



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS



COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Croton tetradenius* Baill
(EUPHORBIACEAE)

DAIANA NOLASCO MOREIRA FERNANDES

ITAPETINGA - BA
MAIO – 2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**Composição Química, Atividade Antimicrobiana e
Antioxidante do Óleo Essencial de *Croton tetradenius* Bail
(Euphorbiaceae)**

Autor: Daiana Nolasco Moreira Fernandes
Orientadora: Dra Simone Andrade Gualberto
Co-orientadora: Dra. Sandra Lúcia da Cunha e Silva
Co-orientadora: Dra. Lígia Miranda de Menezes

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga – Bahia
Maio – 2016

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e força para superar obstáculos e conseguir alcançar os meus objetivos.

À FAPESB pelo auxílio financeiro possibilitando a realização da pesquisa.

À Prof^a Dra. Simone Andrade Gualberto pela orientação, paciência, confiança, disponibilidade e pelo exemplo profissional.

À Prof^a Dra. Sandra Lúcia da Cunha e Silva pela orientação, atenção, palavras de incentivo no desenvolvimento trabalho.

À Prof^a Dra. Ligia Miranda de Menezes pela orientação e apoio nas etapas do trabalho desenvolvidos no laboratório de microbiologia.

Aos meus pais Cleonice e Deraldo, pelo amor incondicional e pelos seus ensinamentos.

À minha tia Lucy, pela educação, estímulo ao conhecimento e pelo amor.

Ao meu esposo Gidafle pelo amor e cumplicidade ao longo desses anos.

A minha filha Luna e aos sobrinhos, pelo amor e por tornar os momentos de tristeza tão pequenos, diante da alegria que vocês proporcionam.

Aos meus irmãos Ytakaciara, Danusa, Wlisses e William pelo carinho, confiança, amor e amizade.

À equipe dos laboratórios de pesquisa (LAPIN, LAPRON, NECAL e MICROBIOLOGIA) em especial á Marilha, Erica, Maísa, pelo auxílio constante.

Aos meus colegas de curso em especial á Quesia, Karine, Romulo e Arthur.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em ciências ambientais pela oportunidade de realização desse trabalho.

E finalmente a todos os familiares e amigos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. OBJETIVOS.....	13
1.2.1 Objetivo Geral	13
1.2.2 Objetivos Específicos	13
2. Referencial Teórico.....	14
2.1. Bioma Caatinga	14
2.2. Plantas Medicinais e aromáticas.....	16
2.3. O Gênero <i>Croton</i>	17
2.4. Produção de metabólitos secundários pelas plantas.....	20
2.5. Composição química e propriedades dos óleos essenciais	22
2.6. Agentes Antibacterianos Sintéticos e Naturais	23
2.6.1. Métodos de Avaliação da atividade Antibacteriana.....	24
2.6.2 Tipos de bactérias e patogenicidade.....	25
2.6.2.1 <i>Escherichia coli</i>	27
2.6.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.6.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	28
2.6.2.4 <i>Proteus vulgaris</i>	28
2.6.2.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
2.7 Agentes Antioxidantes	29
2.7.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Local de realização dos trabalhos	34
3.2. Obtenção do material vegetal	34
3.3. Extração do óleo essencial	34
3.4. Determinação da composição química do óleo essencial	35
3.5. Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	36
3.5.1 Obtenção dos microrganismos.....	36
3.5.2 Método de difusão em Agar.....	36
3.5.3 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	37
3.7. Avaliação da atividade antioxidante	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Rendimento dos Óleos essenciais	40
4.2. Avaliação da composição química do óleo essencial	40
4.3. Avaliação da atividade Antibacteriana.....	47

4.4. Avaliação da atividade antioxidante	51
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERENCIAS	55

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial das partes aéreas de <i>C. tetradenius</i> coletado no mês de novembro de 2012	41
Tabela 2. Principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial das partes aéreas de <i>C. tetradenius</i> coletado mês de abril de 2015	43
Tabela 3. Estruturas químicas dos constituintes químicos identificados por CG/EM nos óleos essenciais das partes aéreas de <i>C. tetradenius</i>	45
Tabela 4. Resultado da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Croton tetradenius</i> frente a diferentes cepas bacterianas	48
Tabela 5. Resultado da avaliação da atividade antibacteriana do antibiótico Cloranfenicol na concentração de 3,0 mg.mL ⁻¹	48
Tabela 6. Resultados dos testes para determinação da CIM do óleo essencial de <i>Croton tetradenius</i> frente a microrganismos patogênicos	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Croton tetradenius</i>	19
Figura 2. Esquema simplificado da biossíntese dos metabolitos primários e secundários de espécies vegetais.....	21
Figura 3. Ação protetora dos antioxidantes na célula.....	29
Figura 4. Estrutura do DPPH como Radical livre na sua forma reduzida....	33
Figura 5. Extrator de Clevenger modificado.....	35
Figura 6. Teste de determinação da CIM do óleo essencial de <i>Croton tetradenius</i>	49
Figura 7. Resultados de porcentagem de inibição dos radicais livres DPPH provocados pelo óleo essencial de <i>Croton tetradenius</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CG/EM	Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massas
CIM	Concentração inibitória mínima
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UESC	Universidade Estadual Santa Cruz
OE	Óleo essencial
LAPRON	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
OMS	Organização Mundial de Saúde
NUPESQ	Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada
WHO	World Health Organization

RESUMO

FERNANDES, D.N.M. **Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill (Euphorbiaceae)**. UESB, 2016. 74 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

O gênero *Croton* é um dos maiores e mais diversos dentro da família Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.300 espécies, distribuídas nas regiões tropical e subtropical do globo terrestre. Muitas espécies do gênero *Croton* são encontradas no semiárido nordestino, entre elas: *Croton zehntneri*, *Croton argyrophylloides*, *Croton nepetaefolius* e *Croton sonderianus*. Algumas espécies deste gênero produzem óleos essenciais, constituídos por metabólitos secundários predominantemente da classe dos terpenos, os quais apresentam diversas propriedades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, inseticida e antifúngica. Apesar do avanço nos estudos com espécies deste gênero, ainda é crescente a necessidade de pesquisas etno-farmacológico-botânicas sobre espécies vegetais da Caatinga, visando encontrar novas moléculas com propriedades terapêuticas. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a composição química, a atividade antibacteriana e antioxidante dos óleos essenciais de *Croton tetradenius*, obtidos em diferentes períodos, visando ampliar as informações sobre as espécies vegetais encontradas no bioma caatinga da região do semiárido baiano. O material vegetal foi coletado na Floresta Nacional Contendas do Sincorá - BA. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação da parte aérea e sua composição química foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da adaptação do método de difusão em meio sólido e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os microrganismos utilizados foram as cepas de *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. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método do sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Os metabólitos secundários encontrados no óleo essencial da espécie são predominantemente mono e sesquiterpenos. Os microrganismos testados mostraram-se resistentes às amostras, nas diferentes concentrações avaliadas e a capacidade redutora dos óleos frente aos radicais DPPH foi considerada baixa.

Palavras-chave: Atividades biológicas, Caatinga, Metabólitos secundários.

ABSTRACT

FERNANDES, D.N.M. **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity evaluation of *Croton tetradenius* Baill essential oil (Euphorbiaceae)**. UESB, 2015. 74 p. (Master - Master in Environmental Sciences - Area of Concentration in Environment and Development).

Croton genus is one of the largest and most diverse in the Euphorbiaceae family, with about 1.300 species distributed in tropical and subtropical regions of the globe. Many species of *Croton* genus have been identified in the Brazilian semi-arid northeast, including: *Croton zehntneri*, *Croton argyrophyloides*, *Croton nepetaefolius* and *Croton sonderianus*. Some species of this genus produce essential oils consist predominantly of secondary metabolites class of terpenes, which have various biological properties, such as antimicrobial activity, anti-inflammatory, antioxidant, insecticide and antifungal. Despite advances in studies of species of this genus, it is also increasing the need for ethno-pharmaco-chemical-botanical research on plant species of Caatinga Biome, aiming to find new molecules with therapeutic properties. Given the above, this study aimed to evaluate the chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the *Croton tetradenius* essential oil, aiming to expand the information on plant species found in the Bahia semi-arid region. The plant material was collected in Contendas do Sincorá National Forest - BA. The essential oil was obtained by hydrodistillation of the leaves and stems and its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antimicrobial activity evaluation was carried out by adapting the method of diffusion in solid medium and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Microorganisms used were the strains of *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. The antioxidant activity was evaluated by sequestration method of free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl). The secondary metabolites found in the essential oil of the species are predominantly mono and sesquiterpenes. The microorganisms tested were resistant to the samples in different concentrations evaluated and the reducing ability of oils on DPPH radicals was considered low.

Keywords: Biological activities, Caatinga, Secondary metabolites.

1- INTRODUÇÃO

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta, fundamentalmente, influências da cultura indígena, africana e europeia. Embora os estudos sobre plantas medicinais brasileiras tenham aumentado significativamente nas últimas décadas, ainda há muito que se conhecer sobre as espécies vegetais encontradas em território nacional, sobretudo as endêmicas, haja vista sua extensão territorial e ampla biodiversidade (BRITO et al., 2009).

As plantas são organismos que sintetizam uma grande variedade de metabólitos secundários, também chamados de princípios ativos, muitos dos quais se apresentam como produtos naturais biologicamente ativos, que podem apresentar diferentes ações biológicas sobre outras espécies (AGNES et al., 2005).

A Caatinga, por apresentar um habitat característico, abriga uma variedade de plantas medicinais e aromáticas, onde diversas de suas espécies são largamente empregadas na elaboração de produtos fitoterápicos (MAIA, 2004).

A organização mundial de saúde classifica as plantas medicinais como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos”, sendo consideradas não apenas compostos bioativos, mas como protótipos para a descoberta de novas moléculas (BRASIL, 2006).

Muitas das espécies encontradas no bioma caatinga pertencem ao gênero *Croton*, sendo um dos maiores e mais diversos da família Euphorbiaceae, distribuídos na região tropical e subtropical, sendo rico em constituintes químicos (SALATINO et al, 2007).

O gênero *Croton* é composto por diversas espécies, entre elas: *Croton zehntneri*, *Croton argyrophyllodes*, *Croton nepetaefolius*, *Croton sonderianus*, *Croton argyrophyllus*, *Croton linearifolius*, *Croton heliotropopholius*, *Croton triqueter*, *Croton tetradenius*, entre outras, encontradas no semiárido nordestino. Muitas dessas espécies são aromáticas, produtoras de óleos essenciais, que são constituídos por misturas complexas de compostos, com propriedades biológicas características, como atividade antimicrobiana e antioxidante (OLIVEIRA, 2008).

Dentre as atividades biológicas apresentadas pelos óleos essenciais, a atividade antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência de populações de bactérias, especialmente de origem hospitalar (OLIVEIRA et al., 2006). Outra atividade de interesse é a antioxidante, promovida por compostos capazes de minimizar os efeitos deletérios provocados pelos radicais livres sobre as células e, conseqüentemente, de inibir ou retardarem o desenvolvimento de doenças.

Portanto, estudos relacionados às propriedades químicas e farmacológicas, bem como de etnobotânica são de grande importância para o conhecimento e confirmação das propriedades terapêuticas dessas espécies, visando à ampliação do conhecimento científico e a preservação dos biomas onde elas são encontradas.

Diante do exposto, o presente trabalho visou avaliar a composição química, a atividade antioxidante e a atividade antibacteriana dos óleos essenciais do *Croton tetradenius*, com o intuito de ampliar as informações sobre as propriedades farmacológicas dessa espécie, encontrada no bioma caatinga da região do semiárido baiano.

1.1- OBJETIVOS

1.2.1- Geral

Realizar a prospecção química e biológica de óleos essenciais da parte aérea de *Croton tetradenius* obtidos em diferentes períodos, visando conhecer sua composição química e seu potencial para aplicação como antibacteriano e antioxidante natural.

1.2.2- Específicos

- Avaliar a composição química de óleos essenciais do *Croton tetradenius* por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais do *Croton tetradenius* sobre diferentes cepas de microrganismos, pelo método de difusão em meio sólido e determinar sua concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas testadas;
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais do *Croton tetradenius* pelo método do sequestros de radicais livres DPPH.

2- REFERENCIAL TEORICO

2.1. Bioma Caatinga

O Bioma Caatinga, localizado predominantemente na região Nordeste do Brasil, é exclusivamente brasileiro e abriga uma ampla biodiversidade. Com grande variabilidade de flora, apresenta plantas lenhosas arbustivas, plantas herbáceas anuais e espécies endêmicas (ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002; BRASIL, 2003).

O Ministério do Meio Ambiente considera a Caatinga como um dos biomas mais amplos encontrado em território nacional, abrangendo uma área de cerca de 734 mil km². No entanto, nos últimos quinze anos, a Caatinga perdeu cerca de 40.000 Km² de sua área, transformando-se em deserto, por causa da intervenção do homem na região. Aproximadamente 40% da área original ainda permanece com uma cobertura da vegetação nativa, sendo boa parte de sua cobertura vegetal usada para a extração de lenha, para a agricultura, entre outras (BRASIL, 2002; SILVA et al., 2004; GARIGLIO, 2010).

As áreas com uma maior preservação são escassas, fragmentadas e comumente situadas nos pontos mais inacessíveis. Segundo o Sistema Estadual de Informações Ambientais (SISTEMA) da Bahia, 100.000 ha são degradados anualmente. Além disso, muitas das áreas avaliadas como primárias são, na verdade, áreas de exploração desde o século XVI (SISTEMA, 2007). Como consequência desta degradação, torna-se difícil a identificação de características primordiais do bioma (FRANÇA et al., 2003).

Mesmo com tanta degradação, a Caatinga é ainda um habitat característico para plantas medicinais e aromáticas, possui diversas espécies que são largamente empregadas na medicina popular, bem como na elaboração de produtos fitoterápicos (MAIA, 2004). As plantas medicinais são utilizadas por muitas comunidades tradicionais, curandeiros, empresas fabricantes de essências e aromas, indústrias de alimentos, dentre outros.

Em vista disto, o número de pesquisas sobre plantas com propriedades medicinais da região semiárida do Nordeste do Brasil tem aumentado, e o crescimento da procura por plantas medicinais gera preocupações para as comunidades do entorno, sobretudo quando as espécies são coletadas para comercialização de forma não sustentável (GARIGLIO, 2010).

Para a TRAFFIC (Análise de Registros de Flora e Fauna em Comércio), a preservação das plantas medicinais é de importância mundial, sendo de prioridade nas suas atividades, com destaque em reforçar a proteção e conservação dos recursos naturais com manejos efetivos, valorizando a cultura e economia (SILVA, 2011; SILVA et al., 2014).

No Brasil, existem muitas espécies de plantas endêmicas coletadas de forma exploratória, que estão incluídas na lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção, como é o caso do Jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*, *P. microphyllus* e *P. trachylophus*) (SBB, 1992).

O órgão responsável pelo controle das atividades de comércio de plantas medicinais é o IBAMA, com função de aplicar políticas ambientais e normativas. A Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9605/98) possibilitou à legislação ambiental um grande avanço, onde podem ser aplicadas punições para quem realiza crimes contra o meio ambiente (BRASIL, 1998).

A Portaria nº 122 de 19 de março de 1985 do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal – IBDF rege diversas atividades, tais como a coleta, transporte, comercialização e industrialização de plantas com propriedades medicinais, aromáticas ou tóxicas de cada região e a realização das atividades previstas nesta Portaria necessitam de registro e da autorização do IBAMA (BRASIL, 1995; MARTINS, 2001).

Assim, os programas da TRAFFIC trabalham com o tema da comercialização de plantas medicinais, com o interesse de garantir a segurança e conservação de recursos, procurando aprimorar o conhecimento sobre a atividade comercial destas espécies e agenciar um manejo apropriado e a integração de esforços (SILVA, 2011).

Muitos trabalhos indicam que as populações pertencentes a este bioma, em sua grande maioria, precisam diretamente dos recursos naturais disponíveis para sua sobrevivência (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002; ALBUQUERQUE e LUCENA, 2004).

Assim, diante da potencialidade dos recursos naturais disponíveis é interessante traçar planos de conservação e recuperação das áreas exploradas, complementando com trabalhos de etnobotânica, visando à preservação, também, dos conhecimentos tradicionais sobre os recursos naturais (DIEGUES, 2000).

2.2. Plantas medicinais e aromáticas

No mundo aproximadamente 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais para o atendimento de suas necessidades básicas de saúde (BAGETTA et al., 2010, SPADACIO et al., 2010). O uso dessas plantas no tratamento das enfermidades é uma prática realizada desde tempos remotos, onde o homem, pela sua necessidade e carência de outras fontes, buscava na natureza soluções para melhorar sua própria condição de vida, conquistando uma maior longevidade (MUKHERJEE et al., 2010).

No Brasil existem iniciativas do governo que buscam estimular o uso do conhecimento etnobotânico para cuidados básicos com a saúde. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é um exemplo, se baseando nos fundamentos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, buscando ampliação das opções terapêuticas e melhoria da saúde dos usuários do Sistema Único de Saúde – SUS, bem como a preservação do conhecimento das comunidades tradicionais e a valorização do uso sustentável da biodiversidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

As plantas usadas tradicionalmente para a preservação da saúde constituem uma importante fonte para a obtenção de novos compostos biologicamente ativos (OLIVEIRA et al., 2006), bem como para a produção de um grande número de fármacos, provenientes direta ou indiretamente de plantas (SILVA FILHO et al. 2009).

Os compostos biologicamente ativos produzidos pelas plantas são denominados metabólitos secundários, muitos dos quais são utilizados como fármacos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, dos 252 medicamentos reconhecidos como básicos e essenciais, 11% são de origem vegetal (GURIB- FAKIM, 2006). Dos produtos biologicamente ativos obtidos das plantas, os óleos essenciais são um exemplo, apresentando uma constituição química complexa (GONÇALVES et al., 2003, SOUZA, et al., 2010).

Os óleos essenciais exercem diversas atividades essenciais à sobrevivência do vegetal, sendo uma delas a defesa contra a ação de microrganismos patogênicos (OLIVEIRA, et al., 2006).

As avaliações das atividades inseticida, bactericida, fungicida e antioxidante de óleos essenciais têm demonstrado resultados importantes. Portanto, é de extrema importância a caracterização botânica das espécies vegetais, através de estudos de bioprospecção, que visem a determinação de sua composição química e suas propriedades farmacológicas (CUNHA; RIBEIRO; ROQUE, 2007).

2.3. Gênero *Croton*

O gênero *Croton* foi proposto por Linnaeus em 1753 ao descrever 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Depois dessa proposta, o gênero já recebeu atenção de diversos estudiosos, destacando-se Webster (1992, 1993, 1994, 2001), que propôs a classificação infragenérica mais recente para o gênero (SILVA et al., 2009).

Este gênero possui cerca de 1.300 espécies, popularmente conhecidas como velames ou marmeleiros e são largamente distribuídas em regiões quentes da Terra, ocorrendo principalmente nas regiões sudeste e nordeste do Brasil. Diversos novos táxons de *Croton* têm sido propostos para o Brasil, desde a revisão de Müller (1873). Estima-se que no Brasil existem em média 350 espécies e no Nordeste um total de 52 (SALATINO et al. 2007; CORDEIRO e CARNEIRO TORRES, 2006).

Entre as principais características do gênero *Croton* estão as inflorescências, as flores femininas com pétalas reduzidas, látex não-leitoso, estames encurvados no botão e indumentos do tipo estrelados, escamiforme ou simples (LIMA,2006).

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).

Quimicamente o gênero *Croton* é diverso, evento que qualifica as espécies como amplamente promissoras para estudos de prospecção de substâncias com propriedades farmacologicamente ativas, sendo assim, alvo de pesquisas em estudos fitoquímicos e biológicos (RANDAU et al., 2004). As espécies desse gênero são ricas em metabólitos secundários, tais como, terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos, e possuem um grande potencial econômico, principalmente para a indústria farmacêutica, devido às propriedades medicinais que estes metabólitos conferem à muitas espécies (RANDAU et al., 2004; PAYO, et al., 2001).

Muitas dessas espécies tiveram suas atividades biológicas comprovadas, tais como atividade inseticida, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, dentre outras. E entre os principais compostos biologicamente ativos das espécies de *Croton* destacam-se os terpenoides, fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides e tocoferóis (SILVA et al., 2011).

Na Amazônia, algumas espécies com látex, tais como, *Croton urucurana*, *C. palanostigma* e *C. blanchetianus* são vastamente utilizadas por comunidades no tratamento de diversas doenças (POLLITO et al., 2004, WEBSTER, 2004). Também existem outras espécies nativas, que representam um importante recurso medicinal, a exemplo do *C.*

cajucara Benth, cujos extratos possuem atividades antioxidante e antilipidêmica, sendo usada no combate da diabetes, diarreias, afecções do trato gastrointestinal, malária, febre, no controle de colesterol, dentre outras (MATOS, 2011).

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. campestres*, *C. heliotropiifolius*, *C. rhamnifolioides*, *C. grewioides*, *C. sellowii* e *C. zehntneri* são usadas popularmente como inseticidas naturais, purgantes, antiespasmódicos, antiinflamatórios e antibióticos (VILA-VERDE et al., 2005, MACIEL et al. 2007; CORDEIRO E CARNEIRO TORRES, 2009).

Extratos da espécie *Croton lecheri* Müll. Arg., popularmente conhecida como “sangue-de-drago”, possuem atividades antioxidante, antimicrobiana, mutagênica e antiviral (GUPTA et al., 2008, LOPES e LOPES et al., 2004). Outras espécies, como, o *Croton urucurana* apresentam atividade antinociceptiva (RAO et al., 2007), o *Croton campestres* atividade moluscicida (BABILI et al., 2006) e o *Croton cuneatus* atividade anti-inflamatória (SUÁREZ et al., 2006).

Também existe uma variedade de espécies aromáticas pertencentes ao gênero *Croton*, que produzem óleos essenciais. As espécies de *Croton* produtoras de óleos essenciais são ricas em mono e sesquiterpenoides e fenilpropanoides (PALMEIRA et al. 2006; PESSOA, et al. 2012).

Esses compostos voláteis são responsáveis pelo aroma dessas plantas, e apresentam uma grande diversidade estrutural, o que aumenta a probabilidade dos óleos essenciais serem verdadeiras fontes de substâncias bioativas (RANDAU et al., 2004).

MORAIS (2006), em suas pesquisas com espécies do Ceará confirmou a atividade antioxidante do óleo essencial do *C. zehntneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides*.

O *Croton argyrophyloides* Mull. Arg. é utilizado na medicina popular no tratamento de diversas doenças, como diabetes, inflamação, dores nas costas, doenças venéreas, intoxicação e dores de cabeça (ALBUQUERQUE et al., 2007). O óleo essencial desta espécie apresenta uma elevada atividade antifúngica frente ao *Microsporium canis* e uma baixa toxicidade, sendo uma promissora fonte de novos agentes fitoterápicos. Outras atividades biológicas atribuídas ao seu óleo essencial foram relatadas, incluindo sua capacidade antioxidante, larvicida, e antipasmódica (FONTENELE et al., 2008; MORAIS et al., 2006; AGUIAR et al., 2012).

Espécies de *Croton jacobinensis* tiveram suas atividades avaliadas e confirmadas. Estas espécies são restritas ao semiárido brasileiro, tendo o nome popular de velame roxo e velame preto (SILVA et al., 2010). Estudos com extratos etanólicos dessa espécie demonstraram sua atividade inseticida (PONTES et al., 2011). Outro estudo com componentes voláteis de óleos essenciais de caules e folhas dessa espécie evidenciaram atividade acaricida relevante contra *Tetranychus urticae* (NEVES e CAMARA, 2011). O *Croton jacobinensis* também apresenta atividade antimicrobiana comprovada, sobre cepas de *Neisseria*, de *Nocardia*, e de *Brucella* (LIMA et. al., 2001).

O *Croton nepetaefolius* possui atividade sobre cepas de *Streptococcus* sp., oriundos da mucosa oral e produtores de biofilme (TEIXEIRA et al., 2011). Já o *Croton zehntneri* apresenta atividade antimicrobiana importante contra *Staphylococcus aureus*, entre outros microrganismos, atividade anti-helmíntica e efeito cardiovascular (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2006; COSTA et. al. 2008).

O *Croton tetradenius* Baill (Figura 1) é uma espécie endêmica da região Nordeste, ocorrendo em vegetação de caatinga nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe. É encontrada, geralmente, em florestas perenifólias sobre solo arenoso ou pedregoso (LUCENA, 2009; CARNEIRO-TORRES, 2009).

Esta espécie possui quatro a seis nectários cilíndricos no pecíolo, que é a característica mais facilmente utilizada no seu reconhecimento. As flores são observadas nos meses de fevereiro, março, maio e setembro e os frutos em fevereiro e maio (LUCENA e ALVES, 2000).



Figura 1. *Croton tetradenius*

Fonte: A autora

Carvalho e colaboradores (2015), ao analisarem os hidrolatos do óleo essencial de *Croton tetradenius*, relataram a atividade tóxica para as larvas do *A. aegypti*, demonstrando um potencial de aplicação para o bioproduto. Foram também identificados no óleo essencial de *Croton tetradenius*, monoterpenos e sesquiterpenos como constituintes majoritários (SANTANA, 2011). No entanto, sua composição química e atividades biológicas precisam ser mais pesquisadas, pois ainda existem poucos trabalhos na literatura sobre esta espécie.

Trabalhos mais recentes têm reunido informações sobre o uso medicinal, químico e farmacológico das espécies de *Croton*, evidenciando o grande potencial deste gênero. Porém, a ampliação dos estudos químicos e farmacológicos são de suma importância, devido à grande distribuição do gênero no país e ao crescente número de espécies de *Croton* identificadas (SALATINO et al., 2007).

2.4. Produção de metabólitos secundários pelas plantas

O desenvolvimento, adaptação e disseminação das espécies vegetais são decorrência da realização de suas reações metabólicas e os compostos produzidos durante estes processos são denominados metabólitos primários e secundários. Dentre os metabólitos primários encontram-se os açúcares, proteínas e lipídios, que são essenciais a todos os seres vivos e apresentam funções definidas. Já os metabólitos secundários, tais como os alcaloides, terpenoides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e ligninas, apresentam estruturas complexas e são encontrados em concentrações bem menores nas plantas, sendo sua distribuição restrita a algumas espécies. Os metabólitos secundários apresentam propriedades biológicas muito variadas e são responsáveis, dentre outras funções, pela adaptação e disseminação das espécies vegetais (CASTRO et al. 2004).

Os metabólitos secundários têm aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromatizantes, inseticidas, bactericidas, fungicidas, dentre outras. Esses compostos são diversos em estruturas e tamanhos, sendo distribuídos por todo o reino vegetal (BURT, 2004; COLLIN, 2001; VERPOORTE e MEMELINK, 2002). São produzidos por plantas, insetos, microrganismos e algumas espécies de animais, podendo constituir modelos em que o homem se inspira para sintetizar, em laboratório, compostos similares com diferentes propriedades e aplicações (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Nas plantas, os metabólitos secundários são característicos de determinadas espécies, sendo resultado da adaptação às condições ambientais, necessários à sua sobrevivência e perpetuação em ambientes hostis (VIEGAS JR., 2003).

As principais vias biosintéticas para a produção de metabólitos secundários nas plantas são: a rota do ácido chiquímico, o qual é precursor de vários compostos aromáticos (Figura 2); a rota do acetato, que é precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos e prostaglandinas e a rota dos aminoácidos, responsável pela formação dos alcaloides. Os terpenos são produzidos a partir de isoprenoides, obtidos através da via do mevalonato, sintetizados a partir do acetil-CoA (TAIZ e ZEIGER, 2009).

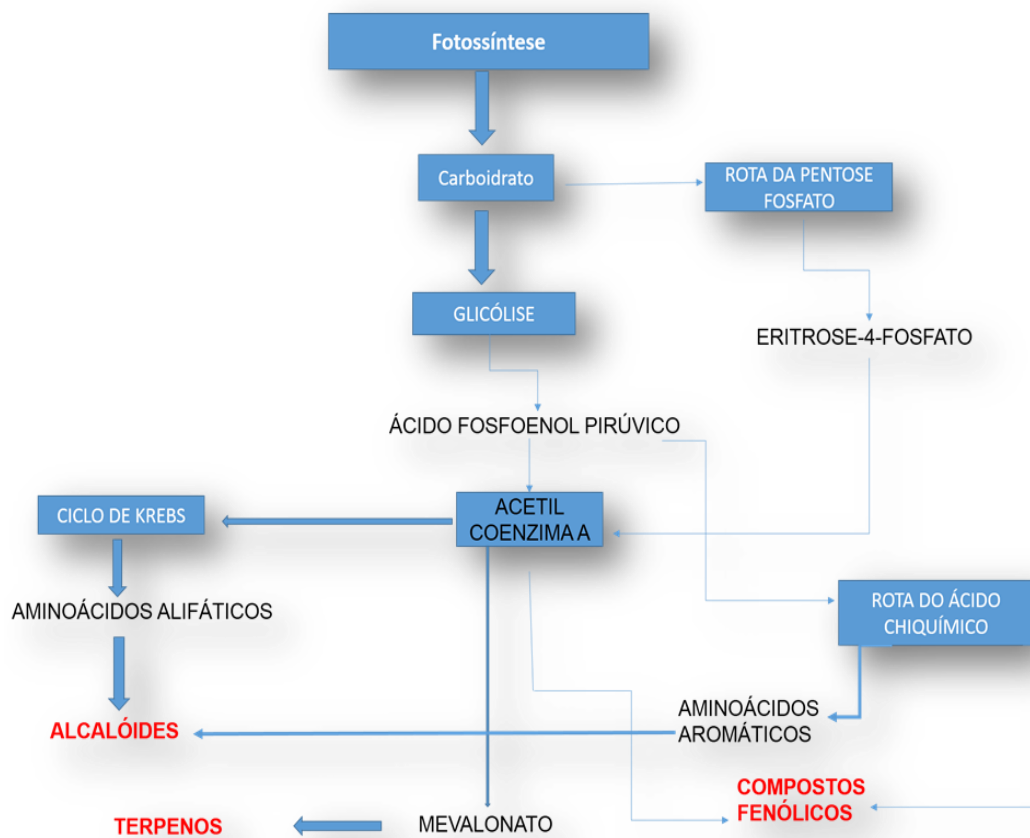


Figura 2. Esquema simplificado da biossíntese dos metabólitos primários e secundários de espécies vegetais.

Fonte: Adaptado de TAIZ e ZEIGER (2009)

As principais classes de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides. Estes metabólitos são de grande interesse comercial, devido às atividades biológicas que apresentam, sendo considerados compostos naturais farmacologicamente ativos (BESSA et al., 2007).

2.5. Composição química e propriedades dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies vegetais, apresentando-se como líquidos voláteis a temperatura ambiente, contribuindo para o aroma das plantas que os produzem. Eles são normalmente elaborados nas folhas, mas podem ser encontrados em flores, inflorescências, sementes, gravetos, cascas, frutos e raízes, sendo armazenados em espaços extracelulares. Quimicamente, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, na sua maioria odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2007; PORTO et al., 2008).

A composição e a concentração das substâncias que constituem os óleos essenciais podem sofrer influência de fatores como a radiação, temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, época de coleta e outros. Os óleos essenciais são produtos complexos e, dependendo da espécie, podem conter mais de 100 constituintes químicos, possuindo um ou dois componentes majoritários que lhes confere os sabores e odores próprios. Os constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais pertencem principalmente à classe dos terpenos, acrescidos de moléculas menores, como ésteres de ácidos graxos, fenilpropanoides, álcoois, aldeídos, cetonas de cadeia curta e, em alguns casos, hidrocarbonetos alifáticos (SIMÕES et al., 2007).

Os terpenos, principais constituintes dos óleos essenciais, são divididos em diferentes subclasses, de acordo com o número de unidades de isopreno presentes em suas estruturas, como: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) e, quando ocorre a adição de elementos adicionais nas suas estruturas, geralmente o oxigênio, são denominados terpenoides (FRANZ, 2010; PADUCH et al., 2007).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são muitas e estes apresentam vantagens importantes quando comparados a outros produtos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideais para uso em nebulizações e em inalações. A sua volatilidade e o baixo peso molecular dos seus constituintes permitem que eles sejam absorvidos e rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI e CZEPAK, 2008).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais é atribuída aos monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, a exemplo dos monoterpenos oxigenados linalol, 1,8-cineol, neral e geranial e aos compostos fenólicos, como timol e mentol (SOUZA et al.,

2003; SOUZA et al., 2006; BANDONI e CZEPAK, 2008), que agem como agentes de inibição do crescimento de microrganismos.

Um dos possíveis mecanismos de ação desses compostos ocorre pela interação dos componentes do óleo com a dupla camada fosfolipídica da parede da bactéria, o que produz um aumento na sua permeabilidade, acarretando na perda dos componentes da célula. Isso ocasiona mudanças no sistema enzimático celular, que podem gerar alterações na produção energética, destruição do material genético e na síntese dos constituintes estruturais da célula (KUMAR et al., 2008).

Outro fator de extrema importância no que se refere aos óleos essenciais é que eles apresentam um risco mínimo de desencadear resistência nos microrganismos patogênicos, uma vez que estes produtos são uma mistura complexa de diversas substâncias com propriedades antimicrobianas atuando por múltiplos mecanismos (BAKKALI et al., 2008; OKE et al., 2009).

2.6. Agentes Antibacterianos Sintéticos e Naturais

Os antimicrobianos são compostos que têm ação sobre fungos e bactérias, e são responsáveis pela eliminação ou diminuição das taxas de morbidade e mortalidade causadas por doenças infecciosas causadas por microrganismos (SILVA, 2007).

O interesse pelas plantas com propriedades antibacterianas deve-se ao aumento da resistência dos microrganismos aos fármacos sintéticos presentes no mercado. Devido aos crescentes casos de resistência e o surgimento de superbactérias, a utilização de produtos naturais de origem vegetal surge como uma alternativa, pois os vegetais sintetizam uma diversidade de compostos químicos bioativos, em relação aos produtos sintéticos (GEORGOPAPADAKOU 2005; NOVAIS et al., 2003).

Nas últimas décadas observou-se um aumento significativo na utilização de produtos naturais para o tratamento de enfermidades, tendo ampliado globalmente sua popularidade em países em desenvolvimento e naqueles onde a medicina convencional é predominante nos sistemas públicos de saúde (SILVEIRA et al., 2008).

Pesquisas realizadas com plantas comprovam que alguns metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, a exemplo dos flavonoides, têm atividade antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2000).

Os antimicrobianos se diferenciam pelo seu mecanismo de ação, sendo classificados de acordo com seu local de atuação. Assim, existem antimicrobianos que atuam na parede

celular, na síntese de DNA, na síntese proteica celular e os que afetam a atividade enzimática intracelular (MOREIRA, 2004).

Alguns compostos desempenham seu efeito antimicrobiano através de alterações na estrutura da parede celular do microrganismo (SAAD, 2006; EDRIS, 2007). Estas interações promovem uma interferência na atividade da bomba de prótons, possivelmente alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática (OUSSALAH et al., 2006 e PASQUA et al., 2007). Isto pode provocar interrupção nos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, etapas da fosforilação, translocação de proteínas e outras reações que dependem das enzimas, acarretando na perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, portanto, provocando a morte bacteriana (DORMAN e DEANS, 2000).

Além deste, existe também outro importante mecanismo de ação, que inclui a desnaturação das proteínas citoplasmáticas e inativação de enzimas celulares que conduzem à morte das células bacterianas (BURT, 2004).

No entanto, independentemente do mecanismo de ação, é preciso que todos os antimicrobianos tenham amplo espectro de ação, toxicidade seletiva e mecanismo de ação específico, atuando particularmente nas células-alvo (MURRAY, et. al., 2002).

2.6.1 Métodos de Avaliação da atividade antibacteriana

Vários métodos laboratoriais podem ser utilizados para testar a sensibilidade de bactérias frente aos agentes antimicrobianos.

O método de difusão em ágar tem por finalidade testar patógenos de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas (VALGAS, 2002). A metodologia tem por objetivo fornecer dados iniciais da ação antimicrobiana de produtos naturais, pela facilidade e rapidez de execução. Este teste é fundamentado na presença ou ausência de um halo de inibição produzidos pelas amostras testadas, é de fácil execução, demonstrando linearidade e precisão (ESMERINO, 20004).

As substâncias testadas por este método na sua maioria são de natureza hidrofílica, com exceção dos óleos essenciais, sendo necessária sua diluição com solventes e agentes emulsificadores. Os resultados obtidos são confiáveis quando os testes de difusão em ágar usam o princípio da metodologia padronizada, com as medidas dos diâmetros dos halos de inibição correlacionados com as concentrações inibitórias mínimas (CIMs), frente às cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (KLANČNIK et al., 2010).

Os métodos de diluição em tubos ou em placas são testes semiquantitativos, onde se realizam diluições seriadas de forma quantitativa do produto testado e determina-se a concentração inibitória mínima (VALGAS, 2002). É o método padronizado indicado atualmente pelo Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), descrito originalmente por Bauer e colaboradores (1966). Porém, esse método e suas variantes devem ser escolhidos conforme cada amostra a ser testada, onde as adaptações devem ser padronizadas e validadas para se conseguir reprodutibilidade e garantir, assim, que os resultados tenham confiabilidade.

2.6.2 Tipos de Bactérias e patogenicidade

Bactérias são microrganismos unicelulares, procariotos, encontrados em todos os ambientes, que podem ou não possuir patogenicidade e provocar infecções nos animais e vegetais. As características desses microrganismos, sua dose infectante e o meio onde se encontram são fatores cruciais para seu desenvolvimento e proliferação (SILVA et al., 2014).

As bactérias possuem uma organização celular relativamente simples, formadas basicamente por uma membrana plasmática recoberta por uma parede celular, com seu material genético localizado normalmente em uma região do nucleóide, existindo, em alguns casos, moléculas menores de DNA chamadas de plasmídeos (TORTORA, 2012).

Existe também nas bactérias o processo de recombinação genética, que permite que elas se transformem em microrganismos capazes de degradar determinadas substâncias, como, por exemplo, alguns fármacos, tornando-as resistentes aos mesmos (GWENDOLYN, 2005).

As bactérias podem ser classificadas a partir das características da parede celular em Gram positivas e Gram negativas. As Gram-positivas possuem paredes celulares mais simples, compostas por aproximadamente 90% de peptidoglicanos, diferindo das Gram-negativas, que contêm uma quantidade menor de peptidoglicanos, sendo sua estrutura mais complexa por ter uma parede externa de lipopolissacarídeos, tornando os microrganismos mais resistentes. Assim, de acordo com a estrutura da parede celular serão coradas de vermelho ou violeta, em conformidade com a técnica de Gram, sendo classificadas em Gram-positivas as bactérias que tiverem coloração violeta e Gram-negativas com a cor avermelhada (TRABULSI et al., 1999; TORTORA, 2012).

Nos seres humanos, alguns microrganismos fazem parte da microbiota normal, onde auxiliam no bom funcionamento do organismo. Entretanto, algumas espécies de

microrganismos nocivos a sua saúde podem causar doenças de diversos tipos, como intoxicações do trato gastrointestinal e urinário (GODINHO, 2010).

Doenças infecciosas causadas por bactérias são ainda uma das principais causas de morte no mundo. O desenvolvimento de resistência por esses microrganismos aos antibacterianos comumente encontrados no mercado, associado aos efeitos colaterais que seu uso por tempo prolongado e em altas dosagens produz, aumenta a necessidade de descoberta de novos fármacos mais ativos e seletivos contra bactérias patogênicas (HALL-STOODLEY et al., 2009).

Algumas espécies bacterianas possuem alto potencial para desenvolver cepas resistentes a vários antibióticos, que podem surgir de forma natural ou adquirida. A natural está relacionada com características da espécie bacteriana, própria da herança genética do microrganismo e não apresenta riscos à saúde. Já a resistência adquirida pode trazer vários problemas para o estado clínico dos indivíduos, visto que surge quando uma bactéria que anteriormente era sensível a uma dada droga torna-se resistente à mesma, sendo necessária a busca por novos agentes terapêuticos (TORTORA, 2012; NETO, 2000).

Também alguns autores relacionam a resistência de muitos microrganismos ao uso descomedido dos antibióticos por décadas pela indústria agrícola, pecuária e no ambiente doméstico para tratar ou inibir rapidamente a maioria das infecções. Na sua maioria o mau uso dos medicamentos antimicrobianos na medicina humana e animal, tem sido responsável pela seleção sem precedentes na evolução microbiana (DUARTE, 2006; WHITE, 2002). Com isto, a sociedade está contribuindo para o aparecimento de doenças infecciosas que apresentam agentes etiológicos resistentes a muitos e, algumas vezes, a todos os agentes antimicrobianos usados pela medicina (SOUZA et al., 2005). O crescimento da resistência antimicrobiana causa um aumento na morbidade e mortalidade de indivíduos e o aumento dos custos das instituições de saúde com os pacientes (DANCER, 2001; KUNER e OHO, 2003).

Assim, existe uma gama 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. Determinados microrganismos apresentam maior sensibilidade aos óleos essenciais, dentre eles, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* (SANDRI et al., 2007; PRABUSEENIVASAN et al., 2006).

2.6.2.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo encontrado na microbiota intestinal humana e de outros animais de sangue quente. Este microrganismo faz parte dos coliformes termotolerantes, devido à sua capacidade de resistir a elevadas temperaturas, ocorrendo nas fezes dos animais. Sua presença em alimentos indica provável contaminação por fezes ou esgoto (TORTORA, 2012).

Estas bactérias causam doenças intestinais como diarreias e podem provocar doenças extra-intestinais como septicemia, meningite e infecções urinárias e, portanto, são conhecidas como *E. coli* patogênicas extra-intestinais. A transferência de genes de resistência para bactérias da microbiota intestinal humana é hoje uma das maiores preocupações da saúde pública mundial (GAZAL et al., 2014).

2.6.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus é um gênero de bactérias Gram-positivas vastamente difundidas na natureza, sendo parte da microflora da pele e mucosas de animais. Algumas espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas como agentes etiológicos de muitas infecções oportunistas humanas (NOSTRO et al., 2004).

As espécies de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* são espécies mais comuns em provocar infecção em humanos e nos animais. Estas espécies são responsáveis também por causar diferentes tipos de intoxicações, a exemplo do *S. aureus*, que tem sido o microrganismo mais comum de infecções supurantes que podem atacar diversos tecidos e/ou órgãos, causando furúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite, artrite bacteriana, dentre outras (PEREIRA et al., 2004).

Das espécies com potencial para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos e aumentar a sensibilidade aos agentes antimicrobianos, os estafilococos têm sido reconhecidos como tendo crescente e preocupante resistência antimicrobiana (GEORGOPAPADAKOU, 2002; NOSTRO et al., 2004). Diante disso, se faz necessário buscar novas moléculas sintetizadas por plantas, ou produtos naturais como os óleos essenciais, ativos contra bactérias patogênicas (CARVALHO, 2012).

2.6.2.3 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faz parte de um gênero das bactérias Gram-positivas que inclui diversas espécies residentes no trato gastrointestinal, da vagina e da cavidade bucal como comensais. Algumas de suas espécies, como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, podem causar infecções urinárias e endocardite. Estes microrganismos são facultativos, têm pouca exigência quanto ao seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperaturas de 10 a 45°C, e podem sobreviver a 60°C por alguns minutos (KAYAOGLU et al., 2004).

Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium*. *E. faecalis* ocorre com frequência em canais obturados, exibindo sinais de periodontite crônica apical. Estudos in vitro comprovaram a capacidade do *E. faecalis* em penetrar nos túbulos dentinários. É um microrganismo que possui em sua parede celular o ácido lipopoliteicóico (LTA), que ajuda na ligação das bactérias às células eucarióticas, incluindo linfócitos (ZOLETTI et al., 2006; ROCAS et al., 2004).

2.6.2.4 *Proteus vulgaris*

O gênero *Proteus* engloba bacilos Gram-negativos encontrados amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da flora normal do trato gastrointestinal humano. O gênero é composto por cinco espécies, nomeadas por: *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens* e *P. hauseri* (BIEDENBACH et al., 1994).

Estes microrganismos estão relacionados com infecções graves em seres humanos, juntamente com espécies de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*.

Proteus também é encontrado em vários habitats, incluindo instalações de hospitais. No ambiente hospitalar é fácil colonizar pele e mucosa oral de pacientes e funcionários (SMITH et al., 2009; FAZENDEIRO et al., 1985).

2.6.2.5 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é um patógeno Gram-positivo, anaeróbico facultativo, encontrado no trato respiratório, podendo causar infecções invasivas e não invasivas, provocando grandes taxas de morbi-mortalidade, especialmente em grupos de risco, como em crianças menores de cinco anos de idade e idosos. A *S. pneumoniae* é responsável, em média, por 2 milhões de pneumonias por ano, que levam a morte em todo o planeta, o que corresponde a cerca de metade das mortes por pneumonia em crianças menores de cinco anos e idosos (OBARO E ADEGBOLA, 2002; KADIOGLU et al., 2008).

O *Streptococcus pneumoniae* é o principal agente etiológico da pneumonia bacteriana, exceto no período neonatal. A sua estrutura bioquímica consiste de membrana celular com dupla camada lipídica envolvida por uma parede bacteriana que é formada de peptídeoglicano associado ao polissacarídeo (KADIOGLU et al., 2008).

2.7. Agentes Antioxidantes

Compostos antioxidantes possuem a capacidade de neutralizar os radicais livres produzidos pelas células, através da doação de radicais hidrogênio ou elétrons, que irão reagir e eliminar a ação destrutiva destas espécies. No organismo humano existem dois sistemas antioxidantes de proteção contra os radicais livres. Um inclui antioxidantes internos, formados por enzimas, como a catalase, a peroxidase e a superóxido dismutase (Figura 3). O outro sistema é exógeno, como é o caso dos antioxidantes fornecidos pela dieta (PIETTA, 2000; SOUZA, 2007).

Segundo Neves (2009), a ação dos antioxidantes baseia-se na inativação de radicais livres e na redução de peróxidos, para que os produtos permaneçam impossibilitados de formar espécies reativas e produtos de decomposição. Assim, antioxidantes são substâncias que, em quantidades mínimas em relação à amostra oxidável, inibem expressivamente a oxidação, retardando o início ou reduzindo sua taxa (SILVA et al., 1999).



Figura 3. Ação protetora dos antioxidantes na célula
Autor: Gabriel Vieira, 2008.

Na autoxidação, que é uma reação na qual ocorre a formação de radicais livres, podendo ser ou não na ausência de luz, as substâncias antioxidantes podem atuar bloqueando as reações em cadeia ou de maneira preventiva nas reações de iniciação. Deste modo, os

compostos que agem impedindo as reações em cadeia são classificados como doadores e receptores de elétrons. Os doadores de elétrons concorrem com os lipídios pelo radical peróxil, tendo como resposta a redução da velocidade das reações. Os aceptores de elétrons concorrem com o oxigênio pelo radical livre, diminuindo a formação do radical peróxil (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001; ARAÚJO, 2015). Os oxidantes são compostos formados durante o metabolismo de forma natural e, se não regulados, podem causar danos. Logo, a oxidação é um processo no qual o oxigênio é adicionado, ou hidrogênio e elétrons são removidos, formando as espécies reativas de oxigênio (ERO's) (SANTOS et al., 2011). Como as ERO's ocorrem como parte normal do metabolismo celular ou por exposição a fatores ambientais, a redução do oxigênio a superóxido ocorre em especial pela ação da NADPH oxidase, durante a respiração. A reação seguinte forma o peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase, que tem capacidade maior de oxidação pela reação, formando o radical hidroxil, o qual é muito reativo (GASTELL E ALEJO, 2000; SOUZA, 2007).

As espécies reativas de oxigênio são formadas em excesso quando o organismo está em desequilíbrio, onde o metabolismo energético está acelerado, sendo assim um fator que contribui para danos celulares. No entanto, essas espécies reativas de oxigênio (ERO'S) são muitas vezes de grande importância, como na ativação do sistema imunológico e na produção do fator relaxante derivado do endotélio (SCHNEIDER E OLIVEIRA, 2004).

Nos alimentos, as reações de oxidação produzem efeitos deletérios, como alterações no sabor, no odor, na cor e na textura, podendo ainda gerar compostos tóxicos. A falta de equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o controle pelos sistemas de defesa antioxidantes das células, gera o estresse oxidativo (KOURY E DONÂNGELO, 2003).

Esse estresse oxidativo produz radicais livres capazes de deteriorar componentes celulares, como o rompimento de cromossomos, ruptura de proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos. A oxidação também pode acarretar perdas de vitaminas A, D, E e K, carotenóides, fitoesteróis e de outros antioxidantes, causando danos às células (KOLAKOWSKA, 2003).

No organismo humano, o surgimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, como o câncer, doenças cardíacas, Alzheimer e envelhecimento têm sido associados ao estresse oxidativo (CADENAS E DAVIES, 2000).

As meia-vidas das ERO's são diferentes e estas são eliminadas por diferentes mecanismos de defesa. Os danos provocados pelos oxidantes podem ser reduzidos, antes que aconteçam reações com os alvos biológicos, prevenindo as reações em cadeia. Há muitos benefícios dos antioxidantes sintéticos na preservação de alimentos, mas sua utilização tem sido restringida por seus efeitos adversos em diferentes espécies de animais experimentais.

Dentre estes efeitos estão o desenvolvimento de cânceres no estômago de animais roedores após exposição ao BHA e efeitos colaterais nos pulmões, fígado e sangue causado por BHT (BANNWART E TOLEDO, 1999; JECFA, 2009). Os limites máximos no Brasil permitidos para adição destes antioxidantes, individualmente ou combinados, é de 0,02 g / 100 g de óleos e gorduras (BRASIL, 2005).

Alternativamente aos antioxidantes sintéticos, existe um interesse pelos antioxidantes naturais encontrados em ervas, frutas, vegetais e outros alimentos, os quais apresentam capacidade de diminuir ou inibir a oxidação dos lipídios. Os extratos vegetais, suas misturas, concentrados e isolados têm sido constantemente estudados e revisados com relação à sua atividade antioxidante (MOURE et al., 2001).

Dentre os diversos grupos de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, encontram-se os compostos fenólicos, que possuem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é normalmente relacionada às suas propriedades redutoras e de seu arranjo químico. Estes compostos exercem um papel de extrema importância na neutralização ou no sequestro de radicais livres, que atuam tanto na etapa de iniciação como na difusão do processo oxidativo (RAZAVI et al., 2008).

Uma importante classe de compostos antioxidantes dessa natureza são os tocoferóis. Os tipos diferem-se no grau de substituição do anel aromático, e têm uma cadeia lateral isoprênica saturada. A partir do arranjo dos grupos metil no anel são nomeados alfa, beta, gama e sigma (ARAÚJO, 2015). Também tem os monoterpênicos, que estão presentes nos vegetais e são encontrados em abundâncias na natureza, em especial nos óleos essenciais, dentre eles, o α -terpineol, α -tujona, 1,8-cineol, γ -terpineno e o α -pineno (COSTA et al., 2012; MOTHANA et al., 2011; BICAS et al., 2011).

Portanto, a descoberta de novos produtos como ação antioxidante é fundamental nos dias atuais, que possam ser utilizados no tratamento de Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington, epilepsia e Alzheimer (REED, 2011; COSTA et al., 2012).

2.7.1 Avaliação da atividade antioxidante

Existem várias metodologias utilizadas para avaliar a atividade antioxidante de uma substância ou extratos de plantas, onde se deve fazer uso de mais de um método para aumentar a confiabilidade dos resultados. Segundo Halliwell (2000), se um composto exibe

baixa atividade antioxidante *in vitro*, ele possivelmente terá baixa atividade *in vivo*, e vice-versa, o que indica o potencial antioxidante dos compostos analisados.

Os métodos mais conhecidos e utilizados são ABTS, DPPH, FRAP, Co-oxidação do β -caroteno e ácido linoleico (ALVES et al., 2010).

O método ABTS é uma técnica relativamente simples, que permite medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005). Esta técnica consiste em sequestrar o radical do ABTS [2,2'-azino-bis(3-etil-benzolína-6-sulfonado) com persulfato de potássio, que pode ser formado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. A alteração na estrutura que ocorre quando o cátion ABTS é sequestrado provoca um decréscimo na absorvância, que é lida em diferentes tempos, sendo representadas a partir de gráficos (PÉREZ e SAURA, 2006). Além deste decréscimo é possível observar a mudança de coloração da mistura, que inicialmente é azul, e quando em presença da amostra com propriedade antioxidante, ocorre a perda da cor (HENRIQUEZ et al., 2002).

A metodologia de sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é também uma das metodologias mais utilizadas para a determinação da atividade antioxidante é o método de sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), por ser um teste rápido e sensível. O DPPH é um radical cromóforo, que simula as espécies reativas de oxigênio (EROs) (CANO et al., 2000).

Esta metodologia consiste na capacidade do DPPH em reagir com os doadores de hidrogênio, onde a substância antioxidante doa um H^+ e assim ocorre uma redução. O radical livre DPPH é estável, de coloração púrpura, com absorvância a 516 nm. Entretanto, quando ocorre sua redução, o DPPH passa a ter coloração amarela (Figura 4). Portanto, à medida que o DPPH sofre redução pelas substâncias presentes na solução teste, observa-se a mudança de coloração, e o grau deste descoramento mostra a capacidade antioxidante da amostra (OLIVEIRA et al., 2009).

A reação entre o radical livre DPPH e um antioxidante é facilmente detectada por espectroscopia, devido a sua intensa absorção na região do visível, o que facilita a avaliação do potencial antioxidante de um composto (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS et al., 1995;).

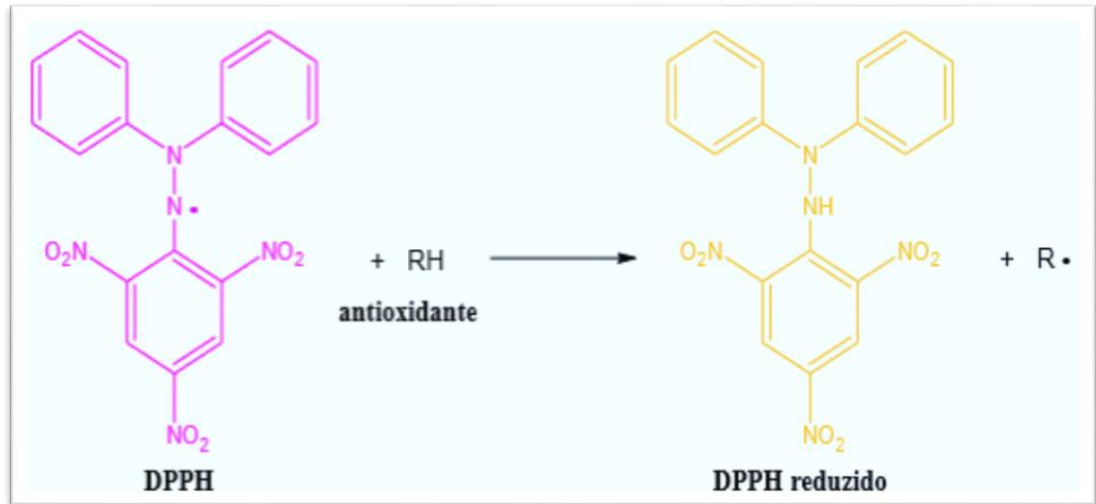


Figura 4. Estruturas do DPPH: como radical livre e na sua forma reduzida
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2009.

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH, geralmente é expressa como EC₅₀, que é a concentração efetiva capaz de reduzir em 50% a concentração inicial dos radicais DPPH da solução. Dessa maneira, quanto menor o valor do EC₅₀, menor terá sido a quantidade da amostra empregada para reduzir o radical DPPH• e maior a sua atividade antioxidante (COSTA et al, 2010).

Já o método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, primeiro descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), possibilita avaliar a capacidade de um composto em prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres produzidos durante o processo de peroxidação do ácido linoleico. A reação pode ser monitorada através do espectrofotômetro pela perda da coloração do β -caroteno, em comprimento de onda de 470 nm, através da leitura imediata e em intervalos de 15 min, num total de 2 h (BROINIZI et al., 2007). Este método fundamenta-se na perda da coloração amarela do β -caroteno, que ocorre em função do ataque do ácido linoléico peroxidado às duplas ligações do β -caroteno, que perde seu cromóforo, resultando na perda da coloração alaranjada própria da solução (JAYAPRAKASHA, et al., 2007).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos trabalhos

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Itapetinga, destacando-se o Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos (NECAL), Laboratório de Microbiologia de Alimentos e o Laboratório de Microbiologia. A composição química dos óleos essenciais foi determinada na Universidade do Vale do Itajaí/UNIVALI, Santa Catarina.

3.2 Obtenção do material vegetal

A espécie *Croton tetradenius* foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, situada no Município de Contendas do Sincorá, Estado da Bahia, com o acompanhamento de um funcionário da reserva, nos meses de novembro de 2012 e abril de 2015. Nos experimentos foram utilizadas as partes aéreas (folhas, inflorescências e caulículos) de *Croton tetradenius*. A identificação da espécie foi realizada por um botânico especialista da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. As exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob o registro HUESB 3521.

3.3 Extração do óleo essencial

O material vegetal foi encaminhado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON) da UESB, onde foram pesadas e, em seguida, secas em estufa de circulação de ar da marca Solab, a 50°C no laboratório do NECAL, por um período de 24 horas. Para a extração utilizou-se 100 gramas da parte aérea triturada manualmente, submersos em 1,5 litros de água deionizada em um balão de fundo chato. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger modificado, por 2 horas e 30 minutos, a uma temperatura de 100°C (Figura 5). Posteriormente, foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) ao óleo para remoção da água residual. Em seguida, o óleo foi acondicionado em um

frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração a temperatura de $-4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até a realização das análises.

O rendimento do óleo essencial foi calculado pelo método de base livre de umidade (BLU), de acordo com metodologia proposta por SANTOS et al. (2009).



Figura 5. Extrator de Clevenger modificado
Fonte: A autora

3.4 Determinação da composição química do óleo essencial

A composição química dos óleos essenciais foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM), em parceria com a Universidade do Vale do Itajaí/UNIVALI, Santa Catarina, com o objetivo de identificar e quantificar os constituintes químicos majoritários das amostras. O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu, com detector de massa modelo GCMS-QP2010S, apresentando interface acoplada a um computador para controle e aquisição de dados com sistema de amostragem automatizada. As condições de operação do equipamento foram as seguintes: Coluna: Marca Agilent DB -1: 0,25 mm x 30 m, espessura do filme 0,25 μm , 100% de dimetil polisiloxano; Forno: Rampa: início 100°C (2min) até 200°C a 10°C/min, logo após a 25°C/min até 300°C permanecendo por 4 min; Volume de injeção: 1,0 μL ; Detector: MS razão m/z com scan 40 a 450 uma; Eluente: He, 0,75 mL/min (100°C); Injetor: splitless: razão do split 50,0:1 a 280° C. As análises dos espectros de massas foram realizadas por comparação aos espectros encontrados na biblioteca NIST 8.0 e, também, pelo cálculo dos respectivos Índices de Kolvats (IK) e comparação com os valores descritos na literatura.

3.5. Avaliação da atividade antibacteriana

3.5.1 Obtenção dos microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão nos testes de Difusão em Ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM), originárias de culturas do “American Type Culture Collection” (ATCC), obtidas na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

Para a avaliação da atividade antibacteriana utilizaram-se sete cepas bacterianas padrão. As cepas foram de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Proteus vulgaris*.

3.5.2 Método de difusão em ágar

A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido adaptado (BAUER et al., 1966). As sementeiras dos microrganismos foram feitas em meio sólido de ágar nutriente e Brain Heart Infusion Broth (BHI), incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, os inóculos destes microrganismos foram retirados e colocados em 9,0 mL de BHI e incubados em shaker (Incubadora Shaker refrigeradora SL 222/ CFR Solab) a uma temperatura de 37°C a 160 rpm por 24 horas. No dia seguinte, a suspensão do meio contendo os microrganismos foi diluída 10 vezes, seguido pela medição da densidade ótica (D.O) em um espectrofotômetro (Nova 2000 Wavelength) a 600 nm. Para obter a D.O desejada, agitou-se novamente a suspensão no shaker por 1 hora a 37°C e 160 rpm. Ao obter a D.O. esperada (0,6 - 0,8), na fase LOG de crescimento bacteriano, colocou-se 1 mL da suspensão bacteriana em placas estéreis e adicionou-se 25,0 mL de meio semi- sólido, contendo ágar (10%) mais BHI fundido a 50°C.

Após o processo de solidificação do meio de cultura, discos de papel de filtro com 9 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL das soluções etanólicas do óleo essencial de *Croton tetradenius*, nas concentrações de 1,0; 3,0; 6,0; 12,0 e 24,0 mg.mL⁻¹, e foram colocados nas placas sobre os meios solidificados e incubadas a 37°C por um período de 48 horas.

Os ensaios foram realizados em triplicata, acompanhados do controle positivo, o antibiótico Cloranfenicol na concentração de 3,0 mg.mL⁻¹ e do controle negativo, o solvente etanol. Os resultados finais foram expressos como as médias das medidas dos halos de

inibição provocados por cada amostra, considerados como positivos os halos com tamanho igual ou superior a 10 mm de diâmetro, conforme descrito por ROMEIRO (2001).

3.5.3 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada segundo o método do CLSI (2003), no laboratório de Produtos Naturais e Biotecnológicos (LPNBio) da Universidade do Sudoeste da Bahia. Os valores da CIM foram determinados através da diluição do óleo essencial de *Croton tetradenius* em dimetilsulfóxido (DMSO 5%). Todos os testes foram realizados em triplicata e utilizou-se o antibiótico Cloranfenicol como controle positivo.

Utilizaram-se placas de 96 poços estéreis, próprias para microdiluição. Inicialmente, colocou-se em cada poço, 90 μL do meio Caldo Muller Hinton (CMH) e, posteriormente, adicionou-se a partir da terceira coluna (A3), até a décima segunda coluna (A12), as soluções do óleo essencial, nas concentrações de 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada coluna recebeu uma concentração diferente do óleo essencial, de acordo com os valores especificados anteriormente. Por último foi adicionada uma alíquota de 10 μL da suspensão do microrganismo em cada poço. Utilizou-se também o controle positivo na concentração de 20,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, na coluna A13, para observação do crescimento dos microrganismos. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, em estufa. Após este período de incubação foram adicionados 30 μL de rezasurina na concentração final de 0,01% para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Neste ensaio foram realizados os controles de viabilidade dos microrganismos testados, de esterilidade do meio de cultura, do óleo essencial e do potencial de inibição do DMSO sobre os microrganismos testados. Para a determinação da Concentração Mínima Microbicida (CMM) repicou-se uma alíquota de 5,0 μL das concentrações que apresentaram atividade na placa do CIM, em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH). Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A CMM foi considerada a menor concentração do óleo essencial onde não houve crescimento celular sobre a superfície do AMH.

3.6. Avaliação da atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante foi realizada preliminarmente uma análise qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Como fase estacionária utilizaram-se placas de vidro cobertas com sílica gel e como fase móvel uma mistura de Hexano e Acetato de Etila na proporção de 9:1. A revelação das cromatoplasmas foi realizada com uma solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) a 0,2%.

A avaliação da atividade sequestradora de radicais livres DPPH foi determinada de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), adaptado por Rufino et al. (2010). O método DPPH é baseado na captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por compostos antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Para a realização dos testes foram pesados 100 mg do óleo essencial, homogeneizados em 10 mL de álcool metílico, para obtenção de uma solução estoque de concentração correspondente a 10,0 mg.mL⁻¹. A partir da solução estoque foram obtidas as diluições de 5,0 e 2,5 mg.mL⁻¹. As soluções para a realização dos ensaios foram preparadas adicionando-se 0,1 mL de cada diluição do óleo essencial, inclusive da solução estoque, em tubos de ensaio contendo 3,9 mL da solução metanólica de DPPH a 0,06 mM e homogeneizados em agitador de tubos. As misturas foram mantidas em ambiente escuro durante 50 minutos antes da realização das leituras. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 515 nm. A curva padrão foi feita com soluções de DPPH nas concentrações de 10 a 60 µM e o álcool metílico foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. O controle negativo foi feito utilizando-se metanol no lugar das amostras e o controle positivo foi feito utilizando-se o padrão BHT.

A atividade antioxidante é indicada pelo decaimento da absorbância das amostras, correlacionado ao decaimento da absorbância do controle, resultando na porcentagem de sequestro de radicais livres. A porcentagem da atividade antioxidante das amostras foi calculada de acordo com a Equação 1, descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}} \right\}$$

Eq. 1

Onde:

AA%: atividade antioxidante em porcentagem

Abs amostra: absorbância da amostra

Abs branco: absorbância do branco

Abs controle: absorbância do controle

Utilizou-se como controle positivo uma solução de BHT nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹, nas mesmas condições realizadas para as amostras do óleo essencial.

O valor correspondente à metade da absorvância inicial do controle (solução metanólica de DPPH a 0,06M) foi substituído pelo y da Eq. 2, para encontrar o consumo em μM de DPPH e, em seguida, transformado para g de DPPH.

Equação da curva do DPPH

$$y = -6.10^{-5}x + 0,665 \quad (R^2 = 0,9884)$$

Eq. 2

Onde:

y = Absorvância inicial do controle / 2

x = concentração em μM do DPPH

g DPPH = (μM DPPH / 1.000.000) * 394,3 (peso molecular do DPPH)

As médias das absorvâncias obtidas para as diferentes diluições do óleo essencial foram plotadas no eixo Y e as diluição correspondentes (mg.L⁻¹) no eixo X, para a determinação da equação da reta (Eq. 3). Para calcular a Atividade Antioxidante (AA) substitui-se a absorvância equivalente a 50% da concentração do DPPH pelo y (Eq. 3) para encontrar o resultado que corresponde à quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC₅₀).

Cálculo do EC₅₀

$$y = -0,0004x + 0,555 \quad (R^2 = 0,9776)$$

Eq. 3

Onde:

y = Absorvância inicial do controle / 2

x = EC₅₀ (mg.L⁻¹)

O valor encontrado na Eq.3 (mg.L⁻¹) foi dividido por 1.000 para transformar para g.L⁻¹ e, em seguida, dividiu-se pelo valor encontrado em g de DPPH (Eq. 1) para obter o resultado final, que é expresso em g de óleo essencial / g DPPH.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas do *C. tetradenius*, das espécies coletadas nos meses de novembro de 2012 e abril de 2015 foram obtidos com rendimentos semelhantes, de 2,73% e 2,75%, respectivamente.

O rendimento dos óleos essenciais extraídos de diversas espécies de *Croton* varia de 0,05 a 3,15%, de acordo com informações encontradas na literatura. O rendimento do óleo essencial da parte aérea do *C. tetradenius* foi maior que o encontrado por Dourado e Silveira (2005), que ao avaliarem o rendimento dos óleos essenciais obtidos das folhas de espécies de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* obtiveram valores de 0,075% e 0,72%.

No trabalho realizado por Aguiar et al. (2014), o óleo essencial das folhas de *C. zehntneri* foi obtido com rendimento de 2,0%. Em trabalhos com espécies de *Croton cajucara* foram obtidos rendimentos de 0,97%, e 0,65%, respectivamente, de dois morfotipos, o branco e o vermelho (CHAVES et al., 2006).

A variação na produção de óleos essenciais por espécies vegetais está relacionada a fatores como temperatura ambiente, umidade do ar, diversidade genética de cada espécie, bem como a época do ano (SILVA et al., 2006). Assim, observou-se que o *Croton tetradenius* produz o óleo essencial em um excelente rendimento em relação a outras espécies do mesmo gênero.

4.2 Avaliação da composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais das partes aéreas de *Croton tetradenius* foi determinada por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), onde foram identificados e quantificados os constituintes químicos majoritários presentes nos óleos avaliados. Os resultados foram obtidos através da determinação das áreas dos principais picos observados nos cromatogramas, juntamente com a comparação dos espectros de massas

de cada constituinte presente no óleo com aqueles encontrados na biblioteca da base de dados do NIST 8.0

A análise da composição química do óleo essencial das partes aéreas de *Croton tetradenius* coletadas no mês de novembro de 2012 evidenciou a presença de 32 constituintes, dos quais 24 foram identificados, pertencentes à classe dos monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 1). Os monoterpenos encontrados no óleo foram: α -tujeno, α -pineno, canfeno, sabineno, β -mirceno, α -felandreno, *p*-cimol, γ -terpineno, β -linalol, cânfora, isoborneol, terpinen-4-ol, acetato de α -terpineol, representando 62,08% dos constituintes. Os sesquiterpenos identificados foram: elixeno, copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, α -cariofileno, β -selineno, germacreno, β -bisaboleno, (-)-espatulenol e hexahidrofarnesil acetona, correspondendo a 14,17% dos constituintes identificados.

Tabela 1. Principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial das partes aéreas de *C. tetradenius* coletadas no mês de novembro de 2012

CONSTITUINTE QUÍMICO	CLASSE	IKC	IKL	% DO CONSTITUINTE
α -tujeno	Monoterpeno	932	930	1,61
α -pineno	Monoterpeno	941	939	3,95
Canfeno	Monoterpeno	956	954	2,52
Sabineno	Monoterpeno	976	975	1,31
β -mirceno	Monoterpeno	9866	990	5,67
α -felandreno	Monoterpeno	1008	1002	4,03
<i>p</i> -cimol	Monoterpeno	1020	-----	8,57
γ -terpineno	Monoterpeno	1059	1056	5,89
β -linalol	Monoterpenoide	1088	-----	3,04
Cânfora	Monoterpenoide	1136	1146	19,01
Isoborneol	Monoterpenoide	1152	1160	1,05
Terpinen-4-ol	Monoterpenoide	1171	1177	2,48
α -Terpineol	Monoterpeno	1181	1188	0,62
Acetato de α -terpineol	Monoterpenoide	1340	-----	2,33
Elixeno	Sesquiterpeno	1344	-----	0,39
Copaeno	Sesquiterpeno	1387	1432	2,74
β -elemeno	Sesquiterpeno	1395	1390	1,22
β -cariofileno	Sesquiterpeno	1431	1419	1,75

α -cariofileno	Sesquiterpeno	1463	1454	2,95
β -selineno	Sesquiterpeno	1494	1492	0,71
Germacreno	Sesquiterpeno	1503	1500	1,48
β -bisaboleno	Sesquiterpeno	1509	1505	0,62
(-)-Espatulenol	Sesquiterpenoide	1577	1578	1,32
Hexahidrofarnesil acetona	Sesquiterpenoide	1821	-----	0,99

IKC=índice de retenção de Kovats calculado

IKL= índice de retenção de Kovats da literatura

Entre os compostos identificados, a *cânfora* foi o componente majoritário encontrado no óleo (19,01%), seguida de um componente não identificado (12,42%), *p-cimol* (8,57%), γ -terpineno (5,89%), β -mirceno (5,67%), α -felandreno (4,03%), α -pineno (3,95%), β -linalol (3,04%), α -cariofileno (2,95%), copaeno (2,74%), canfeno (2,52%), terpinen-4-ol (2,48%) e acetato de α -terpineol (2,33%).

A análise do óleo essencial extraído das partes aéreas de *Croton tetradenius* coletadas no mês de abril de 2015, comprovou a presença de 65 constituintes químicos, dos quais foram identificados 35, pertencentes às classes dos monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 2). Foram encontrados 75,44% de monoterpenos, 3,69% de sesquiterpenos; 20,87% dos compostos não foram identificados.

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial da espécie coletada em novembro de 2012 foram semelhantes aos encontrados no óleo essencial do *Croton tetradenius* coletado em abril de 2015, onde a *cânfora* também foi o componente majoritário (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%).

Pesquisas científicas comprovam que muitas espécies do gênero *Croton* são produtoras de óleos essenciais, sendo seus constituintes pertencentes principalmente à classe dos terpenóides, além dos fenilpropanóides (PALMEIRA-Jr. et al., 2006). Estes constituintes voláteis proporcionam o agradável aroma das plantas (RANDAU et al., 2004) e exibem uma enorme variedade estrutural, aumentando as chances desses óleos essenciais se tornarem fontes de novas moléculas biologicamente ativas e menos tóxicas, que poderão ser transformadas em novos fármacos, visando ampliar o arsenal terapêutico, substituindo os produtos industrializados e importados, gerando uma grande economia para o país.

Os óleos essenciais das partes aéreas das espécies de *C. zenhtneri*, *C. argyrophylloides* e *C. nepetaefolius* encontradas na região nordeste foram estudados e sua composição química

identificada. O *C. zenhtneri* e o *C. nepetaefolius* são constituídos por monoterpenoides, sesquiterpenoides e arilpropanoides, enquanto no óleo do *C. argyrophyloides* foram encontrados monoterpenoides e sesquiterpenoides, mas não arilpropanóides (MORAIS et al., 2006).

Tabela 2. Principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial das partes aéreas de *C. tetradenius* coletadas no mês de abril de 2015

CONSTITUINTE QUÍMICO	CLASSE	IKC	IKL	% DO CONSTITUINTE
Triciclono	Monoterpeno	922	-----	2,34
α -pineno	Monoterpeno	931	939	5,57
Canfeno	Monoterpeno	944	954	4,27
2-ciclohexeno-1,4-diona	Cetona	952	-----	0,34
Sabineno	Monoterpeno	965	975	1,32
β -pineno	Monoterpeno	972	979	0,83
β -mirceno	Monoterpeno	979	990	4,23
α -felandreno	Monoterpeno	999	1002	1,53
(+)-4-careno	Monoterpeno	1010	1011	3,53
<i>p</i> -cimol	Monoterpeno	1013	-----	13,11
Limoneno	Monoterpeno	1021	1029	4,49
β -ocimene	Monoterpeno	1034	1037	0,16
γ -terpineno	Monoterpeno	1047	1059	3,14
β -terpineol	Monoterpenoide	1052	1144	0,10
β -linalol	Monoterpenoide	082	1096	1,05
Cânfora	Monoterpenoide	1123	1146	24,81
Isoborneol	Monoterpenoide	1140	-----	0,77
Borneol	Monoterpenoide	1147	-----	0,10
4-terpineol	Monoterpenoide	1160	1177	1,78
α -terpineol	Monoterpenoide	1170	1188	0,30
Carvacrol	Monoterpenoide	1262	1299	0,16
Acetato de mirtenila	Monoterpenoide	1303	1326	0,37
Acetato de α -terpineol	Monoterpenoide	1330	-----	1,14
Copaeno	Sesquiterpeno	1373	1375	0,96
β -elemeno	Sesquiterpeno	1385	1390	0,16

β -cariofileno	Sesquiterpeno	1414	1419	0,35
α -cariofileno	Sesquiterpeno	1446	1454	0,61
β -eudesmene	Sesquiterpeno	1476	-----	0,32
γ -elemeno	Sesquiterpeno	1487	-----	0,08
β -bisaboleno	Sesquiterpeno	1498	1505	0,15
δ -cadineno	Sesquiterpenoide	1511	1523	0,07
Nerolidol	Sesquiterpenoide	1545	1563	0,08
(-)-Espatuleno	Sesquiterpenoide	1558	1578	0,35
Óxido de cariofileno	Sesquiterpenoide	1564	1583	0,22
Hexahidrofarnesil acetona	Sesquiterpenoide	1814	-----	0,34

IKC= índice de retenção de Kovats calculado

IKL= índice de retenção de Kovats da literatura

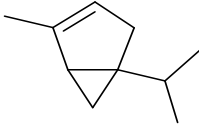
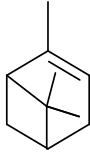
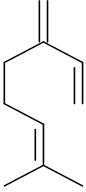
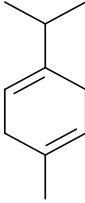
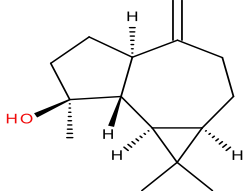
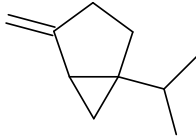
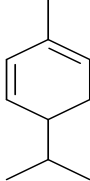
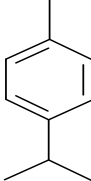
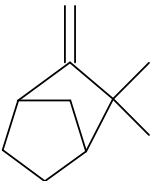
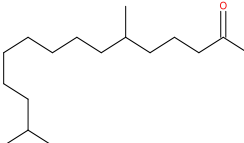
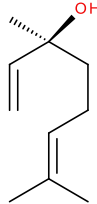
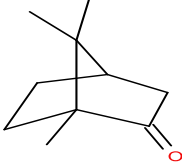
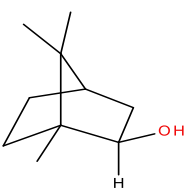
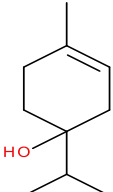
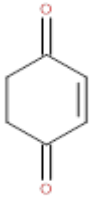
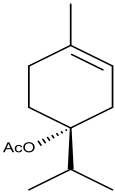
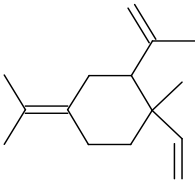
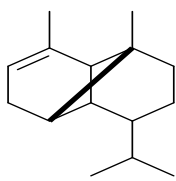
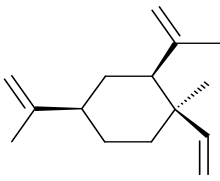
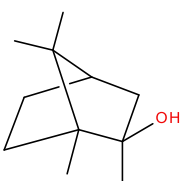
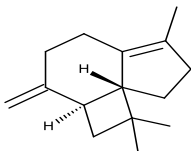
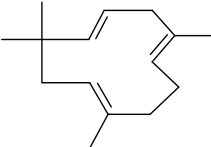
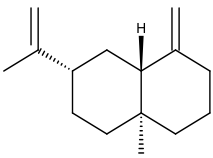
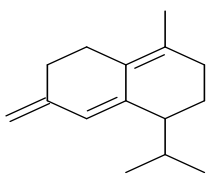
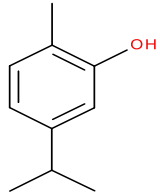
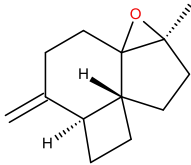
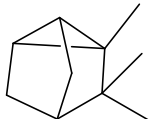
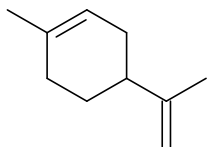
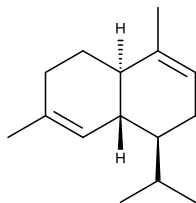
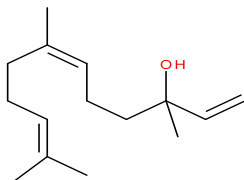
Craveiro e colaboradores (1981), investigando a composição de várias espécies do gênero *Croton* identificaram uma gama de compostos, dentre eles α -pineno, cânfora, 1,8-cineol, β -cariofileno, α -humuleno, γ -elemeno, cadideno, mirceno, α -cubebeno, *p*-cimeno, metil-eugenol, metil isoeugenol, α -guaieno, estragol, limoneno, dentre outros.

Também foi possível identificar uma variedade de mais de 20 compostos nas espécies de *Croton antanosiensis*, *C. decaryi*, *C. geayi* e *C. sakamaliensis* (RADULOVIC et al., 2006), destacando-se α e β -pinenos, 1-8-cineol, borneol, α -terpineol e sesquiterpenos não oxigenados (cariofileno e α -humuleno).

Os óleos essenciais de *Croton tetradenius* demonstraram uma diversidade de monoterpenos e sesquiterpenos, (Tabela 3). Porém, as análises revelaram distintas concentrações dos mesmos constituintes encontrados nos dois óleos e, também, demonstraram uma elevada porcentagem de diferentes constituintes no óleo extraído no ano de 2015, enquanto o óleo essencial extraído no ano de 2012 teve muito menos constituintes químicos identificados.

A diferença na composição dos óleos essenciais podem estar relacionada com a fisiologia da planta, na qual a sua composição e o seu rendimento dependem de enzimas específicas que catalisam a formação de compostos voláteis em um órgão, na fase de crescimento e de estresses abióticos da planta, como a temperatura, a salinidade do solo e a umidade do ar do ambiente (SANGWAN et al., 2001).

Tabela 3. Estruturas químicas dos constituintes químicos majoritários identificados por CG/EM nos óleos essenciais das partes aéreas de *C. tetradenius*.

				
α-tujeno	α-pineno	β-mirceno	γ-terpineno	(-)-Espatuleno
				
Sabineno	α-felandreno	<i>p</i>-cimol	Canfeno	Hexahidrofarnesil acetona
				
β-linalol	Cãnfora	Isoborneol	Terpinen-4-ol	2-Ciclohexeno-1,4-diona
				
Acetato de α-terpineol	Elixeno	Copaeno	β-elemeno	Isoborneol
				
β-cariofileno	α-cariofileno	β-selineno	Germacreno	Carvacrol
				
Óxido de cariofileno	Triciclono	Limoneno	δ-cadineno	Nerolidol

A literatura apresenta dados compatíveis com os encontrados neste trabalho, onde os óleos essenciais do gênero *Croton* são caracterizados pela predominância de monoterpenos e sesquiterpenos (MECCIA et al., 2000).

Fatores abióticos como a radiação, temperatura, precipitação, época de coleta, ventos, altitude, solo e outros, geralmente estão relacionados à diferença de composição e à concentração dos constituintes químicos presentes em um óleo essencial (GOUINGUENE & TURLINGS, 2002).

Outras espécies tiveram seus óleos essenciais analisados e alguns dos constituintes encontrados foram semelhantes aos dos óleos essenciais de *Croton tetradenius* estudados. No óleo essencial extraído das folhas de *Croton heliotropiifolius* foram identificados o α -pineno, linalol, β -cariofileno, germacreno, espatuleno, eucaliptol, entre outros. No óleo essencial de *Croton blanchetanus* foram identificados os compostos: α -pineno, β -pineno e β -mirceno (OLIVEIRA, 2008; ANGÉLICO, 2011).

Pino e colaboradores (2006) identificaram como componentes majoritários dos óleos essenciais das espécies de *C. rosmarinoides*, *C. litoralis*, *C. spiralis* e *C. myricifolius* os compostos: α -bisabolol, 1,8-cineol, espatulenol, α -terpineol, borneol, óxido de cariofileno, e acetato de bornila.

No óleo essencial de *C. blanchetianus* foram identificados 18 compostos a partir da análise por CG/EM, dos quais 38,88% são monoterpenos, 55,55% são sesquiterpenos e 5,57% diterpenos. Os compostos encontrados em maior concentração foram o -limoneno (24%), o cariofileno (19%), o δ -elemeno (17%) e o α -pineno (15%). No ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* os índices de mortalidade variaram entre 0 e 100% (MEDEIROS et al., 2014).

Também foram identificados através de CG-EM os constituintes do óleo essencial de *C. zehntneri*, sendo os principais constituintes encontrados o Eucaliptol, o Estragol (99,15%) e o Espatulenol (AGUIAR et al., 2014).

Trabalhos com outras espécies de *Croton*, como o *C. heliotropiifolius*, *C. muscicapa* e *C. zambesicus* comprovaram a presença dos compostos β -cariofileno, α -pineno e óxido de cariofileno nos seus óleos essenciais. Assim, a composição química das espécies do gênero *Croton* tem demonstrado uma rica diversidade de constituintes químicos presentes em seus óleos essenciais (ANGÉLICO et al., 2012; FREITAS et al., 2010; ANGÉLICO, 2011).

Rao e colaboradores (2007), em seus trabalhos, comprovaram que a complexidade química dos óleos essenciais proporciona uma variedade de funções biológicas. Já Dourado

(2003), descreve a importância do gênero *Croton*, evidenciando o quanto é rico em constituintes com grande diversidade química e propriedades biológicas.

O *Croton tetradenius* é uma espécie promissora para estudos de atividades analgésica e anti-inflamatória por ser rica em monoterpenos (AGUIAR, 2005). Alguns estudos associam essa ação à presença de monoterpenos como a carvona, β -mirceno, citral, limoneno e linalol, compostos presentes no óleo essencial da espécie estudada. Segundo Guimarães e colaboradores (2013) os monoterpenos são excelentes constituintes para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da dor.

Trabalho recente realizado por Sá (2013), confirma a atividade anti-inflamatória de 32 monoterpenos. A partir deste trabalho é possível destacar a atividade anti-inflamatória de óleos essenciais, mas pouco se sabe do mecanismo de ação dos seus constituintes.

Outro composto presente no óleo essencial de *Croton tetradenius* que possui atividade antinociceptiva, analgésica e anti-inflamatória é o *p*-cimeno (BONJARDIM et al., 2012; MENDES et al., 2010).

Trabalhos com o carvacrol também demonstraram o seu efeito antinociceptivo (GUIMARÃES et al., 2012). Os monoterpenos 1,8-cineol, borneol, cânfora e β -tujona são constituintes também presentes no óleo essencial de *Croton tetradenius* que possuem atividade anti-inflamatória comprovada (EHRNHÖFER-RESSLER, 2013).

4.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os testes de avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em meio sólido, com os óleos essenciais de *Croton tetradenius*, nas concentrações de 1,0 mg.mL⁻¹ a 24,0 mg.mL⁻¹, não produziram halos de inibição em nenhuma das concentrações testadas frente aos microrganismos (Tabela 4).

As cepas bacterianas foram resistentes ao controle negativo, comprovando que o solvente não interferiu no crescimento dos microrganismos e, portanto, não altera os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana.

Tabela 4. Resultados da avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton tetradenius* frente a diferentes cepas de bacterianas

Microrganismos	Concentrações mg.mL⁻¹	Halos de inibição (mm)
<i>ATCC Escherichia coli</i> 35288	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Escherichia coli</i> 25922	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Pneumoniae</i> 700603	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Proteus vulgaris</i>	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Staphylococcus aureus</i> 25923	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Staphylococcus aureus</i> 43300	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Enterococcus faecalis</i> 51299	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0
<i>ATCC Enterococcus faecalis</i> 292012	1,0; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0	0

Como controle positivo foi utilizado o antibiótico Cloranfenicol, na concentração de 3,0 mg.mL⁻¹, para a avaliação comparativa das amostras frente ao padrão de referência.

Os halos de inibição formados com o antibiótico Cloranfenicol variaram de 10 a 25 mm (Tabela 5). A cepa *ATCC E. coli* 25922 foi a que sofreu a maior inibição pelo antibiótico, indicando sua maior susceptibilidade ao mesmo. Referente ao tamanho dos halos, Alves (2000), propôs uma classificação na qual se considera como inativas as amostras que produzam um halo menor que 9 mm.

Tabela 5. Resultados da avaliação da atividade antibacteriana do antibiótico Cloranfenicol na concentração de 3,0 mg.mL⁻¹

Microrganismos	Halos de inibição (mm)
<i>ATCC Escherichia coli</i> 35288	10
<i>ATCC Escherichia coli</i> 25922	25
<i>ATCC Pneumoniae</i> 700603	11
<i>ATCC Proteus vulgaris</i>	16
<i>ATCC Staphylococcus aureus</i> 25923	19
<i>ATCC Staphylococcus aureus</i> 43300	15
<i>ATCC Enterococcus faecalis</i> 51299	10
<i>ATCC Enterococcus faecalis</i> 292012	18

O Cloranfenicol é um antibiótico da classe dos anfenicóis, que age principalmente como bacteriostático, interferindo na síntese proteica bacteriana. Ele é ativo contra microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e anaeróbios (MELO et al., 2012).

Os microrganismos testados no ensaio anterior foram submetidos à microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e os resultados estão resumidos na Tabela 6.

A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada a menor concentração responsável em inibir por completo o crescimento microbiano. Os valores de CIM são determinados pela leitura visual, depois da adição de resazurina, sendo considerada como positiva para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa para os que obtiveram coloração rosada (SALVAT et al., 2001). Assim, o teste realizado com o óleo essencial de *Croton tetradenius* foi negativo onde os poços apresentaram a cor rosada, com exceção do controle positivo (Figura 6).

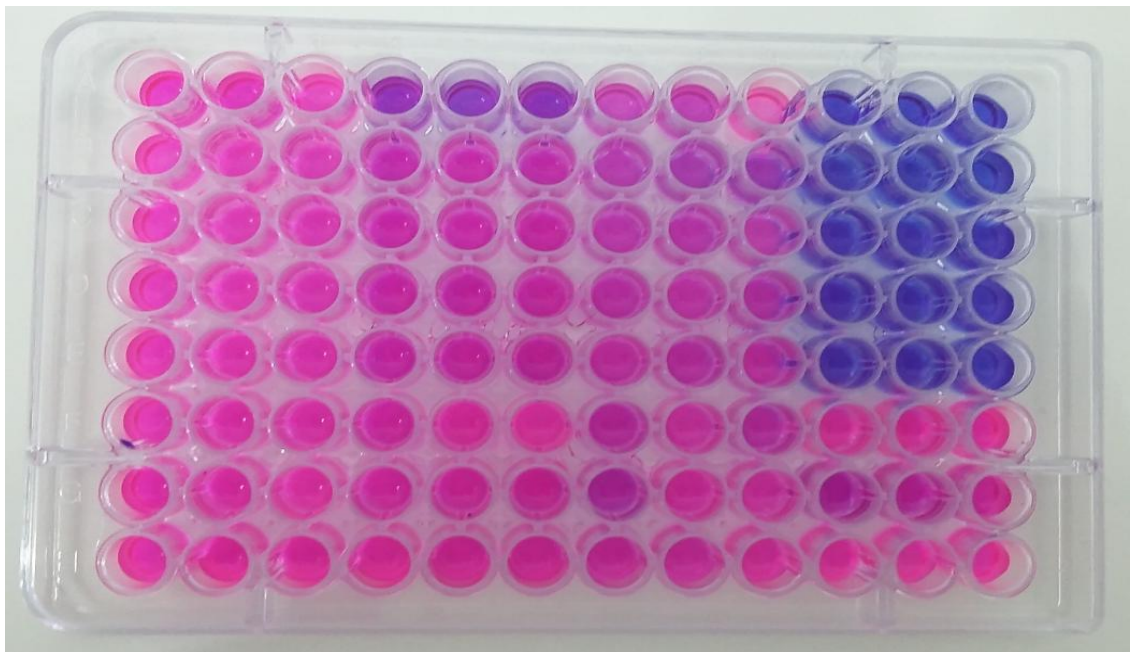


Figura 6. Teste de determinação da CIM do óleo essencial de *C. tetradenius*

Não foi possível determinar a CIM do óleo essencial de *Croton tetradenius*, uma vez que este não mostrou atividade frente aos microrganismos testados, o que já havia sido constatado nos testes de difusão em meio sólido.

Tabela 6. Resultados dos testes para determinação da CIM do óleo essencial de *Croton tetradenius* frente a microrganismos patogênicos

Microrganismos	<i>E. Fecalis</i> ATCC 31299	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 25921	<i>S.</i> <i>saprophyticus</i> ATCC 35552	<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Concentração mg.mL⁻¹						
40,0	-	-	-	-	-	-
20,0	-	-	-	-	-	-
10,0	-	-	-	-	-	-
5,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-
1,25	-	-	-	-	-	-
0,62	-	-	-	-	-	-
0,31	-	-	-	-	-	-

(+) Apresentou sensibilidade nas concentrações testadas. (-) Não teve atividade nas concentrações testadas

(**) Bacteriostático (*) Bactericida.

O desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas bactérias a múltiplos antimicrobianos tem sido um problema, e a procura por substâncias bioativas, principalmente derivadas de plantas, tem sido grande nas últimas décadas. Este interesse se dá devido à diversidade de metabolitos secundários produzidos pelos vegetais como, alcaloides, flavonoides, terpenoides e compostos fenólicos, os quais apresentam comprovadas propriedades farmacológicas, dentre elas, atividade antibacteriana (COELHO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2000).

O óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri*, evidenciou atividade antimicrobiana positiva, principalmente frente a *Staphylococcus aureus* (Costa et. al. 2008). Também foi observado a atividade antimicrobiana em outras espécies de *Croton*, a exemplo, o *C. pulegioides*, onde ao analisar o extrato metanólico, comprovou a atividade antimicrobiana com maiores halos de inibição frente as bactérias Gram-positivas, principalmente *Staphylococcus aureus* e aos fungos, sendo um gênero promissor com uma gama de espécies com potencial antimicrobiano (ARRAIS et al., 2014).

Em trabalhos realizados com o óleo essencial de *Croton sonderianus* foram identificados diterpenos na sua constituição química, os quais exibem atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e atividade fungicida contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophyts* e *Polyporus sanguineus* (GONZALEZ et al., 1981; MCCHESENEY et al., 1991).

Os óleos essenciais apresentam em sua constituição diversas substâncias com prováveis atividades biológicas, de maneira que se esperava encontrar resultado positivo em relação à atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton tetradenius*. Entretanto, este resultado não é único e nem restrito ao óleo essencial analisado (PACKER, LUZ, 2007).

A inexpressiva atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie estudada pode estar relacionada à quantidade insatisfatória de determinados metabólitos no óleo, sobretudo aqueles com hidroxilas fenólicas, como é o caso do linalol, 1,8-cineol, geranial e carvacrol, que possuem ação antimicrobiana comprovada. Outro fator a ser considerado é que nas folhas contém uma menor concentração de compostos com propriedades antimicrobianas que em outras partes da planta, a exemplo da casca (BURT, 2004; OYEDEMI, et al., 2009).

Outra justificativa para a falta de resultados dos óleos sobre as bactérias pode estar atribuída à ação da sua parede celular, onde a camada 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 estranhas, defendendo os microrganismos de concentrações inibitórias ou letais dos agentes antimicrobianos (NIKAIDO e VAARA, 1985; NIKAIDO, 1989).

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

4.4 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação qualitativa da atividade antioxidante do óleo essencial de *Croton tetradenius*, pela técnica de CCD, utilizando solução reveladora de DPPH a 0,2% em metanol, comprovou a existência de substâncias com propriedades antioxidantes, evidenciada nas cromatoplasmas pela presença de manchas amarelas intensas sobre o fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH.

O radical livre DPPH exibe coloração violeta e na presença de doadores de elétrons e hidrogênio se reduz, tornando-se amarelo. Esta reação é bastante utilizada para testar a capacidade de compostos em sequestrar radicais livres ou radicais hidrogênio e, assim, é útil para analisar a atividade antioxidante de extratos vegetais (ALVES et al., 2010).

Na avaliação quantitativa da atividade antioxidante, feita pelo método do sequestro de radicais livres DPPH, o óleo essencial apresentou tempo ótimo de 50 minutos de reação para consumir a quantidade máxima de DPPH e, a partir desta análise, realizaram-se os testes, pois é de extrema importância que se determine o tempo de reação de cada amostra.

O óleo essencial extraído no ano de 2012 da espécie de *C. tetradenius* exibiu valor de EC_{50} correspondente a $2,49 \text{ mg.mL}^{-1}$, encontrado a partir da curva $y = 0,0001x - 0,5110$ ($R^2 = 0,9991$). O controle positivo BHT apresentou um valor de EC_{50} correspondente a $0,61 \text{ mg.mL}^{-1}$, encontrado a partir da curva $y = -0,0004x + 0,555$ ($R^2 = 0,9776$).

Os resultados das porcentagens de inibição para as diferentes concentrações do óleo analisado foram crescentes, onde a concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi de 7,06%, a de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi de 12,21% e a de $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de 21,37% (Figura 7). Os valores de porcentagem de atividade antioxidante demonstram que o óleo essencial analisado apresenta uma capacidade antioxidante moderada, quando analisado por este método.

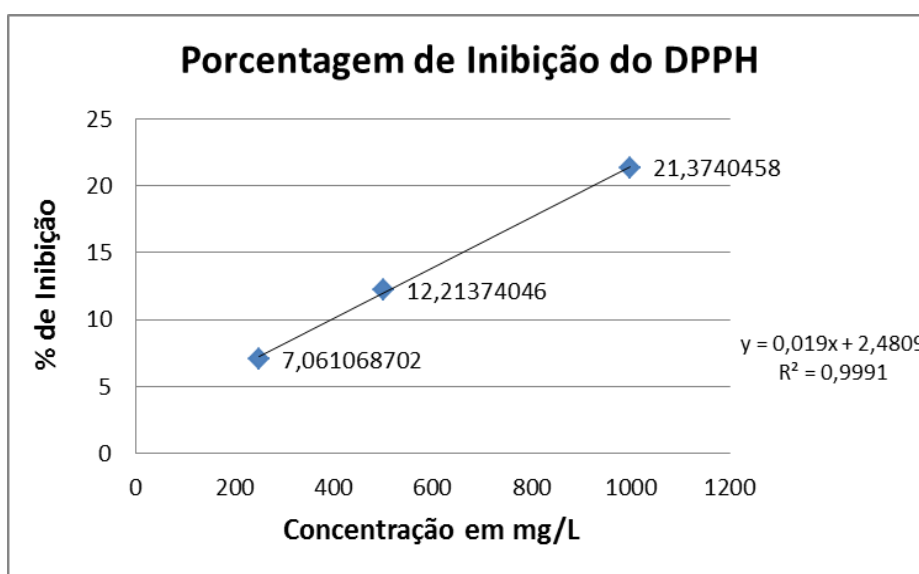


Figura 7. Resultados de porcentagem de inibição dos radicais livres DPPH provocados pelo óleo essencial de *Croton tetradenius*

O óleo essencial do *C. tetradenius* extraído no ano de 2015 exibiu valor de EC_{50} de $4,03 \text{ mg.mL}^{-1}$, encontrado a partir da curva de regressão linear $y = -6.10^{-5}x + 0,665$ ($R^2 = 0,9884$), enquanto o controle positivo BHT apresentou um valor de EC_{50} de $0,61 \text{ mg.mL}^{-1}$, encontrado a partir da curva $y = -0,0004x + 0,555$ ($R^2 = 0,9776$).

O resultado da porcentagem de inibição dos radicais DPPH foi de 3,84% para a concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 6,94% para a de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e de 11,01% para a concentração de $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Esses resultados demonstram que óleo essencial extraído no ano de 2015 apresentou uma menor capacidade antioxidante que o obtido no ano de 2012. Este fato pode ser justificado pela dificuldade de doação de radicais hidrogênio por parte dos constituintes do óleo, para estabilizar os radicais DPPH.

Estudos realizados com diferentes partes de *C. chelidonioides*, utilizando o método fotocolorimétrico de sequestro de radicais livres de DPPH, indicaram atividade antioxidante da espécie, sobretudo na maior concentração usada de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FALCÃO et al., 2006).

Em outros trabalhos realizados com espécies de *Croton*, como *C. blanchetianus*, e *C. heliotropiifolius*, encontrou-se atividade antioxidante positiva, com CE_{50} de $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (ANGÉLICO, 2011).

Em trabalho realizado por Moraes et al. (2006), com os óleos essenciais do *C. zenhtneri*, que apresentou como compostos majoritários o *E*-anetol, formiato de anisila e anisaldeído, com o *C. nepetaefolius*, com compostos majoritários como o metileugenol e α -Copaeno e *C. argyrophyloides*, com o 1,8-cineol, α -pineno e espatulenol como compostos majoritários, indicou que os óleos essenciais dessas espécies apresentam resultados positivos para atividade antioxidante.

Catunda e colaboradores (2002), relataram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Croton argyrophyloides*, constituído pelos terpenos, α -pineno e β -guaieno, enquanto CANUTO (2005), verificou a presença outras atividades, tais como, atividade anti-edematogênica e antinociceptiva.

Já Lourens e colaboradores (2004), evidenciaram atividade antioxidante nos óleos essenciais de quatro outras espécies deste mesmo gênero, descrevendo assim, o potencial que este gênero apresenta.

Assim, uma vez que os metabólitos secundários são responsáveis pelo efeito de proteção contra vários processos patológicos na planta, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade de outros estudos, para avaliar a ação biológica de substâncias isoladas e produtos obtidos da espécie *Croton tetradenius*.

5- CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *Croton tetradenius* foram obtidos com rendimento médio de 2,74%, o que é considerado um ótimo resultado.

A análise por CG-EM demonstrou a presença de 32 constituintes no óleo essencial obtido do material vegetal coletado no ano de 2012, dos quais 24 foram identificados, enquanto no óleo essencial obtido do material vegetal coletado no ano de 2015 foram encontrados 65 constituintes químicos, dos quais foram identificados 35 compostos.

Os principais constituintes químicos encontrados em ambos os óleos essenciais pertencem à classe dos monoterpenos e sesquiterpenos, sendo a cânfora o composto majoritário encontrado.

A avaliação da atividade antimicrobiana feita pelo método de difusão em meio sólido e pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) demonstrou que as cepas bacterianas testadas foram resistentes ao óleo essencial obtido das partes aéreas do *C. tetradenius*.

O óleo essencial obtido das partes aéreas do *C. tetradenius* extraído em 2012 apresentou capacidade antioxidante melhor que o óleo obtido em 2015.

Outro aspecto que pôde ser analisado no trabalho, apesar de não ter sido objeto desse estudo, indica que o óleo essencial de *Croton tetradenius* é um produto natural com potenciais propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, através de dados da literatura referentes aos seus constituintes químicos individuais. Desta forma, faz-se necessário avaliar, além das propriedades farmacológicas, possíveis efeitos tóxicos das substâncias bioativas presentes nos óleos essenciais.

6- REFERÊNCIAS

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): Levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Rev. Bras. Plant. Med.** v.8, p.79–84, 2005.

AGUIAR, U.N.; LIMA, S.G.; ROCHA, M.S.; FREITAS, R.M.; OLIVEIRA, T.M.; SILVA, R.M.; MOURA, L.C.B.; ALMEIDA, L.T.G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, Vol. 37, p. 50-55, 2014.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. **Uso de recursos vegetais da Caatinga: O caso do Agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil)**. Interciência, Vol. 27, p. 336-345, 2002.

ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P. **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica. Recife: Livro Rápido/NUPEEA, 189p. 2004.**

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânico. **Química Nova** vol.33 n.10 São Paulo 2010.

ALVES, H.M.A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Química Nova na Escola**, n. 3, maio, 2001.

ANGÉLICO, E.C. **Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kunt e *Croton blanchetianus* Baill.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande- UFCG. Patos-PB 2011.

ANGÉLICO, E.C.; COSTA, J.G.M.; GALVÃO, F.F.R.; SANTOS, F.O.; RODRIGUES, O.G. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (Sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. *Revista de Biologia e Farmácia*, vol 07, n 01, 2012.

ANGNES, S.I.A. **Isolamento, Caracterização Química e Avaliação da Propriedade Inseticida do Óleo Essencial da *Piper amplum* Kunth.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Regional de Blumenau. Blumenau SC, 2005.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática.** 6ª Ed. Viçosa: UFV, p. 478 2015.

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 Mediciniais**, Campinas, vol.16, p.316-322, 2014.

AZEVEDO, M.M.B. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de *Croton Cajucara* Benth. e *Croton sacaquinha* Croizat. E obtenção de seus componentes bioativos.** Dissertação (Mestrado em ciências de Alimento), Instituto de Química-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

AZEVEDO, M.M.B.; CHAVES, F.C.M.; ALMEIDA, C.A.; BIZZO, H.R.; DUARTE, R.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxy-calamenene-Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. **Molecules**. Vol. 18, p.1128-1137, 2013.

BABILI, F.E.L. FEBRE, N.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Fitoterapia**, Vol.77, p.384-387, 2006.

BAGETTA, G. MORONE L.A.; ROMBOLA L.; AMANTEA D, RUSSO R, BERLIOCCHI, L.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T.; ROTIROTI, D.; CORASANITI, M.T. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, Vol. 81, p. 453-61, Sep 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 46, p. 446-475, 2008.

BANDONI, A.L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil.** Vitória: Edufes, p. 624. 2008.

BANNWART, G.C.M.C.; TOLEDO, M.C.F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Vol. 33, p.245-255, 1999.

BARA M.T.F.; VANETTI M.C.D. Estudo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 1998; 7-8(1).

BAUER, A. W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by astandardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Vol. 45, p. 493-496, 1966.

BESSA, T.; TERRONES M.G.H.; SANTOS, Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico**, vol. 1, p.1-17, 2007.

BICAS, J.L.; NERI-NUMA, I.A.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food Chem Toxicol**. Vol. 49(7): p. 1610-5. 2011

BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Precisão preditiva de teste de difusão de disco para *Proteus vulgaris* e Providencia espécies contra as cinco mais recente cefalosporinas

administradas por via oral, cefdinir, cefetamet, cefprozil, cefuroxima, e loracarbef. **Journal Clinical Microbiol.** Vol. 32: p. 559-562. 1994.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss Technol**, Vol. 28, p. 25-30, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensmittelWissenschaft und-Technologie*, Vol. 28, p. 25-30, 1995. commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Vol. 9, p. 575-580, 2008.

BRASIL. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova o “regulamento técnico do uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005.

BRASIL. **Lei n° 9.605**, de 12 de fevereiro de 1998. Lex: Acesso em: 09 jun. 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília; 2006.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, P. 60 – (Série B. Textos Básicos de Saúde, 1ª edição) 2009.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco. p. 382, 2003.

BRASIL. **Portaria Normativa n° 122-P, DE 19/03/85**. O PRESIDENTE DO INSTITUTO BRASILEIRO DO DESENVOLVIMENTO FLORESTAL - IBDF, no uso das atribuições que lhe confere o artigo 25, inciso IX, do Regimento Interno aprovado pela Portaria Ministerial n.º 229, de 25 de abril de 1.975, e, tendo em vista as disposições da Lei n.º 4.771, de 15 de setembro de 1.965 - Código Florestal, e o Decreto-Lei n° 289, de 28 de fevereiro de 1967.

BRITO, V.F.S.; DANTAS, I.C.; DANTAS, D.S. **Plantas medicinais utilizadas pela comissão de mulheres na zona rural no município de Lagoa Seca-PB**. ISSN 1983-4209 – Vol. 03, 2009.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI, J.; **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Vol. 27, p. 902. 2007.

BURT, S.; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a 59 review. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 94, n. 3, p. 223 -253, 2004.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, Vol.148, p.288-294, 2007.

CANO, A.; ACOSTA, M.; ARNAO, M.B. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox report : communications in free radical research**, vol. 5, n. 6, p. 365–370, 2000.

CANUTO, K.M. **Efeito Antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* Muell.** Arg. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2005.

CARNEIRO-TORRES, D.S. **Diversidade de *Croton L.* (Euphorbiaceae) no Bioma Caatinga.** Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana. 296 f. 2009.

CARNEIRO-TORRES, D.S.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A.M.; BERRY, P.E. & RIINA, R. Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. **Brittonia**. Vol. 63: p. 122-132. 2011.

CARVALHO, A.C.B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, vol.48, n.2, p.219-237, 2010

CARVALHO, K.S.; CRUZ, R.C.D.; SILVA, S.L.E.C.; GUALBERTO, S. A. Atividade larvicida dos extratos aquosos e do hidrolato das folhas de croton tetradenius sobre o aedes aegypti. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.11 n.21; p. 2015.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos Secundários.** 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2005.

CATUNDA JÚNIOR, F.E.A. **Estudo químico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*.** Monografia (Lic. Plena em Química). Universidade Estadual do Ceará, 2003.

CATUNDA-JÚNIOR, F.E.A.; LUCIANO, J.H.S.; MORAIS, S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Vol.4:p 23-29. 2002.

CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R.; ANGELO, P.C.S.; XAVIER, J.J.B.N. Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de dois morfotipos de sacaca (*Croton cajucara* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, vol. 8, n. 4, p. 117-119, 2006.

CHAVES, M.H.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; COSTA, D.A.; OLIVEIRA, C.A.A.; COSTA, A. F.; J. BRITO, F. E. M. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Vol. 20, p. 106-112, 2010.

CHAVES, M.H.; SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; JR-VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.C.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, Vol. 30: p. 351-355. 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. – **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. 23 (1). Substitui a Norma M2-A7, 20 (1), 2005.

COELHO DE SOUZA, G.; 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**. vol. 90, p. 135-143. 2004.

COLLIN, H. A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulators**. vol.34, p.119-134, 2001.

CORDEIRO, I.E.D.S. CARNEIRO-TORRES. Euphorbiaceae In: GIULIETTI, A.M.; A.A. CONCEIÇÃO E.L.P.Q. Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido Brasileiro vol. 1:p. 106–116. 2006.

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**. Vol. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: Editora UFC. 1981.

CUNHA, A.P.; RIBEIRO, J.A.; ROUQUE, O.R. “Plantas Aromáticas em Portugal: caracterização e utilizações”. Ed. Fundação Calouse Gulbenkian, Lisboa, 2007.

DANCER, S.J. The problem with cephalosporins. **J Antimicrob Chemother**. Vol. 48: p. 463-478. 2001.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, vol.88, p. 308-316. 2000.

DOURADO, R.C.M., SILVEIRA, E.R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation, **Journal of Essential Oil Research**, vol. 17: p. 36-40. 2005.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos naturais. **Multiciência**. vol.7. p.16. 2006.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. vol. 21, n. 4, p. 308- 23, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199238>

EHRNHÖFER-RESSLER, M.M.; FRICKE, K.; PIGNITTER, M.; WALKER, J.M.; WALKER, J.; RYCHLIK, M. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. **Journal Agric Food Chem.** Vol. 61: p. 3451-9. 2013

ENDONÇA, D.E.; ONOFRE, SIDENEY, B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** vol. 19: p. 577-581. 2009.

ESMERINO, L.A; PEREIRA, A.V. ADAMOWICZ, T.; BORGES, D.M.; TALACIMON, E.A; SCHELESKY, M.E. Método Microbiológico para determinação para a potência de antimicrobianos. Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, vol.10(1): p. 53-60, 2004 **Farmacopéia Brasileira.** 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FALCÃO, D.Q.; EDLAINE, R.; COSTA, ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R. M.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** vol. 16: p. 73-76. 2006.

FAZENDEIRO J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; MCWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G.P.; ASBURY, M. A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H.G.; ELIAS, C.; FANNING, G.R.; STEIGERWALT, A.G.; O'HARA, C.M.; MORRIS, G.K.; SMITH, P.B.; BRENNER, D.J. Biochemical de novas espécies e biogroups de *Enterobacteriaceae* isoladas a partir de amostras clínicas. **Journal Clin Microbiol.** Vol. 21: p. 46-76. 1985.

FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L; MC GAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacology.** Vol 94: p 205-217, 2004.

FONTENELLE, R.O.S., MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; NASCIMENTO, N.R.F.; KERNTOPF, M.R.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology.** vol. 104, p.1383-1390. 2008.

FRANÇA, F.; MELO, E.; GÓES N.A.; ARAÚJO, D.; BEZERRA, M.G.; RAMOS, H. M.; CASTRO, I.; GOMES, D. Flora vascular de açudes de uma região do semi-árido da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** vol. 17, p. 549-559, 2003.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal** vol. 25: p 112-113, 2010.

FREITAS, J.V.B.; GOMES, C.L.; VIEIRA, M.G.S.; QUEIROZ, V.A.; NETO, A.C.; GRAMOSA, N.V. Constituintes, químicos voláteis das folhas de *Croton muscicapa* Mull. Arg. In:**Congresso Brasileiro de Química, 2010.**

GARIGLIO, M.A. (Orgs.). Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010.

GASTELL, P.L.P.; ALEJO, J.L.P. Métodos para medir el dano oxidativo. **Revista Cubana de Medicina Militar**, vol. 29, p. 192-198, 2000.

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.

GUIMARÃES, A.G., QUINTANS, J.S.S., QUINTANS-JR, L.J. Monoterpenes with Analgesic Activity. A Systematic Review. **Phytother. Res.** v.27, p.1–15, 2013.

GUIMARÃES, A.G. et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol.*; v. 385, n.3, p.253-63, 2012.

GEOGOPAPADAKOU, N.H. Infectious disease: drug resistance, new drugs. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, vol. 5, p. 181-191, 2005.

GODINHO, V.M. **Investigação de bactérias patogênicas por tecnicas moleculares em um sistema de tratamento de esgotos compostos por reator UASB e lagoas de polimento.** Dissertação (Doutorado) - Programa de pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

GONÇALVES, L.A.; BARBOSA, L.C.A.; AZEVEDO, A.A.; CASALI, V.W.D.; NASCIMENTO, E.A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 6, n. 1, p.8-14, 2003.

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.

GOINGUENÉ, S.P.; TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**. vol. 129, p.1296-1307. 2002.

GUPTA, D.; BLEKLEY, B.; GUPTA, R.K. Dragons blood: botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of ethnopharmacology**. IBAMA/PNUD, vol. 115, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 27: p. 1-93. 2006.

GWENDOLYN, P.G. Engelkirk; Burton R. **Microbiologia para as Ciências da Saúde**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

HALLIWELL, B. **The antioxidant paradox**. *Lancet*. 2000.

HALL-STOODLEY e STOODLEY P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**. Vol. 11(7), p. 1034-1043, 2009.

HENRIQUEZ C, ALIAGA C, LISSI E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. **Int J Chem Kin.** Vol. 34(12): p. 659-65. 2002

IORQUE M.K, BROOKS, G.F.; FISS E.H. Avaliação da auto SCAN-W: Um sistema rápido para identificação e testes de susceptibilidade de bacilos gram-negativos fermentativo. **Journal Clin Microbiol.** vol. 30: p. 2903-2910. 1992.

JAYAPRAKASHA, G.K., NEGI, P.S., JENA, B.S., RAO, J.M. Antioxidant and antimutagenic activities of Cinnamomum zeylanicum fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis.** vol.20, p.330–336, 2007

JECFA. New specifications prepared. in FAO JECFA Monographs 7, **World Health Organization**, 2009.

JONES, K. Review of Sangre de Drago (Croton lechleri) – A south american tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine.** Vol. 9: p. 877-896, 2003.

KADIOGLU, A; WEISER, J.N; PATON J.C.; ANDREW P.W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Revisit Microbiol**, vol. 6, n. 4, p. 288-301, 2008.

KALEMBA D, KUNICKA A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, 10:813-829.2003.

KAYAOGU G, ORSTAVIK D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** Vol. 15:p. 308-20. 2004.

KLACNIK A.; PISKERNIK, S.; JERSEK B.; MOZINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal Microbiol Methods.** vol. 81:p. 121–126, 2010.

KOLAKOWSKA, A.; SIKORSKI, Z.E. Lipid Oxidation in Food Systems. In: Chemical and Functional Properties of Food Lipids. Boca Raton: **CRC PRESS**, 2003. (Versão digital em: www.crcpress.com).

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco. Estresse oxidativo e atividade física. **Revista Nutrição.** Campinas, vol. 16, n.4, p.433-441, 2003.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C.S.; DUBEY, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against postharvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, vol.9, p.575-580, 2008.

KUNNER, D.; OHO A.M. O desafio do controle da resistência aos antimicrobianos os hospitais. **Pharmacia Brasileira.** Vol. 36: p. 90-92. 2003

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

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI_FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.25, n.4, p.726-732, 2005.

KVIECINSKI, M.R. Avaliação das Atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L.(Asteraceae). Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia, 2007.

LAPENDA, T.L.S.; MORAIS, W.A.; ALMEIDA, F.J.F.; FERRAZ, M.S.; LIRA, M.C.B.; SANTOS, N.P.S.; MACIEL, M.A.M.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Encapsulations of trans-dehydrocrotonin in liposomes: an enhancement of the antitumor activity. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, vol. 9, n. 3, p.499-510, 2013.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: **ARGOS**, p. 483-501, 2001.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 16: p. 300-306, 2006.

LOPES E LOPES, M.I.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J.A.P.; SALVADOR, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.95, n.2-3, p.437-445, 2004.

LOURENS, A.C.U. In: Vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African: *Helichrysum* species. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 95, p.253-258, 2004.

LOW, D.E. Changing trends in antimicrobial-resistant pneumococci: it's not all bad news. **Clin Infect Dis**.vol.41. p. 228-33, 2005.

LUCENA, M.F.A.; AMORIM, B.S.; ALVES, M. Sinopse das espécies de Euphorbiaceae s.l. do Parque Nacional Serra de Itabaiana, Sergipe, Brasil. **Revista Caatinga**. 22(4): 214-224. 2009.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, vol.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAIA, G.N. Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades. 1ª ed. **Leitura & Arte**. P.19-31, 2004.

MANDELL, L.A. Epidemiology and etiology of community-acquired pneumonia. **Infect Dis Clin North Am**. Vol. 18(4): p.761-76, 2004.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Vol. 45, pp 594-598. 1968.

MARTINS, R.C. **Plantas Medicinais e Aromáticas**. III Relatório interno. (2001).

MCCHESENEY, J.D.; CLARK, A.M.; SILVEIRA, E.R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus* II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. **Pharmacology Research**, vol.8, p.1243-1247, 1991.

MECCIA, G.L.B.; ROJAS, C.; ROSQUETE & A. SAN FELECiano. Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. **Journal Flavour Fragrance**. vol. 15:: 144-146. 2000.

MEDEIROS, J. A. M.; SILVA, G. S.; SILVA, I. S. A.; MELO, A. M.; LIMA, S. G.; BELTRÃO FILHO, E. M.; QUIRINO, M. R. Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill) e avaliação de sua atividade citotóxipotencial frente a *artemia salina leach*. ABQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA. 54º congresso Brasileiro em Química, Natal, Rio Grande Norte, 03 a 07 de novembro 2014.

MELO, E.D.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, vol. 26, n. 3, p. 639– 644, 2006.

MELO, V.V.; DUARTE, I.P.; SOARES, A.Q. Guia Antimicrobianos. Universidade Federal de Goiás Hospital das Clínicas Coordenação de Farmácia Residência Multiprofissional em Saúde Eixo Específico: **Farmácia**. 1.ed. - Goiânia, 2012.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. vol. 53, n. 2, p. 127-130, 2001.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Vol. 48, p 91. 1971.

MONTE, F.J.Q. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste –*Croton argyrophyloides* Muell. Arg.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1980.

MORAIS S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; STONE, J.; MARTINS NETO, R. D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *croton* do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, 29: 907-910. 2006.

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, vol. 29, p. 907-910, 2006.

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JÚNIOR F.E.A.; SILVA, A.R.A.; STONE, J.; NETO, M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, vol. 29: p. 907-910. 2006.

MORAIS, S.M.; NETO, M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil, 2005.

MOTHANA, R.A.A.; HASSON, S.S.; SCHULTZE, W.; MOWITZ, A.; LINDEQUIST, U. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species. **Food Chem.** Vol. 126(3): p.1149-54. 2011

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.J.; DOMÍNGUEZ, M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, vol. 72, p. 145-171, 2001.

MUKHERJEE, P.K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity. In: MANDER, L.; LIUHUNG-WEN. Comprehensive natural products II. **Hardbound: Elsevier**. chap. 3.14, p. 479-507. 2010. Multiciência. VOL.7. p.16. 2006.

MURRAY, P.R.; PFALLER, M.A.; KOBAYASHI, G.S.; OSENTHAL, K.S. Microbiologia médica. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 762. 2004.

NARDI, G.M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; ARRUDA, D.C.; DELLE MONACHE, F. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, Vol.10: p 176–84. 2003.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.31, p.247-56, 2000.

NASCIMENTO, J.L. COELHO, A.G.; BARROS, Y.S.O.; SILVA, O.A.; FREITAS, R.M.; ROCHA, M.S. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. **Boletim Informativo Geum**, vol. 5, p. 44-53, 2014

NCCLS. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. **NCCLS document M44-A**, 2004.

NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada - M2-A8. 8. ed. USA: NCCLS, p.58, 2003.

NETO, A. **Antibióticos na Prática Médica**. 5. ed. São Paulo: Roca, p. 304. 2000.

NETO, J.D.N.; SOUZA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. Vol. 34, p.125-130. 2013

NEVES, I.A.; CAMARA, C.A. Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and essential oil composition of four *Croton* species from Caatinga biome in northeastern Brazil. **Naturals Products Community**, vol.6, n. 6, p.893-899, 2011.

NEVES, J.M.; MATOS, C.M.; MOUTINHO, C.G.; GOMES, L.R.; TEIXEIRA, T. Actividade antioxidante e avaliação in vitro da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *Mentha piperita*. **Rev Fac. Ciênc. Saúde**. Vol.6: p. 344-54. 2009

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

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

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO S.; ALONZO, V. **FEMS Microbiol Lett**. Vol. 230, p. 191-195, 2004.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira Farmacognosia**, vol.13, p. 5-8, 2003.

OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. **Journal Med Microbiol**, vol. 51, n. 2, p. 98-104, 2002.

OKE, F.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALTUNDAG, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, vol. 112, p. 874-879, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; VALETIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702. 2009.

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.

OLIVEIRA, F.P.; LIMA E.O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C.; BARRETO, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 16: p. 510-516, 2006.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mecanismo de ação de orégano espanhol, canela chinesa, e óleos essenciais salgados contra as membranas celulares e muros de *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes*. **Journal Food. Prot.** Vol. 69, p. 1046-1055, 2006.

OYEDEMI, S.O.; OKOH, A.I.; MABINYA, L.V.; PIROCHENVA, G.; AFOLAYAN, A.J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**. vol. 8, n. 7, p. 1280-1286, 2009.

PRABUSEENIVASAN, S., JAYAKUMAR, M., IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Compl Alternative Medicine**. Vol 6: p 39. 2006.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PADUCH, R.; KANDERFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, vol. 55, n. 5, p. 315–327, 2007.

PALMEIRA, J.R.S.F.; ALVES, V.L.; MOURA, F.S.; VIEIRA, L.F.A.; COSERVA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.16, n.3, p.397-402, 2006.

PASQUA, R.D.; BETTS, G.N.; HOSKINS, M.E.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrana toxicidade de compostos antimicrobianos a partir de óleos essenciais. **Journal Agric. Comida. Chem.**, vol. 55 p. 4.863-4.870. 2007.

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**, vol.35, p.203-06, 2001.

PEREIRA M.S.V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; TAKAKI, G.M.C. Eliminação de resistência a drogas por fluoroquinolonas em *Staphylococcus aureus* de Origem Bovina. **Pesq Veterinário Bras.** 24: 11-14, 2004.

PEREIRA, B.E.; DIEGUES, A.C. Conhecimento de populações tradicionais como possibilidade de conservação da natureza: uma reflexão sobre a perspectiva da etnoconservação. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, n. 22, p. 37-50. Editora UFPR, jul./dez, 2010.

- PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res Int**; vol. 39: p. 791-800. 2006
- PESSOA, O.D.L.; NETO, M.A.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. . **Química Nova**, Vol. 35, No. 11, 2169-2172, 2012.
- PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PINO, J.A.; MARBOT, R.; PAYO, A.; HERRERA, P.; MARTI, M.P. Volatile leaf oils from Cuban Euphorbiaceae: *Croton rosmarinoides* Millsp., *Croton litoralis* Urb., *Croton spiralis* Muell. Arg. and *Croton myricifolius* Griseb. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 18, n. 3, p. 256-260, 2006.
- POLLITO, P.A.Z.; TOMAZELLO, M.; TAKASHIBA, H.E. Contribuição ao conhecimento do status de conservação das espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Brasil. **Natureza e Conservação**, vol.2, p.42-55, 2004.
- PONTES, W.J.T, DE OLIVEIRA, J.C.G, CÂMARA, C.A.G, DE ASSIS, C.P.O, DE OLIVEIRA, J. V, JÚNIOR, M. G. C. G, BARROS, R. Effects of the Ethanol Extracts of Leaves and Branches from Four Species of the Genus *Croton* on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **BioAssay**, vol. 6, n. 3, 2011.
- PORTE, A.; GODY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, vol. 19, p. 193-210, 2001.
- PORTO, R.R.A.; ROEL, A.R.; SILVA, M.M.; COELHO, R.M.; SCHELEDER, E.J.D.; JELLER, A.H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** vol. 41, p. 586-589, 2008.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, vol. 48, p. 3396-3402, 2000.
- RADULOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTENAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 34, n. 8, p. 648-653, 2006.
- RAHMAN, A.; KANG, S. C. Inhibition of foodborn pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) B.S.P. **Journal of Food Safety**. vol. 29, p. 176-189, 2009.
- 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). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 4. p. 89-96. 2004.

RANDAU, K.P.; FLORENCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S.; Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespásmica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.14, n.2. 2002.

RAO, V.S.; GURGE, L.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; MARTINS, D.T.O.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, F.A. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.113, n.2, p.357-360, 2007.

RAZAVI, S.M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S.D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18: 1-5. 2008.

REED T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biol Med**. Vol. 51(7): P. 1302-19. 2011

ROCAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. JR.; SANTOS K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Revista Endod**. vol. 30: p. 315-20. 2004.

ROESLER, R; MALTA, L. G; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R. B; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p.53-60, 2007.

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

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, 127: 1-4, 2007.

SÁ, R.C.S.; ANDRADE, L.N.; SOUSA, D.P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**. Vol. 18. p. 1227-54. 2013.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm**. Vol. 42:p. 1-16. 2006.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plant. **Plant. Growth Regulation**, vol 34:p. 3-21. 2001.

SAIDANA, D.; MAHJOUB, M. A.; BOUSSAADA, O.; CHRILAA, J.; CHÉRAIF, I.; DAAMI, M.; MIGHRI, Z.; HELAL, A. N. Composição química e atividade antimicrobiana de compostos voláteis de *Tamarix boveanai* (Tamaricaceae) **Microbiol. Res.** vol.163 pp. 445-455, 2008.

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

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.E.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal Braz. Chem. Soc.** vol. 18(1): p 11-33. 2007.

SANCHEZ-MORENOS C, LARRAURI J.Á, SAURA-CALIXTO F.A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J Sci Food Agric.** vol. 76: p 270. 1998.

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.** Vol. 103: p. 823-828. 2007.

SANTANA, V.S. Estudo comparativo de óleos essenciais de espécies de *Croton* do estado de Sergipe. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

SANTOS, A. PADUAN, R.H.; GAZIN, Z.C.; JACOMASSI, E.; OLIVEIRA, P.S.; CORTEZ, D.A.G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

SANTOS, F. Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn). Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande. Patos-PB. 2011.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 32: p. 293-297. 2001.

SBB. Centuria Plantarum Brasiliensium Exstintionis Minitata. Sociedade Botânica do Brasil. Brasília, DF. (1992).

SECCO, R.S. *Croton faroensis*, uma nova Euphorbiaceae da Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p.333-335, 2004.

SILVA V.A.; OLIVEIRA, C.R.M.; PESSÔA, H.L.F.; PEREIRA M.S.V. Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Mull. On bactéria that cause dental caries. **Revista de Odontologia da UNESP.** V.40, n.2, p.69- 72, 2011.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. Plantas Medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa: artes e livros, p. 135, 2000.

SILVA, F.K.S. Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. p 162, 2008.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.17: p. 572-577. 2007.

SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Org.). Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente**: Universidade Federal de Pernambuco, p. 382, 2004.

SILVA, J.S.; SALES, F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, Vol. 4, p. 879-901, 2009.

SILVA, N.A.; OLIVEIRA, F.F.; COSTA, L.C.B.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, R.A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill. N.E.BR.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 8:p. 52-55. 2006.

SILVA, S.L.C.; CARVALHO, M.G.; GUALBERTO, S.A.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; VASCONCELOS, K.C.F.; OLIVEIRA, N.F. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Acta Veterinaria Brasilica**, vol.4, n.4, p.252-258, 2010.

SILVA, S.R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA L.H.; MARTINS, MARCUS V.M. Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos Gerais sobre Legislação e Comércio. Centro Nacional de Conservação da Flora, 2001.

SILVA, S.R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA L.H.; MARTINS, MARCUS V.M. Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos Gerais sobre Legislação e Comércio. Centro Nacional de Conservação da Flora, 2001. http://fitoscience.com.br/administracao/upload/20100823_101801.pdf; MAIO - 2014.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRAM, A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol. 18, n. 4, p. 618-626. 2008.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e feniliterpenóides. **Química Nova**, vol. 27(1): p. 46- 49. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. ed. 6, Porto Alegre, ED. UFRGS p. 1102, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. 6, Porto Alegre, ED. UFRGS, p.1102. 2007.

SIQUEIRA, R.J.B.; MAGALHÃES P.J.; LEAL-CARDOSO J.H.; DUARTE, G.P.; LAHLOU S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sciences**, vol.78, n.20, p.2365-2372, 2006.

SISTEMA. Estadual de Informações Ambientais. Disponível em: <<http://www.seia.ba.gov.br>> Acesso em: 23 maio. 2014.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; ARAÚJO, P.B.M; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M. H. Fenólicos totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. Vol. 30(2): p. 351-5. 2007

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M. S. Antioxidant Determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, Vol. 181, p. 1199–1200, 1958.

SOUZA E.L.; STAMFORD T.L.M.; LIMA E.O.; TRAJANO, V.N. Emergência e resistência microbiana **Laes & Haes** Vol. 26: p. 112-128, 2005.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO. **Brasil. Acta bot. bras.** Vol. 20, p. 135-142. 2006.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUSA, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Braz Arch Biol Technol.** vol. 48: 245-250. 2005

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, Vol.17, nº113, p. 38-42, 2003.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, S.A.M.; MEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, Vol. 6, n.10, p. 1-11, 2010.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V.N.; SMYTH, W.F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 33, p. 421–426, 2009.

SPADACIO, C.; CASTELLIANOS, M.E.P; ALEGRES, S.M; TOVEY, P; BRROM, A. Medicinas alternativas e complementares: uma metassíntese. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro.vol 26(1): p. 7-13, 2010.

SUÁREZ, A.I.; BLANCO, Z.; COMPAGNONE, R.S.; SALAZAR-BOOKAMAN, M.M.; ZAPATA, V.; ALVARADO, C. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**. vol.105, p.99-101. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artemed: 2009.

TEIXEIRA, E.H.; SÁ, N.C.; CAVALCANTE, T.T.; ARAÚJO, A.X.; SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; CUNHA, R.M.S.; CUNHA, B.S. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives of oral biology**, vol. 57, 550–555, 2012.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol.19, p.669-675, 2006.

THORMAR, H. Lipídeos e óleos essenciais como Agentes Antimicrobianos. John Wiley e Sons, Reino Unido. p. 203-238. 2011.

TOLEDO, M.C.F. Aspectos toxicológicos dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 33, p.245-255, 1999.

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

TRABUL S.I.L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 3 ed. São Paulo: Atheneu,1999.

VARGAS, R.M.F.; CASSEL, E.; GOMES, G.M.F.; LONGHI, L.G.S.; SERAFINI, L.A.; SANTOS, A.C.A. The carqueja essential oil supercritical extraction: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brazil, vol. 23, n. 03, p. 375-382, 2006.

VERPOORT, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**. vol.13, p.181-187, 2002.

VIEGAS J.R.C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. Vol. 26, 2003.

VILA VERDE, G.M; FERREIRA, H.D; REZENDE, M.H; PAULA, J.R. Estudo farmacognóstico das folhas do anis do cerrado, *Croton zehntneri* Pax & H. Hoffm coletado em Serranópolis – Go. **Revista Elet. de Farm.**, vol. 2, n. 2, 2005.

WEBSTER, G.L. Synopsis of *Croton* and *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in Western Tropical Mexico. **Contributions from the University of Michigan Herbarium** 23: 353-388. 2001.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.Z.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.D.; MCDERMONT, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microb Infect.** Vol. 4: p. 405-41. 2002

WHO. (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva.pp.1-30. [Em linha]. Disponível em <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4928e/s4928e.pdf>>

WONG-LEUNG, Y.L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, vol. 69, p. 11-16,1988.

WOOLHOUSE, M.E.J. População biologia dos países emergentes e re-emergentes patógenos. **Tendência Microbiol.** vol.10: p. 3-7, 2002.

WRIGHT, G.D. Mecanismos de resistência aos antibióticos. **Curr Opin Microbiol Chem.** Vol. 7: p. 563-569, 2003.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. Antioxidants in food – practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, p. 380. 2001. (Versão digital em: www.woodhead-publishing.com)

ZOLETTI, G.O.; SIQUEIRA, J.F.JR.; SANTOS, K.R. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. **Journal Endod.** Vol. 6; p. 32:722. 2006.