. Os resultados apresentou que o óleo essencial de *Croton tetradenius* possui atividade antimicrobiana contra os isolados testados *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, exceto para *Klebsiella pneumoniae* que se mostrou resistente ao óleo essencial testado.

Palavras-chave: Disco-difusão, Hidrodestilação; Metabólitos secundários; Resistência microbiana.

ABSTRACT

Medicinal plants of northeastern Caatinga are widely used in folk medicine by local communities, due to the therapeutic potential they present. Bacterial resistance to multiple drugs has increased in recently due to the indiscriminate use of antibiotics, generating the need for new broad spectrum drugs. Essential oils are known to be complex mixtures of volatile, lipophilic and odorous organic compounds that have numerous constituents due to secondary metabolites. This work aimed to evaluate the antimicrobial activity of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) essential oil collected in the municipality of Triunfo-PE, obtained from the leaves by the hydrodistillation process. The evaluation was made by the paper disc diffusion method, in Petri plates, containing the Müller-Hinton Agar medium, sown with bacterial suspensions previously adjusted to a 0.5 of the Mac Farland scale of three isolates. Discs containing 10 µL and 15 µL of the undiluted essential oil were added to the plates and incubated at 36 °C for 24 hours. Paper discs with the antibiotic Amikacin 30 µg/disc were used as positive control. The tests were performed in triplicates and the inhibition halos established in the average of the halos measured for each species of bacteria. The results show that *Croton tetradenius* essential oil has antimicrobial activity against the tested isolates *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, except for *Klebsiella pneumoniae* which was resistant to the tested essential oil.

Keywords: Diffusion-disc; Hydrodistillation; Secondary metabolites; Microbial resistance.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu saúde e paz para que eu pudesse realizar esse trabalho, além de todas as maravilhas que Ele tem reservado para a minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), por ceder espaço físico e recursos ao laboratório de microbiologia para realização desta pesquisa.

Ao Departamento de Antibióticos da UFPE, de Recife-PE, por ceder os isolados das espécies de bactérias.

A minha orientadora Ana Luiza da Silva por sua disponibilidade, empenho, apoio e confiança. Serei eternamente grata por oportunizar esse trabalho.

As professoras Cassia Lima Silva Gusmão e Cynthia Maria Carneiro Costa, por aceitarem participar da banca.

Ao prof. Carlos Romero Ferreira de Oliveira por ter cedido o laboratório do Núcleo de Pós-Graduação em Produção vegetal (PGPV) da unidade para a extração do óleo essencial.

À minha família, pelo apoio e incentivo que foram essenciais para o meu crescimento. Em especial, ao meu marido Rafael Alves de Lima pelo amor, carinho e compreensão, que sempre me confortaram nos momentos de dificuldades.

Enfim, obrigada a todos, mesmo àqueles que não tenham sido citados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Processo de hidrodestilação para extração do óleo essencial de *Croton tetradenius* em aparelho tipo Clevenger modificado; (B) Balão volumétrico acoplado ao aparelho rotaevaporador, ligado a uma bomba de vácuo; (C) Vidro âmbar com o óleo essencial coletado.....18

Figura 2. Teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius* coletado em Triunfo, PE, frente a *Staphylococcus aureus*.....22

Figura 3. Teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius* coletado em Triunfo, PE, frente a *Escherichia coli*.....23

Figura 4. Teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius* coletado em Triunfo, PE frente a *Klebsiella pneumoniae*.....24

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Plantas Medicinais	10
2.2. Metabólitos Secundários	10
2.3. Óleos Essenciais.....	11
2.4. Atividade Antimicrobiana	13
2.5. <i>Croton tetradenius</i> Baill.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Área de estudo	17
3.2. Obtenção do Óleo Essencial	17
3.3. Isolados Bacterianos	18
3.4. Testes da Atividade Antimicrobiana.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas para fins medicinais na prevenção, tratamento, e cura de doenças é uma das mais antigas formas de práticas curativas da humanidade. Diversas culturas se valem das plantas medicinais, como principal ou a única matéria prima da elaboração de medicamentos. O conhecimento sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado interesse científico, buscando novos caminhos para o controle e tratamento de diversas doenças. A partir desses dados etnofarmacológicos passados por gerações e com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, um maior número de plantas têm revelado e comprovado valor terapêutico. Logo, resultando no maior número de compostos naturais, conhecidos como metabólitos secundários (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

Nas últimas décadas, as investigações sobre fitoterápicos foram intensificadas e estas passaram a proporcionar tratamentos alternativos para vários males, inclusive no controle bacteriano (PUPO, 2007). O estudo desses agentes é importante no campo da saúde, visto que, mundialmente busca-se substâncias menos tóxicas e eficazes contra bactérias resistentes, capazes de combater novos patógenos (BARBOSA FILHO, 2007; OSTROSKY, 2008).

Muitas das espécies encontradas no domínio Caatinga pertencem ao gênero *Croton*, sendo um dos maiores e mais diversos da família Euphorbiaceae. São distribuídos na região tropical e subtropical, sendo rico em constituintes químicos com potencial antimicrobiano (SALATINO *et al.*, 2007). O gênero *Croton* é composto por diversas espécies, que entre elas estão: *Croton argyrophylloides*, *Croton heliotropopholius*, *Croton linearifolius*, *Croton nepetaefolius*, *Croton sonderianus*, *Croton triqueter*, *Croton zehntneri* e *Croton tetradenius*, facilmente encontradas no semiárido do Nordeste brasileiro. Muitas dessas espécies são aromáticas e produtoras de óleos essenciais, que são constituídos por misturas complexas de compostos, com propriedades biológicas (OLIVEIRA, 2008).

Neste contexto, o óleo essencial destaca-se como eficiente antimicrobiano alternativo. Os princípios ativos podem ser encontrados em todo

tecido vivo das plantas, concentrados na casca, flores, folhas, frutos, sementes e constituídos quimicamente por um grupo de compostos distintos como os hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos como aldeídos e cetonas. A exploração da atividade biológica de substâncias químicas de plantas constitui uma forma potencial de controle alternativo de doenças e resistência microbiana gerando o desenvolvimento de modelos que viabilizem sistemas de produção sustentáveis e a conservação da biodiversidade e recursos naturais. Os principais compostos naturais com propriedades antimicrobianas encontrados nas plantas são geralmente fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, assim como o tanino, cumarina, terpenóides, alcalóides, lectinas e polipeptídios (GONÇALVES, 2005).

A resistência de bactérias às múltiplas drogas tem aumentado nos últimos anos devido ao uso indiscriminado de antibióticos, gerando a necessidade de novas fórmulas para fármacos em geral. Os óleos essenciais podem ser uma alternativa ao combate desses patógenos, pois são fonte de vasta diversidade molecular com diferentes mecanismos antimicrobianos. Assim sendo, a procura por propriedades antimicrobianas em óleos essenciais de plantas tem sido intensificada e incentivada (YAP *et al.*, 2014).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial extraído a partir das folhas de *Croton tetradenius* Baill, seu potencial frente a isolados bacterianos por meio da técnica disco-difusão, diferentes volumes do óleo extraído.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas Medicinais

A aplicabilidade de plantas medicinais para a cura de doenças e sintomas remonta ao início da civilização e, em várias culturas, produtos botânicos eram empregados para essa finalidade (HALBERSTEIN, 2005; LUCA, 2014). São largamente utilizadas na medicina popular pelas comunidades locais, que possuem uma vasta farmacopeia natural, em boa parte proveniente dos recursos vegetais cultivados no próprio local por estas populações ou cultivados em ambientes antropicamente alterados (GOMES, 2008).

As comunidades rurais estão intensamente ligadas a utilização de plantas medicinais, pois estas são na maioria das vezes o único recurso disponível para o tratamento de doenças na região. Além disso, muitas pessoas crescem ouvindo de seus familiares sobre a importância e eficácia de certos vegetais para cura de doenças corriqueiras. (ROQUE *et al.*, 2010). No Brasil, o uso de plantas medicinais tem recebido relevante destaque, fato devido ao aumento do uso destas plantas, que são fontes de substâncias ativas que provocam no organismo humano reações que levam a cura e/ou o alívio da doença (ROSA, 2012).

2.2. Metabólitos Secundários

Devido à grande importância dos produtos vegetais para o tratamento de diversas doenças, a química e a medicina desenvolveram os seus campos específicos para identificar as substâncias bioativas e consequentemente introduzi-las em tratamentos terapêuticos (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Essas substâncias são provenientes do metabolismo secundário das plantas, este processo metabólico é derivado do metabolismo primário, que é um conjunto de processos que desempenham funções essenciais na planta e forma vários compostos orgânicos, que por sua vez pode apresentar atividade biológica (DELBONE; LANDO, 2010).

Os metabólitos secundários possuem atividades biológicas comprovadas, muitos são de valor comercial elevado. Do ponto de vista

farmacêutico o maior interesse está no número de substâncias ativas. Muitas técnicas podem ser empregadas para a detecção e a quantificação de metabólitos secundários em amostras de espécies vegetais. Os métodos espectrofotométricos são mais práticos, reprodutíveis e baratos que outras metodologias, permitindo assim a análise desses compostos. (SOBRINHO, 2011). Metabólitos secundários são amplamente distribuídos e apresentam várias funções ecológicas e inúmeras atividades farmacológicas, cientificamente comprovadas, sendo bem representadas por taninos, flavonóides e cumarinas (AMORIM, 2008).

Pelo fato de serem naturais e biodegradáveis geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos podendo atuar sobre variadas moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparados a fármacos sintéticos, tornam-se substâncias chaves para a pesquisa de novos medicamentos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Tanto na indústria de alimentos quanto na área da saúde há uma enorme necessidade de encontrar novos agentes antimicrobianos para garantir a inocuidade alimentar e a saúde do ser humano. Simultaneamente a esse fato, a investigação de novos agentes antimicrobianos tem recebido destaque, devido ao aumento do número de espécies de bactérias que se mostram resistentes aos agentes desinfetantes e antimicrobianos sintéticos utilizados (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

2.3. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são responsáveis por desempenhar diversas funções importantes para as plantas, agindo como sinais químicos para comunicação entre as espécies, proteção para microrganismos patogênicos, atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, para perpetuação da espécie, assim como nos odores liberados pelas folhas, flores e frutos (MARASCHIN; VEPOORT, 1999).

São misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, lipofílicas e odoríferas, que apresentam numerosos constituintes e podem ser extraídos dos vegetais de diversas formas (folha, cascas, raízes, frutos e flores). Nos últimos anos tem se visto um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO; YUNES, 1997). Dentre as atividades

farmacológicas a antimicrobiana vem sendo estudada com mais vigor devido ao agravamento da resistência microbiana a antibióticos convencionais. O interesse na busca por agentes antimicrobianos provenientes de produtos naturais é justificável, uma vez que possuem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (ANGÉLICO, 2011). Os óleos essenciais de plantas exibem atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON; RILEY, 1995). Podem apresentar ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Ainda que as indústrias farmacêuticas tenham produzido um número considerável de novos antibióticos nas últimas três décadas, tem aumentado a resistência de microrganismos à essas drogas. Em geral, bactérias tem uma habilidade genética para transmitir e adquirir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

A composição química dos óleos essenciais resulta do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação (MACIEL *et al.*, 2002). O conteúdo pode variar consideravelmente de uma espécie para outra, em função de parâmetros climáticos e de fatores agrônômicos como fertilização, irrigação, colheita e principalmente a fase de desenvolvimento da planta na época da colheita. Muitas plantas existem sob vários fenótipos, isto é, diferindo na sua aparência e diversidade qualitativa e quantitativa, normalmente detectada na composição do óleo essencial obtido (KERROLA *et al.*, 1994).

O método de extração do óleo essencial pode ser realizado através de diversas técnicas e suas propriedades dependem do tipo de extração. Os métodos mais empregados são: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO₂ supercrítico (MACHADO; JUNIOR, 2011).

A técnica da hidrodestilação baseia-se na separação dos componentes de uma mistura por meio das diferenças em suas pressões de vapor. O material vegetal permanece em contato com as moléculas de água em

ebulição, o vapor formado força a abertura das paredes celulares, permitindo a evaporação do óleo que está situado entre as células da planta. O vapor formado que consiste de uma mistura de moléculas de água e de óleo é então resfriado por um condensador, gerando um produto líquido de duas fases, visto que, trata-se de dois líquidos não capazes de misturar-se e que posteriormente serão separados (BIASI; DESCHAMPS, 2009; SARTOR, 2009; SILVA, 2011).

2.4. Atividade Antimicrobiana

A natureza é considerada um precioso reservatório de substâncias a serem exploradas para o desenvolvimento de novos fármacos. Diversas drogas foram descobertas por triagem de compostos naturais e já são utilizadas para o tratamento de uma variedade de doenças (BARBOSA *et al.*, 2016).

As doenças infecciosas ainda causam morte em todo mundo, sendo de significativa importância o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Nesse aspecto, o estudo de extratos e óleos essenciais orgânicos pode ser uma boa alternativa na busca de compostos promissores que apresentem diversas atividades biológicas (PAULA, 2015).

Com o passar dos anos a detecção de microrganismos com uma ampla diversidade genética vem sendo perceptível às pesquisas, sendo estes capazes de provocar diversas doenças. Apesar de existirem muitas opções de terapias antimicrobianas disponíveis no mercado para as diferentes infecções bacterianas, seu uso indiscriminado levou muitas espécies de bactérias patogênicas a adquirirem resistência (KIM, 2007).

Muitos são os mecanismos fisiológicos através dos quais as bactérias se tornam resistentes: produção de enzimas que inativam as drogas, mudança na conformação do receptor da droga, impermeabilidade da membrana a droga, sistemas de bombeamento que expulsa a droga de forma ativa de dentro das células, impedindo assim a sua ação. Devido a estes fatores ocorrem complicações no tratamento, como a ineficácia terapêutica e até mesmo a morte do paciente (MARQUES; ZUCCHI, 2006)

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada com sua hidrofobicidade que os faz interagir com os lipídeos da parede, membrana celular e mitocôndria das células microbianas, alterando a permeabilidade e gerando distúrbios nestas estruturas, resultando em fraturas grosseiras que provocam o vazamento de íons, moléculas e conteúdo celular, levando à morte ou inibição da bactéria (BURTS, 2004). Em função do caráter multicomponente dos óleos essenciais a resistência bacteriana é menos provável de ser desenvolvida, uma vez que esses óleos afetam numerosos alvos no patógeno (FARISA, 2017).

Tendo em vista a resistência das bactérias a múltiplos antimicrobianos, o conhecimento sobre determinadas espécies de plantas com propriedades antimicrobianas e a busca por substâncias derivadas desses vegetais teve um grande impulso nos últimos anos (COELHO *et al.*, 2004). O interesse pelas plantas é devido a grande variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabolitos secundários, tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides e compostos fenólicos, os quais, já possuem potente atividade antimicrobiana demonstradas por trabalhos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Assim, existe uma série de pesquisas com microrganismos patogênicos, responsáveis pela contaminação de alimentos e capazes de provocar infecções em humanos e animais. A realização de testes *in vitro* tem por objetivo identificar novos bioprodutos com atividade antimicrobiana (SANDRI *et al.*, 2007). Diversos métodos avaliam a atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos vegetais e óleos essenciais, sendo os mais conhecidos: difusão em disco, difusão utilizando cavidades no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima - CIM. São técnicas comumente aceitas internacionalmente para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (OSTROSKY, 2008).

Pesquisas realizadas com o objetivo de avaliação de extratos vegetais e óleo essencial, sugerem a utilização de diferentes metodologias para que os

resultados possam ser comparados com outros estudos de diferentes grupos de pesquisas (OSTROSKY, 2008; OTHMAN *et al.*, 2011).

2.5. *Croton tetradenius* Baill

A família botânica Euphorbiaceae Juss, atualmente abriga cerca de 64 gêneros e 950 espécies no Brasil, nas formas: arbusto, árvore, erva, liana, volúvel, trepadeira ou subarbusto, são encontradas em diferentes tipos de substratos. A família é de origem nativa, mas não é endêmica do Brasil, possui uma ampla distribuição geográfica, com ocorrência confirmada em todas as regiões do Brasil e na maioria dos domínios fitogeográficos como: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORA DO BRASIL 2020 em construção, 2019).

O gênero *Croton* L. é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.200 espécies distribuídas predominantemente no continente americano. Com cerca de 316 espécies, o Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, que está representado nos mais variados ambientes e tipos de vegetação (BERRY *et al.*, 2005). Apesar disso, é um gênero que apresenta dificuldades, pois é taxonomicamente complexo e por isso tem sido negligenciado em favor de gêneros menores e mais claramente delimitados. Para muitos botânicos e ecólogos *Croton* tem sido uma incógnita taxonômica esse fato pode ser devido ao grande tamanho do gênero, à proliferação de nomes e à dificuldade em se acessar as coleções-tipo que se encontram depositadas em diversos herbários do mundo. (LIMA; PIRANI, 2008).

Muitas espécies de *Croton* crescem com facilidade em locais degradados, tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. Essa característica se deve especialmente a produção massiva de flores e frutos durante a maior parte do ano, o que as tornam espécies candidatas para a restauração de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008). Além disso a química do gênero *Croton* é consideravelmente diversa, fato que qualifica o

grupo como altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias naturais farmacologicamente ativas, sendo, por esta causa, alvo de pesquisas tanto em estudos fitoquímicos como para testes de suas atividades biológicas (RANDAU *et al.*, 2004). Sendo assim um forte potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido aos diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides, que são atribuídos a propriedades terapêuticas a muitas espécies vegetais (RIZSCK, 1987; PAYO *et al.*, 2001).

A espécie *Croton tetradenius* apresenta forma de vida: arbusto, erva, subarbusto. É nativa e endêmica do Brasil. Possui distribuição geográfica confirmada nas regiões: Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Goiás) e Sudeste (Minas Gerais). Na região Nordeste tem por nome popular Velaminho-da-serra (FLORA DO BRASIL 2020 em construção, 2019).

Carvalho (2016), trabalhando com o óleo essencial obtido a partir das folhas de *Croton tetradenius* expõe efeito tóxico sobre larvas e adultos do *Aedes aegypti*, comprovando assim o seu possível uso como inseticida botânico. O estudo teve suas concentrações avaliadas e estão de acordo com os testes de toxicidade. A composição química é constituída por monoterpenos e sesquiterpenos, sendo a cânfora o componente mais importante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo:

O município de Triunfo em Pernambuco, situa-se na região da Serra da Baixa Verde, território do Pajeú. Tem área da unidade territorial de 191,518km². A cidade está situada a 1.004 metros de altitude o que lhe configura o título de cidade mais alta do Estado de Pernambuco. Possui cerca de 15.006 habitantes de acordo com o último censo realizado pelo IBGE em 2010. IBGE (2019). A coleta do material vegetal da espécie *Croton tetradenius*, foi realizada na zona rural do município de Triunfo em maio de 2019, período chuvoso, durante a floração da espécie de planta utilizada.

3.2. Obtenção do Óleo Essencial

Após a coleta, no laboratório do Núcleo de Pós-Graduação em Produção vegetal (PGPV), as folhas foram colocadas em sacos de papel tipo Kraft de 2kg e em seguida levados à uma estufa de secagem por um período de 48 horas sob a temperatura de 50 °C. Posteriormente as folhas foram trituradas para iniciar o processo de extração do óleo essencial. Para tal, 100 g do material vegetal foi triturado e colocado em um balão volumétrico de 3 l contendo 2 l de água destilada e submetido ao processo de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado. Nesse processo é obtido o líquido emulsionável. O qual foi acondicionado em um funil de bromo, onde foram fracionados 400 ml de emulsão para 100 ml de solvente diclorometano (CH₂Cl₂). A solução foi agitada e colocada em decantação para a obtenção de duas fases, onde uma delas comporta a mistura solvente-óleo e na outra apenas água. Após a decantação, a mistura de óleo-solvente foi transferida para um balão volumétrico com auxílio de um funil de vidro contendo algodão e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), para evitar a contaminação da mistura com água. O balão volumétrico foi acoplado ao aparelho rotaevaporador, ligado a uma bomba de vácuo, para a etapa de separação do óleo e do solvente, restando apenas o óleo no balão, o qual foi coletado com auxílio de uma pipeta e acondicionado em vidro âmbar, hermeticamente fechado e armazenado em baixas temperaturas (5°± 2 °C) para conservação das características.

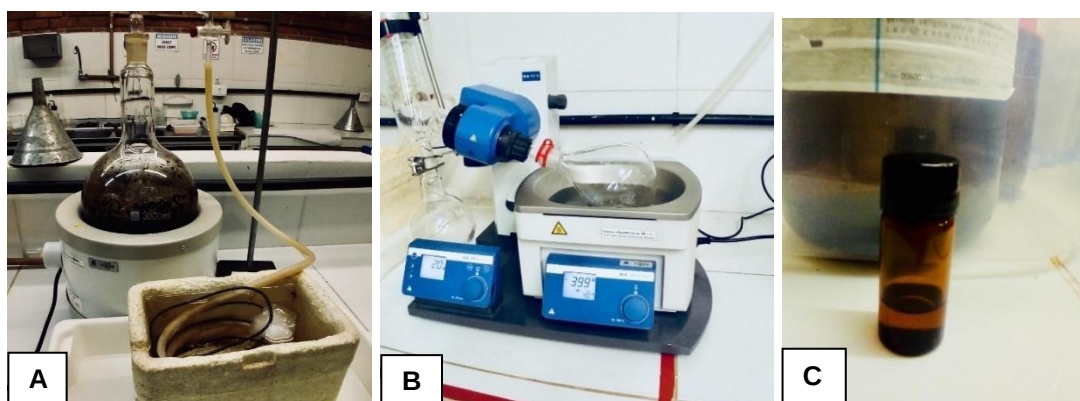


FIGURA 1. (A) Processo de hidrodestilação para extração do óleo essencial de *Croton tetradenius* em aparelho tipo Clevenger modificado; (B) Balão volumétrico acoplado ao aparelho rotaevaporador, ligado a uma bomba de vácuo; (C) Vidro âmbar com o óleo essencial coletado.

3.3. Isolados Bacterianos

Os isolados bacterianos foram obtidos da Coleção de Culturas UFPEDA, Departamento de Antibióticos da UFPE, Recife-PE. As bactérias utilizadas foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, mantidos em meio de cultura Ágar Nutriente.

3.4. Testes da Atividade Antimicrobiana

Para os testes em disco-difusão, as bactérias foram repicadas em tubos de ensaio, contendo 10 ml do meio de cultura Ágar Nutriente, após 24 horas de crescimento foram realizadas suspensões bacterianas em solução de água destilada esterilizada, ajustadas ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde aproximadamente a $1,5 \times 10^6$ UFC/ml, com o auxílio de um agitador de tubos de ensaio tipo Vortex, as culturas ativas das bactérias em suspensão foram semeadas por superfície nas placas com auxílio de Swab esterilizado, em placas de Petri, com meio de cultura Ágar Müeller-Hinton (composição g/L: Peptona de caseína 17,5; Peptona 3,0; Agar 15 Ca^{2+} 20-25; Mg^{2+} 10-12,5; pH 7,4). Para todas as espécies de bactérias testadas: *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram montadas por placas, um disco de controle positivo contendo 30 μg do antibiótico Amicacina vendido comercialmente e dois discos de papel Whatmann com 6 mm de diâmetro com o óleo essencial de *Croton tetradenius*, um foi embebido com 10 μl de óleo essencial e o outro disco com 15 μl . Após 24 horas de incubação as placas

foram retiradas da estufa e analisadas visualmente para verificação de formação halos de inibição, a atividade antimicrobiana foi analisada a partir da formação de halos de inibição, os quais foram medidos seus diâmetros e expressos em milímetros. Os testes foram realizados em triplicatas e os halos de inibição estabelecidos na média da medição dos halos, para cada espécie de bactérias. considerados como positivos os halos com tamanho igual ou superior a 10 mm de diâmetro, conforme descrito por ROMEIRO (2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de sensibilidade para a avaliação da atividade antibacteriana ao ser analisado os resultados do óleo essencial extraído a partir das folhas de *Croton tetradenius*, foi verificada inibição do crescimento da espécie *Staphylococcus aureus*, com a maior formação de halos. Nos volumes de 10 µL e 15 µL respectivamente, do óleo puro por disco de papel de 6 mm, foi possível a visualização e medição do halo de inibição correspondente em uma média da medição dos halos das triplicatas de 18 mm e 21 mm (Figura 2). Nos mesmos volumes para a espécie *Escherichia coli* foi possível detectar maior resistência bacteriana apresentando halos de inibição pequenos com 10 mm e 13 mm (Figura 3). *Klebsiella pneumoniae* não produziu halos de inibição em nenhum dos volumes testados (Figura 4).

Os resultados obtidos pelo controle positivo com o antibiótico Amicacina 30µg, vendido comercialmente, em cada espécie de bactéria testada foram os seguintes: para *Staphylococcus aureus* 29mm foi a maior inibição pelo antibiótico, indicando susceptibilidade ao fármaco, em relação a *Escherichia coli* foi possível visualizar halos de inibição correspondente a 20mm. Para *Klebsiella pneumoniae* a média da medição dos halos das triplicatas foi correspondente a 19mm (Tabela 1). Referente ao tamanho dos halos, Alves (2001), propôs uma classificação na qual se considera como inativas as amostras que produzam halo menor que 10mm.

Microrganismo	Óleo essencial 10/disco	Óleo essencial 15/disco	Antibiótico Amicacina 30 µg /disco
<i>S. aureus</i>	18 mm	21 mm	29 mm
<i>E. coli</i>	10 mm	13 mm	20 mm
<i>K. pneumoniae</i>	AS	AS	19 mm

Tabela 1: Diâmetro dos halos de inibição após análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius*. (SA = sem atividade)

Os óleos essenciais de plantas, em geral, têm atraído interesse dos pesquisadores e da indústria farmacêutica devido à vasta diversidade de constituintes bioativos. Estudos comprovam a atividade antibacteriana de óleos essenciais de algumas espécies do gênero *Croton* (COSTA *et al.*, 2008), no qual o óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri*, conhecida popularmente como “canela de cunhã” demonstrou potencial biológico contra bactérias patogênicas, sendo constituído principalmente de monoterpenóides e sesquiterpenóides. O óleo essencial de *Croton blanchetianus*, apresenta atividade antibacteriana e fungicida e seu constituinte majoritário encontrado é o espatulenol (TZAKOU; SKALTSA, 2003).

Assim como espécies do gênero *Croton* comprovam potencial biológico no óleo essencial, a espécie testada *Croton tetradenius* nesse trabalho, apresentou atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus é um gênero de bactérias Gram-positivas amplamente distribuída na natureza, que são sensíveis a altas temperaturas. A disseminação é comum, pois faz parte da microbiota da pele e da nasofaringe de 15% dos humanos sadios, com isso é responsável por muitas das infecções contraídas nos hospitais. *Staphylococcus aureus* desenvolveu ao longo da sua evolução estratégias e mecanismos bioquímicos e genéticos de patogenicidade para sua perpetuação na natureza, tais mecanismos podem causar desde simples contaminações até infecções mais graves. (SANTOS, 2007).

De acordo com os resultados do presente trabalho o óleo essencial de *Croton tetradenius* mostrou-se ativo em compostos antimicrobianos, tendo em vista que o teste *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* apresentou halos de inibição significativos, podendo ser amplamente estudada a respeito dos seus metabólitos secundários.



Figura 2. Teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius* coletado em Triunfo, PE, frente a *Staphylococcus aureus*.

A espécie *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo encontrado na microbiota intestinal humana. Este microrganismo faz parte dos coliformes termotolerantes, devido à sua capacidade de resistir a elevadas temperaturas, ocorrendo também nas fezes de animais. Sua presença em alimentos indica prováveis fontes de contaminação (TORTORA, 2012).

Essa bactéria pode causar doenças intestinais como diarreias, além de doenças extra-intestinais como meningite e infecções urinárias. A transferência de genes de resistência para bactérias da microbiota intestinal humana é apontada como uma das maiores preocupações da saúde pública mundial (GAZAL *et al.*, 2014).

Nos testes da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius*, frente a *Escherichia coli* foi evidenciado halos de inibição menores se comparados aos testes frente a *Staphylococcus aureus*, porém, os resultados também apresentaram sensibilidade desta bactéria ao óleo essencial.

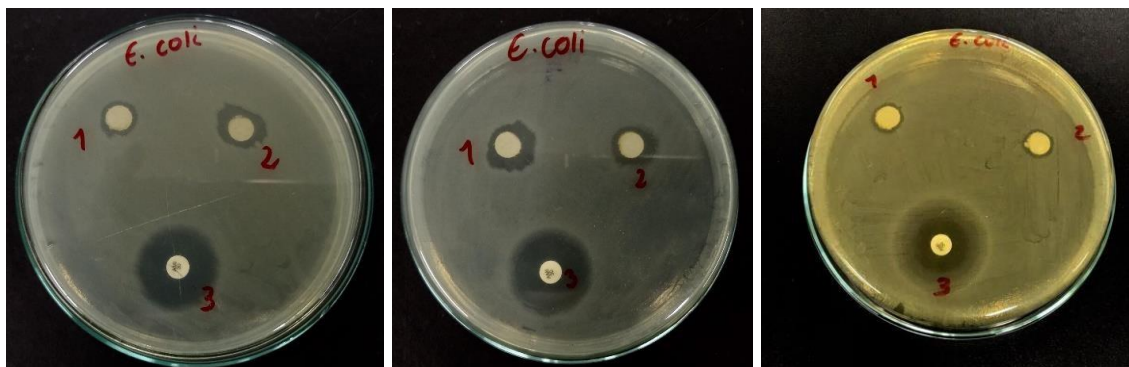


Figura 3. Teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius* coletado em Triunfo, PE, frente a *Escherichia coli*.

Costa e colaboradores, (2008) trabalhando com o óleo essencial de *Croton zehntneri*, evidenciaram atividade antimicrobiana positiva frente a *Staphylococcus aureus*. Também foi observado a atividade antimicrobiana em outras espécies do gênero *Croton*, a exemplo, o *C. pulegioides*, comprovou a atividade biológica com maiores halos de inibição frente às bactérias Gram-positivas, principalmente com *Staphylococcus aureus*, sendo uma espécie que se mostra sensível a várias espécies do gênero *Croton* com potencial antimicrobiano (ARRAIS *et al.*, 2014).

Gonzalez e colaboradores, (1981) no trabalho realizado com o óleo essencial de *Croton sonderianus* identificaram diterpenos na constituição química do produto que exibe atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* entre outras espécies de bactérias.

Dentre as bactérias Gram-negativas, responsáveis por grande parte das infecções nosocomiais resistentes, está a *Klebsiella pneumoniae*, pertencente à família Enterobacteriaceae, que se destaca pela habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos (KOLPA *et al.*, 2018). As doenças causadas por *K. pneumoniae* geralmente estão relacionadas com o estado imunológico do indivíduo e sua gravidade muitas vezes é potencializada devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 2015).

Nos testes o óleo essencial da espécie *Croton tetradenius* não apresentou atividade antimicrobiana contra *K. pneumoniae*, apenas o controle

positivo com o antibiótico Amicacina contendo 30 µg, evidenciando assim a ineficiência do óleo essencial nos volumes testados.

Uma justificativa para que a espécie *Klebsiella pneumoniae* apresente resistência ao óleo essencial pode ser atribuída à ação da sua parede celular, onde as camadas de fosfolipídios as tornam impermeáveis aos compostos lipofílicos. Além disto, existe a bomba de efluxo, outra defesa que os microrganismos apresentam, que consiste em eliminar as substâncias exógenas, defendendo os microrganismos de concentrações inibitórias ou letais dos agentes antimicrobianos (NIKAIDO; VAARA, 1985; NIKAIDO, 1989).

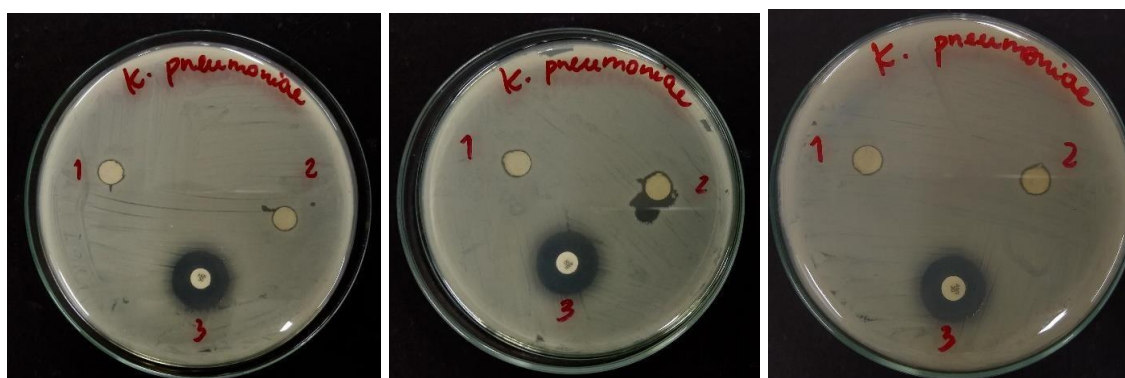


Figura 4. Teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton tetradenius* coletado em Triunfo, PE frente a *Klebsiella pneumoniae*.

Ainda que muitos óleos essenciais e seus constituintes apresentem atividades biológicas frente a diversos microrganismos, mais estudos são necessários, visando maior prospecção sobre seus mecanismos de ação (KURITA *et al.*, 1981).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo constatou que o óleo essencial de *Croton tetradenius* apresenta atividade antibacteriana frente aos isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esses resultados abrem caminho para novas prospecções no controle e tratamento de infecções causadas por agentes patogênicos resistentes aos fármacos convencionais. Futuros estudos são necessários para esclarecer quais componentes são efetivamente responsáveis pela atividade antimicrobiana da espécie *Croton tetradenius* e os mecanismos envolvidos nos processos bioquímicos no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, H.M.A. Diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Química Nova Escola, n. 3, 2001.

AMORIM, E.L.C. Simple and accurate procedure for determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. Functional Ecology, v.2, p. 88-94, 2008.

ANGÉLICO, E. C. Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* kunte e *Croton blanchetianus* Baill. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde Tecnologia Rural. Patos-PB, p. 87, 2011.

ARRAIS, L.G.; LYRA, H.F.S.; BATISTA, D.C.A.; COUTINHO, F.N.; SARAIVA, A.M.; PEREIRA, R.C.A.; PISCIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S.; MELO, S.J. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Campinas, v.16, p.316-322, 2014.

BARBOSA FILHO, J.M. Natural products with antileprotic activity. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, p.141-148, 2007.

BARBOSA, L.C.A; FILOMENO, C.A; ROBSON, R. T. R. R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. Molecules, v. 21, n. 12, p. 1671, 2016.

BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. American Journal of Botany, v. 92, p. 1520-1534, 2005.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

BURTS. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods - a review. International Journal of food microbiology, p. 223- 253, 2004.

CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Antimicrob. Chemother. v. 35, p. 421-424, 1995.

CARVALHO, K.S. Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae) UESB, Programa De Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 85f. Itapetinga-BA, 2016.

COELHO, S.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 135-143, 2004.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

CROTON IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17541>>. Acesso em: 2 Nov. 2019.

DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology-Champaign then Chicago*, v.56, n.11, p.69-78, 2002.

DELBONE, C. A.C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. Congresso de Educação do Norte Pioneiro. 10ª edição. UENP-CCNE-CLA Campus Jacarezinho, 2010.

EUPHORBIACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>>. Acesso em: 3 Nov. 2019.

FARISA, B. S. Antivirulent properties of pnderexplored *Cinnamomum tamala* essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: an in vitro study. *Frontiers Microbiol*, v.8, p.1144, 2017.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*. Santa Catarina, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1997.

GAZAL, L.E.D.S.; PUÑO-SARMIENTO, J.J.; MEDEIROS, L.P.; KOGA, V.L.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G; "Pesquisa da Resistência Antimicrobiana de *Escherichia Coli* Patogênica Extraintestinal (Expec) em Adubo Orgânico de Origem Aviária da Região de Londrina-PR, In: Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene [Blucher Food Science Proceedings, v.1, n.1]. São Paulo: Blucher, p. 131-132, 2014.

GOMES, E. C. Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia, v. 5, n. 2, 2008.

GONÇALVES, A.L. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos 880 vegetais de algumas árvores nativas. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONZALEZ, A.G.; FRAGA, B.M.; HERNANDEZ, M.G.; HANSON, J.R. The ¹³C NMR spectra of some ent-18-hydroxykaur-16-enes. Phytochemistry, v.20, p.846-847, 1981.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and Cross-cultural Usage Patterns. Medicinal Plant Usage, n.15, p. 686-699, 2005.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/triunfo/panorama>. Acesso em: 05/12/2019.

KERROLA K; GALAMBOSI B; KALLIO H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.42, p. 776-781, 1994.

KIM, J.S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed, Nanotech Biol Med, v. 3, n.1, p. 95-101, 2007.

KOLPA, M.; WALASZEK, M.; GNIADEK, A. Incidence, microbiological profile and risk factors of healthcare-associated infections in intensive care units: a 10 year observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. Int. J. Environ. Res. Public Health, v.15, p.112, 2018.

KURITA, N.; MAKOTO, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. Agricultural and Biological Chemistry, v. 45, p. 945-952, 1981.

LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s). Biota Neotrópica, v.8, p. 177-231, 2008.

LUCA, V.D. Utilização de plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra Furada, Santa Catarina, Brasil: uma abordagem etnobotânica. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 12, n. 2, p. 59-65, 2014.

MACHADO, T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Caderno acadêmico*, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

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

MARASCHIN, M.; VEPOORT; R. Engenharia do metabolismo secundário. *Brasília, Biotecnologia, ciências e desenvolvimento*, v. 23, p. 24-28,1999.

MARQUES, D. C; ZUCCHI, P. Comissões farmacoterapêuticas no Brasil: além das diretrizes internacionais, 2006.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microb*, v.31, p.247– 256, 2000.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 33, p. 1831-1836, 1989.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.

OLIVEIRA, A.P.R. Efeito do óleo Essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. Sobre o Trato Gastrointestinal. Dissertação (Mestrado em Ciências fisiológicas), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

OSTROSKY, E.A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

OTHMAN, M.; LOH, H.S.; WIART, C.; KHOO, T.J.; LIM, K.H.; TING, K.N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, v. 84, p. 161–166, 2011.

PAULA, J.C. Trypanocidal activity of organic extract from the Brazilian and Spanish marine sponges. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 651-656, 2015.

PAYO, H.A.; DOMINICIS, M.E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M; SARDUY, R. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. Revista Cubana de Farmácia, v. 35, p: 203-206, 2001.

PEREIRA, P.S.; BORGHI, M.; ARAÚJO, C.F. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. Antimicrobial Agents Chemother., v.59, p.4453-4456, 2015.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PUPPO, M.T. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. Química Nova, v.30, n.6, p. 1446-1455, 2007.

RANDAU, K.P.; FLORÊNCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). Rev. Bras. Farmacogn, v.4, n. 2, p. 89-96, 2004.

RIZSK, A.F.. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 94, p. 293-326, 1987.

ROMEIRO, R. S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. Viçosa: Editora UFC, 2001.

ROQUE, A. A; ROCHA, R.M; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). Revista brasileira de plantas medicinais, Botucatu, v. 12, n. 1, 2010.

ROSA, R.L. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D'Oeste – SC. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 2, p. 306- 310, 2012.

SALANTINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Journal Braz. Chem. Soc. v.18, n.1, p.11-33, 2007.

SANDRI, I.G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A.P.L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chem, v. 103, p. 823-828, 2007.

SANTOS, A.L.D. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SARTOR, R. B. Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos) 99p. Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SILVA, M. G. F. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.). 70p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

SOBRINHO, T.J.S.P. Phenolic content and antioxidant capacity of our Cnidoscolus species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.5 p.2310-2316, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 934, 2012.

TZAKOU, O; SKALTSA, H. Composition and bacterial activity of the essential oil of *Satureja parnassica* subsp *parnassica*. Planta medica, v.69, n. 3, p. 282-284, 2003.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, n.3, v.28, p. 519-528, 2005.

YAP, P.S.X.; YIAP, B.C.; PING, H.C.; LIM, S.H.E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. The Open Microbiology Journal, v. 8, p. 6-14, 2014.