



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ELAYNE CARDOSO DE VASCONCELOS

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus* BAILL**

FLORIANÓPOLIS

2022

ELAYNE CARDOSO DE VASCONCELOS

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus* BAILL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão, (UFSC).
Coorientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, (UFC).
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi, (UFPR).

FLORIANÓPOLIS

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vasconcelos, Elayne Cardoso de
Caracterização do potencial bioativo do óleo essencial e
do extrato aquoso das folhas de *Croton blanchetianus* BAILL
/ Elayne Cardoso de Vasconcelos ; orientador, Gláucia
Maria Falção de Aragão, coorientador, Evânia Altina Teixeira
de Figueiredo, coorientador, Daniel Angelo Longhi, 2022.
213 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Óleo essencial. 3.
Microbiologia preditiva. 4. Bactérias patogênicas e ácido
lálticas deteriorantes. 5. Modelagem. I. Aragão, Gláucia
Maria Falção de. II. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira de.
III. Longhi, Daniel Angelo IV. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. V. Título.

ELAYNE CARDOSO DE VASCONCELOS

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus* BAILL

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão - Presidente PPGEAL

Prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins - Membro externo IFGO

Profa. Dra. Deise Helena Baggio - Membro externo UFSC

Dra. Denise Adamoli Laroque - Membro interno PPGEAL

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão
que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de
Alimentos.

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado aos meus queridos: pai (*in memoriam*), mãe, irmã, esposo e filho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a proteção Divina em todos os momentos.

Ao meu pai Tiago Camelo de Vasconcelos (*in memoriam*) e minha mãe Luiza Cardoso Ribeiro de Vasconcelos por serem sempre presentes e me proporcionarem acesso a bons colégios e a uma educação com qualidade, que serviram de alicerce para as minhas realizações.

À minha irmã Elsia Cardoso de Vasconcelos por sempre torcer para o meu êxito, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Roberto Henrique Dias da Silva e meu filho Thiago Henrique Cardoso Dias da Silva, pela compreensão da ausência física em certos momentos e no apoio para mais essa conquista.

À minha orientadora, prof. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão, o meu especial agradecimento. Obrigado por todos os ensinamentos, amizade, pela paciência e dedicação, orientação sábia e oportuna nos momentos que mais precisei, tudo resultado da sua competência e profissionalismo.

À minha coorientadora, prof. Dr^a. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, que me acolheu deste o meu mestrado com sua coorientação, seus ensinamentos, sensibilidade e sua amizade que levo e levarei por toda minha vida! Minha gratidão.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Daniel Angelo Longhi, por ter aceitado contribuir com esse trabalho, pela sua atenção, presteza e pelo compartilhamento do seu conhecimento sobre os tratamentos dos dados e todas as orientações da minha tese.

A todos os professores do Doutorado Institucional (DINTER), entre Instituto Federal do Ceará (IFCE) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo conhecimento compartilhado, disponibilidade e convivência agradável.

Ao meu professor de graduação e primeiro orientador, Dr. Manoel Henrique Klein Júnior, pelos ensinamentos, dedicação, incentivos que contribuíram de forma decisiva para a construção da minha carreira profissional e sua amizade de longas datas que muito estimo.

Ao meu professor e orientador do mestrado Dr. Jorge Fernando Fuentes Zapata pela sua orientação sempre sábia, dedicação incondicional em ajudar para o melhor desempenho de todo o trabalho e sobretudo pela amizade construída.

A todos meus professores que tive ao longo da vida que terão sua contribuição e foram imprescindíveis para a minha formação.

Ao prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e a prof. Dr^a. Nayara Coriolano de Aquino, por compartilhamento dos seus conhecimentos, sua disponibilidade e ajuda na coletada e obtenção da matéria-prima.

À professora Dr^a. Larissa Moraes Ribeiro da Silva pelo apoio e disponibilidade prestada em todos os momentos.

Ao prof. Dr. Boris Stambuk por ter concedido o equipamento ELISA para realização dos experimentos e à técnica do laboratório Gabriela Duarte Karasiak pelo acompanhamento na realização das análises.

Aos pesquisadores da EMBRAPA, Dr^a. Celli Rodrigues Munix e Dr. Kirley Marques Canuto, pela ajuda técnica na análise de microscopia eletrônica e cromatográfica, respectivamente, as quais contribuíram de maneira significativa para o enriquecimento do trabalho desenvolvido.

À Andréia Tremarin e Denise Adamoli Laroque, por aceitarem fazer parte da banca examinadora de qualificação e pelas contribuições para o enriquecimento do trabalho.

Ao prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins, a prof^a. Dra. Deise Baggio Ribeiro e a Dra. Denise Adamoli Laroque, pela disponibilidade em fazer parte da banca da tese e pelas contribuições valiosas.

Às bolsistas Rayane Clecia de Sousa Menezes (UFC) e Ana Sheila de Queiroz Souza (EMBRAPA) por suas colaborações indispensáveis na execução de determinadas análises.

Aos meus colegas da turma do Doutorado Institucional (DINTER-IFCE/UFSC), pelo aprendizado coletivo, angustias compartilhadas e momentos de descontração.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) da UFSC, em especial Wiaslan Figueiredo Martins, Danielle de Sousa Severo, Natielle Maria Costa Menezes e Camila Casagrande Paganini, os quais me receberam de braços abertos no laboratório, compartilharam seus aprendizados e experiências e me ajudaram nessa conquista.

Às minhas amigas, Maria Jaiana Gomes Ferreira e Flayanna Gouveia Braga Dias, pela receptividade no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) da UFC,

convivência, amizade, acalma de aflições, ensinamentos e aprendizados compartilhados.

Ao meu amigo de trabalho o professor Dr. Antônio Belfort Dantas Cavalcante (*in memoriam*), além de sua companhia agradável, pelo incentivo e sugestões de projetos para o doutorado.

Aos meus colegas de trabalho, professores do IFCE, campus Limoeiro do Norte, que acreditaram que seria possível a realização do meu doutorado e me ajudaram para o êxito deste.

Ao IFCE por proporcionar, contribuir e apoiar na realização dessa etapa profissional.

À UFC, UFSC e ao Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pelo apoio e suporte fornecidos para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Doutorado Institucional (DINTER/IFCE/UFSC) pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que de alguma forma participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento da realização deste sonho, minha eterna GRATIDÃO.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

(Guimarães Rosa, 1956).

RESUMO

Considerando a busca por antimicrobianos provenientes de fontes naturais, o *Croton blanchetianus* (marmeleiro) se mostra como uma alternativa promissora, por ser uma planta presente no bioma Caatinga, que apresenta atividade biológica. Dessa forma, este trabalho objetivou caracterizar e avaliar o óleo essencial (OECB) e o extrato aquoso (EACB) das folhas frescas e secas de *C. blanchetianus*. Para tal, no OECB foram identificados os compostos químicos, a atividade antimicrobiana, o efeito toxicológico e a ação desse óleo essencial sobre bactérias patogênicas e as ácido-lácticas (BAL) deteriorantes, a qual foi modelada. No EACB foram avaliadas a atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos bioativos. O OECB das folhas frescas e secas foi extraído por hidrodestilação e o EACB, proveniente do processo de obtenção do óleo essencial, foi coletado e liofilizado. No EACB foram quantificados os compostos fenólicos, taninos, flavonoides e atividade antioxidante por meio de métodos espectrofotométricos. Foi determinada a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, e os danos morfológicos causados às células bacterianas foram observados por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Foi realizada a caracterização físico-química do OECB, sendo determinada a densidade e o índice de refração. A análise da composição química dos OECBs foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa (CG-EM). A avaliação da atividade antimicrobiana do OECB proveniente das folhas frescas e secas foi realizada pelo método de difusão em ágar, sobre as bactérias patogênicas (BP) *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli*, que são patógenos de interesse em alimentos. Foram ainda determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do OECB sobre as BP e as BAL, *Weissella viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides*, pelo método da microdiluição. No óleo essencial das folhas secas, a toxicidade foi avaliada utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Para avaliação da ação do OECB sobre as BAL, foram determinadas a dose inibitória mínima (DIM) na fase vapor e realizada a análise dos compostos voláteis do óleo essencial por CG-EM, pela técnica de *headspace*. A cinética microbiana foi estudada para as BP e BAL com concentrações de 0,90, 1,80, 2,71 e 4,51 mg/mL do óleo essencial das folhas secas. Para modelar a ação do óleo essencial sobre as BP e BAL comparou-se os modelos de inativação log-linear com ombro e Weibull, e de crescimento de Gompertz modificado e Baranyi e Roberts. Na análise estatística, foram utilizados os índices: coeficiente de determinação, raiz do erro médio quadrático, fator de tendência e fator de exatidão. Os resultados mostraram a presença de elevados teores de compostos fenólicos, taninos e flavonoides, bem como a presença de antioxidantes no extrato aquoso. O EACB das folhas frescas e secas apresentaram atividade contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e provocaram danos celulares, mas não foram efetivos sobre *S. Enteritidis* e *E. coli*. Os compostos químicos majoritários presentes no OECB, de ambas as folhas, foram: α -pineno, eucaliptol, sativeno, E-cariofileno, biciclogermacreno e espatulenol. O eucalyptol e D- α -pinene são os voláteis majoritários presentes no óleo essencial das folhas secas. A densidade relativa e o índice de refração do óleo essencial das folhas secas foram 0,9025 g/mL e 1,4963, respectivamente. O óleo essencial das folhas frescas e secas apresentou atividade antimicrobiana variável contra as diferentes BP testadas, no entanto, o óleo essencial proveniente das folhas secas mostrou uma maior ação contra as BP. Observou-se o efeito bacteriostático e bactericida sobre as BAL, tanto na fase líquida como na fase

de vapor do óleo essencial. A concentração letal (CL₅₀) do OECEB das folhas secas sobre a *A. salina* foi de 326 µg/mL, considerado moderadamente tóxico. Nas cinéticas, o OECEB inativou as BAL, e o modelo primário de Weibull foi o que melhor descreveu a inativação ao longo do tempo para *W. viridescens* (com p fixo de 1,52) e *L. mesenteroides* (com p fixo de 1,49). As bactérias *L. monocytogenes* e *S. aureus* também foram inativadas pelo OECEB, descritas pelo modelo de Weibull com p fixos de 0,74 e 1,11, respectivamente. As bactérias *S. Enteritidis* e *E. coli* não foram inibidas pelo OECEB e apresentaram cinéticas de crescimento que foram descritas pelo modelo de Baranyi e Roberts. Estes resultados demonstram a potencialidade de aplicação do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas do *C. blanchetianus* como fontes alternativas de compostos antimicrobianos e compostos bioativos com ação antioxidante no extrato aquoso, destacando-se por serem produtos naturais.

Palavras-chave: marmeleiro. antimicrobiano. microbiologia preditiva.

ABSTRACT

Considering the search for antimicrobials from natural sources, *Croton blanchetianus* (marmeleiro) shows itself as a promising alternative because it is a plant present in the Caatinga biome, which has biological activity. Thus, this work aimed to characterize and evaluate the essential oil (CBEO) and aqueous extract (CBAE) of fresh and dry leaves of *C. blanchetianus*. To this end, the CBEO identified the chemical compounds, the antimicrobial activity, the toxicological effect and the action of this essential oil on lactic acid and pathogenic bacteria, which was modeled. In the CBAE, the antioxidant and antimicrobial activity of bioactive compounds were evaluated. The CBEO from the fresh and dry leaves was extracted by hydrodistillation and the CBAE, from the essential oil process, was collected and lyophilized. In the CBAE, phenolic compounds, tannins, flavonoids and antioxidant activity were quantified through spectrophotometric methods, the antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method, and the morphological damage caused to bacterial cells was observed by Transmission Electron Microscopy. The physical-chemical characterization of the CBEO was carried out, and the density and refractive index were determined. The analysis of the chemical composition of the CBEOs was performed by gas chromatography coupled to mass spectrophotometry (GC-MS). The evaluation of the antimicrobial activity of CBEO from fresh and dried leaves was performed by the agar diffusion method, on pathogenic bacteria (PB) *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, which are pathogens of interest in food. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of CBEO on PB and lactic acid (LAB), *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides* were also determined by the microdilution method. In the essential oil of the dried leaves, the toxicity was evaluated using the microcrustacean *Artemia salina*. To evaluate the action of CBEO on LAB, the minimum inhibitory dose (MID) in the vapor phase was determined and the analysis of volatile compounds of the essential oil was performed by GC-MS, using the headspace technique. Microbial kinetics were studied for PB and LAB with concentrations of 0.90, 1.80, 2.71 and 4.51 mg/mL of essential oil from dried leaves. To model the action of the essential oil on the PB and LAB, the log-linear inactivation models with shoulder and Weibull, and the modified Gompertz and Baranyi and Roberts growth models were compared. In the statistical analysis, the coefficient of determination, root mean square error, trend factor and accuracy factor were used. The results showed the presence of high levels of phenolic compounds, tannins and flavonoids, as well as the presence of antioxidants in the aqueous extract. CBAE from fresh and dried leaves showed activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*, and caused cellular damage, but were not effective against *S. Enteritidis* and *E. coli*. The major chemical compounds present in the CBEO, from both leaves, were: α -pinene, eucalyptol, sativene, E-caryophyllene, bicyclogermacrene and spathulenol. Eucalyptol and D- α -pinene are the major volatiles present in the essential oil of dried leaves. The relative density and refractive index of the essential oil of the dried leaves were 0.9025 g/mL and 1.4963, respectively. The essential oil from the fresh and dry leaves showed variable antimicrobial activity against the different PB tested, however, the essential oil from the dry leaves showed a greater action against the PB. The bacteriostatic and bactericidal effect on LAB was observed, both in the liquid phase and in the vapor phase of the essential oil. The lethal concentration (LC₅₀) of CBEO from dried leaves on *A. salina* is 326 μ g/mL, which was considered moderately toxic. In the kinetics, the CBEO inactivated the LAB, and the Weibull primary model was the one that best described the inactivation over time for

W. viridescens (with a fixed p of 1.52) and *L. mesenteroides* (with a fixed p of 1.49). The bacteria *L. monocytogenes* and *S. aureus* were also inactivated by the CBEO, described by the Weibull model with fixed p of 0.74 and 1.11, respectively. The bacteria *S. Enteritidis* and *E. coli* were not inhibited by the CBEO and showed growth kinetics that were described by the Baranyi and Roberts model. These results show the potential of application of the aqueous extract and essential oil of the leaves of *C. blanchetianus* as alternative sources of antimicrobial compounds and bioactive compounds with antioxidant action in the aqueous extract, standing out for being natural products.

Keywords: marmeleiro. antimicrobial. predictive microbiology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 –	<i>Croton blanchetianus</i> Baill.....	36
Figura 3.2 –	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.....	40
Figura 3.3 –	Curva de crescimento microbiano: λ (fase lag), μ_{max} (velocidade específica máxima de crescimento), N_0 (concentração celular inicial) e N_{max} (concentração celular máxima).	55
Figura 3.4 –	Ilustração das curvas de inativação microbiana normalmente observadas na literatura. A: (∇) log-linear, (x) log-linear com cauda, (\square) sigmoidal, (\circ) log-linear com ombro. B: (∇) bifásica, (x) côncava, (\square) bifásica com ombro, (\circ) convexo	58
Figura 3.5 –	Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull para diferentes valores para o fator de forma p	62

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 –	<i>Croton blanchetianus</i> (marmeleiro) identificadas por meio de lacres, UEPE	71
Figura 4.2 –	Exsicata do exemplar de <i>Croton blanchetianus</i> Baill coletado no município de Limoeiro do Norte – CE.....	72
Figura 4.3 –	Extração óleo essencial das folhas de <i>C. blanchetianus</i> coletado no município de Limoeiro do Norte – CE.....	73
Figura 4.4 –	Óleo essencial das folhas de <i>C. blanchetianus</i> coletado no município de Limoeiro do Norte – CE.....	73
Figura 4.5 –	Extração do óleo essencial das folhas frescas de <i>C. blanchetianus</i>	75
Figura 4.6 –	Folhas frescas de <i>Croton blanchetianus</i> (marmeleiro).....	75
Figura 4.7 –	Folhas secas de <i>Croton blanchetianus</i> (marmeleiro).....	75
Figura 4.8 –	Extração do óleo essencial das folhas secas de <i>C. blanchetianus</i>	75

Figura 4.9 –	Fluxograma simplificado das etapas realizadas desse estudo.....	76
CAPÍTULO 5		
ITEM 5.1		
Figura 1 –	Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>S. aureus</i> (A – controle, aumento de 38.700x); sob ação do extrato aquoso de <i>C. blanchetinaus</i> proveniente das folhas frescas (B, aumento de 38.000x) e folhas secas (C, aumento de 64.000x) e de células de <i>L. monocytogenes</i> (D – controle, aumento de 40.000x) sob efeito do extrato aquoso das folhas secas (E, aumento de 30.000x) nas concentrações equivalentes aos respectivos CBMs.....	89
ITEM 5.4		
Figure 1 –	Kinetic experimental data (symbols) of <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , and <i>W. viridescens</i> in the control samples (without addition of <i>C. blanchetianus</i> essential oil – CBEO, unfilled symbols) and in samples with different concentrations of <i>C. blanchetianus</i> essential oil (CBEO, filled symbols), and the fitting (continuous lines) of the Baranyi and Roberts growth and Weibull inactivation primary models. Filled symbols: squares, diamonds, triangles, and circles represent samples with 0.9 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.71 mg/mL, and 4.51 mg/mL of CBEO, respectively	150
Figure 2 –	δ parameter values (symbols) of <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>W. viridescens</i> at different concentrations (0.9 to 4.51 mg/mL) of <i>C. blanchetianus</i> essential oil (CBEO), and the fitting (continuous lines) of the power and hyperbolic secondary models.....	161
ITEM 5.4.1		
Figura 5.4.1.1 –	Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever	

	a influência da concentração do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> sobre o parâmetro primário δ (h) da <i>W. viridescens</i> . Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> as linhas contínuas o ajuste dos modelos.	171
Figura 5.4.1.2 –	Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> sobre o parâmetro primário δ (h) da <i>L. mesenteroides</i> . Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> as linhas contínuas o ajuste dos modelos	172
Figura 5.4.1.3 –	Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> sobre o parâmetro primário δ (h) da <i>L. monocytogenes</i> . Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> as linhas contínuas o ajuste dos modelos	173
Figura 5.4.1.4 –	Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> sobre o parâmetro primário δ (h) da <i>S. aureus</i> . Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> as linhas contínuas o ajuste dos modelos	174

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 3

Quadro 3.1 – Alguns trabalhos do estudo da composição química e/ou atividade antimicrobiana de <i>Croton</i>	46
Quadro 3.2 – Trabalhos de modelagem preditiva com uso de óleo essencial (OE)	68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 5

ITEM 5.1

Tabela 1 – Comparação da concentração de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, ABTS e DPPH no extrato aquoso das folhas frescas (EAFF) e extrato aquoso das folhas secas (EAFS), provenientes do processo de hidrodestilação do *C. blanchetianus* 84

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), expressos em mg/mL, dos extratos aquosos das folhas frescas (EAFF) e secas (EAFS), proveniente do processo de extração do óleo essencial de *C. blanchetianus*, sobre as bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes*..... 86

ITEM 5.1.1

Tabela 5.1.1 – Equações da reta das curvas padrões dos compostos fenólicos, taninos, flavonoides e atividade antioxidante por DPPH e ABTS 96

ITEM 5.2

Tabela 1 – Área relativa (AR) correspondente à porcentagem dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* determinada por *headspace*..... 103

Tabela 2 – Avaliação visual do efeito dos compostos voláteis de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o crescimento de *W. viridescens* e *L. mesenteroides*..... 105

ITEM 5.3

Tabela 1 – Comparação da composição química do óleo essencial das folhas frescas (FF), folhas secas, sem armazenamento (FS1) e das folhas secas, extraído o óleo essencial de *C. blanchetianus* após armazenamento de 8 meses (FS2) 124

Tabela 2 –	Diâmetros dos halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> frente as bactérias patogênicas estudadas.....	128
ITEM 5.4		
Table 1 –	Main components present in the <i>C. blanchetianus</i> essential oil (CBEO) from the dried leaves. Analyzes performed of CBEO extracted from dry leaves freshly harvested (A) and from dry leaves stored in the dark, at room temperature ($35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) for eight months (B)	148
Table 2 –	Statistical indexes of the fitting of different primary models to the kinetic data of <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , and <i>W. viridescens</i> at different concentrations of <i>C. blanchetianus</i> essential oil (CBEO)	153
Table 3 –	Calculated time for five decimal reductions (5DR) and estimated parameters (δ , μ_{max} , and y_{max}) (\pm 95% confidence intervals) of the fitting of Weibull and Baranyi and Roberts primary models to the kinetic inactivation and growth data of <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , and <i>W. viridescens</i> at different concentrations of <i>C. blanchetianus</i> essential oil (CBEO)	155
Table 4 –	Model parameters (\pm 95% confidence intervals) and statistical indexes of the fitting of different secondary models to the δ parameter of <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , and <i>W. viridescens</i> at different concentrations of <i>C. blanchetianus</i> essential oil (CBEO)	160
ITEM 5.4.1		
Tabela 5.4.1.1 –	Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Weibull p fixo aos dados experimentais sob diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> e do modelo Baranyi e Roberts aos dados do controle, sobre	

	<i>W. viridescens</i> ($p = 1,52$), <i>L. mesenteroides</i> ($p = 1,49$), <i>L. monocytogens</i> ($p = 0,76$), <i>S. aureus</i> ($p = 1,11$).	169
Tabela 5.4.1.2 – Média dos valores de pH e seus respectivos desvio padrão, dos meios de cultivos da <i>W. viridescens</i> e <i>L. mesenteroides</i> com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> e do meio de cultivo controle.....		175

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio)
AC	acetato de celulose
AlCl ₃	cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
AR	Área relativa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	bactérias ácido lácticas
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CBEO	<i>Croton blanchetianus essential oil</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE	Ceará
CBM	Concentração bactericida mínima
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CL ₅₀	concentração letal para 50% da população
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institut</i>
CNPq	<i>National Council for Scientific and Technological Development</i>
CFU/mL	<i>Colony Forming Units per milliliter</i>
DETAL	Departamento de engenharia e tecnologia de alimentos
DINTER	Doutorado Institucional
DIM	Dose inibitória mínima
DMI	Dose mínima inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DO	densidade óptica
DR	<i>decimal reductions</i>
EAFF	extrato aquoso da folha fresca
EAFS	extrato aquoso da folha seca
EAG	Equivalente de ácido gálico

EAT	Equivalente de ácido tânico
EC ₅₀	Concentração efetiva em 50%
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EQ	Equivalente quercetina
EUA	Estados Unidos da América
FAPESC	<i>Foundation for Research Support of Santa Catarina</i>
FF	folha fresca
FS	folha seca
H ₂ O	Água
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICB4	isolados de <i>Croton blanchetianus</i> 4
ICB8	isolados de <i>Croton blanchetianus</i> 8
IE	Impacto de elétrons
IFCE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
ISSO	<i>International Standart Organization</i>
KCl	cloreto de cálcio
LAB	<i>lactic acid bacteria</i>
LiEB	laboratório de Engenharia Biológica
LMA	laboratório de Microbiologia de alimentos
Log	Logarítmico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MRS	<i>Man, Rugosa and Sharpe</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difeniltetrazólio
MSE	Erro do quadrado médio
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio anidro
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OE	óleo essencial
OECB	óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i>

OEO	óleo essencial de orégano
pH	Potencial hidrogênio iônico
RMSE	raiz do erro médio quadrático
R ²	coeficiente de determinação
RT	tempo de retenção
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SISVAR	Programa de análise estatística e planejamento de experimentos
T	Temperatura
t ₀	tempo zero
t ₂₄	tempo em 24 horas
TEO	óleo essencial de tominho
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo de triptona de soja
UEPE	Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/g	Unidade Formadora de Colônias por g
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV-C	radiação ultravioleta C
YE	Extrato de levedura

LISTA DE SÍMBOLOS

ω -3	ômega – 3
B	Beta
H	Hora
A	Alfa
A	aumento logarítmico da população ou fase estacionária
λ	duração da fase lag
D	tempo de redução decimal
N_0	concentração celular inicial
nD	índices de refração
N_{max}	concentração celular máxima
N	concentração de microrganismos
N	Índice de refração à temperatura de trabalho
R^2	coeficiente de determinação
t	Tempo
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento
m	parâmetro de curvatura do modelo
h_0	parâmetro que expressa o estado fisiológico das células quando $t=t_0$
k	constante de reação
p	fator de forma
Δ	fator de escala
n	número de dados experimentais
p	número de parâmetros do modelo
C	Concentração
a, b, r, n	coeficientes do modelo
Y_{max}	logaritmo da população microbiana
C, M, B	parâmetro do modelo
S	comprimento do ombro; p (adimensional) é um fator de forma (h)
N_t	concentração de células no tempo t
y_0	logaritmo da concentração microbiana inicial
y	logaritmo da concentração microbiana em dado tempo
y_{max}	logaritmo da concentração microbiana máxima

a, b, c, d, f, g, h	parâmetros empíricos dos modelos
T'	temperatura de trabalho
$F(t)$	<i>function related to the physiological state of the cells</i>
$h_{0,av}$	<i>average of all h_0 values were calculated</i>
$a, c, e, \text{ or } g$	<i>Parameters of according to the secondary model</i>
$b, d, f, \text{ or } h$	<i>Parameters of according to the secondary model</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE	32

CAPÍTULO 2

2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	33

CAPÍTULO 3

3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1	O GENÊRO <i>Croton</i>	35
3.2	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Croton</i>	38
3.2.1	Composição química	38
3.2.2	Atividade antimicrobiana	41
3.3	POTENCIAL ANTIOXIDANTE	51
3.3.1	Extrato vegetal	51
3.4	MICROBIOLOGIA PREDITIVA	53
3.4.1	Modelos primários	54
3.4.1.1	<i>Modelos primário de crescimento</i>	54
3.4.1.1.1	Modelo de Gompertz	55
3.4.1.1.2	Modelo de Gompertz modificado	56
3.4.1.1.3	Modelo de Baranyi e Roberts	57
3.4.1.2	<i>Modelos primários de inativação</i>	58
3.4.1.2.1	Modelo Log-linear	58
3.4.1.2.2	Modelo Log-linear com ombro	60
3.4.1.2.3	Modelo de Weibull	61
3.4.2	Modelos secundários	62
3.4.3	Validação dos modelos	63
3.4.3.1	<i>Coefficiente de determinação (R^2)</i>	63
3.4.3.2	<i>Raiz do erro do quadrado médio (RMSE)</i>	63
3.4.3.3	<i>Fator de tendência</i>	64
3.4.3.4	<i>Fator de exatidão</i>	64

3.4.4	Modelagem do efeito antimicrobiano de óleos essenciais	65
CAPÍTULO 4		
4	METODOLOGIA GERAL	71
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	71
4.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO AQUOSO	72
4.3	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA	76
CAPÍTULO 5		
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	77
5.1	POTENCIAL BIOATIVO, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Croton Blanchetianus</i>	77
1.	INTRODUÇÃO	77
2.	MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1	Coleta, preparo das folhas de <i>C. blanchetianus</i>	79
2.2	Obtenção do extrato aquoso das folhas de <i>C. blanchetianus</i>	79
2.3	Quantificação de compostos bioativos e determinação da atividade antioxidante	80
2.4	Atividade antimicrobiana	81
2.4.1	<i>Preparo do inóculo</i>	81
2.4.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	81
2.4.3	<i>Observação microscópica da ação do extrato aquoso sobre os microrganismos</i>	82
2.5	Análise estatística	83
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO	83
3.1	Compostos bioativos e a atividade antioxidante	83
3.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	86
3.3	Observação microscopia do efeito do extrato aquoso sobre as bactérias patogênicas	87
4.	CONCLUSÃO	90
5.	AGRADECIMENTOS	91
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

5.1.1	Informação complementar	96
5.2	AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Croton blanchetianus</i> BAILL	97
1.	Introdução	97
2.	Metodologia	99
2.1	Material vegetal	99
2.2.	Obtenção do óleo essencial	100
2.3	Determinação dos compostos voláteis	100
2.4	Determinação da Dose Mínima Inibitória (DMI) da fase vapor	101
3.	Resultados e Discussão	102
3.1	Compostos voláteis	102
3.2	Dose Mínima Inibitória (DMI) na fase vapor	104
4.	Conclusão	106
	Agradecimentos	107
	Referências	107
5.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Croton blanchetianus</i> BAILL	113
1.	Introdução	113
2.	Material e métodos	115
2.1	<i>Extração do óleo essencial</i>	115
2.2	<i>Rendimento do óleo essencial</i>	116
2.3	<i>Caracterização físico-químicas do óleo essencial</i>	116
2.3.1	<i>Determinação da densidade absoluta</i>	116
2.3.2	<i>Determinação do índice de refração</i>	117
2.4	<i>Análise da composição química</i>	117
2.5	<i>Atividade antimicrobiana das bactérias patogênicas por difusão em ágar</i>	117
2.6	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)</i>	119
2.6.1	<i>Cepas bacterianas</i>	119
2.6.2	<i>Preparo do inóculo</i>	119

2.6.3	<i>Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)</i>	120
2.7	<i>Avaliação da toxicidade do óleo essencial frente ao microcrustáceo <u>Artemia salina</u> Leach</i>	121
3.	Resultados e discussões	122
3.1	<i>Caracterização físico-química e rendimento do óleo essencial</i>	122
3.2	<i>Composição química do óleo essencial</i>	122
3.3	<i>Atividade antimicrobiana por difusão em ágar</i>	127
3.4	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)</i>	130
3.4	<i>Toxicidade do óleo essencial</i>	131
4.	CONCLUSÃO	133
	Agradecimentos	134
	Referências	134
5.3.1	Informação complementar	140
5.4	MODELING THE EFFECT OF <i>Croton blanchetianus</i> BAILL ESSENTIAL OIL ON PATHOGENIC AND SPOILAGE BACTERIA	141
1.	Introduction	142
2.	Material e methods	143
2.1	Collection and preparation of plant material	143
2.2	Essential oil extraction	143
2.3	Chemical composition of the essential oil	144
2.4	Bacterial species, inoculums, and pre-cultivation preparations	144
2.6	Experimental data of the bacterial kinetics	145
2.7	Mathematical modeling of bacterial kinetics	146
3.	Results and discussion	147
3.1	Chemical composition	147
3.2	Modeling the effect of CBEO on pathogenic and spoilage bacteria	149
3.2.1	Primary modeling	149
3.2.2	Secondary modeling	159

4	Conclusion	162
	References	163
5.4.1	Informação complementar	168
5.4.1.1	<i>Resultado e discussão</i>	168
5.4.1.1.1	Índice estatístico	168
5.4.1.1.2	Modelo secundário	170
5.4.1.1.3	Avaliação do pH	174
5.4.1.2	<i>Conclusão</i>	175
CAPÍTULO 6		
6	CONCLUSÃO GERAL	176
	REFERÊNCIAS	178
	APÊNDICE A	204
	APÊNDICE B	205
	APÊNDICE C	206
	APÊNDICE D	207
	APÊNDICE E	208
	APÊNDICE F	209
	APÊNDICE G	210
	APÊNDICE H	211
	APÊNDICE I	212

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem como uma das finalidades a produção de alimentos inócuos e com um tempo de vida útil adequado ao consumo. As alterações microbiológicas causadas por microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes são importantes, porque podem comprometer a saúde do consumidor e o prazo de validade, respectivamente.

Sabendo que a segurança de alimentos é uma questão de saúde pública, a busca por técnicas que garantam a qualidade e inocuidade de alimentos é contínua (ENGEL et al., 2016; LI et al., 2019; MARCHI et al., 2011; MENEZES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2010a). Uma das alternativas para a redução do crescimento microbiano em alimentos é o uso de aditivos alimentares sintéticos, mas há uma preocupação quanto à segurança da aplicação desses aditivos, tendo em vista que algumas dessas substâncias químicas têm consequências toxicológicas aos consumidores (HONORATO et al., 2013; VERAS et al., 2021).

A demanda dos consumidores por alimentos cada vez mais saudáveis, leva à busca de conservantes alimentares com baixo risco potencial à saúde, em substituição ao uso de conservantes químicos sintéticos (AZEREDO, 2012; BELASLI, 2020). O alcance da segurança microbiológica dos alimentos passa, entre outros, pelo uso de embalagens ativas, culturas protetoras e compostos naturais, como extratos, óleos essenciais e bacteriocinas (ALVES et al., 2020; BUNGENSTOCK et al., 2021; FALLEH et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVARES-TENORIO; KLOTZ-CEBERIO et al., 2020).

Os compostos bioativos relacionados à capacidade antioxidante têm sido objeto de pesquisa devido à sua grande importância na saúde humana (PAZ et al., 2015). A atividade antioxidante dos extratos aquosos vem contribuindo para a estabilidade de alimento ao longo do período de estocagem (VEECK et al., 2015; VENCATO et al., 2020). Os óleos essenciais constituem-se de misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidos de partes de plantas e são reportadas atividades antibacterianas, antiparasitárias, antifúngicas, antioxidante e neuroprotetoras (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012; SOUTO et al., 2020; FERNANDES et al., 2021).

Na região Nordeste do Brasil, várias pesquisas (ARAÚJO FILHO et al., 2017; BRITO et al., 2018; COSTA et al., 2008) vêm sendo desenvolvidas na flora da Caatinga com o objetivo de fornecer comprovação científica da importância de produtos naturais extraídos de plantas da família Euphorbiaceae, especialmente o gênero *Croton*, focados na composição química, efeitos sazonais e atividade biológica do óleo essencial (ALBUQUERQUE et al., 2020). O *Croton blanchetianus* é um arbusto, típico do sertão, popularmente conhecido como marmeleiro (SILVA et al., 2012a) e apresenta ações gastroprotetoras, antiinflamatórias e antinoceptivas (CAVALCANTI et al., 2020). O óleo essencial de *Croton blanchetianus* mostrou atividade antibacteriana e antifúngica (MELO et al., 2013).

As bactérias ácido-láticas (BAL), em algumas situações, podem ser responsáveis pela deterioração de alimentos, especialmente produtos cárneos refrigerados e embalados a vácuo (BRUNO, 2011; KOUTSOUMANIS et al., 2020). Os alimentos podem, ainda, apresentar o risco potencial de veicular diversos microrganismos que, muitas vezes, são patogênicos para o homem (RIOS-CASTILLO et al., 2021; ROSBERG et al., 2021). Assim, a busca por mecanismos que permitam limitar o crescimento ou inativar esses microrganismos é crescente nas indústrias (RAMOS, 2017).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta com a finalidade de aplicar modelos que descrevem e predizem o crescimento e/ou a inativação de microrganismos sob determinadas condições ambientais. Os modelos matemáticos podem prever mudanças na população de microrganismos em alimentos quando expostos a mudanças ambientais durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento (KOUTSOUMANIS et al., 2016; TENENHAUS-AZIZA; ELLOUZE, 2015).

A abundância do gênero *Croton* na região Nordeste, a importância de alguns microrganismos contaminantes de alimentos e não havendo ainda nenhum relato sobre o uso da microbiologia preditiva na modelagem do efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre microrganismos de interesse em alimentos justificam a relevância da presente pesquisa. Além disso, este trabalho se justifica pelo estudo de produto natural, que pode apresentar a capacidade de atuar como inibidor microbiano, com potencial de aplicação em alimentos. Oportunamente, deve-se ressaltar que a utilização apenas das folhas não compromete o desenvolvimento da espécie vegetal no bioma Caatinga.

Desta forma, espera-se propiciar informações úteis ao desenvolvimento de novas pesquisas e assim abrir caminhos para a investigação da atividade antimicrobiana numa matriz alimentar, bem como, contribuir com informações que possibilitem o aproveitamento futuro dos recursos naturais como alternativa aos conservantes sintéticos e tecnologias não-térmicas.

1.1 APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE

A tese é composta de capítulos, sendo que o capítulo 1 compreende a Introdução, capítulo 2 os objetivos, capítulo 3 a Revisão bibliográfica, capítulo 4 a Metodologia geral, capítulo 5 os Resultados e discussão. Este capítulo foi escrito no formato de artigos científicos, com suas respectivas metodologias específicas. Assim o item 5.1, tem como título “Potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano do extrato aquoso do processo de extração do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* Baill”, artigo publicado na revista Revista Scientia Plena, 2021 (doi: 10.14808/sci.plena.2021.121501). No item 5.2 intitulado “Ação antimicrobiana dos compostos voláteis o óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill”, está o artigo publicado na Revista Research, Society and Development, 2022 (doi: 10.33448/rsd-v11i1.24785) e nos itens 5.3 e 5.4 estão os artigos a serem submetidos para publicação. Nas informações complementares, são apresentadas as informações não contempladas nos artigos. Cada item apresenta a formatação de acordo com a revista publicada. No capítulo 6 está a Conclusão geral.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e avaliar o efeito bioativo do óleo essencial (OECB) e do extrato aquoso (EACB) das folhas frescas e secas de *C. blanchetianus* Baill.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o material botânico coletado na Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão (UEPE) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Limoeiro do Norte e preparar a exsicata;
- Extrair, por hidrodestilação, o óleo essencial das folhas frescas e secas do *Croton blanchetianus* Baill e obter um extrato aquoso liofilizado resultante da decocção da extração do óleo essencial folhas;
- Determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis) do extrato aquoso liofilizado, obtido por meio da hidrodestilação das folhas frescas e secas de *Croton blanchetianus* Baill;
- Determinar a composição química do óleo essencial das folhas frescas, secas e folhas secas armazenadas por 8 meses do *Croton blanchetianus* Baill;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas frescas e secas sobre as bactérias patogênicas, através do método de difusão em ágar;
- Determinar a toxicidade do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (fase líquida) do crescimento das bactérias patogênicas e das bactérias deteriorantes ácido-lácticas (*Weissella viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides*);
- Determinar a dose inibitória mínima (DIM) (fase vapor) das bactérias ácido-lácticas, sob a ação do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill;

- Determinar a cinética de inativação ou crescimento e modelar o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill sobre as bactérias patogênicas e deteriorantes ácido-lácticas, em meio de cultura (*in vitro*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O GENÉRO *Croton*

A família Euphorbiaceae está representada por aproximadamente 290 gêneros e cerca de 7500 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África. Os gêneros mais representativos são: *Euphorbia* (1500 espécies), *Croton* (1000 espécies) e *Phyllanthus* (400 espécies). No Brasil, incidem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies, de hábito e habitat diferentes, difundidos em todos os tipos de vegetação (SANTOS, 2007). O *Croton blanchetianus* é uma espécie representativa da família Euphorbiaceae, apresentando padrão de distribuição agregada nas áreas da Caatinga (BARBOSA et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Segundo Cordeiro et al. (2015), as muitas espécies do gênero *Croton* podem ser encontradas no bioma Caatinga. As espécies de *Croton* nativas do Nordeste são conhecidas com as denominações populares de marmeleiros, canelas e velames (SANTOS, 2007). Os marmeleiros são arbustos ou pequenas árvores que podem atingir uma altura de até 4,0 m, apresentam elevada produção anual de sementes, facilidade de germinação, padrão de dispersão de sementes e possuem grande capacidade de sobrevivência durante a época de seca, perdendo as folhas, mas rebrotando logo após as primeiras chuvas na Caatinga, ficando repletas de flores pequenas, com coloração branca. As flores são abundantes e exalam perfume característico, atraindo visitantes florais e polinizadores, principalmente abelhas (SANTANA, 2009; SILVA et al., 2012a). Dentre essas plantas, podem-se citar as seguintes espécies: “marmeleiro preto” (*Croton sonderianus*) (Sinonímia: *C. blanchetianus*, Govaert et al., 2000) (Figura 3.1), “marmeleiro branco” (*Croton jacobinensis*) e “marmeleiro sabiá” (*Croton nepetaefolius*) (SANTOS, 2007).

Figura 3.1 – *Croton blanchetianus* Baill.

Fonte: Elaborado pela autora.

Muitas espécies de *Croton* são utilizadas para amplas finalidades, desde as ecológicas, como a recuperação de matas ciliares (*Croton urucurana* Baill). Devido à sua grande capacidade de rebrota e o seu rápido crescimento, o marmeleiro é uma espécie potencial para restauração de áreas degradadas, além de contribuir na nutrição e preservação de espécies animais no bioma Caatinga (SILVA et al., 2012a).

O marmeleiro é um recurso natural de grande importância para a população que habita nesse bioma, pois é de grande utilização em muitas comunidades rurais, especialmente para produção de lenha, construção de pequenos cercados para abrigar animais (ALVES et al., 2014) e, ainda, utilizada como condimentos em queijos e outros produtos alimentícios, além de contribuir na produção de mel de abelhas com grande aceitação no mercado externo, pois, segundo Alves et al. (2016), vários autores, através de análises melissopalínológicas, ressaltam a importância do marmeleiro preto, como uma das principais fontes de néctar da Caatinga para a produção de mel em apiários comerciais. Ainda, em algumas comunidades do Centro-Oeste, as raízes dos velames (*Croton agrarius* Baill) também são empregadas na culinária para a produção de tapioca (SILVA et al., 2012a).

Desde os primeiros registros históricos, extratos vegetais de plantas aromáticas têm sido utilizados com diferentes fins em alimentos, medicamentos e cosméticos (MACHADO, 2011). A família Euphorbiaceae compreende espécies que

têm sido utilizadas como fitoterápicos (OLIVEIRA et al., 2010b). O *Croton* apresenta uma grande riqueza de metabólitos secundários, como alcaloides e terpenos (ARAÚJO et al., 2010; MOURA et al., 2013; PEREIRA JÚNIOR et al., 2014).

Na medicina popular, as folhas e cascas da espécie *C. blanchetianus* Baill são usadas na forma de infusões, chá para distúrbios gastrointestinais, como diarreia e constipações, cefaleia e pneumonia (ABREU et al., 2001, CHAVES; REINHARD, 2003). Segundo McChesney et al. (1991), essa planta possui atividades diversificadas, como anti-inflamatória, gastroprotetora e antimicrobiana e os ensaios farmacológicos de espécies de *Croton* na forma como são tradicionalmente usados vêm corroborando os efeitos anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antimalárico, antimicrobiano, antiespasmódico, antiulcerogênico, antiviral, mio-relaxante, dentre outros (SALATINO et al., 2007).

Diversas espécies de *Croton* vêm sendo estudadas e os resultados dessas pesquisas têm ocasionado grandes contribuições para o campo científico (FONTENELLE, 2008). Na área da saúde, estudos mostram a atividade antimicrobiana de extratos de *Croton blanchetianus* sobre *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus mutans*, bactérias comuns na formação de biofilmes orais (FIRMINO et al., 2019), a ação do extrato aquoso da casca do *Croton cajucara* Benth foi hipolipemiante, sugerindo seu uso para prevenir as dislipidemias encontradas em pacientes diabéticos (RODRIGUES et al., 2010), efeito do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* e de seu constituinte cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta de ratos (FARIAS, 2006), boa atividade antimicrobiana do extrato de marmeleiro sobre *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus sobrinus*, bacterianas causadoras de cárie dentária (SILVA et al., 2011).

Segundo Brito (2018), espécies de *Croton* são uma grande fonte de fitoquímicos com propriedades bioativas excepcionais e sua exploração pode ser útil para diferentes setores industriais, como indústrias de cosméticos, medicinais e farmacêuticas. No ramo dos alimentos, em virtude da existência de uma crescente demanda por alimentos livres de produtos químicos sintéticos como conservantes, abordagens alternativas e seguras têm sido utilizadas para o controle de patógenos veiculados por alimentos (ARAÚJO et al., 2017; NAZIR et al., 2017). Ainda, segundo Silva et al. (2010a), o óleo essencial de marmeleiro pode ser utilizado como uma

alternativa aos promotores de crescimento, em substituição aos antimicrobianos na ração de frangos de corte, não prejudicando o rendimento de peito de frango.

3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton*

3.2.1 Composição química

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquida, obtidos de partes de plantas (SANTOS, 2004). A *International Standard Organization* (ISO) define os óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de planta mediante destilação por arraste com vapor d'água (KNAAK; FIUZA, 2010).

Na maioria das vezes, os óleos essenciais apresentam um alto valor agregado, pois são obtidos em pequenas quantidades e ainda apresentam características de volatilidade (BORGES et al., 2014; SILVA, 2018a; OLIVEIRA et al., 2016a). Nos vegetais, esses óleos desempenham funções relacionadas com sua volatilidade que pode ser tanto para atrair polinizadores quanto para repelir insetos, atuando assim como mecanismo de defesa da planta contra predadores, patógenos dentre outros (VIZZOTTO et al., 2010). Essas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas (SILVA et al., 2020).

Por meio do metabolismo secundário das plantas, podem ser produzidos compostos que não são essenciais à sobrevivência da mesma, no entanto confere à planta uma vantagem de sobrevivência no ambiente (GARCIA; CARRIL, 2009) e esses compostos apresentam composição química complexa (SOUSA; SOUSA, 2017; OUSSALAH, 2007).

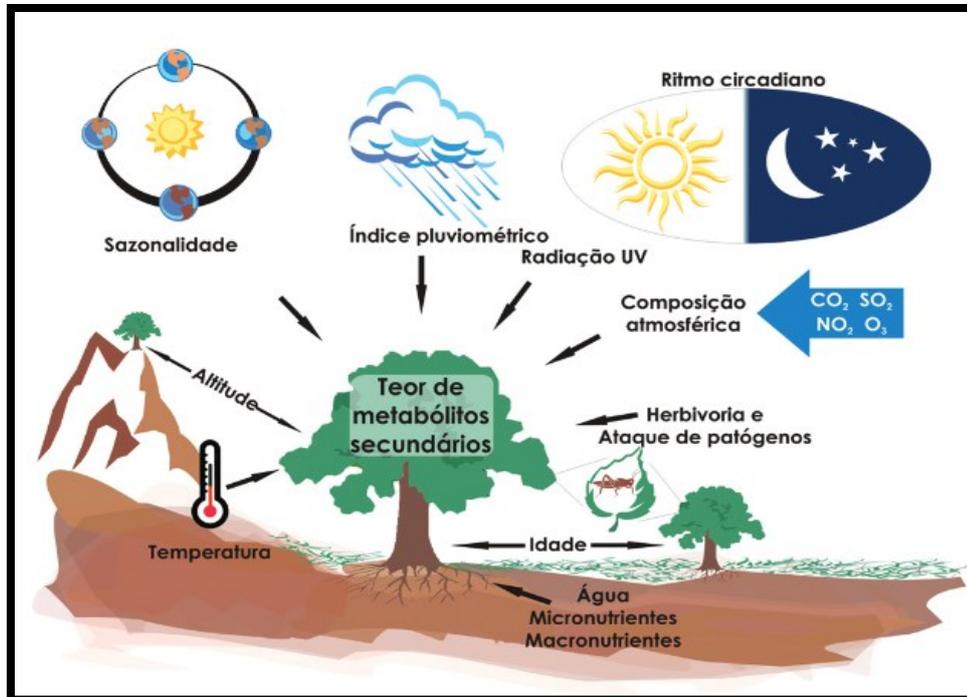
Com base numa classificação química, os metabólicos secundários das plantas podem ser divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e componentes nitrogênio-alcaloides, sendo que dentro dos terpenos, mais especificamente os monoterpenos, costumam estar presentes as substâncias voláteis, denominadas óleos essenciais (VIZZOTTO et al., 2010).

Vários órgãos da planta podem armazenar os óleos essenciais, como, por exemplos, nas flores (laranjeira), nas folhas (capim-limão, eucalipto, louro, marmeleiro), nas cascas dos caules (canelas), na madeira (sândalo, pau-rosa), nas raízes (vetiver), nos rizomas (cúrcuma, gengibre), nos frutos (anis-estrelado, funcho)

e nas sementes (noz moscada) (OUSSALAH, 2007; ROBBERS et al., 1997; RODRIGUES et al., 2019). Quando numa mesma planta ocorre o armazenamento em locais diferentes, o óleo essencial desse pode apresentar variação na sua composição química. A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente (DORMAN; DEANS, 2000; MORAIS, 2009; SOUSA; SOUSA, 2017). A presença de compostos fenólicos em plantas da Caatinga pode ser interpretada como adaptações ao ambiente semiárido, pois, considerando a alta incidência solar e a restrição hídrica nesse ambiente, a combinação das funções de proteção herbívora e fotodano, desempenhadas pelos compostos fenólicos, seria benéfica para as plantas, especialmente durante o período de seca. (BARROS; SOARES, 2013).

A composição química de um óleo essencial, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente de acordo com a época de coleta, condições climáticas (clima, estação do ano), solo (condições geográficas) e técnica usada para a extração (MACIEL et al., 2002; MORAIS, 2009; RIBEIRO et al., 2018). Os óleos essenciais de *Croton argyrophyloides*, *Croton jacobinensis* e *Croton sincorensis* apresentaram variação na composição química e no rendimento devido à mudança de temperatura ambiente e incidência solar (SOUZA et al., 2017b) (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.



Fonte: GOBBO-NETO; LOPES (2007).

Segundo Souza et al. (2017a) é possível maximizar algum determinado componente presente no óleo essencial que apresente uma bioatividade específica, ajustando a condição de extração. Barros et al. (2018) visando verificar o tempo de extração necessário para esgotamento máximo dos óleos essenciais de *Croton* spp., concluiu que o melhor tempo de extração e esgotamento dos óleos foi de 2 horas.

Embora a composição química dos óleos essenciais seja muito diversificada, eles possuem de um até quatro compostos, conhecidos como componentes majoritários, que são característicos da espécie vegetal (ALENCAR FILHO, 2017; PERES, 2004). A análise da composição química do óleo essencial das folhas, flores, raízes e casca do caule de *Croton sonderianus* Muell. Arg. mostrou os componentes majoritário são β -felandreno, biciclogermacreno, cipereno e β -elemeno, respectivamente (DOURADO; SILVEIRA, 2005).

Alencar Filho et al. (2017) observaram que a composição química do *Croton heliotropiifolius* kunth, coletado na localidade de Caboclo em Pernambuco, apresentou o β -Cariofileno (46,99%) como constituinte majoritário, com pouca variação entre as quatro estações do ano, sendo que nos meses de inverno, mês com a menor

precipitação (0,0 mm), menor umidade relativa (47,5%) e temperatura máxima (32,4°C) muito próxima da maior observada (33,6°C), o óleo essencial apresentou maior teor deste composto.

Na análise do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus*, coletadas em diferentes horas do dia em regiões do Ceará, apresentaram a mesma composição química com teores diferentes. O composto majoritário foi o 1,8-cineol, com teores de 37,7%, 27,9%, 34,5%, 23,0% e 28,5% nas horas de coletas de 6h, 9h, 12h, 15h e 18h, respectivamente (DOURADO; SILVEIRA, 2005).

Os quimiotipos também conhecidos como raças químicas são vegetais com características botânicas idênticas, porém quimicamente diferentes, sendo frequentemente encontrados em plantas ricas em óleos voláteis. A caracterização dos quimiotipos é de grande importância para as plantas, uma vez que afeta diretamente seus princípios ativos e, conseqüentemente, todas as suas propriedades (AQUINO, 2013).

O óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri* apresenta tipos químicos caracterizados pelos compostos estragol, anetol, eugenol e metil-eugenol (COSTA et al., 2008; MORAIS et al., 2006).

Os constituintes do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* foram classificados como sesquiterpenos, sendo o composto químico biciclogermacreno o marcador químico presente em todas as amostras, seguido (Z)-cariofileno, germacreno B e epi-longipinanol e, conseqüentemente, a caracterização de apenas um quimiotipo (ARAÚJO et al., 2020a).

Outras espécies de *Croton* apresentam diferenças na composição química do óleo volátil, como é o caso das espécies *C. blanchetianus*, *C. angyrophyllodes* e *C. heliotropiifolius*, podendo esta variação estar relacionada a quimiotipos. No entanto, para comprovar a existência de novos quimiotipos são necessários estudos mais aprofundados (ANGÉLICO et al., 2011; BRITO et al., 2018).

De acordo com Morais (2009) é importante que, juntamente com os ensaios para verificação da atividade biológica, seja realizada a análise química do(s) óleo(s) essencial(ais) avaliado(s), para que se possa obter a caracterização fitoquímica deste(s).

3.2.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada com sua composição, configuração estrutural, grupos funcionais e a sinergia entre os seus compostos (DORMAN; DEANS, 2000).

O estudo dos efeitos sinérgicos entre óleos essenciais e/ou seus componentes químicos podem ser utilizado tanto para melhorar a sua atividade antimicrobiana quanto para reduzir as concentrações necessárias para alcançar um efeito antimicrobiano particular para segurança de alimentos e para fins de saúde (NAZZARO et al., 2013). Uma vez que as alterações microbiológicas provenientes de microrganismos deteriorantes são importantes nos alimentos por comprometer a vida útil dos mesmos e o uso de conservantes sintéticos podem causar problemas de saúde para os consumidores a longo prazo (SOUZA et al., 2019), as plantas e seus derivados são alternativas viáveis no processo de conservação de alimentos, garantindo a estabilidade das características organolépticas e nutricionais desses produtos, além de sua qualidade e segurança (CAMPÊLO et al., 2019).

Os óleos essenciais apresentam atividade contra microrganismos patogênicos de origem alimentar e deteriorantes *in vitro* e, em menor grau, na matriz alimentar (CALO et al., 2015). No entanto, segundo Yousefi et al. (2020) o óleo essencial pode ser potencialmente usado como um substituto aos conservantes químicos em carnes de aves para mitigar ou inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Ajourloo et al. (2021) verificou que baixa concentração (0,3%) (p/v) do óleo essencial *Ziziphora clinopodioides* é suficiente para reduzir entre 0,90 e 2,05 log UFC/g a contagem da *L. monocytogenes* em salsicha fresca do tipo dos Balkan, embalada em atmosfera modificada e armazenadas por 13 dias sob refrigeração, e conclui ainda que o referido óleo essencial tem potencial para ser usado como um conservante em salsicha fresca sem quaisquer efeitos sensoriais adversos significativos ($p > 0,05$).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são atribuídas à ação de componentes majoritários: timol, linalool, carvacrol, eugenol, carvona, 1,8-cineole, cinamaldeído, limoneno, α - e β -pineno, p -cimeno (BURT, 2004; YOUSEFI et al., 2020).

De modo geral, alguns estudos têm mostrado que o princípio ativo dos componentes dos óleos essenciais em relação à atividade antimicrobiana segue uma ordem decrescente de atividade, assim o eugenol, carvacrol/ácido cinâmico, metil chavicol do manjeriço, cinamaldeído, citral/geraniol (BURT, 2004).

Silveira et al. (2012) concluíram que, para as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* testadas, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (0,075 - 10 mg/mL) avaliados, em ordem decrescente, foi: citronela, lavanda, eucalipto. Enquanto para as espécies Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*, a atividade inibitória dos óleos essenciais segue a seguinte ordem: lavanda, eucalipto, citronela. Sendo assim, na escolha de um óleo essencial para uma determinada aplicação, é importante que seja levado em consideração o microrganismo de interesse, uma vez que a atividade inibitória variou entre as espécies de um mesmo grupo.

Os organismos Gram-positivos parecem ser muito mais suscetíveis aos óleos essenciais comparados aos Gram-negativos (CALO et al., 2015). Burt (2004) considera esse resultado esperado, uma vez que as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana exterior que envolve a parede celular. Segundo Joshi (2018) as bactérias Gram-negativas tendem a ser mais resistentes aos metabólitos secundários da planta, principalmente devido à camada lipopolissacarídeo membrana, que limita a difusão de compostos.

Os testes antimicrobianos na fase vapor são baseados na característica natural de volatilidade dos óleos essenciais. Assim, os componentes dos óleos essenciais e suas volatilidades relativas determinam as características de seus vapores, que por sua vez têm um impacto no potencial antimicrobiano (BURT, 2004). A atividade inibitória dos óleos essenciais na fase de vapor, contra os microrganismos de origem alimentar e deteriorantes, é maior do que na forma líquida e altamente atribuída aos seus principais constituintes e tipos de cepas (AMIRI et al., 2020; VELÁZQUEZ-NUÑEZ et al., 2013). Alguns estudos colocam que as substâncias que compõem o óleo essencial, quando na fase vapor, estão livres para se ligarem ao microrganismo por suas características lipofílicas, o que gera uma atividade, em geral, mais intensa que na fase líquida, onde os componentes estão solvatados, o que reduz o contato com o microrganismo (LAIRD; PHILLIPS, 2011; MUNHÓZ-BONILLA et al., 2013). De acordo com Felipe e Bicas (2017) os terpenos apresentam relevante importância na química dos aromas. Outros autores reportam o composto químico α -pineno, um terpeno, com atividade antimicrobiana (LEITE et al., 2007; NETOPILOVA et al., 2020).

A aplicação de óleo essencial na fase de vapor em vários produtos foi estudada e tem sido reportada pela sua eficácia antimicrobiana com doses relativamente baixas (ALMEIDA et al., 2022; BOUKHATEM et al., 2014; LAROQUE et al., 2020; LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2018; PAGANINI et al., 2021; SEO et al., 2015). Pereira (2016) em seu estudo sobre a determinação da atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos na fase vapor do óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides*, comparou a atividade antimicrobiana na fase líquida, pelo método da microdiluição em placa, com a fase vapor, pelo método da placa invertida modificado, e os resultados indicaram uma atividade mais potente para a fase vapor do que na fase líquida, sendo que o *Staphylococcus aureus* apresentou CIM de 0,392 mg/L na fase vapor e 19 mg/L na líquida. Já para *Candida albicans* foi 0,833 mg/L, na fase vapor e 94,4 mg/L na fase líquida. Entretanto, para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus brasiliensis*, os valores da CIM, em ambas as fases, foram acima de 100 mg/L, sendo então considerado inativo.

A aplicação de óleo essencial de carvacrol combinado com óleo essencial de hortelã-pimenta (80/20 v/v), na fase de vapor (8 mg L⁻¹), alcançou altas reduções microbianas contra microflora saprófita de mesófilos, enterobactérias e fungos (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp.) e *Listeria innocua*, comumente encontrados em ervas culinárias e pode prolongar a vida útil do coentro fresco por mais de 12 dias a 2 °C (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2019). Tyagi e Malik (2012) no estudo sobre a eficácia bactericida e o mecanismo de ação dos vapores do óleo de capim-limão contra *Escherichia coli*, os resultados dos ensaios demonstraram que o óleo de capim-limão (0,364–1,069 µl/m) é altamente eficaz na fase de vapor, apresentando uma perspectiva de aplicação como desinfetante de superfície/ambiente ou para preservação de alimentos. Segundo Amiri et al. (2020), os óleos essenciais derivados de plantas medicinais são alternativas antimicrobianas naturais e promissoras agentes na fase de vapor, porém mais estudos devem ser realizados para explorar os voláteis seguros e potentes.

O *Croton* é um gênero rico em componentes com atividade biológica (TIMICH; SANTOS, 2015). Segundo Firmino et al. (2019) os diterpenos metil 12-hidroxi-3,4-seco-cleistanta-8,11,13,15,4 (18) -pentaeno-3-oato (ICB4) e ent-ácido 3,4-secoatisa-4 (18), 16-dien-3-óico (ICB8), isolados de *C. blanchetianus*, têm ação antibiofilme contra infecções causadas por estreptococos orais (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus parasanguinis*).

Melo et al. (2013) concluíram que o óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill é efetivo agente antimicrobiano *in vitro* para *Aeromonas hydrophila* (reduções de 3-4 ciclos logarítmicos no número de células viáveis em relação ao inicial), *Listeria monocytogenes* (redução de 3-5 ciclos logarítmicos no número de células viáveis em relação ao inóculo inicial) e *Salmonella* Enteritidis, com ação bacteriostática durante todo o período de interação (10 h) comparado com o controle.

Araújo et al. (2017) estudaram a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas (folhas e caules) de *Croton heliotropiifolius* Kunth e identificaram os compostos majoritários, (E)-cariofileno, γ -muuroleno e viridifloreno. Destacaram ainda que os componentes γ -muuroleno e viridifloreno foram identificados e citados pela primeira vez no óleo desta espécie e constataram a atividade antibacteriana do óleo contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Esses autores ressaltam ainda que este óleo essencial pode ser uma alternativa promissora para ensaios futuros contra uma cepa multirresistente de *S. aureus* e um promissor antibacteriano contra outros *Bacillus* spp.

Os produtos botânicos, como os óleos essenciais e os extratos de plantas medicinais e plantas silvestres, têm demonstrado que, além de apresentar uma ampla variedade de espécies, possuem compostos que são eficazes no controle de microrganismos patogênicos (OOTANI et al., 2013).

O Quadro 3.1 apresenta alguns trabalhos sobre a composição química e/ou atividade antimicrobiana de espécies de *Croton*.

Quadro 3.1 - Alguns trabalhos do estudo da composição química e/ou atividade antimicrobiana de *Croton*.

(continua)

Nº	Espécie <i>Croton</i>	Óleo essencial/extrato	Parte da planta estudada	Componente químico majoritário	Microrganismo alvo	Referência
1	<i>Croton zehntneri</i>	óleo essencial	parte aérea	<i>E</i> -Anetol (47,34% às 6:00h e 30,97% às 13:00h)	-*	MORAIS et al., 2006.
2	<i>Croton nepetaefolius</i>	óleo essencial	parte aérea	Metil-eugenol (39,62% às 6:00h e 27,80% às 13:00h)	-*	
3	<i>Croton argyrophyloides</i>	óleo essencial	parte aérea	α -Pineno (14,23% às 6:00h) Espatulenol (14,33 às 13:00h)	-*	
4	<i>Croton zehntneri</i>	óleo essencial das folhas secas	folhas	Estragol (76,8%)	<i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> β - haemolyticus	COSTA et al., 2008.
5	<i>Croton blanchetianus</i> Baill	óleo essencial	folhas	Limoneno (25,70%)	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> , <i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	MELO, 2011.
6	<i>Croton cajucara</i> Bentham	óleo essencial	casca do caule	Cyperene (12,36%)	-	SILVA et al., 2012b.

Quadro 3.1 - Alguns trabalhos do estudo da composição química e/ou atividade antimicrobiana de *Croton*.

(continuação)

Nº	Espécie <i>Croton</i>	Óleo essencial/extrato	Parte da planta estudada	Componente químico majoritário	Microrganismo alvo	Referência
7	<i>Croton pulegioides</i> Baill	extrato metanólico	raiz, caule e folhas	-	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida albicans</i>	ARRAIS et al., 2014.
8	<i>Croton tricolor</i> Klotzsch ex Baill	óleo essencial	caule	(+)-ledeno (13,68%)	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	VASCONCELOS, 2015.
9	<i>Croton tetradenius</i> Baill	Óleo essencial	partes aéreas (folhas, inflorescências e caulículos)	Cânfora (19,01%, novembro 2012 e 24,81% abril 2015)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i>	FERNANDES, 2016.

Quadro 3.1 - Alguns trabalhos do estudo da composição química e/ou atividade antimicrobiana de *Croton*.

(continuação)

Nº	Espécie <i>Croton</i>	Óleo essencial/extrato	Parte da planta estudada	Componente químico majoritário	Microrganismo alvo	Referência
10	<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	óleo essencial	folhas	β -Caryophyllene (46,99%)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella flexneri</i>	ALENCAR FILHO et al., 2017.
11	<i>Croton grewoides</i> Baill	extrato	folhas	α -pinene (47,43%)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MEDEIROS et al., 2017.
12	<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	óleo essencial	parte aérea (folhas e caule)	(<i>E</i>)-caryophyllene (23,85 \pm 0,36%)	<i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , e <i>Salmonella choleraesuis</i>	ARAÚJO et al., 2017.
13	<i>Croton limae</i>	óleo essencial	folhas	Cedrol (28,4%)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i>	LEITE et al., 2017.

Quadro 3.1 - Alguns trabalhos do estudo da composição química e/ou atividade antimicrobiana de *Croton*.

(continuação)

Nº	Espécie <i>Croton</i>	Óleo essencial/extrato	Parte da planta estudada	Componente químico majoritário	Microrganismo alvo	Referência
14	<i>Croton urucurana</i> Baillon	extrato etanólico, hidroalcoólico e aquoso	folhas		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> Thyphimurium	SILVA et al., 2017a.
15	<i>Croton blanchetianus</i> Baill	extratos hexânicos, frações e diterpenos isolados	raízes, lenho e casca do caule	Diterpenos: 12- hidróxi-3,4-seco- cleistanta- 8,11,13,15,4 (18) - pentaen-3-oato de metila e ácido ent- 3,4-secoatisa-4 (18),16-dien-3-óico	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i>	FIRMINO et al., 2018.
16	<i>Croton tetradenius</i> Baill	óleo essencial	folhas	p-cimeno (28,24%)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROCHA, 2020.
17	<i>Croton pulegioidorus</i> Baill	óleo essencial	folhas	trans-Acetato de crisantenila (27,05%)	<i>Staphylococcus aureus</i>	
18	<i>Croton sylvaticus</i>	óleo essencial	folhas	Biciclogermacreno	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	SADGROVE et al., 2019.

Quadro 3.1 - Alguns trabalhos do estudo da composição química e/ou atividade antimicrobiana de *Croton*.
(conclusão)

Nº	Espécie <i>Croton</i>	Óleo essencial/extrato	Parte da planta estudada	Componente químico majoritário	Microrganismo alvo	Referência
19	<i>Croton pseudopulchellus</i>	óleo essencial	folhas	borneol	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	SADGROVE et al., 2019.
20	<i>Croton gratissimus</i>	óleo essencial	folhas	-	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	
21	<i>Croton draco</i>	extrato hidroalcoólico	parte aérea	Timol	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella cholerasuis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	MORALES-UBALDO et al., 2020.
22	<i>Croton ceanothifolius</i> Baill	óleo essencial	folhas	Biciclogermacreno	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	ARAÚJO et al., 2020b.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: *Estudou o efeito antioxidante.

3.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

3.3.1 Extrato vegetal

A oxidação lipídica é a principal causa da degradação química dos alimentos, o que diminui a vida útil comercial dos produtos alimentícios, deteriora suas propriedades sensoriais e reduz a aceitabilidade pelo consumidor (JACOBSEN et al., 2017). Para obter o máximo benefício dos componentes lipídicos bioativos da dieta, é essencial manter sua quantidade e atividade significativa dentro do produto até o consumo e liberação no corpo. No entanto, os componentes bioativos costumam ser sensíveis à luz, ao oxigênio e ao calor. Assim, para proteger os produtos alimentícios com componentes bioativos, alguns desafios devem ser resolvidos, tal como evitar a oxidação dos mesmos (DUHAN et al., 2020).

Os radicais livres, quando produzidos em grande quantidade, podem causar danos graves ao organismo, sendo necessária a ingestão de alimentos que contenham propriedades antioxidantes. Por sua vez, as substâncias antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (PEREIRA; CARDOSO, 2012; VASCONCELOS et al., 2014).

Considerando a preocupação atual a adição de especiarias, de diferentes tipos e formas, pode evitar a deterioração oxidativa em vários sistemas, além de possível suplemento alimentício e farmacêutico (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Os extratos vegetais, suas misturas, concentrados e isolados têm sido constantemente estudados e revisados com relação à sua atividade antioxidante, como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (BALLEN et al., 2019; CUNHA et al., 2016; DEL RÉ; JORGE, 2012; SILVA et al., 2010b). Os estudos para a obtenção de compostos fenólicos, que são amplamente distribuídos no reino vegetal, para a conservação de alimentos (ACHKAR et al., 2013).

Melo et al. (2008) concluíram que a intensidade da ação antioxidante exibida pelas plantas pode ser diferenciada, sendo principalmente determinada pelo número e posições de hidroxilas das moléculas dos compostos fitoquímicos presentes em sua composição. Os compostos fenólicos são sintetizados a partir do metabolismo secundário das plantas, acumulados em praticamente todos os tecidos e muitos compostos apresentam similaridade quanto à estrutura molecular básica, como por

exemplo, a presença de um anel aromático ligado a um grupo hidroxila como é observado nos ácidos fenólicos e flavonoides, substâncias com alto potencial antioxidante (FARAH et al., 2006; OROIAN; ESCRICHE, 2015; SHAHIDI; JANITHA, 1992). Segundo Barreto et al. (2013) substâncias isoladas de *Croton muscicarpa* pertencem às classes de produtos naturais flavonoides e terpenoides, bastante encontradas em espécies de *Croton*.

Muitas especiarias e ervas têm múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidantes, especialmente quando estes contêm compostos polifenólicos (KOZLOWSKA et al., 2015; SAKURAI et al., 2016). KOZLOWSKA et al. (2015) verificaram a ausência da relação entre conteúdo fenólico em extratos de especiarias e sua capacidade de inibir o crescimento das bactérias ácido lácticas. Desta forma, os extratos vegetais podem ser utilizados com sucesso como um aditivo funcional em alimentos fermentados.

Os extratos vegetais etanólicos de *Thymus daenensis* e *Camellia sinensis* mostraram ação como agentes antioxidantes para aumentar a vida útil de amostras de carne de frango e assim podem ser utilizados como conservantes naturais (MOSAVINEZHAD et al., 2020).

A adição de extrato de cravo-da-índia à carne de porco crua forneceu potentes efeitos antimicrobianos e antioxidantes, podendo assim ser usado para prolongar a vida útil do produto. Os autores do estudo ressaltam ainda que o efeito benéfico do cravo foi resultado da alta atividade antioxidante e alto teor de compostos polifenólicos e que, antioxidantes naturais podem ser aplicados na carne para a preservação durante o armazenamento (MUZOLF-PANEK et al., 2019).

Sousa et al. (2020) extraíram por ultrassom compostos fenólicos do extrato etanólico de *Croton heliotropiifolius* e dez compostos fenólicos bioativos foram determinados: catequina, ácido gálico, quercetina, ácido vanílico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido trans-cinâmico, ácido p-cumarico, ácido síngico, ácido ferúlico e ácido clorogênico.

Segundo Aquino et al. (2017) os estudos com os extratos botânicos de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus* resultaram na comprovação de atividade antioxidante, muito provavelmente atribuída à presença de compostos fenólicos.

Segundo Olszewska et al. (2020) devido a suas altas propriedades antimicrobianas, como regra geral, os extratos de materiais vegetais de origem residual apresentaram atividade antioxidante, em alguns casos, próximas às dos anti-

oxidantes sintéticos, e sua extração e uso podem ser uma alternativa para a obtenção de antioxidantes naturais. Mesmo quando os extratos naturais sejam menos eficientes, o uso de alguns deles como antioxidantes alimentares pode ser vantajoso, já que a quantidade não é limitada por lei, muito embora um estudo econômico detalhado e a avaliação de sua potencial toxicidade deve ser realizado antes de qualquer possível aplicação em escala prática (MOURE et al., 2001).

Numa abordagem terapêutica, o uso de extratos aquosos, associados à antibioticoterapia em associações sinérgicas, pode ser bastante promissor para tratamento de doenças bacterianas, podendo contribuir para diminuir o mecanismo de resistência bacteriana causada pelas drogas (ALMEIDA et al., 2013). Autores relatam que, devido ao aumento do número de bactérias entéricas resistentes a antibióticos, o tratamento da enterite pode ser feito com fitoterápicos (BAHADOR; BASERISALEHI, 2011). Assim, pesquisas com plantas conduzem a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos, sendo necessária a elucidação dos componentes ativos presentes nas mesmas, bem como seus mecanismos de ação (MACIEL et al., 2002).

3.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A segurança de alimentos está aliada à saúde pública e com ela, muitos problemas econômicos e higiênico-sanitários podem ser evitados. A microbiologia preditiva é uma ferramenta muito importante para esta finalidade, visto que através dela é possível desenvolver diversas condições de estudo dos produtos, encontrando os melhores métodos e perspectivas para preservá-los e aumentar o tempo de vida útil. Isso contribui na tomada de decisões na indústria alimentícia e ainda é uma ferramenta imprescindível no desenvolvimento de novos processos e produtos (LIRA et al., 2020; OLIVEIRA, 2013a).

A microbiologia preditiva combina elementos de microbiologia, matemática e estatística, aplicados à engenharia de alimentos, com a finalidade de aplicar e desenvolver modelos que possam descrever e/ou prever o crescimento e/ou inativação de microrganismos sob determinadas condições ambientais prescritas (ANASTÁCIO, 2009; FORSYTHE, 2013; PIRES et al., 2019) por meio de equações matemáticas (KOUTSOUMANIS et al., 2020).

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento da população que descrevem. Entre outras classificações, existem modelos de crescimento, de inativação e de limites ou interface de crescimento (modelos cresce-não-cresce) (WHITING, 1995; McMEEKIN; ROSS, 2002).

Segundo Whiting e Buchanan (1993) os modelos matemáticos podem ser classificados em modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem as mudanças na população microbiana em função do tempo. Os modelos secundários descrevem como os parâmetros de um modelo primário variam com as condições ambientais e os modelos terciários combinam os dois últimos tipos de modelos com uma fácil aplicação em *software*.

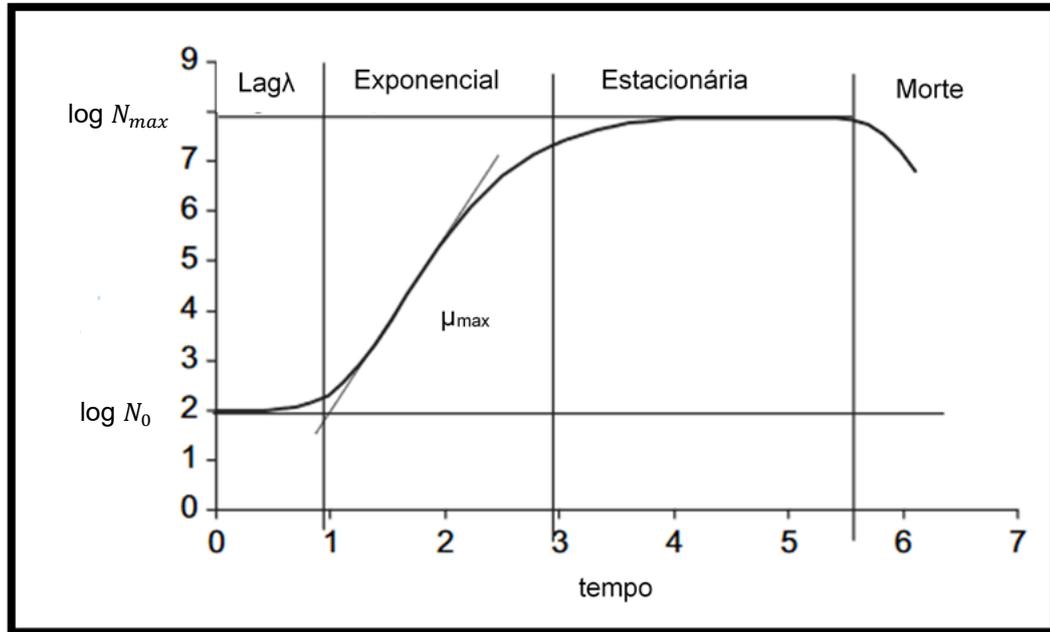
3.4.1 Modelos primários

3.4.1.1 Modelos primário de crescimento

Estes modelos (equações ou funções matemáticas) podem descrever a variação da concentração celular, formação de toxinas, níveis de substrato e produtos metabólicos em função do tempo, fornecendo valores dos parâmetros para as diferentes condições estudadas (SWINNEN et al., 2004; WHITING, 1995).

Os parâmetros obtidos pelos modelos primários de crescimento mais conhecidos são: λ - duração da fase lag (h), μ_{max} - velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), N_0 - população inicial (UFC/mL), N_{max} - população máxima atingida (UFC/mL) ou A - aumento logarítmico da população ($A = \log N_{max} - \log N_0$). Estes parâmetros e as fases distintas do crescimento microbiano podem ser visualizados na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Curva de crescimento microbiano: λ (fase lag), μ_{max} (velocidade específica máxima de crescimento), N_0 (concentração celular inicial) e N_{max} (concentração celular máxima).



Fonte: Adaptado de LEBERT; LEBERT (2006).

3.4.1.1.1 Modelo de Gompertz

Este modelo foi introduzido na microbiologia de alimentos por Gibson et al., em 1987, onde estes autores compararam a equação logística e a de Gompertz na parametrização de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum* (ROSS; McMEEKIN, 1994; GIANNUZZI et al., 1998; LABUZA; FU, 1993).

O modelo de Gompertz é um modelo sigmoidal. A base deste modelo é que, devido à limitação no espaço e/ou nutrientes bem como à produção de metabólitos tóxicos, a velocidade de crescimento microbiano não é constante. Tipicamente, a velocidade de crescimento aumentaria até um máximo e depois então diminuiria.

O Modelo de Gompertz é dado pela Equações 3.1 e os cálculos dos parâmetros μ_{max} e λ são dados pelas Equações 3.2 e 3.3, respectivamente.

$$y = C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (3.1)$$

$$\mu_{max} = \frac{BC}{e} \quad (3.2)$$

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B}\right) \quad (3.3)$$

Em que:

$y = \ln(N/N_0)$;

C , M (h) e B (h^{-1}) = parâmetros empíricos do modelo;

μ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

λ = duração da fase lag (h);

$e = 2,7182$;

t = tempo (h).

3.4.1.1.2 Modelo de Gompertz modificado

Zwietering, et al. (1990) propuseram a reparametrização do modelo de Gompertz com a introdução direta dos parâmetros cinéticos de crescimento que apresentam significado biológico no modelo. Isto facilitou o encontro de valores iniciais e o cálculo de intervalos de confiança durante o ajuste da curva (LABUZA; FU, 1993; VAN IMPE et al., 1995). Zwietering et al. (1990) concluíram que em quase todos os casos testados, o modelo de Gompertz modificado é estatisticamente suficiente para descrever dados de crescimento, e também é simples de se usar.

O Modelo de Gompertz modificado está apresentado na Equação 3.4.

$$y = y_0 + (y_{max} - y_0) \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{max} \exp(1)}{y_{max} - y_0}(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (3.4)$$

Em que:

y = logaritmo da concentração microbiana em dado tempo (log UFC/mL);

y_0 = logaritmo da concentração microbiana inicial (log UFC/mL);

y_{max} = logaritmo da concentração microbiana máxima (log UFC/mL);

λ = duração da fase lag (h);

t = tempo (h);

3.4.1.1.3 Modelo de Baranyi e Roberts

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) propõe uma abordagem para tratar o crescimento microbiano incorporando princípios biológicos. Assim, propuseram um modelo onde a fase de adaptação é atribuída à necessidade de sintetizar um substrato desconhecido que é crítico para o crescimento. Uma vez que as células se ajustam ao novo ambiente, elas crescem exponencialmente a uma velocidade de crescimento específica máxima (μ_{max}) até que sejam limitados pela restrição ditada pelo meio de crescimento.

As Equações 3.5 e 3.6 descrevem o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994), em que a Equação 3.6 representa a função de ajuste desse modelo.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu_{max}F(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{max}F(t)} - 1}{e^{m(\ln(N_{max}/N_0))}} \right) \quad (3.5)$$

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(e^{(-\mu_{max}t)} + e^{-h_0} - e^{[(-\mu_{max}t)-h_0]} \right) \quad (3.6)$$

Em que:

$N(t)$ = concentração de células no tempo t (UFC/mL);

N_0 = concentração inicial de células (UFC/mL);

m = parâmetro de curvatura do modelo;

N_{max} = concentração celular máxima (UFC/mL);

h_0 = parâmetro que expressa o estado fisiológico inicial das células, que é dado pela Equação 3.7.

$$h_0 = \mu_{max}\lambda \quad (3.7)$$

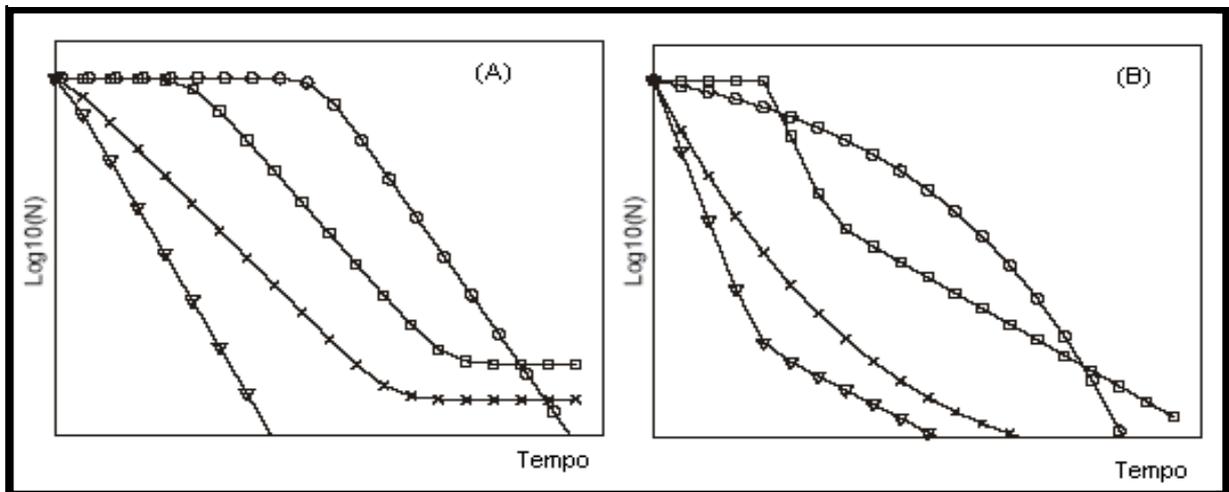
Algumas vantagens do modelo de Baranyi e Roberts é a facilidade de usá-lo, uma vez que existem *softwares* disponíveis onde as equações já estão inseridas, além de apresentar boa capacidade de ajuste, é aplicável a condições com variações

dinâmicas no ambiente e a maioria dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (LEBERT; LEBERT, 2006; VAN IMPE et al., 2005).

3.4.1.2 Modelos primários de inativação

A inativação microbiana tem sido tradicionalmente assumida como uma cinética de primeira ordem (McKELLAR; LU, 2004; PELEG, 2003). Entretanto os modelos de inativação microbiana não-log-lineares têm sido frequentemente apresentados na literatura e são usados para descrever a cinética e inativação de uma ampla variedade de microrganismos, com o mais variado comportamento (GEERAERD et al., 2005; MENEZES, 2020; PELEG, 2003; PELEG; COLE, 1998; VALDRAMIDIS et al., 2006), como ilustrado na Figura 3.4.

Figura 3.4 – Ilustração das curvas de inativação microbiana normalmente observadas na literatura. A: (∇) log-linear, (\times) log-linear com cauda, (\square) sigmoidal, (\circ) log-linear com ombro. B: (∇) bifásica, (\times) côncava, (\square) bifásica com ombro, (\circ) convexo.



Fonte: GEERAERD et al., (2005)

Os modelos primários que descrevem a inativação microbiana são representados pelo modelo log-linear clássico e por modelos não-lineares, como log-linear com ombro e/ou cauda e Weibull, os quais estão destacados neste estudo.

3.4.1.2.1 Modelo Log-linear

O modelo Log-linear assume que todas as células e esporos na população têm a mesma resposta a um dado tratamento letal e que sua cinética de inativação é descrita por uma cinética de primeira ordem (SCHAFFNER; LABUZA, 1997). A velocidade de inativação do número de microrganismos pode ser descrita como uma reação de 1ª ordem, como na Equação 3.8.

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (3.8)$$

Em que:

k = constante de reação (1/t);

N = concentração de microrganismos (UFC/mL)

Considerando-se condições iniciais, como $t_0 = 0$ e $N = N_0$, e integrando dentro de um determinado intervalo de tempo (0 a t), no qual foi aplicado o tratamento em condições constantes, tem-se a Equação 3.9.

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (3.9)$$

Na forma exponencial, a Equação 3.8 pode ser escrita pela Equação 3.10:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kt} \quad (3.10)$$

ou seja, a destruição de microrganismos ocorre de forma exponencial.

Aplicando-se logaritmo decimal, tem-se a Equação 3.11.

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{kt}{2,303} \quad (3.11)$$

O parâmetro D é definido, em termobacteriologia, como o tempo de redução decimal e está escrito na Equação 3.12.

$$\frac{k}{2,303} = \frac{1}{D} \quad (3.12)$$

Em que:

D = tempo, em condições ambientais constantes, necessário para a inativação de 90% do número de microrganismos (tempo de redução decimal).

Substituindo a equação 3.12 na equação 3.11, encontra-se a equação de Ralm, que descreve a curva de sobreviventes, Equação 3.13.

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (3.13)$$

3.4.1.2.2 Modelo Log-linear com ombro

A inativação de muitos microrganismos não ocorre de maneira log-linear, já que nem todos os microrganismos são completamente idênticos, pois se fossem, os microrganismos quando expostos a determinadas condições ambientais, todos morreriam ou seriam inativados exatamente ao mesmo tempo (PELEG, 2006).

O modelo Log-linear com ombro (Equação 3.14), descrito por Geeraerd et al. (2000), pode descrever curvas de inativação de microrganismos que apresentam resistência distinta, com aparecimento de ombro anteriormente à fase exponencial de inativação. Este modelo tem a vantagem de estimar um comportamento log-linear com ou sem ombro, apresentando uma transição suave entre as fases de ombro e log-linear (GEERAERD et al., 2005).

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\frac{t}{D} \frac{1}{\left(1 + \left(\exp\left(\frac{S}{D}\right) - 1\right) \left(\exp - \frac{t}{D}\right)\right)} \quad (3.14)$$

Em que:

N_t = população de microrganismos (UFC/mL), no instante t ;

N_0 = população inicial do microrganismo (UFC/mL);

t = tempo (h);

D = tempo de redução decimal, ou seja, o tempo necessário para a inativação de 90% da população microbiana (h).

S = duração do ombro (h);

3.4.1.2.3 Modelo de Weibull

O modelo de Weibull foi inicialmente formulado em 1933 para a modelagem de redução do tamanho de formas, conhecida como distribuição de Rosin-Rammler (PELEG, 2006) (Equação 3.15). Segundo Mafart et al. (2002) uma grande vantagem do modelo de Weibull, proposto por Waloddi Weibull em 1936, é a simplicidade matemática e ótima flexibilidade.

$$\log \left(\frac{N_t}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (3.15)$$

Em que:

N_t = população de microrganismos (UFC/mL) no instante t ;

N_0 = população inicial do microrganismo (UFC/mL);

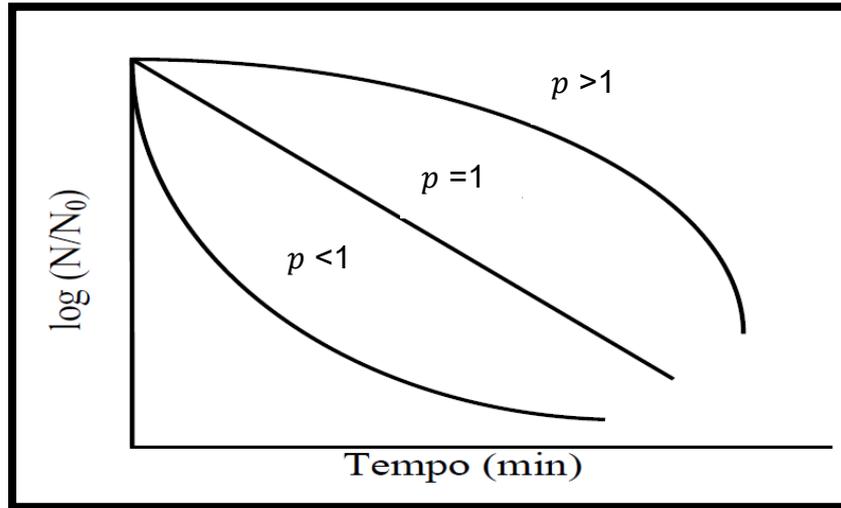
t = tempo (min);

p = fator de forma;

δ = fator de escala (min).

No modelo de Weibull, a direção da concavidade da curva de sobreviventes é uma manifestação das diferentes vias de inativação dos microrganismos (Figura 3.5). Curvas com concavidades voltadas para baixo ($p > 1$) retratam uma população que diminui progressivamente mais rápido, assim, o tempo necessário para destruir a mesma fração de microrganismos diminui com o passar do tempo. Concavidades voltadas para cima ($p < 1$) podem formar uma cauda após certo tempo e indicam que a população de microrganismos contém membros que morrem rapidamente. Porém, à medida que o processo de destruição ocorre, os sobreviventes são os mais resistentes, levando a um tempo maior de inativação (ARAGÃO et al., 2007; PELEG, 2006). Uma curva linear de sobreviventes, considerada como cinética de primeira ordem, é um caso especial da equação de Weibull onde $p = 1$ (McKELLAR; LU, 2004).

Figura 3.5 – Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull para diferentes valores para o fator de forma p .



Fonte: HABERBECK, (2011).

3.4.2 Modelos secundários

Os modelos secundários são equações que descrevem como variam os parâmetros de crescimento e/ou inativação dos modelos primários com a mudança de um ou mais fatores, por exemplo, temperatura, pH e atividade de água (WHITING, 1995).

O modelo secundário pode ser obtido por qualquer equação que apresente o melhor ajuste aos dados experimentais, sem levar em conta o mecanismo, uma vez que a utilidade do modelo secundário é a descrição da variação dos parâmetros de interesse em função de fatores ambientais, através de funções, como por exemplo a concentração do óleo essencial ([OECB]). Sendo assim, diversas equações podem ser usadas, como por exemplo, raiz quadrada (Equação 3.16), exponencial (Equação 3.17), hiperbólica (Equação 3.18) e da potência (Equação 3.19).

$$\sqrt{k} = a[OECB] + b \quad (3.16)$$

$$k = c \exp(d[OECB]) \quad (3.17)$$

$$k = e \frac{1}{[OECB] - f} \quad (3.18)$$

$$k = g[OECB]^h \quad (3.19)$$

Em que k é o parâmetro de interesse do modelo primário, no exemplo, concentração do óleo essencial de *C. blanchetianus* e a, b, c, d, e, f, g, h são parâmetros empíricos dos modelos.

3.4.3 Validação dos modelos

Na microbiologia preditiva, a qualidade do ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais, bem como a comparação do desempenho de diferentes modelos aplicados necessitam ser validados por técnicas estatísticas apropriadas. Assim, alguns índices estatísticos podem ser usados para avaliar a confiabilidade ou qualidade do ajuste (*goodness-of-fit*) dos modelos preditivos de crescimento e/ou inativação, bem como para comparar o ajuste de uma série de modelos aos dados utilizados para a sua elaboração (McCLURE et al., 1994).

Há um número de fontes de variabilidade que podem ser inerentes ao microrganismo, a erros sistemáticos devido aos métodos analíticos de laboratório e às técnicas de modelagem inadequadas para descrever os dados (BLACKBURN, 2000).

Os índices estatísticos normalmente utilizados na literatura são o coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro médio quadrático (RMSE), o fator de tendência e o fator de exatidão.

3.4.3.1 Coeficiente de determinação (R^2)

O coeficiente de determinação (R^2) descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva, indicando assim sobre a confiabilidade de um modelo. Este índice mede a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. Quanto maior o valor ($0 < R^2 \leq 1$), melhor é a predição obtida pelo modelo.

3.4.3.2 Raiz do erro do quadrado médio (RMSE)

O raiz do erro do quadrado médio (RMSE) é um índice estatístico que é definido pela raiz quadrada da soma quadrática do resíduo, dividido pelo número de graus de liberdade. O RMSE representa o desvio entre a medida experimental e o valor predito, ou seja, descreve o quanto os valores preditos estão próximos dos valores

observados. Os valores de RMSE são maiores que zero e quanto menor o seu valor, melhor será a adequação do modelo. As Equações 3.20 representa o cálculo da raiz do erro médio quadrático.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (valor_{observado} - valor_{predito})^2}{n - p}} \quad (3.20)$$

Em que:

n = número de dados experimentais;

p = número de parâmetros do modelo.

3.4.3.3 Fator de tendência

O fator de tendência indica se a média dos valores observados se encontram acima ou abaixo da linha de equivalência (predito = observado). O valor do índice de tendência fornece informações importantes sobre o tipo de desvio verificado nos valores preditos pelos modelos matemáticos, ou seja, se eles superestimam ou subestimam os valores observados. Assim, se o valor do fator de tendência é igual 1, a resposta predita é igual a observada; se o valor do fator de tendência maior que 1, a resposta predita é maior que a observada; se o valor do fator de tendência menor que 1, a resposta predita é menor que a observada. A Equação 3.21 representa o cálculo do fator de tendência.

$$fator\ de\ tendência = 10^{\left(\frac{\sum \log(valor_{predito}/valor_{observado})}{n}\right)} \quad (3.21)$$

3.4.3.4 Fator de exatidão

O fator de exatidão calcula a média da distância entre cada ponto e a linha da equivalência como uma medida de quão próximas, da média, as predições estão das observações (ROSS, 1996). Quanto maior o valor do fator de exatidão, menor será a exatidão da estimativa da média. Quando o fator de exatidão tem o valor de 1, este significa que existe concordância perfeita entre os valores observados e os preditos pelo modelo. A Equação 3.22 representa o cálculo do fator de exatidão.

$$fator\ de\ exatidão = 10^{\left(\frac{\sum |\log(valor_{predito}/valor_{observado})|}{n}\right)} \quad (3.22)$$

3.4.4 Modelagem do efeito antimicrobiano de óleos essenciais

A ação dos óleos essenciais como antimicrobiano natural tem sido estudada como uma forma de desenvolver tecnologias não-térmicas de preservação de alimentos para aumentar a vida útil (LEE et al., 2020) ou diminuir a ação desses tratamentos (ARIOLI et al., 2019). A modelagem matemática é uma ferramenta que pode descrever o efeito da ação inibitória do óleo essencial no comportamento dos microrganismos (BASAK, 2018; KOUTSOUMANIS et al., 1999; ABDOLLAHZADEH et al., 2017). Alguns autores utilizaram o modelo log-normal para descrever a influência de fatores como a presença do óleo essencial de *Carum copticum*, pH, temperatura e tamanho do inóculo analisados no crescimento da *Salmonella* Typhimurium (SHAKERI et al., 2017).

O modelo de Baranyi e Roberts indicou um bom ajuste para descrever o crescimento de *E. coli* sob diferentes condições de temperatura (20 – 42 °C), pH (4,5 – 8,5), concentração de cloreto de sódio (0 – 5% p/v) e concentração de óleo essencial de *Carum copticum* (0-750 ppm). Dois parâmetros de crescimento (velocidade específica máxima de crescimento e tempo de adaptação) das curvas de crescimento sob efeitos combinados de temperatura, pH, cloreto de sódio e óleo essencial foram modelados usando um modelo quadrático (equação polinomial de superfície de resposta). Os resultados mostraram que o modelo de superfície de resposta forneceu um método útil e preciso para prever os parâmetros de crescimento de *E. coli* e poderia ser aplicado para garantir a segurança de alimentos no que diz respeito ao controle de *E. coli* (SHAHNIA et al., 2012). Araújo (2016) observou valores elevados de R² (≥ 0,97) para as curvas de crescimento pelo modelo de Baranyi e Roberts em amostras de queijo coalho inoculadas com cepas de *E. Coli* e armazenadas a 10 °C. Baranyi e Silva (2017) ressaltaram que o uso eficiente de modelos preditivos na tomada de decisão para microbiologia de alimentos precisa considerar três pontos principais: (1) a incerteza e variabilidade das informações utilizadas com base nas quais a decisão deve ser tomada; (2) a validade dos modelos preditivos que auxiliam o avaliador; e (3) o custo gerado pela diferença entre a escolha a *priori* e o resultado

posterior para avaliar os riscos e reguladores que possam usar em uma recomendação específica (escolha/decisão).

De acordo com Schlei et al. (2018) os fenômenos de inativação ou crescimento de patógenos são complexos e, se comparados a fenômenos de outras áreas, poucos modelos os descrevem e poucos estudos foram desenvolvidos. Ainda ressaltam a grande variabilidade das respostas que um microrganismo pode apresentar às inúmeras variáveis que influenciam um determinado processo de crescimento ou inativação. No entanto, modelos matemáticos desenvolvidos mostraram a difusividade do cinamaldeído e do eugenol, princípios ativos presentes em *Cinnamomum cassia* e *Syzygium aromaticum*, respectivamente, na carne. Ainda, a quantidade de cinamaldeído e eugenol que se difundiu através da carne teve um efeito positivo significativo no prazo de validade microbiológico, organoleptico e químico da carne bovina (MOHAN et al., 2017).

Segundo Oliveira et al. (2013b), o modelo de Weibull pode ser usado para descrever as curvas de inativação de antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais contra patógenos. Possas et al. (2017) verificaram o efeito do óleo essencial de tomilho, como um antimicrobiano natural, sobre o comportamento da *Salmonella* Enteritidis em quatro formulações de fatias de carne de peru pronta para o consumo, armazenadas a 10 e 25 °C. Em geral, os resultados sugeriram que o padrão de sobrevivência de *S. Enteritidis* em três formulações refletiram um declínio mais pronunciado dos níveis desse patógeno nos primeiros dois dias de armazenamento a 10 °C, seguido por uma desaceleração na redução nos dias subsequentes. No caso que foi observado crescimento, o modelo Baranyi e Roberts forneceu um ajuste aceitável para os dados, com $R^2 \geq 0,98$ e $MSE \leq 0,30$. E nos casos em que houve inativação, o ajuste do modelo de Weibull mostrou índices estatísticos de $R^2 \geq 0,95$ e $MSE \leq 0,11$ e parâmetros p menor que 1 para todas as formulações avaliadas, resultando em curvas de sobrevivência com concavidade ascendente.

Na avaliação da influência da concentração (0,0%, 0,7% e 1,4%) do óleo essencial de orégano e das temperaturas de armazenamento (8, 25 e 36 °C) em pH 5, sobre os parâmetros cinéticos de crescimento da *Salmonella* Enteritidis em maionese industrial do tipo caseira, os resultados obtidos indicam que a inibição do crescimento é mais eficiente com uma maior concentração do óleo essencial e em temperatura mais elevada, sendo aproximadamente três vezes superior a 36 °C em relação a 8 °C. O modelo usado de Baranyi e Roberts mostrou um bom ajuste aos

dados com índices estatísticos R^2 (= 0,921) mais alto quando usado a maior concentração de óleo essencial e da temperatura de armazenamento. Assim, os autores inferiram que a adição de óleo essencial de orégano à maionese pode ser uma alternativa eficaz para o controle de surtos de infecção bacteriana causados por *Salmonella* Enteritidis (ROBAZZA et al., 2016).

O efeito inibitório dos óleos essenciais (0,05%, 0,10% e 0,15% (v/v)) de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerição (*Ocimum basilicum*), limão (*Citrus limon L.*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*) sobre o crescimento de *Salmonella* Typhimurium *in vitro* evidenciou uma melhor ação inibitória com o uso do óleo essencial de orégano. O modelo de Baranyi e Roberts se ajustou bem aos dados obtidos do crescimento de *S. Typhimurium* em amostras de hambúrgueres de carne mecanicamente separada de tampaqui, tratadas com óleo essencial de orégano, embaladas a vácuo ou não, armazenado a 12 °C, segundo a análise dos dados estatísticos (R^2 entre 0,905 e 0,964).

Segundo Bagheri et al. (2020) os constituintes dos óleos essenciais têm diferentes propriedades antimicrobianas. Desta forma, os modelos matemáticos podem ser usados para descrever e prever o efeito de famílias químicas nas propriedades antimicrobianas de óleos essenciais.

O Quadro 3.2 relaciona alguns trabalhos sobre o uso da modelagem preditiva para avaliar o efeito antimicrobiano de óleo essencial sobre diversos produtos.

Quadro 3.2 – Trabalhos de modelagem preditiva com uso de óleo essencial (OE).

(continua)

Nº	Objetivo	Produto	Óleo essencial	Bactéria	Modelagem matemática	Referência
1	Analisar o efeito da ação conjunta do OE de orégano e do calor sobre a resistência dos esporos de <i>Bacillus coagulans</i> , em caldo nutriente a 4° Brix e pH 4,2	-	óleo essencial de orégano	cepa de <i>Bacillus coagulans</i>	modelo de Weibull	HABERBECK, 2011
2	Avaliar o efeito do tratamento termoquímico (calor e óleo essencial) na vida útil de mexilhões (<i>Perna perna</i>) processados em embalagens flexíveis	mexilhões pré-cozidos e resfriados	óleos essenciais de orégano e de manjerição	Coliformes termotolerantes (45 °C), Contagem de estafilococos, <i>Escherichia coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , bactérias lácticas, contagem total de mesófilos, psicrófilos e psicrotróficos	modelo de Baranyi e Roberts	COSTA, 2013.
3	Avaliar o desempenho do modelo de Gompertz modificado e modelo logístico para prever o efeito de OE no crescimento microbiano	filés de truta arco-íris (<i>O. mykiss</i>) frescos	óleos essenciais de orégano e tomilho	<i>E. coli</i>	modelos Gompertz modificado e modelo logístico	SAGDIC; OZTURK, 2014.

Quadro 3.2 – Trabalhos de modelagem preditiva com uso de óleo essencial (OE).

(continuação)

Nº	Objetivo	Produto	Óleo essencial	Bactéria	Modelagem matemática	Referência
4	Avaliar a vida útil e verificar a aplicabilidade da modelagem na previsão da vida útil	presunto fatiado	óleo essencial de alecrim	Bactérias ácido lácticas	modelos Gompertz modificado por Zwietering, Logístico modificado por Zwietering e Logístico modificado por Corradinie Peleg	ZIBETTI et al., 2014.
5	Avaliar o comportamento do tratamento com OE a diferentes temperaturas de armazenamento; Modelagem da capacidade inibitória do TEO	carne de aves pronta para consumo	óleo essencial tomilho (TEO)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	modelos Weibull e Weibull modificado	POSSAS et al., 2016.
6	Avaliar a ação antimicrobiana de filmes ativos de acetato de celulose incorporados com diferentes concentrações de OE para posterior aplicação dos filmes com as concentrações mais efetivas.	Presunto	óleo essencial de orégano	<i>W. viridescens</i> <i>P. fluorescens</i>	modelo de Baranyi e Roberts	PAGANINI, 2017.
7	Avaliar o efeito da aplicação de diferentes concentrações OE sobre parâmetros físico-químicos e microbiológicos, durante o armazenamento	linguiça toscana	óleo essencial de alecrim e orégano	flora natural de bactérias ácido lácticas.	modelo Baranyi e Roberts, Huang e Robazza et al.	BADIA, 2018.

Quadro 3.2 – Trabalhos de modelagem preditiva com uso de óleo essencial (OE).

(conclusão)

Nº	Objetivo	Produto	Óleo essencial	Bactéria	Modelagem matemática	Referência
8	Modelar o efeito da utilização de OE de orégano como agente antimicrobiano no crescimento da flora natural de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas	presunto fatiado embalado a vácuo	óleo essencial de orégano	flora natural de bactérias ácido lácticas.	modelos de Baranyi e Roberts, Gompertz modificado	Menezes, et al., 2018.

Fonte: Elaborada pela autora.

CAPÍTULO 4**4 METODOLOGIA GERAL****4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL**

A matéria vegetal foi coletada na Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão (UEPE) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *Campus* Limoeiro do Norte. Foram identificadas, por meio de lacres de cores diferentes (Figura 4.1), cinco árvores, entre as coordenadas geográficas latitude 05°10825' S e longitude 38°00717' O.

Figura 4.1 – *Croton blanchetianus* (marmeleiro) identificadas por meio de lacres, UEPE.

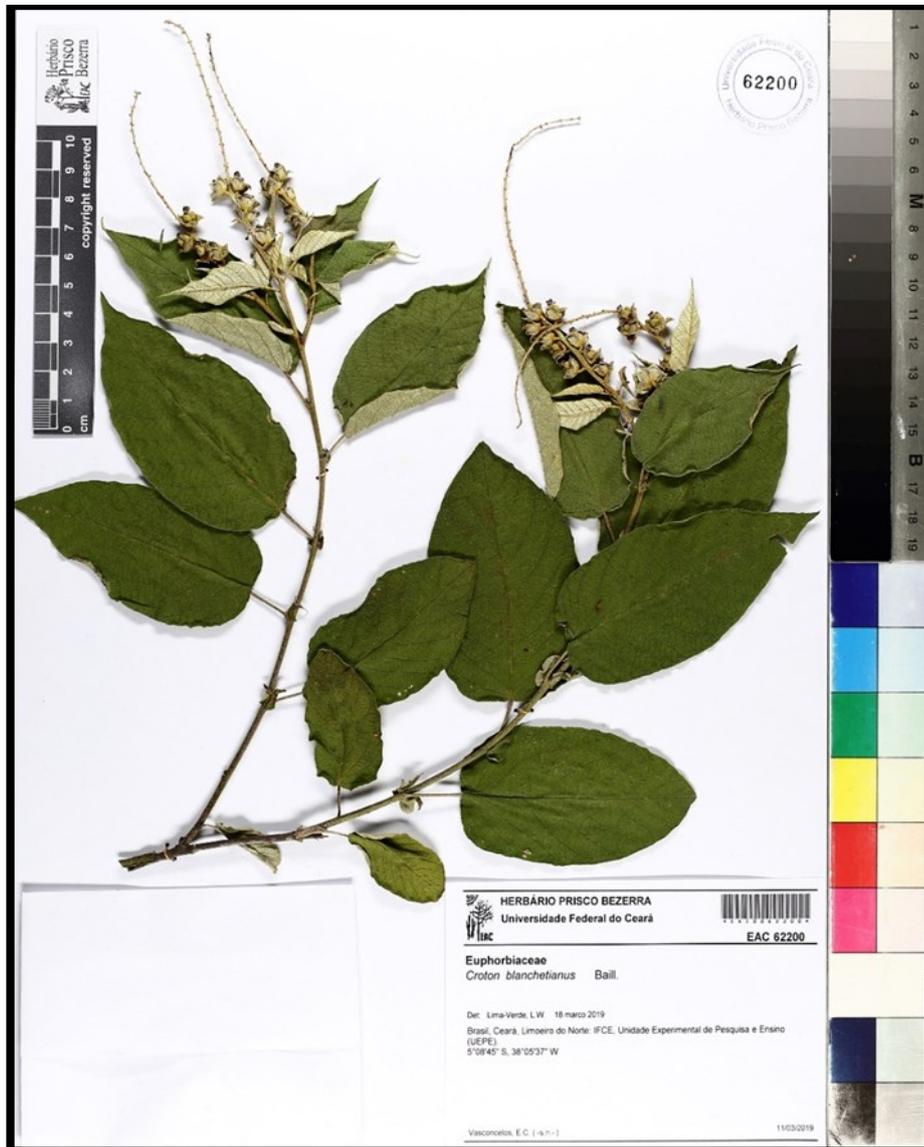


Fonte: Elaborado pela autora.

As coletas foram realizadas no período chuvoso, (janeiro a maio), turno da manhã e identificadas por Luiz Wilson Lima-Verde, do Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará – UFC, Centro de Ciências - Departamento de Biologia

- Campus do Pici, onde a exsicata com número de registro 62200 - *Croton blanchetianus* Baill encontra-se depositada (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Exsicata do exemplar de *Croton blanchetianus* Baill coletado no município de Limoeiro do Norte – CE.



Fonte: Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará - UFC

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO AQUOSO

Após a coleta do material vegetal, as folhas foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório de Química de Alimentos do IFCE.

O processo de extração do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* foi realizado por meio da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado

(GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960), acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L e uma manta térmica como fonte geradora de calor, conforme modelo citado na Farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019) (Figura 4.3). Para cada processo de extração foram pesadas 300 g da amostra, juntamente com 2,5 L de água destilada e, submetidos a uma temperatura de extração 100 °C, durante 2 horas, contados do momento da condensação da primeira gota de óleo. Após a extração (Figura 4.4), o óleo foi coletado e adicionado de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção da água residual e, em seguida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur o óleo foi coletado e acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração (2 a 8 °C) até a realização das análises.

Figura 4.3 – Extração do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* coletado no município de Limoeiro do Norte – CE.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.4 – Óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* coletado no município de Limoeiro do Norte – CE.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após o período de extração do óleo essencial (Figura 4.5), o extrato aquoso obtido por decocção das folhas frescas (Figura 4.6) de *C. blanchetianus* foi filtrado,

coletado e denominado extrato aquoso das folhas frescas. Outras folhas de *C. blanchetianus* foram secas de forma natural, sobre sacos plásticos, expostas (Figura 4.7) à temperatura ambiente, com uma média de 31 ± 5 °C, até aproximadamente 9% de umidade (5 a 6 dias, aproximadamente) e posteriormente realizada a extração do óleo essencial (Figura 4.8), posterior filtragem, coleta do extrato aquoso, e denominado de extrato aquoso das folhas secas de *C. blanchetianus*. Sendo que uma quantidade das folhas secas foi acondicionada em sacos plásticos, ao abrigo da luz e armazenados por 8 meses, para posterior processo de extração do óleo essencial e, em seguida, comparação da composição química com o óleo essencial anteriormente extraído das folhas secas de *C. blanchetianus*.

Figura 4.5 – Extração do óleo essencial das folhas frescas de *C. blanchetianus*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.6 – Folhas frescas de *C. blanchetianus* (marmeleiro).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.7 – Folhas secas de *C. blanchetianus* (marmeleiro).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.8 – Extração do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*.

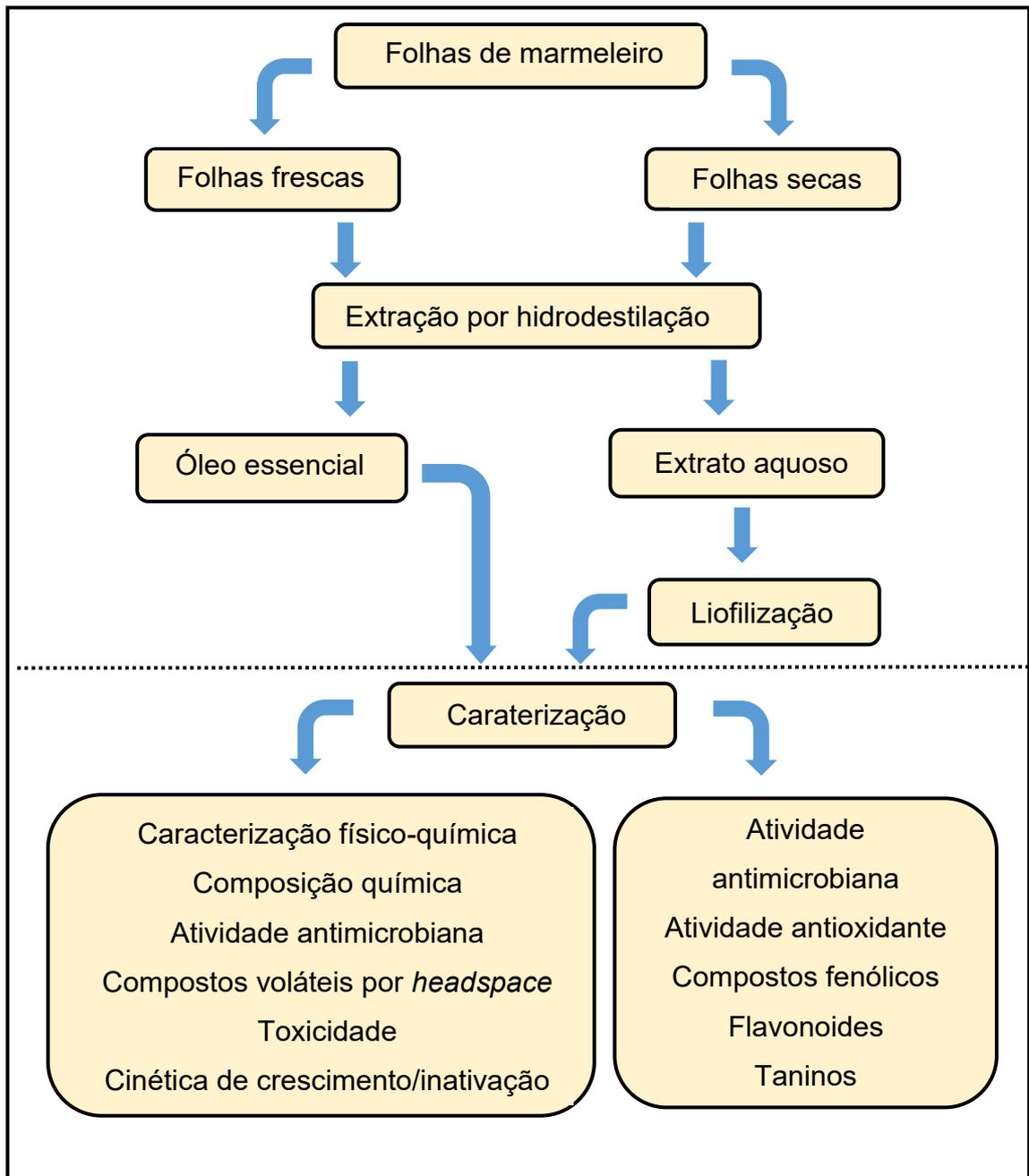


Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA

A Figura 4.9 apresenta um fluxograma simplificado das principais etapas desenvolvidas, desde a obtenção das folhas de *C. blancetianus* (marmeleiro), obtenção do óleo essencial e do extrato aquoso, bem como das análises realizadas.

Figura 4.9 – Fluxograma simplificado das etapas realizadas desse estudo.



Fonte: Elaborada pela autora.

CAPÍTULO 5

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 POTENCIAL BIOATIVO, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Croton blanchetianus* BAILL

Resumo

O *Croton blanchetianus* Baill, conhecido como marmeleiro, é rico em metabólitos secundários, como alcaloides e terpenos, que podem apresentar efeitos biológicos. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano dos extratos aquosos resultantes do processo de extração do óleo essencial das folhas frescas e secas do *C. blanchetianus*. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e posteriormente o extrato aquoso foi coletado e liofilizado, sendo submetido às análises. A determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima contra bactérias patogênicas de interesse em alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*) foi realizada pelo método de microdiluição. O efeito dos extratos aquosos sobre as células bacterianas foi avaliado por imagens de microscopia eletrônica de transmissão. A avaliação da atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS e DPPH. O extrato aquoso das folhas frescas apresentou maiores teores de flavonoides e atividade antioxidante por ABTS em comparação com o extrato de folhas secas. Os compostos fenólicos, taninos e a atividade antioxidante pelo método DPPH não diferiram significativamente entre ambos os tipos de folhas. Ambos os extratos aquosos apresentaram atividade antimicrobiana apenas sobre as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*). Foram observadas alterações celulares em *S. aureus* e *L. monocytogenes* sob ação do extrato aquoso de folhas frescas e secas. Os resultados indicam a possibilidade de utilização do extrato aquoso das folhas secas de *C. blanchetianus* como aditivo bioativo e para melhoria da segurança de alimentos, no que diz respeito às bactérias Gram-positivas. Palavras-chave: marmeleiro, bactérias patogênicas, microscopia eletrônica de transmissão

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem como uma de suas finalidades a produção de alimentos inócuos e com um prolongado tempo de vida útil. Há, portanto, uma preocupação quanto à segurança do uso de conservantes químicos, tendo em vista que são considerados responsáveis por muitos atributos carcinogênicos e teratogênicos, além da toxicidade residual [1]. O uso de conservantes químicos está

na contramão da busca pelo consumo de produtos naturais e que apresentem características benéficas à saúde [2].

O *Croton blanchetianus* é uma espécie representativa da família Euphorbiaceae, apresentando padrão de distribuição agregada nas áreas da Caatinga [3, 4]. É uma planta arbustiva, típica do sertão, encontrada em abundância no Nordeste brasileiro, popularmente conhecida como marmeleiro [5]. Cascas e folhas de *Croton* sp. são comumente usadas na medicina popular na forma de chás e infusões para distúrbios gastrointestinais, como diarreia e constipações, dentre outros [6, 7].

As propriedades bioativas relacionadas ao consumo desses chás estão associadas à sua composição fitoquímica. A análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* revelou a presença de alcaloides, açúcares redutores, derivados cinâmicos, flavonoides, saponinas, taninos condensados, terpenos, esteroides, catequinas (taninos catéquicos) [8-11]. Os produtos botânicos como os óleos essenciais e os extratos de plantas medicinais e plantas silvestres têm demonstrado a presença de compostos eficazes no controle de microrganismos patogênicos [12]. Segundo Firmino et al. (2019) [13], os diterpenos metil 12-hidroxi-3,4-seco-cleistan-8,11,13,15,4 (18) -pentaeno-3-oato (ICB4) e ent-ácido 3,4-secoatisa-4 (18), 16-dien-3-óico (ICB8), isolados de *C. blanchetianus*, têm potencial para serem utilizados como agente terapêutico contra infecções causadas por estreptococos orais (*Streptococcus mutans* e *S. Parasanguinis*), devido à ação antibiofilme.

Os compostos bioativos relacionados à capacidade antioxidante têm sido objeto de pesquisa devido à alta importância na saúde humana [14] e uso na indústria de alimentos. Os extratos vegetais, suas misturas, concentrados e isolados têm sido constantemente estudados e revisados com relação à atividade antioxidante, como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos [15, 16]. A atividade antioxidante dos extratos aquosos vem contribuindo para a estabilidade de alimentos ao longo do período de estocagem [17, 18].

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano, do extrato aquoso resultante do processo de extração (hidrodestilação) do óleo essencial das folhas frescas e secas do marmeleiro (*C. blanchetianus* Baill).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta, preparo das folhas de *C. blanchetianus*

Para a coleta das folhas de *C. blanchetianus*, cinco árvores, entre as coordenadas geográficas latitude 05°10825' S e longitude 38°00717' W, foram marcadas com lacres de cores diferentes na Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão (UEPE) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Limoeiro do Norte, cadastro no SisGen AC5ED78. A coleta foi realizada no período chuvoso, turno da manhã. Uma amostra foi coletada para a identificação e realização da exsicata e depositada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará (UFC) (# 62200).

As folhas foram secas à temperatura ambiente (31 ± 1 °C), durante 5 a 6 dias. As folhas frescas foram utilizadas imediatamente após coleta, para o processo de extração do óleo essencial. O teor de umidade das folhas frescas e secas foi determinado conforme o procedimento recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz [19].

2.2 Obtenção do extrato aquoso das folhas de *C. blanchetianus*

O extrato aquoso foi obtido por meio da extração do óleo essencial das folhas frescas e secas do *C. blanchetianus*, através da técnica de hidrodestilação, em aparelho Clevenger modificado [20], acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L e uma manta térmica como fonte geradora de calor, conforme modelo descrito na Farmacopeia Brasileira (2019) [21]. Para o processo de extração, ambos tipos de folhas (secas ou frescas) (300 g) foram colocadas no balão de fundo redondo com adição de água destilada (2,5 L) e submetidas a uma temperatura de 100 °C por 2 horas, contadas a partir do momento da condensação da primeira gota de óleo. Posteriormente ao período de extração do óleo essencial das folhas, o extrato aquoso presente no balão de fundo redondo, obtido por decocção das folhas foi filtrado, coletado em frasco de cor âmbar e denominados extrato aquoso das folhas frescas (EAF) e extrato aquoso das folhas secas (EAFS) e ambos armazenado sob refrigeração (2 a 8 °C). Em seguida, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em frasco de vidro, protegido da luz e armazenadas a -18°C, até o momento das análises.

2.3 Quantificação de compostos bioativos e determinação da atividade antioxidante

A quantificação de compostos fenólicos nas amostras dos extratos aquosos foi realizada de acordo com Larrauri et al. (1997) [22], através do método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA) como padrão e concentração de 10 mg/mL dos EAFF e EAFS do *C. blanchetianus*, sendo as análises feitas em triplicata. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU, modelo UV-1800), a um comprimento de onda de 700 nm e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato seco.

A determinação de taninos nas amostras EAFF e EAFS foi baseada na metodologia do IAL (2008) [19], que utiliza o ácido tânico (Sigma-Aldrich, EUA) para a curva padrão. A concentração dos extratos utilizada foi de 4 mg/mL. As análises foram realizadas em triplicata, a leitura foi feita num espectrofotômetro (SHIMADZU, modelo UV-1800) a 760 nm, e o resultado final expresso em mg equivalente de ácido tânico (EAT)/g.

A determinação dos teores de flavonoides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998) [23], utilizando uma curva padrão de quercetina (Sigma, EUA) e a concentração dos extratos aquosos testada foi de 4 mg/mL, sendo utilizadas alíquotas de 0,1 mL e 0,2 mL das amostras EAFF e EAFS, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata e a leitura em espectrofotômetro a 420 nm, sendo os resultados expressos em mg de quercetina por 100g de EAFF e EAFF do *C. blanchetianus*.

A capacidade antioxidante do EAFF e EAFS do *C. blanchetianus* foi determinada pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), de acordo com metodologia descrita por Rufino et al. (2007) [24]. Para a realização do ensaio, as amostras foram diluídas em água destilada nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. As leituras foram realizadas através de um espectrofotômetro a 515 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, e a capacidade antioxidante foi expressa como a concentração de antioxidante necessária para reduzir a quantidade original de radicais livres em 50% (EC₅₀).

A capacidade antioxidante dos extratos foi também avaliada pelo método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio), conforme

procedimento descrito por Rufino et al. (2007) [25]. Para realizar a análise de ABTS, foram preparadas soluções com as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL para o EAFF e 1, 2 e 2,5 mg/mL para o EAFS. Os ensaios foram realizados em triplicata, a leitura feita em espectrofotômetro a 734 nm e os resultados expressos em micromolar equivalente de trolox por g de extrato seco (liofilizado) de *C. blanchetianus* (μM trolox/g de extrato).

2.4 Atividade antimicrobiana

2.4.1 Preparo do inóculo

Para a determinação do potencial antimicrobiano in vitro dos EAFF e EAFS do *C. blanchetianus*, foram utilizadas linhagens de referência de *Staphylococcus aureus* ATCC-27664, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Listeria monocytogenes* ATCC-19115, e *Salmonella* Enteritidis IAL-1132.

As cepas de *S. aureus*, *S. Enteritidis*, e *E. coli* foram cultivadas no meio Ágar Tripticase de Soja – TSA (Difco, Sparks, USA), e as de *L. monocytogenes* foram cultivadas no mesmo meio de cultura, porém enriquecido com 0,1 % extrato de levedura – TSA+YE (Difco, Detroit, EUA) e todas as cepas foram incubadas a 35 °C/24 h em estufa tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). Ao término do período de incubação, colônias isoladas de cada microrganismo foram transferidas para tubos contendo 5 mL do caldo triptona de soja – TSB e incubadas a 35 °C por 24 horas, em estufa tipo BOD para a obtenção de uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10^8 UFC/mL para cada microrganismo. Essas condições foram baseadas em ensaios anteriores que determinaram o ajuste do inóculo fazendo-se diluições seriadas a fim de obter uma suspensão bacteriana de 10^5 UFC/mL, posteriormente utilizada para os ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana.

2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos foi utilizado o método de microdiluição, utilizando placas de 96 poços [26]. Inicialmente,

os EAFF e EAFS liofilizados foram diluídos em água destilada estéril e filtrados (0,22 µm). As concentrações testadas estavam no intervalo de 3 a 25 mg/mL para os ensaios de *L. monocytogenes* e *S. aureus* e 28 a 50 mg/mL para *E. coli* e *S. Enteritidis*. Em cada poço da microplaca, foram adicionados 100 µL das diluições dos extratos e, em seguida, foram adicionadas alíquotas de 100 µL em caldo Trypticase de Soja (TSB) contendo cada inóculo individualmente, com uma concentração final de 10^5 UFC/mL. Todos os experimentos, nas diferentes concentrações, foram realizados em triplicata. O controle positivo consistiu em 100 µL do inóculo em caldo TSB e 100 µL água, e o controle negativo foi elaborado com diferentes concentrações da solução de extrato aquoso testadas adicionadas de caldo TSB. A microplaca foi incubada a $35 \pm 1,0$ °C por 24 horas em leitor de absorvância onde foi realizada leitura de densidade óptica inicial (D.O.) a 630nm, desde o tempo zero (t_0) e a cada 2 horas até o tempo de 24 horas (t_{24}). Os resultados foram obtidos pela diferença das leituras de absorvância DO630nm ($t_{24} - t_0$), sendo consideradas as Concentração Inibitória Mínima (CIM), as menores concentrações em que a solução do extrato inibiu o crescimento dos microrganismos, definido como a leitura a DO630, com diferença de leitura ($t_{24} - t_0$) $\leq 0,05$ [27]. Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), uma alíquota de 100 µL de cada poço cuja concentração das soluções de extrato indicava atividade inibitória ($(t_{24} - t_0) \leq 0,05$) foi espalhada na superfície de placa contendo meio Ágar Trypticase de Soja - TSA, em seguida as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. As CBM's foram identificadas como as menores concentrações das soluções antimicrobianas de extratos testadas, cujas contagens das placas indicaram redução de três ciclos logarítmicos ($3,0 \log_{10}$ UFC/mL) de células viáveis, a partir da concentração do inóculo inicial (10^5 UFC/mL) ou aquelas que apresentaram a ausência de crescimento microbiano [26, 27].

2.4.3 Observação microscópica da ação do extrato aquoso sobre os microrganismos

O preparo das cepas de *S. aureus* e *L. monocytogenes* foi realizado conforme o item 2.4.1. Nos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo foram feitos o controle positivo e a CBM do extrato aquoso de *C. blanchetianus* para cada bactéria.

Volumes iguais do fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4) e da suspensão bacteriana de 10^5

UFC/mL foram colocados em tubos eppendorf (2 mL) e mantidos a 4 °C, durante a noite [28]. Posteriormente, foram realizadas quatro lavagens nas amostras, sendo a primeira com o fixador e as outras três lavagens com tampão fosfato, sempre após retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado. Entre cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min a 10 °C. Foi colocado uma gota da solução microbiana sobre a grade, sendo retirado o excesso após três minutos. Em seguida, foi adicionada uma gota do contrastante ácido fosfotúngstico, deixado em repouso por três minutos e posteriormente retirado o excesso. As amostras foram visualizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Vega 3 Tescan, mediante o uso do detector STEM no laboratório de Bioimagem da Embrapa Agroindústria Tropical, conforme Muniz et al. (2019) [29].

2.5 Análise estatística

Os resultados dos compostos bioativos e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente e as comparações de médias foram realizadas utilizando o teste t-Student, bilateral para amostras independentes ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* Statistica 10.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Compostos bioativos e a atividade antioxidante

O teor de umidade das folhas frescas foi $54,5 \pm 1,20$ % e, após secagem, as folhas secas apresentaram teor de umidade de $7,5 \pm 0,10$ %.

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises dos compostos fenólicos, taninos, flavonoides e atividade antioxidante pelo método ABTS e DPPH do EAFF e EAFS do *C. blanchetianus*.

Tabela 1: Comparação da concentração de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, ABTS e DPPH no extrato aquoso das folhas frescas (EAFF) e extrato aquoso das folhas secas (EAFS), provenientes do processo de hidrodestilação do *C. blanchetianus*.

Extrato aquoso	Compostos fenólicos (mg EAG/g)	Taninos (mg EAT/g)	Flavonoides (mg de EQ /g)	ABTS μ M trolox/g	EC ₅₀ mg/L
EAFF	276,05 \pm 19,17 ^a	236,13 \pm 32,25 ^a	33,94 \pm 1,60 ^a	906,39 \pm 28,27 ^a	947,67 \pm 35,92 ^a
EAFS	269,92 \pm 8,35 ^a	186,38 \pm 30,37 ^a	27,67 \pm 0,48 ^b	627,85 \pm 109,39 ^b	817,5 \pm 163,55 ^a

^{a,b} médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste t-Student, para amostras independentes ($p < 0,05$).

A análise dos extratos aquosos identificou compostos fenólicos e taninos, que também foram observados na análise fitoquímica dos extratos etanólicos e metanólicos das folhas secas de *C. blanchetianus*, realizada por de Silva et al. (2021) [30]. Os EAFF e EAFS do *C. blanchetianus* não apresentaram diferença significativamente ($p < 0,05$) nos teores de compostos fenólicos e taninos.

Costa et al. (2017) [31] encontraram, para o extrato etanólico do caule de *Croton argyrophyllus*, valores de 269,72 \pm 6,25 mg EAG/g para o conteúdo de fenóis totais, valores próximos ao observados neste estudo. Nascimento et al. (2017) [32] observaram o potencial terapêutico dos compostos fracionados, como O-glicosídeos Kaempferol e quercetina, flavonoides-C-glicosídeos, taninos e derivados do ácido cinâmico do *Croton cajucara*, sobre o edema de pata em ratos induzido por carragenina, confirmando assim o uso popular deste *Croton* e atribuíram esse resultado aos compostos fenólicos que são amplamente associados a muitas atividades biológicas e farmacológicas das plantas.

A presença de taninos no extrato aquoso das folhas *C. blanchetianus* está de acordo com a prospecção fitoquímica realizada com os extratos etanólicos das folhas de *C. blanchetianus*, onde foi identificada a presença de taninos [33] indicando assim o bom desempenho do solvente aquoso utilizado nesse estudo. Em uma abordagem das interações ecológicas entre vegetais e herbívoros, sugere-se que os teores de taninos podem diminuir a taxa de predação por tornarem os materiais vegetais impalatáveis, afastando seus predadores naturais e constituindo assim um modo de defesa [34, 35]. Segundo da Silva et al. (2019) [36], os taninos estão entre os compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais que apresentam atividade antioxidante.

Em relação ao teor de flavonoides, EAFF e EAFS apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), sendo observada uma maior quantidade no EAFF em relação ao EAFS. O processo de secagem das folhas do *C. blanchetianus* pode ter influenciado o teor de flavonoides presente no EAFS. Alguns autores mencionam que as condições de temperatura e o tempo de secagem influenciam no rendimento de flavonoides [37-39]. Ainda Torres et al. (2018) [40] identificaram a temperatura como sendo um fator de seleção para a extração de diferentes categorias de flavonoides. Por meio da análise da composição fitoquímica não foi possível identificar flavonoides nos extratos etanólicos e metanólicos das folhas e raízes do *C. blanchetianus* [30].

A atividade antioxidante determinada pelo método DPPH (EC_{50}) não apresentou diferença significativa entre os EAFF e EAFS. No entanto, pelo método ABTS, as amostras apresentaram diferença, com um teor de antioxidante maior para o EAFF quando comparado ao EAFS do *C. blanchetianus* (Tabela 1), provavelmente devido ao maior teor de umidade presente nas folhas frescas que pode ter contribuído para uma maior extração dos compostos bioativos presente nas folhas. Segundo Almeida et al. (2021) [41], a atividade antioxidante do extrato aquoso da casca de achachairu (*Garcinia humilis*) foi maior quando determinada pelo método ABTS. Os autores consideraram que isso pode ser devido ao maior poder de extração atribuído à polaridade do solvente aquoso enquanto, para a atividade antioxidante determinada por DPPH, não foi possível observar qualquer diferença relevante. De acordo com Rufino et al (2010) [42], o método ABTS é indicado para compostos hidrofílicos e o método DPPH pode ser utilizado tanto para compostos hidrofílicos e lipofílicos. Moure et al. (2001) [15] consideraram que a diferença entre os resultados da atividade antioxidante entre amostras pode acontecer por diversos fatores como temperatura, concentração da amostra, efeito do solvente usado na extração, método de determinação, dentre outros.

Outros tipos de extratos apresentaram melhores valores comparados a esse estudo. Assim, segundo de Aquino et al. (2017) [43], o extrato etanólico das folhas frescas de *C. blanchetianus* apresentou um EC_{50} de $6,5 \pm 0,5$ mg/L. O EC_{50} dos extratos metanólicos das folhas secas do *C. argyrophyllus* e do *C. heliotropiifolius* foram 222 ± 8 e 357 ± 4 mg/L, respectivamente, pelo método DPPH [44]. A literatura apresenta relatos sobre o efeito antioxidante do extrato obtido com diferentes partes da planta, como o caule, a folha de várias espécies de *Croton* sp. [43-46]. Brito et al.

(2018) [44] relatou que os extratos das folhas do *C. argyrophyllus* e *C. heliotropiifolius* tiveram maior teor de antioxidante quando comparado ao caule.

Os resultados mostram que não houve diferença estatística entre as concentrações dos compostos fenólicos, taninos e antioxidantes pelo método DPPH entre os EAFF e EAFS. Dentre os compostos fenólicos, contudo, apenas a concentração de flavonoides foi superior na análise do EAFF. De forma prática, o EAFS apresenta vantagem sobre o EAFF, pois as folhas, logo após serem coletadas, podem ser secas, para posterior extração do óleo essencial, sem a necessidade de se proceder à imediata extração e sem prejuízo das concentrações dos principais compostos bioativos.

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os resultados das CIM e CBM dos extratos EAFF e EAFS de *C. blanchetianus* estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), expressos em mg/mL, dos extratos aquosos das folhas frescas (EAFF) e secas (EAFS), proveniente do processo de extração do óleo essencial de *C. blanchetianus*, sobre as bactérias *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Extrato aquoso	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
EAFF	3	11	3	NO
EAFS	10	19	17	23

NO – Não observado na faixa das concentrações estudadas

O EAFF apresentou melhor ação para as bactérias Gram-positivas, comparado ao EAFS, uma vez que apresentou ação inibitória em concentrações menores. Em relação aos microrganismos Gram-negativos (*S. enteritidis* e *E. coli*), resultados não apresentados na Tabela, os extratos aquosos de ambas as folhas não apresentaram atividade inibitória ou bactericida nas concentrações testadas. É importante ressaltar que outros estudos já mostraram que os microrganismos Gram-positivos são mais suscetíveis à ação antimicrobiana de extratos vegetais [47, 48], o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo. Ferreira et al. (2020) [49],

trabalhando com o extrato aquoso do caule do marmeleiro (*C. blanchetianus*), reportaram a atividade inibitória e bactericida para bactérias Gram positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*), sendo que as concentrações bactericidas para Gram-positivos variaram de 0,5–3 mg/mL e Gram-negativas de 4,3–19 mg/mL. A ação observada no “extrato aquoso do caule” não foi observada em relação ao “extrato aquoso de folhas” para as bactérias Gram-negativas estudadas. Trabalhando com extrato aquoso do *C. nepetaefolius*, Ferreira et al. (2020) [49] apresentaram uma CIM de 14 mg/mL para *L. monocytogenes* e ausência da CBM na faixa estudada (1 a 18 mg/mL), no entanto, no presente estudo, foi encontrada uma CBM de 23 mg/mL para o EAFS.

Fennell et al. (2004) [50] ressaltaram que diversos fatores podem interferir nos diferentes valores de CIM e de CBM de extratos de plantas, como a técnica aplicada, a cepa do microrganismo utilizada, além de fatores relacionados à planta como local de plantio, época da coleta e se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Ainda, os extratos brutos de espécies vegetais podem muitas vezes apresentar ação antimicrobiana mais efetiva contra patógenos devido ao sinergismo entre os constituintes bioativos, que são extraídos pelo solvente ou método de extração empregado [51].

Numa abordagem terapêutica, o uso de extratos aquosos, associados de forma sinérgica à antibioticoterapia, pode ser bastante promissor para tratamento de doenças bacterianas, podendo contribuir para diminuir o mecanismo de resistência bacteriana causada pelas drogas [52]. Autores relatam que, devido ao aumento da taxa de bactérias entéricas resistentes a antibióticos, o tratamento da enterite pode ser feito com fitoterápicos [53]. Ostrosky et al. (2008) [54] relataram a importância no desenvolvimento e produção de produtos farmacêuticos e cosméticos a partir de extratos vegetais com ação antimicrobiana. Assim, pesquisas com plantas conduzem a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos, sendo necessária a elucidação dos componentes ativos presentes nas mesmas, bem como seus mecanismos de ação [55].

3.3 Observação microscopia do efeito do extrato aquoso sobre as bactérias patogênicas

Os efeitos da ação dos EAFF e EAFS sobre as células de *S. aureus* e do EAFS sobre a cepa de *L. monocytogenes*, nas concentrações equivalentes às respectivas CBM's, podem ser observadas na Figura 1.

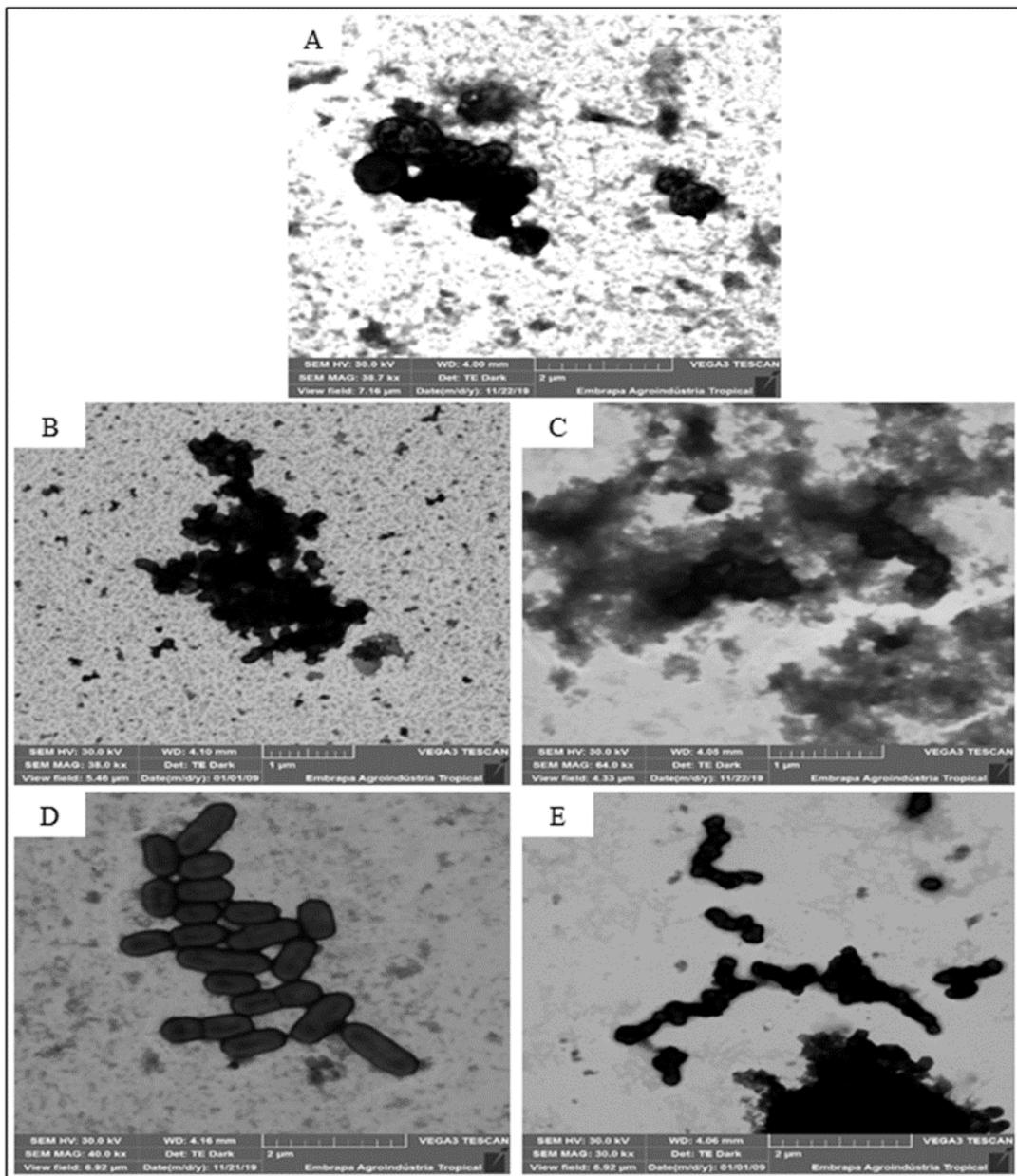


Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de *S. aureus* (A – controle, aumento de 38.700x); sob ação do extrato aquoso de *C. blanchetianus* proveniente das folhas frescas (B, aumento de 38.000x) e folhas secas (C, aumento de 64.000x) e de células de *L. monocytogenes* (D – controle, aumento de 40.000x) sob efeito do extrato aquoso das folhas secas (E, aumento de 30.000x). nas concentrações equivalentes aos respectivos CBM's.

A morfologia celular foi visualizada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de culturas bacterianas tratadas com EAFF e EAFS para auxiliar na compreensão da ação antimicrobiana dos extratos aquosos do *C. blanchetianus*. Segundo Xing et al. (2009) [56], as observações por microscopia eletrônica são ferramentas poderosas para os pesquisadores entenderem melhor o impacto de um agente estressor na morfologia de células bacterianas.

A eletromicrografia de *S. aureus*, sem tratamento com o extrato aquoso do *C. blanchetianus*, mostrou células bem definidas, esféricas, arranjadas em cachos e com paredes íntegras (Figura 1A). A ação do EAFF (Figura 1B) e EAFS (Figura 1C) sobre *S. aureus* apresentou uma perda da limitação entre os arranjos de células bacterianas, ainda com alteração da forma de cocos para agregados celulares, sendo que, sob a ação do EAFS, houve um extravasamento acentuado do conteúdo celular e ausência da forma original, possivelmente devido à presença de compostos bioativos.

Nos tratamentos utilizando-se a CBM do EAFS do *C. blanchetianus* sobre as culturas bacterianas de *L. monocytogenes*, as imagens (Figura 1) mostram uma alteração da forma da célula, possivelmente em nível de parede celular já que a mesma tem a função de manter a forma da célula, proteger contra variações da pressão osmótica e influências do meio externo [57] (Figura 1E). Foi observada uma perda da integridade celular, contrastando com o controle (Figura 1D), em que pode se visualizar uma nítida delimitação celular com formato celular típico de bastonetes e estruturas internas preservadas e nítidas. Utilizando extrato aquoso de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq) contra *L. monocytogenes*, Guimarães et al. (2020) [58] reportaram que, mesmo altas concentrações (90-150 mg/mL) não foram suficientes para destruir sua parede celular e provocar a inibição desse microrganismo.

Kim e Fung (2004) [59], estudando o efeito antibacteriano do extrato aquoso de *Puerariae radix* em patógenos de origem alimentar, concluíram que as células bacterianas tratadas foram mortas pela ruptura das paredes e membranas celulares, bem como por perturbações irregulares da matriz intracelular.

4. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos provenientes do processo de hidrodestilação do óleo essencial do *C. blanchetianus* (marmeleiro) apresentam compostos bioativos, tanto nos extratos aquosos obtidos das folhas frescas como nos obtidos das folhas secas do *C. blanchetianus*. Assim, os resultados apresentados sugerem que os extratos aquosos apresentam potencial para serem utilizados como aditivos em alimentos, agindo como conservantes e antioxidantes.

Os extratos aquosos das folhas frescas e secas de *C. blanchetianus* apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos Gram-positivos (*S. aureus* e *L. monocytogenes*), e ausência de atividade antimicrobiana sobre os

microrganismos Gram-negativos (*S. Enteritidis* e *E. coli*). A concentração bactericida mínima do extrato do *C. blanchetianus* provocou uma alteração na morfologia de *S. aureus* e de *L. monocytogenes*, sendo mais expressivo em culturas de *S. aureus*, com extravasamento celular.

As análises realizadas mostraram que é possível utilizar o extrato aquoso proveniente das folhas secas, cuja extração do óleo essencial não precisa ser imediata após a colheita, sem grandes prejuízos nos teores das substâncias bioativas, apresentando vantagem tecnológica sobre o extrato aquoso das folhas frescas.

Os resultados apontam um potencial para a melhoria da segurança de alimentos, utilizando-se compostos naturais (extratos aquosos de *C. blanchetianus*) que podem ser rotulados como “verdes”, indo ao encontro das demandas dos consumidores por produtos mais naturais e seguros. Os resultados desse trabalho mostram o potencial no uso do extrato aquoso de *C. blanchetianus*, no entanto, é necessária a realização de algumas análises complementares, tais como teste de toxicidade e análises sensoriais para confirmar a possibilidade de utilização desse extrato em alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Doutorado Institucional (DINTER), a Universidade Federal do Ceará (UFC), a Embrapa Agroindústria Tropical pelas imagens de microscopia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Sci Technol.* 2005;38:565-70. doi: 10.1016/j.lwt.2004.07.012
2. Sakurai FN, Estrela KCA, Tamayo MS, Casseb MO, Nakasato M. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. *Demetra.* 2016;11(4):1097-113. doi: 10.12957/demetra.2016.18170
3. Barbosa AS, de Andrade AP, Félix LP, Aquino ÍS, Silva JHCS. Composição, similaridade e estrutura do componente arbustivo arbóreo de áreas de Caatinga. *Nativa.* 2020 Mai/Jun;8(3):314-22. doi: 10.31413/nativa.v8i3.9494
4. de Souza MR, Ferreira MB, de Sousa GG, Alves AR, de Holanda AC. Caracterização florística e fitossociológica do componente lenhoso de um fragmento

- florestal de Caatinga em Serra do Mel, Rio Grande do Norte, Brasil. *Nativa*. 2020 Mai/Jun;8(3):329-35. doi: 10.31413/nativa.v8i3.9136
5. Maia-Silva C, da Silva CI, Hrcir M, de Queiroz RT, Imperatriz-Fonseca VL. Guia de plantas: visitadas pelas abelhas na Caatinga. 1 ed. Fortaleza (CE): Fundação Brasil Cidadão; 2012.
 6. Queiroz MMF, Queiroz EF, Zeraik ML, Marti G, Favre-Godal Q, Simões-Pires C, et al. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. *Phytochem Lett*. 2014. Dec;10:xxxvii-xciii. doi: 10.1016/j.phytol.2014.08.013
 7. Chaves SAM, Reinhard KJ. Palespharmacology and Pollen: Theory, method and application. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(Suppl):207-11.
 8. Freitas AFS, Costa WK, Machado JCB, Ferreira MRA, Paiva PMG, Medeiros PL, et al. Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. *S Afr J Bot*. 2020;(133):30-9. doi: 10.1016/j.sajb.2020.06.015
 9. Oliveira IMM, Santos HS, Sena Jr DM, Cruz BG, Teixeira AMR, Freire PTC, et al. Vibrational spectra and DFT calculations of sonderianin diterpene. *J Mol Struct*. 2015 Jun;(1099):226-31. doi: 10.1016/j.molstruc.2015.06.049
 10. dos Santos PM, Scripsema J, Huster RM. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2005 Out/Dez;(4):321-5.
 11. Lopes EL, Andrade Neto M, Silveira ER, Pessoa ODL, Braz-Filho, R. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. *Quim Nova*. 2012;35(11):2169-72.
 12. Ootani MA, Aguiar RW, Ramos ACC, Broto DR, da Silva JB, Cajazeira JP. Use of essential oils in agriculture. *J Biotechnol Biodivers*. 2013 May;4(2):162-74.
 13. Firmino NCS, Alexandre FSO, de Vasconcelos MA, Pinheiro AA, Arruda FVS, Guesdes MLS, et al. Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral Streptococci biofilms. *Ind Crops Prod*. 2019;131:371-77. doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.062
 14. Paz M, Gíllon P, Barroso MF, Carvalho AP, Domingues VF, Gomes AM, Becker H, et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive componunds. *Food Chem*. 2015 Apr;1(172):462-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.102
 15. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. 2001;72:145-71.
 16. Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Bello-Koblitz MG. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semin Cienc Agrar*. 2010 Jul/Set;31(3):669-82.
 17. Vencato AA, Nickel VS, Silva MAS, Kindlein L, Bergmann GP, Avancini CAM. Salt and crude plant extracts as preservatives in a meat model system (ground pork shoulder). *Rev Caatinga*. 2020 Abr-Jun;33(2):562-70. doi: 10.1590/1983-21252020v33n229rc
 18. Veeck APL, Klein B, Ruviaro AR, Quatrin A, Ferreira LF, Daniel AP, et al. Estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados tratados com extratos *Lippia alba*. *Cienc Rural*. 2015 Jun;45(6):1113-9.
 19. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos - IAL. 4. ed. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008.
 20. Gottlieb OR, Magalhães MT. Modified distillation trap. *Chemist Analyst*. 4th ed. 1960;49:114.
 21. Farmacopeia Brasileira. 6. ed. Brasília (SP): Agência Nacional de Vigilância Sanitária SAI; 2019.

22. Larrauri JÁ, Rupérez P, Saura-Calixto F. Effect of drying temperatura on the stability of polyphenols and antioxidant activityof red grape pomacepeels. J Agric Food Chem. 1997 April;45(4):1390-3. doi: 10.1021/jf960282f
23. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apic Res. 1998;37(2):99-105. doi: 10.1080/00218839.1998.11100961
24. Rufino MSM, Alves RE, de Brito ES, de Moraes SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2007. (Comunicado Técnico, 127).
25. Rufino MSM, Alves RE, de Brito ES, de Moraes SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2007. (Comunicado Técnico, 128).
26. Branen JK, Davidson PM. Enhancementofnisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. Int J Food Microbiol. 2004;90:63-74. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00172-7
27. Brandt AL, Castillo A, Harris KB, Keeton JT, Hardin MD, Taylon TM. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. J Food Sci, Malden. 2010;75(9):557-63. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01843.x
28. Karnovsky MJA. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Int J Cell Biol. 1965;27(2):137-8.
29. Muniz CR, Azevedo HMC, Rosa MF. Preparo de amostras para observação de nanoestruturas em microscópio eletrônico de varredura acoplado a detector STEM. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2019. (Comunicado Técnico, 248).
30. de Silva AIB, de Sá-Filho GF, de Oliveira LC, Guzen FP, Cavalcanti JRLP, Cavalcante JS. Perfil fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do *Croton Blanchetianus*. Rev Bras Multidiscip. 2021;24(1):134-42. doi: 10.25061/2527-2675/ReBraM/2021.v24i1.1057
31. Costa MAR, dos Santos RRC, Gualberto AS, Cunha e Silva SL. Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). Encicl Biosf Centro Científico Conhecer, Centro Científico Conhecer. 2017 Jun;14(25):687-701. doi: 10.18677/EnciBio_2017A53
32. Nascimento AM, Maria-Ferreira D, Dai Lin FT, Limura A, de Santana-Filho AP, de Wermerc MFP, et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. J Pharm Biomed. 2017 Aug;145:821-30. doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.032
33. Rodrigues OG, Angélico EC, da Costa JGM, Lucena MFA, Queiroga Neto V, Silva WW. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotrpiifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares. Agropecuária Científica no Semiárido. 2016 Jul/Set;12(3):237-41.
34. Paes JB, Moraes VM, de Lima CR. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), Cássia (*Senna siamea*) e Ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. Floresta e Ambiente. 2002 Jan/Dez;9(1):135-44.
35. João RES, Raga A. Mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos sugadores. Campinas (SP): Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Apta; 2016. (Documento Técnico, 23).
36. da Silva AFG, Feitosa BH, Lima VT, da Silva VFB. Antioxidante activity and total phenol, flavonoid end tanin contentes of *Croton floribundus* and *Croton urucurana*.

- Encicl Biosf: Centro Científico Conhecer. 2019;16(30):11-22. doi: 10.18677/EnciBio_2019B2
37. Borgo J, Xavier CAG, Moura DJ, Richter MF, Suyenaga ES. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. Rev Bras Farmacogn. 2010 Jan/Mar;20(1):12-7.
38. Rababah, TM, Al-u'datt M, Alhamad M, Al-Mahasneh M, Ereifej K, Andrade J, et al. Effects of drying process on total phenolics, antioxidant activity and flavonoid contents of common Mediterranean herbs. Int J Agric Biol Eng. 2005 Apr;8(2):145-50. doi: 10.3965/j.ijabe.20150802.1496
39. Jansuma S, Charoensuo L, Jirakiattiku Y, Harakotr B. Effects of drying temperatures and times on antioxidant contents and their activities of *Centella asiatica* (L.) urb. leaves. Thai Science and Technology Journal (TSTJ). 2020 Dec;28(12):2261-71. doi: 10.14456/tstj.2020.179
40. Torres DS, Pereira ECV, Sampaio PA, de Souza NAC, Ferraz CAA, de Oliveira AP, et al. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. Quim Nova. 2018 Mai;41(7):743-7. doi: 10.21577/0100-4042.20170236
41. Almeida RLJ, Santos NC, Alves IL, André AMMCN. Evaluation of thermodynamic properties and antioxidant activities of Achachairu (*Garcinia humilis*) peels under drying process. Flavour Fragr J. 2021 Oct;36:213-22. doi: 10.1002/ffj.3635
42. Rufino MSM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chem. 2010 Aug;121(4):996-1002. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.037
43. de Aquino VVF, da Costa JGM, Angélico EC, de Medeiros RS, de Araújo MF, Rodrigues OG. Metabólitos secundários e ação antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. Acta Brasiliensis. 2017 Set;1(3):7-10. doi: 10.22571/Actabra13201730
44. Brito SSS, Silva F, Malheiro R, Baptista P, Pereira JA. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. Ind Crops Prod. 2018;113:308-15. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.044
45. Nardi GM, Felippi R, DalBó S, Siqueira-Junior JM, Arruda DC, Monache FD, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. Phytomedicine. 2003 Mar;10(2-3):176-84. doi: 10.1078/094471103321659906
46. Salatino A, Salatino MLF, Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). J Braz Chem Soc. 2007;18(1):11-33. doi: 10.1590/S0103-50532007000100002
47. Askari GA, Kahouadji A, Khedid K, Mousaddak M, Ouaffak L, Charof R, et al. Evaluation of antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of leaves of *Vitis vinifera* collected from different regions in Morocco. Eurasian J Agric Environ Sci. 2012;12(1):85-90.
48. Ferreira SB, Palmeira JD, de Souza J, de Almeida JM, Figueiredo MCP, Pequeno AS, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anal Clin. 2010;42(1):27-31.
49. Ferreira MJG, Dias FGB, dos Santos MS, Menezes RCS, da Silva LMR, de Figueiredo EAT. Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. Res Soc Dev. 2020;9(5):1-14. doi: 10.33448/rsd-v9i5.3295

50. Fennell CW, Lindsey KL, McGawb LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J Ethnopharmacol.* 2004;94:205-17. doi: 10.1016/j.jep.2004.05.012
51. Simonetti E, Ethur ME, Castro LC, Kauffmann C, Giacomini AC, Ledur A, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Rev Bras Pl Med Campinas.* 2016;18(1):9-18. doi: 10.1590/1983-084X/15_005
52. Almeida GD, Godoi EP, Santos EC, de Lima LRP, de Oliveira ME. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. *Rev Cienc Farm Basica Apl.* 2013;34(4):487-92.
53. Bahador N, Baserisalehi M. The effect of *Quercus castaneifolia* extract on pathogenic enteric bacteria. *Anaerobe.* 2011 Aug;17(6):358-60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.07.007
54. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn.* 2008 Abr/Jun;18(2):301-7.
55. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr PV, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova.* 2002;25(3):429-38.
56. Xing K, Chen XG, Kong M, Liu SC, Cha DS, Park HJ. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Polym.* 2009;76:17-22. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.09.016
57. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* 9. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2012.
58. Guimarães TLF, da Silva LMR, Lima CBL, Magalhães FEA, de Figueiredo EAT. Antimicrobial activity of microcapsules with aqueous extract of chambá (*Justicia pectoralis* Jacq). *Rev Cienc Agron.* 2020;51(3):1-8. doi: 10.5935/1806-6690.20200033
59. Kim S, Fung DYC. Antibacterial effect of crude water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on food-borne pathogens in liquid medium. *Lett Appl Microbiol.* 2004;39:319-25. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01582.x

5.1.1 Informação complementar

As equações das retas das curvas-padrões para a quantificação dos compostos fenólicos, taninos, flavonoides e atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS estão dispostas na Tabela 5.1.1

Tabela 5.1.1 – Equações da reta das curvas padrões dos compostos fenólicos, taninos, flavonoides e atividade antioxidante por DPPH e ABTS.

Análise	Equação da reta
Compostos fenólicos	$y = 0,0125x - 0,0144; R^2 = 0,9969$
Taninos	$y = 0,046x - 0,0992; R^2 = 0,9858$
Flavonoides	$y = 0,0185x - 0,1448 R^2 = 0,9995$
DPPH	$y = 0,0105x + 0,0024; R^2 = 0,9997$
ABTS	$y = -0,0003x + 0,6044; R^2 = 0,9985$

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus* BAILL

Resumo

O *Croton blanchetianus*, popularmente denominado marmeleiro, é um arbusto rico em metabólitos secundários que apresenta diversas atividades biológicas. O objetivo desse estudo foi determinar a composição dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* e sua ação antimicrobiana (dose mínima inibitória – DMI do vapor) sobre as cepas das bactérias ácido-lácticas (BAL), *Weissella viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides*, deteriorantes de produtos cárneos. O óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* foi extraído pela técnica de hidrodestilação e os compostos voláteis foram analisados pela técnica de *headspace*, por cromatografia gasosa. A dose mínima inibitória na fase vapor foi definida como a dose mínima de solução de óleo essencial de *C. blanchetianus* em DMSO 5% cujo vapor inibe completamente o crescimento das BAL, durante 48 horas. Posteriormente, o efeito bactericida e bacteriostático foi determinado. Os compostos majoritários encontrados foram os terpenos eucaliptol (32,94%) e D- α -Pinoeno (29,43%). A dose mínima inibitória foi de 0,32g/mL, para ambos os microrganismos. O efeito bactericida para *W. viridescens* foi observado pela ação do vapor da solução de 0,32 g/mL e, para a *L. mesenteroides*, o efeito bacteriostático e bactericida foi pela ação do vapor da solução de 0,40 g/mL e 0,57 g/mL, respectivamente. Assim, foi possível observar a presença de terpenos como compostos majoritários na análise por *headspace*, bem como a atividade antimicrobiana, bacteriostática e bactericida do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* frente as BAL *W. viridescens* e *L. mesenteroides*.
Palavras-chave: *Headspace*; Antimicrobiano; Bacteriostático; Bactericida.

1. Introdução

O *Croton blanchetianus* é um arbusto colonizador típico do sertão, encontrado em abundância no Nordeste brasileiro, popularmente conhecido como marmeleiro (Santos, 2007; Cordeiro et al., 2015). Por ocasião das primeiras chuvas na caatinga, ocorre a floração do marmeleiro, que se caracteriza por apresentar flores pequenas, de cor branca e exalar perfume característico (Silva et al., 2012). As folhas e cascas do gênero *Croton*, frequentemente espécie *C. blanchetianus* Baill, são usadas na medicina tradicional, na forma de infusões para distúrbios gastrointestinais, reumatismo, cefaleia, hemoptise e hemorragia uterina (Abreu et al., 2001; Chaves & Reinhard, 2003; Albuquerque et al., 2007; Cartaxo et al., 2010). Diversas espécies de *Croton* vêm sendo estudadas e os resultados têm trazido grandes contribuições para o campo científico, como ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana

(Fontenelle, 2008), sendo o *C. blanchetianus* bastante estudado quanto às potencialidades do seu óleo essencial e extratos (Silva et al., 2020; Silva et al., 2021).

O *Croton* apresenta uma grande riqueza de metabólitos secundários, compondo o óleo essencial, como alcaloides, terpenos e óleos voláteis. (Araújo et al., 2010; Cavalcanti et al., 2012; Moura et al., 2013; Pereira Jr. et al., 2014). Além de possuir atividades biológicas comprovadas (Silva-Alves et al., 2015). De acordo com Brito et al. (2018), espécies de *Croton* são uma grande fonte de fitoquímicos com propriedades bioativas excepcionais e sua exploração pode ser útil para diferentes setores industriais, como o de cosméticos, medicinais, farmacêuticos e alimentos.

Dentro do gênero *Croton*, o *C. blanchetianus* destaca-se por possuir diferentes propriedades e uma grande aplicabilidade. Firmino et al. (2019) mostraram a atividade antimicrobiana de extratos de *C. blanchetianus* sobre bactérias comuns na formação de biofilmes orais. A atividade miorelaxante do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o músculo liso da traqueia de ratos foi avaliada, demonstrando o potencial terapêutico no tratamento do broncoespasmo, devido a sua ação broncodilatadora (Pinho-da-Silva et al., 2010). Angélico et al. (2014) reportaram a atividade antimicrobiana de *C. blanchetianus* contra cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) e potencialização de antibióticos (amicacina, canamicina, gentamicina) contra *B. cereus*, mostrando um efeito sinérgico. Boa atividade antimicrobiana do extrato de marmeleiro sobre linhagens bacterianas causadoras de cárie dentária foi encontrada por Silva et al. (2011). Esses autores observaram também que o óleo essencial de *C. blanchetianus* pode ser utilizado como uma alternativa aos promotores de crescimento, em substituição aos antimicrobianos na ração de frangos de corte, não prejudicando o rendimento de peito de frango. As potencialidades biológicas de *C. blanchetianus* têm ganhado destaque e suas propriedades já foram avaliadas para aplicação como conservantes de alimentos (Melo, 2011; Ferreira, 2020). Melo et al. (2013) analisaram a eficácia antibacteriana do óleo essencial de *C. blanchetianus* em um modelo de carne cortada em cubos durante o armazenamento sob refrigeração, e concluíram que o óleo essencial de *C. blanchetianus* é eficaz como agente antimicrobiano *in vitro*; no entanto, em um sistema modelo usando carne fresca, sua eficácia foi reduzida e, conseqüentemente, uma concentração maior de óleo essencial foi necessária para inibir o crescimento bacteriano.

A utilização na fase vapor de óleos essenciais foi ressaltada por Pereira et al. (2016), como bons candidatos a atender a busca por novas estratégias de descontaminação, devido a sua ação antimicrobiana. A aplicação do vapor do óleo essencial de carvacrol, orégano, canela, linalol e hortelã-pimenta, bem como o mix destes óleos essenciais, provocaram altas reduções microbianas contra microbiota saprófita de mesófilos, enterobactérias e fungos (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp.) e de patógenos (*Listeria innocua* e *L. innocua inoculum*), comumente encontrados em ervas culinárias (López-Gómez, et al., 2019). O óleo essencial na fase de vapor pode ser altamente eficaz contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes em concentrações relativamente mais baixas do que na fase líquida, causando assim um efeito mínimo nas propriedades organolépticas (Velázquez-Nuñez et al., 2013).

O uso de compostos voláteis de óleo essencial associado a outras tecnologias, como um sistema de embalagem ativa, através da impregnação de óleo essencial em materiais absorventes, em sachê ou encapsulado, tem sido considerado como aplicações possíveis, destacando o uso potencial na indústria de alimentos (Pola et al., 2016; Paris et al. 2020).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são microrganismos Gram-positivos, capazes de crescer em condições microaerófilas e têm crescimento fortemente influenciado pela temperatura. São consideradas os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos cozidos, embalados a vácuo, mantidos sob refrigeração. Essas bactérias podem causar alterações como sabores estranhos, descoloração, diminuição do pH e produção de limo, levando a perdas para a indústria de alimentos.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo determinar a composição química e atividade antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial obtido das folhas secas de *C. blanchetianus* Baill, sobre as BAL, *Weissella viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides*, deteriorantes de produtos cárneos.

2. Metodologia

2.1 Material vegetal

A matéria vegetal foi coletada na Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão (UEPE) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará

(IFCE), Campus Limoeiro do Norte (05°10825' S e 38°00717' O). As coletas foram realizadas no período chuvoso, turno da manhã e identificadas no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, onde a exsicata (62200) encontra-se depositada. As folhas de *C. blanchetianus* foram secas de forma natural, expostas à temperatura ambiente (31 ± 1 °C), até aproximadamente 9 % de umidade. A determinação do teor de umidade foi realizada segundo procedimento recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz (ITAL, 2008).

2.2. Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* Baill foi realizada por meio da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado (Gottlieb & Magalhães, 1960), acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L e uma manta térmica como fonte geradora de calor, conforme modelo citado na Farmacopeia brasileira (Brasil, 2019). Para cada processo de extração, foram pesados 300 g da amostra e adicionado de 2,5 L de água destilada e, submetidos a uma temperatura de extração 100 °C, durante 2 horas, contadas a partir do momento da condensação da primeira gota de óleo. Após a extração, o óleo foi coletado e adicionado de, aproximadamente, 5 g de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para remoção da água residual. A separação do óleo essencial foi feita como auxílio de uma pipeta de Pasteur, que removeu apenas a fase oleosa. O óleo coletado foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração, até a realização das análises.

2.3 Determinação dos compostos voláteis

A análise de compostos voláteis foi realizada por cromatógrafo a gás (Agilent GC 7890A), acoplado ao detector MS Agilent 5975C. A coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Agilent) (30 m de comprimento x 250 µm x 0,25 µm de espessura de filme, composta por 5% de fenil-95% metilpolissiloxano) foi ligada a um detector triplo quadrupolo e a uma fonte de ionização por Impacto de elétrons (IE), operando em modo positivo a 70 eV. A varredura de massa variou de 50 a 550 m/z. O hélio com grau de pureza 5.0 foi usado como gás de arraste, a fluxo constante de 1,0 mL/min. As temperaturas do injetor e da interface foram de 250 °C, em modo split de 1:70. Foi utilizado um amostrador automático Agilent GC Sampler 80 equipado com uma

seringa de *headspace* de 2,5 mL. As amostras foram armazenadas em *vials* de 20 mL e incubadas à temperatura e tempo de 80 °C e 300 s, respectivamente. A temperatura da seringa foi de 100 °C e a velocidade do Agitador de 500 rpm. O volume de injeção foi de 250 µL. O programa de temperatura do forno consistiu em uma temperatura inicial de 70 °C, aquecido a 4 °C/min até 180 °C e então 10 °C/min até 250 °C. Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa com os do banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2011).

2.4 Determinação da Dose Mínima Inibitória (DMI) da fase vapor

A Dose Mínima Inibitória (DMI) da fase vapor foi determinada conforme o método de Almeida (2017), com modificações. As cepas das bactérias ácido-lácticas (BAL) *W. viridescens* ATCC 12706 e *L. mesenteroides* ATCC 8293 foram adquiridas na forma liofilizada e reidratadas em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), pH 6,5 (Difco™, Detroit, EUA), em seguida foram armazenadas a - 20 °C, em microtubos (volume do microtubo) com caldo MRS contendo 20% (v/v) de glicerol. Para o preparo do pré-inóculo, as BAL foram reativadas, individualmente, em 10 mL de caldo MRS (Difco™, Detroit, EUA) e incubadas a 30 °C, em BOD (TECNAL modelo TE 390), por 18 horas (baseado em estudo prévio do grupo). A partir do inóculo (10⁹ UFC/mL) das BAL, foram preparadas as diluições em série em água peptonada 0,1%, até uma concentração de 10⁴ UFC/mL. Adicionou-se 100 µL de cada suspensão bacteriana em pontos específicos na superfície do Ágar MRS (Difco™, Detroit, EUA) para a determinação visual do crescimento microbiano. Papeis de filtro circulares, com a mesma área da superfície interna da tampa de placa de Petri (aproximadamente 63 cm²) e previamente esterilizados, foram adicionados de 100 µL das concentrações testadas de 0,90 g/mL do óleo essencial e soluções de óleo essencial em DMSO 5% (v/v) de 0,81, 0,73, 0,65, 0,57, 0,40, 0,32, 0,24, 0,16, 0,08 mg/mL. Os papéis de filtro impregnados com as soluções de óleo essencial de *C. blanchetianus* foram colocados na tampa das placas de Petri, que foram fechadas e com suas bordas seladas com parafilme (parafilm M®). Todas as concentrações testadas foram realizadas em duplicata e foram feitos dois controles, sendo um colocando somente o DMSO 5% no papel de filtro estéril e outro controle foi com o uso somente de papel de filtro estéril na tampa da placa de Petri. Posteriormente todas as placas de Petri foram incubadas invertidas na BOD (TECNAL modelo TE390) a 30 °C por 48 horas.

A dose mínima inibitória (DMI) foi definida como a dose mínima de solução de óleo essencial de *C. blanchetianus* em DMSO 5% necessária para inibir completamente o crescimento de bactérias durante 48 horas. Os resultados foram baseados na presença ou ausência de crescimento, sendo avaliados visualmente. Após a determinação do DIM, foi retirado o papel de filtro com solução de óleo essencial de *C. blanchetianus* em DMSO 5% das placas de Petri em que não foi observado crescimento bacteriano aparente, para verificar se, na fase vapor, as soluções de óleo essencial de *C. blanchetianus* em DMSO 5% testadas apresentaram efeito bactericida (sem crescimento após a retirada do papel de filtro) ou bacteriostático (com crescimento após a retirada do papel de filtro). A borda dessas placas de Petri foi selada com Parafilm M® e posteriormente incubadas invertidas na BOD (TECNAL modelo TE 390) 30 °C durante 48 horas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Compostos voláteis

A Tabela 1 mostra a área relativa (AR = área do composto: área total) correspondente à porcentagem dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*, determinada pela técnica de *headspace*. A análise dos compostos voláteis revelou a presença de 27 compostos, sendo 2 majoritários, Eucaliptol (32,94%) e D- α -Pino (29,43%) (Tabela 1). Esses compostos são da classe química dos terpenos (monoterpenos) e caracterizados por possuírem baixa massa molecular (Bakkali, et al, 2008). Segundo Angélico et al. (2011), na análise do óleo essencial das folhas frescas do *C. blanchetianus*, Eucaliptol e D- α -Pino foram encontrados como compostos voláteis do óleo estudado, similares aos resultados obtidos no presente estudo. Normalmente, os compostos majoritários determinam as propriedades biológicas do óleo essencial (Bakkali et al. 2008).

Tabela 1 – Área relativa (AR) correspondente à porcentagem dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* determinada por *headspace*.

Nº	Compostos voláteis	RT*	AR
1	2-Borneno	3,7721	0,0579
2	Biciclo [3.1.0] hex-2-eno, 4-metil-1- (1-metiletil) --	4,0812	3,5903
3	D- α -Pineno	4,2242	29,4331
4	Biciclo[2.2.1]heptano,2,2-dimetil-3-metileno-,(1S)-	4,4874	0,3434
5	β -Felandrene	4,8937	5,271
6	β -Pineno	4,9852	2,6393
7	Biciclo [3.1.0] hex-2-eno, 4-metil-1- (1-metiletil) -	5,1512	8,3497
8	Terpinoleno	5,4144	0,0895
9	B-Pinene	5,483	0,3307
10	3-Carene	5,6204	0,5204
11	o-Cymene	5,9122	3,6221
12	D-Limonene	6,0152	7,1367
13	Eucaliptol	6,0838	32,9493
14	Z-Ocimene	6,3985	0,1623
15	Hidrato de Sabinene <cis->	6,9021	0,4081
16	Terpinoleno	7,4514	0,2213
17	γ -terpineno	7,686	0,4998
18	Álcool fenquílico	8,1151	0,175
19	γ -Terpineno	9,9061	0,3869
20	α -Terpineol	10,278	0,3598
21	Copena	15,9599	0,1308
22	β -Bourbonene	16,2461	0,1043
23	α selineno	16,4978	1,0316
24	Cariofileno	17,2989	1,5178
25	Aromadendreno	17,8825	0,1432
26	1,4,7,-Cicloundecatrieno,1,5,9,9-tetrametil-,Z,Z,Z-	18,3174	0,1715
27	Biciclogermacreno	19,5934	0,3542
Total			100

RT* – Tempo de retenção. Fonte: Autores.

Os monoterpenos constituem 90% dos óleos essenciais. São altamente hidrofóbicos e seus efeitos biológicos estão relacionados com interações com a membrana dos microrganismos. Possuem aplicabilidade diversa, comumente utilizados como componentes de fragrâncias, cosméticos, produtos de limpeza, desinfetantes, aditivos de alimentos e remédios devido aos aromas e possuem relevantes propriedades antimicrobianas (Toscan, 2010). As características dos vapores dos óleos essenciais são determinadas por seus componentes e suas volatilidades relativas, apresentando um impacto no potencial antimicrobiano (Burt, 2004).

Segundo Martins et al. (2019), o eucaliptol constituiu o principal componente do óleo essencial de *Lavandula dentata* L. e a presença desse pode conferir propriedades medicinais ao óleo essencial, devido à ação antifúngica. Através da análise *in silico*, Gomes et al. (2020) observaram o baixo potencial toxicológico do monoterpeno eucaliptol, e que a molécula não apresentou potencial mutagênico e carcinogênico, tornando assim a substância viável para uso terapêutico, de forma eficaz e segura considerando-se os efeitos colaterais no organismo. Ainda Martínez-Pabón et al. (2020) destacaram o composto eucaliptol como um agente com atividade antimicrobiana de amplo espectro, com efeito sobre microrganismos ligados a doenças bucais.

O composto α -pineno é um dos compostos majoritários presente em alguns óleos essenciais, como por exemplo o das folhas de *Libanothamnus neriifolius*, *Psidium guajava* L., com atividade antimicrobiana e destacam-se como fontes promissoras de agentes naturais antimicrobianos (Aparicio-Zambrano et al., 2019; Trindade et al., 2021). Zamyad et al. (2019) sugerem que α -pineno, pelo menos em parte, é responsável pela indução dos efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes do óleo essencial de *Ducrosia anethifolia* em ratos. No estudo do potencial antimicrobiano do α -pineno, foi verificada a ação antibacteriana frente às cepas de *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* (Costa, 2017).

3.2 Dose Mínima Inibitória (DMI) na fase vapor

A Tabela 2 apresenta, de forma qualitativa, o resultado do efeito dos compostos voláteis do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o crescimento de *W. viridescens* e *L. mesenteroides*. A Dose Mínima Inibitória (DMI) para ambos os

microrganismos estudados foi de 0,32 g/mL, ou seja, após 48 horas de incubação a 30 °C, não foi observado crescimento microbiano nas respectivas placas contendo essa concentração de óleo essencial no papel filtro colocado na tampa da placa.

Tabela 2 – Avaliação visual do efeito dos compostos voláteis de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o crescimento de *W. viridescens* e *L. mesenteroides*.

Concentração testada (g/mL)	Cepas	
	<i>W. viridescens</i>	<i>L. mesenteroides</i>
0,90	*	*
0,81	*	*
0,73	*	*
0,65	*	*
0,57	*	*
0,40	*	*
0,32	*	*
0,24	**	**
0,16	**	**
0,08	**	**
Controle	**	**

(*) Sem Crescimento, (**) Crescimento. Fonte: Autores.

Após a determinação da DIM, foram removidos os papéis de filtro das amostras que não apresentaram crescimento microbiano durante as 48 horas de incubação a 30 °C. Em seguida, as placas foram reincubadas nas mesmas condições de tempo e temperatura anteriormente citadas, para avaliação do efeito bacteriostático ou bactericida.

Os compostos voláteis do óleo essencial de *C. blanchetianus* apresentaram efeito bactericida (sem crescimento) para *W. viridescens* na concentração de óleo de 0,32 g/mL (a massa adicionada equivale a 32 mg de óleo por placa de Petri) e com 0,57 g/mL (57 mg por placa de Petri) para *L. mesenteroides*. O efeito bacteriostático foi observado apenas para *L. mesenteroides*, cujo crescimento foi observado no meio utilizando a concentração de 0,40 g/mL, indicando atividade bacteriostática dos compostos voláteis do óleo em estudo contra esta bactéria. Com base nos resultados

obtidos, pode-se afirmar que a bactéria *W. viridescens* mostrou-se mais sensível à ação do óleo essencial de *C. blanchetianus*.

Uma das características que os óleos essenciais apresentam é sua volatilidade (Burt, 2004; Simões, 2011). A hidrofocidade também é um fator importante, de acordo com Ben Arfa et al. (2006) no estudo da atividade antimicrobiana do carvacrol, constataram que a característica hidrofóbica permite o acúmulo de composto na membrana e graças a sua hidrofobicidade apropriada, o carvacrol pode ser acumulado na membrana celular, e induzir uma modificação conformacional na mesma resultando na morte celular microbiana. Desta forma pode-se inferir que os componentes voláteis majoritários do óleo essencial de *C. blanchetianus* foram responsáveis pelo efeito bacteriostático e bactericida apresentado contra as bactérias *W. viridescens* e *L. mesenteroides*.

Avaliando a atividade antimicrobiana do vapor do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (OEO), Paganini (2017) utilizou metodologia semelhante ao presente trabalho. A dose mínima inibitória dos compostos voláteis do OEO observada para *W. viridescens* e *P. fluorescens* foi de 13,8 e 18,4 mg de óleo essencial de orégano por placa de Petri, respectivamente. Avaliando o efeito bacteriostático e bactericida, apenas *P. fluorescens* apresentou efeito bacteriostático e efeito bactericida sobre *W. viridescens*. A BAL estudada também foi mais sensível ao óleo, como no presente estudo. Paganini et al. (2021) aplicou filmes de acetato de celulose (AC) incorporados com OEO para inibir o crescimento de bactérias associadas à deterioração de produtos cárneos (*W. viridescens* (microaerofílica) e *P. fluorescens* (aeróbia)). A atividade antimicrobiana em fase vapor dos filmes contendo OEO foi determinada, mostrando melhor efeito antimicrobiano contra *W. viridescens* do que *P. fluorescens*. A aplicação do filme incorporado com 75 mg de OEO levou a inibição total do crescimento de *W. viridescens*, enquanto para *P. fluorescens* ocorreu apenas a inibição de uma parcela da população bacteriana.

4. Conclusão

A análise dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* por *headspace*, mostrou que os terpenos eucaliptol (32,94%) e D- α -pineno (29,43%) são os compostos majoritários.

Os resultados mostraram relevante atividade antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* contra as duas bactérias estudadas. O efeito bactericida foi observado para uma concentração de óleo de 0,32 g/mL e 0,57 g/mL para *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, respectivamente. O óleo essencial apresentou efeito bacteriostático apenas para *L. mesenteroides* com solução de 0,40 g/mL. Portanto, a bactéria *W. viridescens* se mostrou mais sensível à ação antimicrobiana do óleo.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os compostos voláteis do óleo essencial de *C. blanchetianus* apresentam atividade antimicrobiana contra importantes bactérias responsáveis pela deterioração de produtos cárneos. Pesquisas futuras podem se concentrar na análise da eficácia potencial dos compostos voláteis desse óleo em embalagens ativas para alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Doutorado Institucional (DINTER), ao Instituto Federal do Ceará (IFCE), a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Laboratório Integrado de Engenharia Biológica (Lieb) e a Central de Análise da UFSC.

Referências

Abreu, A. S., Barbosa, P. S., Müller, A. H. & Guilhon, G. S. P. (2001). Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *Glabrior* (Euphorbiaceae). *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*, 1(2), 1-9. <http://www.ufpa.br/revistaic>.

Albuquerque, U. P., Medeiros, P. N., Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Neto, E. M. F., Melo, J. G. & Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 325–354. doi:10.1016/j.jep.2007.08.017

Almeida, P. P. (2017). Desenvolvimento de sistema de embalagem ativo antimicrobiano para pães de forma. *Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)* - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 202p.

Angélico, E. C., Costa, J. G. M., Rodrigues, O. G, Lima, E. Q. & Medeiros, R. S. (2011). Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* (Baill): Resultados preliminares. *Revista da Biologia e Farmácia*, 5(2), 44-49.

Angélico, E. C., Onaldo; G. R., Costa, J. G. M., Lucena, M. F. A., Queiroga Neto, V. & Medeiros, R. S. (2014). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and Croton's varieties modulator in the Brazilian's Northeast Semi-arid. *African Journal of Plant Science*, 8(7), 392-397. doi:10.5897/AJPS2014.1198

Aparicio-Zambrano, R., Rojas-Fermín, L. Velasco, J., Usubillaga, A., Sosa, M. & Rojas, J. (2019). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). *Revista peruana de biología*, 26(1), 95-100. doi:10.15381/rpb.v26i1.15912

Araújo, K. D., Parente, H. N., Éder-Silva, É., Ramalho, C. I., Dantas, R. T., Andrade, L. P. & Silva, D. S. (2010). Levantamento florístico do estrato arbustivo arbóreo em áreas contíguas de Caatinga no Cariri Paraibano. *Revista Caatinga*, 23(1), 63-70, 2010.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.

Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149–154. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

BRASIL. (2019). *Farmacopeia Brasileira*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (6a ed., 874 p). Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Brito, S. S. S., Silva, F., Malheiro, R., Baptista, P. & Pereira, J. A. A. (2018). *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. *Industrial Crops & Products*, 113, 308–315. doi:10.1016/j.indcrop.2018.01.044

Cartaxo, A. L., Souza, M. M. A. & Albuquerque, U. P. (2010). Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 326–342. doi:10.1016/j.jep.2010.07.003

Cavalcanti, J. M., Leal-Cardoso, J. H., Diniz, L. R. L., Portella, V. G., Costa, C. O., Linard, C. F. B. M., Alves, K., Rocha, M. V. A. P., Lima, C. C., Cecatto, V. M. & Coelho-de-Souza, A. N. (2012). The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. *Ethnopharmacol*, 144(2), 240–247. doi:10.1016/j.jep.2012.08.030

Chaves, S. A. M. & Reinhard, K. J. (2003). Palespharmacology and Pollen: Theory, Method and Application, *Memoirs Intitute de Oswaldo Cruz*. 98, (Suppl). 207-211.

Cordeiro, I., Secco, R., Carneiro-Torres, D.S., Lima, L.R., Caruzo, M. B. R., Berry, P., Riina, R., Silva, O. L. M., Silva, M. J. & Sodré, R. C. (2015). *Croton* in Lista de Espécies

da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25478>.

Costa, D. F. N. (2017). Potencial imunomodulador e antimicrobiano do (+)- α -pineno e (+)- β -pineno. *Dissertação* (Mestre em odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 53p.

Ferreira, M. J. G., Dias, F. G. B., Santos, S. M., Menezes, R. C. S., Silva, L. M. R. & Figueiredo, E. A. T. (2020). Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. *Research, Society and Development*, 9(5), 1-14. doi:10.33448/rsd-v9i5.3295

Firmino, N. C. S., Alexandre, F. S. O., Vasconcelos, M. A., Pinheiro, A. A., Arruda, F. V. S., Guedes, M. L. S., Silveira, E. R. & Teixeira, E. H. (2019). Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. *Industrial Crops & Products*, 131, 371–377. doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.062

Fontenelle, R. O. S. (2008). Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophyloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. Isolados de cães. *Tese* (Doutorado no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 163p.

Gomes, L. L., Araújo Neto, A. P., Medeiros, F. L. S., Santana, M. T. P., Santos, T. A., Oliveira, H. M. B. F. & Guênes, G. M. T. (2020). Análise *in silico* da toxicidade do monoterpene eucaliptol. *Research, Society and Development*, 9(5), 1-11. doi: 10.33448/rsd-v9i5.3092

Gottlieb, O. R. & Magalhães, M. T. (1960). *Modified distillation trap*. *Chemist Analyst* (4th ed., p. 49-114), 1960.

ITAL- Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos* (4a ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

López-Gómez, A., Ros-Chumillas, M., Antolinos, V., Buendía-Moreno, L., Navarro-Segura, L., Sánchez-Martínez, M. J., Martínez-Hernández, G. B. & Soto-Jover, S. (2019). Fresh culinary herbs decontamination with essential oil vapours applied under vacuum conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 1-8. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.110942

Martínez-Pabón, M. C. & Ortega-Cuadros, M. (2020). Thymol, menthol and eucalyptol as agents for microbiological control on the cavity. A scoping review. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 49(1), 44-69. doi: 10.15446/rcciquifa.v49n1.87006

Martins, R. P., Gomes, R. A. S., Malpass, A. C. G. & Okura, M. H. (2019). Chemical characterization of *Lavandula dentata* L. essential oils grown in Uberaba-MG. *Ciência Rural*, 49(8), 1-7. doi: 10.1590/0103-8478cr20180964

Melo, G. F. A. (2011). Estudo da composição química e da atividade antibacterina in vitro e em alimentos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill. *Dissertação* (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB, 94p.

Melo, G. F. A., Costa, A. C. V., Garino Jr. F., Medeiros, R. S., Madruga, M. S. & Queiroga Neto, V. (2013). The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1189-1194.

Moura, F. M. L., Baptista, R. I. A. A., Santos, V. V. M., Moura, A. P. B. L. & Costa, M. M. (2013). Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – uma revisão. *Acta Veterinária Brasileira*, 7(2), 125-136.

NIST (National Institute of Standards and Technology). (2011). Mass Spectrometry Data Center. <https://www.nist.gov/system/files/documents/srd/NIST1a11Ver2-0Man.pdf>. <https://chemdata.nist.gov>.

Paganini, C. C. (2017). Ação Antimicrobiana de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano no crescimento de *Weissella viridescens* e *Pseudomonas fluorescens*. *Dissertação* (Mestrado em engenharia de alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 84p.

Paganini, C. C., Laroque, D. A., Carciofi, B. A. M. & Aragão, G. M. F. (2021). Shelf-life extension of meat products by cellulose acetate antimicrobial film incorporated with oregano's essential oil. *Research, Society and Development*, 10(16), 1-12. doi: 10.33448/rsd-v10i16.23335

Paris, M. J., Ramírez-Corona, N., Palou, E. & López-Malo. (2020). Modelling release mechanisms of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil encapsulated in alginate beads during vapor-phase application. *Journal of Food Engineering*, 282, 1-9. doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110024

Pereira, M. A. A. (2016). Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor do óleo essencial *Hesperozygis mirtoides* (St. Hiy ex. Benth.) Epling. *Tese* (Doutorado em farmácia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 96p.

Pereira Jr, L. R., Andrade, A. P., Araújo, K. D., Barbosa, A. S. & Barbosa, F. M. B. (2014). Espécies da Caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. *Floresta e Ambiente*, 21(4), 509–520. doi:10.1590/2179-8087.024212

Pinho-da-Silva, L., Mendes-Maia, P. V., Garcia, T. M. N., Cruz, J. S., Morais, S. M., Coelho-de-Souza, A. N., Lahlou, S. & Leal-Cardoso, J. H. (2010). *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine*, 17, 721–725. doi:10.1016/j.phymed.2010.01.015

Pola, C. C., Medeiros, E. A.A. Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P. & Soares, N. F. F. (2016). Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control

the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 69–78. doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.001

Santos, C. C. (2007). Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Erythroxylum barbatum* O.E. Schulz, *Erythroxylum amplifolium* (Mart) O.E. Schulz (Erythroxylaceae) e *Croton sonderianus* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado em Química orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 306p.

Silva, V. A., Oliveira, C. R. M., Freitas, A. F. R., Costa, M. R. M., Pessoa, H. L. F. & Pereira, M. S. V. (2011). Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária. *Revista de Odontologia da UNESP*, 40(2), 69-72.

Silva, A. B., Oliveira, C. R. F., Matos, C. H. C., Santos, P. É. M. & Lira, C. R. I. M. (2020). Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Nativa, Sinop*, 8(4), 450-455. doi:10.31413/nativa.v8i4.8456

Silva, A. I. B., Sá-Filho, G. F., Oliveira, L. C., Guzen, F. P., Cavalcanti, J. R. L. P. & Cavalcanti, J. S. (2021). Perfil fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do *Croton blanchetianus*. *Revista Brasileira multidisciplinar*, 24(1), 134-142. doi:10.25061/2527-2675/ReBraM/2021.v24i1.1057

Silva, C. M., Silva, C. I., Hrcir, M., Queiroz, R. T. & Fonseca. (2012). *Guia de plantas: visitadas pelas abelhas na Caatinga* (V. L. I.). Fortaleza: Editora Fundação Brasil Cidadão.

Silva-Alves, K. S., Silva, F. W. F., Souza, A. N. C., Albuquerque, A. A. C.; Vale, O. C. & Leal-Cardoso, J. H. (2015). Essential oil of *Croton zehntneri* and its main constituent anethole block excitability of rat peripheral nerve. *Planta Med*, 81(4), 292-297. doi:10.1055/s-0034-1396309

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (2011). *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (6a ed.). Porto Alegre: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Toscan, C. M. (2010). Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. *Dissertação* (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, 84p.

Trindade, J. K. M., Trindade, Í. T. M. Abegg, M. A., Corrêa, G. M., Carmo & D. F. M. (2021). Perfil químico e atividade antimicrobiana do óleo essencial de variedades de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Research, Society and Development*, 10(10), 1-11. doi:10.33448/rsd-v10i10.18794

Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E. & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31, 1-4. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.029

Zamyad, M., Abbasnejad, M. Esmaeili-Mahani, S., Mostafavi, A. & Sheibani, V. (2019). The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. *Arq Neuropsiquiatr*, 77(2), 106-114. doi:10.1590/0004-282X20180147

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus* BAILL

Resumo

O *Croton blanchetianus* Baill presente no bioma Caatinga, e conhecido popularmente como “marmeleiro”. É usado na medicina tradicional na forma de chá, para distúrbios gastrointestinais, dentre outros. Assim como outras espécies do gênero é rica em metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, como por exemplo atividade antimicrobiana. Assim, objetivou-se determinar e comparar a composição química do óleo essencial das folhas frescas e secas, sem e sob armazenamento, a atividade antimicrobiana sobre bactérias deteriorantes ácido-lácticas e patogênicas de interesse em alimentos e a toxicidade do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* (OECB). Os OECB das folhas frescas e secas foram extraídos por hidrodestilação e foi realizada cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (CG/EM). Foi calculado o rendimento do OECB extraído das folhas frescas e secas; e com base nesse resultado as demais análises foram realizadas com OECB extraído das folhas secas, sendo essas as análises da: densidade absoluta, índice de refração, atividade antimicrobiana por difusão em ágar, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), pelo método quantitativo de microdiluição em caldo e a toxicidade, frente aos náuplios *Artemia salina* Leac. O percentual do rendimento do OECB extraído das folhas frescas e secas não diferiu estatisticamente. O OECB proveniente das folhas secas apresentou densidade absoluta de 0,9025 g/mL e o índice de refração 1,4963. Os compostos majoritários OECB, de todos os óleos essenciais estudados foram: eucaliptol, biciclogermacreno, E-cariofileno, α -pineno, espatulenol e sativeno. O OECB apresentou diferentes diâmetros de halos de inibição para as bactérias estudadas, sendo assim classificadas conforme os níveis de sensibilidade em relação ao diâmetro do halo formado. A CMI da *L. monocytogenes* e *S. aureus*, foi 2,26 mg/mL e 1,35 mg/mL, respectivamente. Não foi observado do efeito bactericida para a *L. monocytogenes* e *S. aureus* e atividade antimicrobiana para *E. coli* na faixa das concentrações do OECB estudadas. A CIM do OECB para as bactérias ácido-lácticas (BAL) deteriorantes foi 2,71 mg/mL e 6,77 mg/mL e a CBM foi 6,77 mg/mL e 13,54 mg/mL para *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, respectivamente. Neste estudo foi observado CL₅₀ na concentração de 326 μ g/mL.

Palavras-chave: Rendimento, Concentração inibitória mínima, Concentração bactericida mínima

1. Introdução

O *Croton blanchetianus* Baill é uma espécie representativa da família Euphorbiaceae, apresentando padrão de distribuição agregada nas áreas da Caatinga (Barbosa et al. 2020; Souza et al. 2020), sendo um arbusto típico do sertão, popularmente conhecido como marmeleiro (Silva et al. 2012). Na medicina tradicional, a utilização de várias espécies de *Croton*, a partir de preparações populares como

chás, é amplamente utilizada como agentes de cura e estudos em nível farmacológico, derivados de usos etnobotânicos, destacam sua atividade potencial como anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antimaláricos, antimicrobianos, antiespasmódicos (Salatino et al. 2007; Santos e Pereira, 2020).

O *Croton* apresenta uma grande riqueza de metabólitos secundários, com componentes químicos que possuem uma ampla variedade de atividades biológicas, destacando a produção de terpenos e flavonóides (Coy Barrera et al. 2016). Estudos também relatam a atividade antibiofilme de diterpenos radiculares isolados de *C. blanchetianus* contra estreptococos orais (Firmino et al. 2019). Diversos autores tem relatado o potencial antibacteriano, antifúngico e inseticida do extrato aquoso e do óleo essencial de *C. blanchetianus* (Melo et al. 2013; Silva et al. 2020; Vasconcelos et al. 2021).

Os óleos essenciais apresentam composições químicas diferenciadas conforme as espécies vegetais (Frutuoso et al. 2013). Alguns óleos essenciais têm alta atividade antimicrobiana contra microrganismos deteriorantes e patogênicos e são inúmeras as possibilidades de inserção desses constituintes em produtos alimentícios, visando aumentar a vida útil dos mesmos, bem como permitir ampliar as formas de se estabelecer a segurança dos alimentos (Frutuoso et al. 2013; Ootani et al. 2013; Khorsandi et al. 2018). Há interesse nas indústrias de alimentos em pesquisa de óleos essenciais como conservantes de alimentos devido aos compostos antimicrobianos (Nascimento et al. 2020).

O teste toxicológico mostrou que o extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* foi seguro em ratos através de administração oral, mas produziu efeitos colaterais quando administrado de forma intraperitoneal (Freitas et al. 2020). Cavalcanti et al. (2020), em revisão sobre o gênero *Croton*, descreve diversas espécies correlacionadas com atividades biológicas, algumas com fins terapêuticos e evidenciaram que as variantes *Croton heliotropiifolius*, *Croton sonderianus* (Sinonímia: *C. blanchetianus* Govaert et al. 2000) e *Croton grewioides* constituem uma grande fonte de metabólitos bioativos que podem converter-se em protótipos de novos medicamentos de custo acessível devido ao uso de um recurso natural, como matéria-prima. No entanto esses autores observaram na literatura que as espécies estudadas possuem toxicidade moderada à grave, o que as tornam potencialmente perigosas se utilizadas indiscriminadamente.

Tem sido realizados estudos sobre a toxicidade do extrato das folhas de *C.*

blanchetianus (Lima et al. 2021; Freitas et al. 2020; Figueiredo et al. 2022), no entanto, a literatura consultada sobre a toxicidade do óleo essencial do *C. blanchetianus* é escassa. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar e comparar a composição química do óleo essencial das folhas frescas e secas, sem e sob armazenamento, a atividade antimicrobiana sobre bactérias deteriorantes ácido-lácticas e patogênicas de interesse em alimentos e a toxicidade do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*.

2. Material e métodos

2.1 Extração do óleo essencial

As folhas de *C. blanchetianus* foram coletadas, de cinco árvores, entre as coordenadas geográficas latitude 05°10825' S e longitude 38°00717' W, marcadas com lacres de cores diferentes. A coleta foi feita no período chuvoso, turno da manhã, na Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão (UEPE) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Limoeiro do Norte, localizada na região semiárida do Ceará, Brasil, cadastro no SisGen AC5ED78. Uma amostra foi coletada para a identificação e posterior realização da exsiccata e depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC) (# 62200).

As folhas frescas foram submetidas ao processo de extração do óleo essencial, imediatamente após coleta das folhas no campo. Uma parte das folhas foram secas de forma natural, expostas à temperatura ambiente (31 ± 5 °C), até aproximadamente 9 % de umidade e posteriormente realizada a extração do óleo essencial (FS1), sendo que uma quantidade das folhas secas foi posteriormente acondicionada em sacos plásticos, ao abrigo da luz e armazenados por 8 meses, para posterior processo de extração do óleo essencial (FS2). A determinação da umidade foi feita segundo o procedimento recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O processo de extração do óleo essencial, de todas as amostras das folhas, foi realizado por meio da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado (Gottlieb e Magalhães, 1960), acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L e uma manta térmica como fonte geradora de calor, conforme recomendado na Farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019). Para cada processo de extração, foram pesados 300 g da amostra, adicionada 2,5 L de água destilada e, submetidos a uma temperatura de

extração 100 °C, durante 2 horas, contados do momento da condensação da primeira gota de óleo. Após a extração, o óleo foi coletado e adicionado de, aproximadamente, 5 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção da água residual. A separação do óleo essencial foi feita como auxílio de uma pipeta de Pasteur, que removeu apenas a fase oleosa. O óleo coletado foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração até a realização das análises.

O estudo da composição química foi realizado com o óleo essencial das folhas frescas e comparado com o resultado do óleo essencial das folhas secas, apresentados em Vasconcelos et al (2022) (submetido). As demais análises foram realizadas com o óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*, que não foram submetidas ao processo de armazenamento.

2.2 Rendimento do óleo essencial

O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do óleo essencial obtido (considerando a densidade, item 2.3.1) com a massa vegetal das folhas utilizadas na extração (m/m) e o resultado foi expresso em porcentagem (Santos et al. 2004). O cálculo da massa vegetal foi feito com base na matéria seca das folhas. O ensaio para a determinação dos rendimentos do óleo essencial foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela ANOVA e as comparações de médias foram realizadas utilizando o teste de Tukey a 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional SISVAR (Ferreira, 2014).

2.3 Caracterização físico-químicas do óleo essencial

2.3.1 Determinação da densidade absoluta

A densidade absoluta do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* foi determinada com um balão volumétrico de 5 mL, previamente seco, tarado e aferido. Em seguida encheu-se o mesmo com óleo essencial a 25 °C e procedeu-se a pesagem, segundo metodologia Farmacopeia Brasileira, com adaptação (BRASIL, 2019). O resultado foi expresso em g/mL.

2.3.2 Determinação do índice de refração

A determinação dos índices de refração (nD) do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* foi realizada em refratômetro de ABBE (Marca Optronic), que trabalha numa faixa de índice de 1,300 < nD < 1,700. Para a calibração do aparelho, foi utilizada água destilada, apresentando assim um índice de refração de 1,3340 a 27 °C e corrigido à temperatura de 20 °C (AOAC, 2000), segundo metodologia do IAL (2008).

2.4 Análise da composição química

Foi realizado um estudo comparativo da composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas (FF) e secas (FS1 e FS2) de *C. blanchetianus*. As análises cromatográficas do óleo essencial de *C. blanchetianus* foram realizadas na Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA, CE) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

As análises de GC-MS foram realizadas no cromatógrafo CG-7890B/MSD-5977A Agilent equipado com uma coluna de metilpolissiloxano HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), usando impacto de elétrons a 70 eV, gás carreador de hélio em um fluxo de 1,00 mL/min (8,8 psi) e velocidade linear constante de 36,8 cm/s, temperatura de entrada de 250°C, temperatura do detector de 150°C e temperatura da linha de transferência de 280°C. O forno cromatográfico foi ajustado para uma temperatura inicial de 70°C, com rampa de aquecimento de 4°C/min a 180°C e incremento de 10°C/min a 250°C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada analisando os padrões de fragmentação apresentados nos espectros de massa com os presentes na base de dados fornecida pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos) e a partir de dados da literatura.

2.5 Atividade antimicrobiana das bactérias patogênicas por difusão em ágar

A atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial das folhas frescas e secas de *C. blanchetianus* foi determinada sobre as linhagens de referência de *Staphylococcus aureus* ATCC-27664, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Listeria monocytogenes* ATCC-19115 e *Salmonella* Enteritidis IAL-1132. Os microrganismos

foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos – LMA da Universidade Federal do Ceará.

A susceptibilidade bacteriana foi avaliada através do método qualitativo de difusão em ágar, técnica de poços, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institut* (CLSI, 2017) e Machado et al. (2012), com modificações. Foram utilizadas nos experimentos 50 µL das concentrações de 902,5, 680,0, 450,0 e 220,0 mg/mL, o que corresponde a 100%, 75%, 50% e 25% (v/v), respectivamente, do óleo essencial extraído das folhas frescas e secas de *C. blanchetianus*. Para o preparo das soluções diluídas do óleo essencial foi usado tween 80 a 1% (v/v). As cepas estoques de *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis*, armazenadas sob refrigeração (em torno 8 °C) em tubos Falcon inclinados, com o Ágar Triptona de Soja (TSA) (Difco™, Sparks, EUA), foram transferidas para placas com o ágar TSA (Difco™, Sparks, EUA) e cultivadas. Para a cepa *L. monocytogenes*, o Ágar Triptona de Soja (TSA) (Difco™, Sparks, EUA) foi enriquecido com 0,1% extrato de levedura – TSA+YE (Difco™, Detroit, EUA). Todas as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). Ao término do período de incubação, colônias isoladas de cada microrganismo foram transferidas para tubos contendo 5 mL do caldo triptona de soja – TSB (Difco, Sparks, EUA) e incubadas a 35 °C por 24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) para a obtenção de uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, para cada microrganismo, a qual foi utilizada para os ensaios da avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana. Cada microrganismo patogênico do estudo foi semeado na superfície do ágar Mueller-Hinton (OXOID, Basingstoke, England) com o uso de *swab* estéril. Após um período de 10 minutos, foram feitos poços no meio de cultura, num total de 8 poços, com 6 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, onde foram colocadas alíquotas de 50 µL em cada poço de óleo essencial concentrado e das soluções diluídas de óleo essencial. As placas contendo os microrganismos patogênicos foram incubadas na BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) a 35 °C por 24 horas. A leitura das placas foi analisada quantitativamente medindo o halo de inibição de crescimento ao redor do poço, sendo considerado resultado positivo o diâmetro de, no mínimo, 9 mm (SMÂNIA et al., 1995) ou seja, indicativo de sensibilidade bacteriana ao óleo essencial. Como controle positivo, foi utilizado antibiótico benzetacil® (benzilpenicilina

benzatina, 300.000 U/mL) da Eurofarma e controle negativo o tween 80. O experimento foi realizado em triplicata.

2.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

2.6.1 Cepas bacterianas

A atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial das folhas secas (FS1) de *C. blanchetianus* foi avaliada sobre as cepas das bactérias patogênicas descrita no item 2.5 e as cepas das bactérias deteriorantes, ácido-lácticas (BAL) *Weissella viridescens* ATCC 12706 e *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.

2.6.2 Preparo do inóculo

As cepas estoques de *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis*, armazenadas sob refrigeração (em torno 8 °C) em tubos Falcon inclinados, com o Ágar Triptona de Soja (TSA) (Difco™, Sparks, EUA), foram transferidas para placas com o ágar TSA (Difco™, Sparks, EUA) e cultivadas. Para a cepa *L. monocytogenes*, o Ágar Triptona de Soja (TSA) (Difco™, Sparks, EUA) foi enriquecido com 0,1% extrato de levedura – TSA+YE (Difco™, Detroit, EUA). Todas as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). Ao término do período de incubação, colônias isoladas de cada microrganismo foram transferidas para tubos contendo 5 mL do caldo triptona de soja – TSB (Difco™, Sparks, EUA) e incubadas a 35 °C por 24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) para a obtenção de uma concentração bacteriana final de, aproximadamente, 10⁸ UFC/mL para cada microrganismo. Por meio de estudos anteriores através do plaqueamento foram determinadas as concentrações do inóculo, que foram ajustadas fazendo-se diluições seriadas a fim de obter uma suspensão bacteriana de 10⁵ UFC/mL, que foi utilizada para os ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana.

As cepas das BAL *W. viridescens* e *L. mesenteroides* liofilizadas foram reidratadas em caldo baseado nas formulações de De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) em pH 6,5 (Difco™, Detroit, EUA). Em seguida, foram armazenadas em microtubos com caldo MRS contendo 20% (v/v) de glicerol a -20 °C. Para o preparo do pré-

inóculo, as BAL foram reativadas, individualmente, em 10 mL de caldo MRS (Difco™, Detroit, EUA) e incubadas a 30 °C em BOD (TECNAL modelo TE 390) por 18 horas. Ao término do período de incubação, foram realizadas diluições em tubo de ensaio com 9 mL de caldo MRS (Difco™, Detroit, EUA), até a diluição 10⁵ UFC/mL que foi utilizada para os ensaios da atividade antimicrobiana.

2.6.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CIM e CBM do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* foi realizada pelo método da microdiluição. As soluções de óleo essencial foram preparadas na faixa das concentrações de 0,45 a 13,54 mg/mL usando solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v), de forma que a porcentagem de DMSO no ensaio final em cada poço da microplaca não excedeu 5%. Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionadas 100 µL das diluições do óleo essencial de *C. blanchetianus* e, em seguida, foram adicionadas alíquotas de 100 µL do inóculo a 10⁵ UFC/mL, em caldo TSB (Difco™, Sparks EUA) e caldo MRS (Difco™, Detroit, EUA) para as bactérias patogênicas e BAL respectivamente, contabilizando assim o volume final de 200 µL em cada poço. Ao término das distribuições dos tratamentos, a microplaca com as bactérias patogênicas foi incubada a 35,0 ± 1,0 °C em leitor de absorvância (Elx 808, Instruments BioTek Inc. Winooski, VT, EUA) e com as bactérias BAL foi incubada a 30,0 ± 1,0 °C em um leitor multifuncional (TECAN ECHISTO INFINITE M200 PRO) por 24 h. O crescimento celular foi determinado pela leitura da densidade óptica inicial (DO) a 630nm para as bactérias patogênicas e DO a 600nm para as bactérias BAL a partir do tempo zero (t₀) a cada 2 horas por um período de 24 horas (t₂₄) de incubação. Os resultados foram obtidos pela diferença das leituras de absorvância (t₂₄ – t₀), sendo consideradas como CIM as menores concentrações em que a solução de óleo essencial inibiu o crescimento dos microrganismos definidos com a leitura a DO, com diferenças de leituras inibitórias ≤ 0,05 (Branen e Davidson, 2004; Brandt et al. 2010). Todos os experimentos nas diferentes concentrações foram realizados em triplicata. O controle positivo consistiu em 100 µL do inóculo em caldo TSB para as bactérias patogênicas e caldo MRS para as BAL, a fim de verificar a viabilidade dos microrganismos em estudo, e o controle negativo foi elaborado com diferentes concentrações da solução de óleo essencial testadas adicionada de caldo TSB e MRS

para bactérias patogênicas e BAL, respectivamente, a fim de verificar a inocuidade de cada solução.

Para determinação da CBM, uma alíquota de 100 µL de cada poço, cuja concentração das soluções de óleo essencial indicava atividade antimicrobiana ($(t_{24} - t_0) \leq 0,05$), ou seja, inibição, foi espalhada na superfície de uma placa contendo meio Ágar Triptona de Soja - TSA (Difco™, Sparks, EUA) para as bactérias patogênicas e meio Ágar MRS (Difco™, Detroit, EUA) para as BAL, utilizando o método de plaqueamento *spread plate*. Em seguida, as placas com as bactérias patogênicas foram incubadas a $35,0 \pm 1,0$ °C por 24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) e $30,0 \pm 1,0$ °C por 48 horas em BOD (TECNAL modelo TE 390) as BAL. Após o período de incubação, as CBM foram identificadas como as menores concentrações das soluções de óleo essencial testadas que reduziram em três ciclos logarítmicos ($3,0 \log_{10}$ UFC/mL) as contagens bacterianas a partir da concentração do inóculo inicial ou aquelas que apresentaram a ausência de crescimento microbiano (Branen e Davidson, 2004; Brandt et al. 2010).

2.7 Avaliação da toxicidade do óleo essencial frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* sobre *Artemia salina* foi realizado através da metodologia de Meyer et al. (1982) com adaptações, preparando-se uma solução salina em água destilada, com os seguintes componentes: NaCl (15,15 g/L), MgCl₂.6H₂O (3,13 g/L), MgSO₄.7H₂O (3,87 g/L), CaCl₂.2H₂O (9,88 g/L) KCl (0,41 g/L) e NaHCO₃ (0,11 g/L). O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0 por meio de solução de NaOH 0,1 M. Esta solução foi utilizada para eclosão dos cistos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os cistos foram colocados para eclodir na solução salina por 24 a 48 horas, sob iluminação artificial de 100 watts, com aeração constante e temperatura em torno de 25 °C. Após a eclosão dos cistos, foram transferidas 10 larvas de *A. salina* para frascos contendo a solução de óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* em DMSO 5%, nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/ML. Foram feitos dois controles, um com solução de DMSO 5% e outro com solução salina. Após 24 horas, foi realizada a contagem dos náuplios vivos e mortos e calculada a CL₅₀ (concentração letal para 50% da população em 24 h) de acordo com o método PROBIT, através de *software* Statistica 10 com 95% de

confiança. As soluções de óleo essencial foram classificadas como tóxicas quando foram observados valores de CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração testada e para o controle. A porcentagem de sobreviventes de *A. salina* frente às soluções do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* nas concentrações de 10, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ foi representada pela equação que correlaciona a concentração do óleo essencial e a porcentagem de *A. salina* sobreviventes.

3. Resultados e discussões

3.1 Caracterização físico-química e rendimento do óleo essencial

O óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* apresentou como parâmetros físico-químicos a densidade absoluta de 0,9025 g/mL e o índice de refração 1,4963.

O percentual do rendimento do óleo essencial extraído das folhas de *C. blanchetianus* após 2 horas de extração foi $0,82 \pm 0,13$ % (m/m) e $0,96 \pm 0,18$ % (m/m) para as folhas frescas e secas, respectivamente, não diferindo estatisticamente. O fato do rendimento de extração do óleo de folhas frescas e secas ser próximo é um resultado vantajoso, uma vez que a extração do óleo essencial a partir das folhas secas pode ser mais viável, considerando a logística de ida ao campo para coleta do material vegetal e, logo em seguida, ter que proceder toda a extração do óleo essencial do material coletado para assim obter o óleo essencial das folhas frescas.

Angélico et al. (2011) observaram um rendimento de 0,72% (p/v) para o óleo essencial das folhas frescas de *C. blanchetianus*, extraído por hidrodestilação. Melo (2011), extraíndo óleo essencial das folhas fresca de *C. blanchetianus*, por hidrodestilação, obteve um rendimento de 0,7% (v/v). A literatura reporta que os rendimentos dos óleos essenciais extraídos de diversas espécies de *Croton* varia de 0,05 a 3,15% (Fernandes, 2016).

3.2 Composição química do óleo essencial

Na análise da composição química do óleo essencial extraído das folhas frescas (FF), das folhas secas que não foram armazenadas (FS1) e das folhas secas que foram armazenadas por 8 meses (FS2) de *C. blanchetianus*, foi possível identificar

cerca de 30 constituintes, correspondendo a 89,29, 92,86 e 93,52 % dos compostos do óleo essencial das FF, FS1 e FS2, respectivamente (Tabela 1). Os compostos majoritários foram: eucaliptol (FF – 14,30%, FS1 – 17,74%, FS2 – 16,16%), biciclogermacreno (FF – 13,04%, FS – 13,66%, FS2 – 10,15%), *E*-cariofileno (FF – 11,13%, FS – 10,79%, FS2 – 8,89%), α -pineno (FF – 9,32%, FS – 9,84%, FS2 – 8,44%), espatulenol (FF – 9,99%, FS – 6,21%, FS2 – 9,92%) e sativeno (FF – 5,16%, FS – 5,33%, FS2 – 6,41%). Portanto a composição química do óleo essencial extraído das FF, FS1 e FS2 não apresentaram grandes variações. Alguns compostos minoritários não aparecem em todos os óleos essenciais analisados. Os cromatogramas das FF e FS1 estão apresentados na Figura 1 (APENDICE A).

Tabela 1 – Comparação da composição química do óleo essencial das folhas frescas (FF), folhas secas, sem armazenamento (FS1) e das folhas secas, extraído o óleo essencial de *C. blanchetianus* após armazenamento de 8 meses (FS2).
(continua)

N	Componentes	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Área (%) ^c		
				FF ^c	FS1 ^{c*}	FS2 ^{c*}
1	α-Thujeno	924	928	0,56	1,06	0,94
2	α-Pineno	930	936	9,32	9,84	8,44
3	Canfeno	946	950	0,10	0,10	-
4	Sabineno	971	973	0,85	1,46	1,00
5	β-Pineno	974	978	1,20	1,28	0,92
6	Mirceno	990	989	2,37	2,96	2,74
7	Pseudolimoneno	1006	1004	0,44	0,52	-
8	δ-3-Careno	1010	1011	0,72	0,69	-
9	Eucaliptol	1027	1032	14,30	17,74	16,16
10	Terpinoleno	1094	1087	-	0,43	-
11	δ-Elemeno	1333	1337	0,24	0,23	-
12	α-Cubebeno	1346	1351	0,10	0,06	-
13	Ciclosativeno	1361	1368	0,25	0,22	-
14	α-Copaeno	1371	1376	0,70	0,67	0,79
15	β-Bourboneno	1380	1384	0,87	0,64	1,35
16	Sativeno	1387	1391	5,16	5,33	6,41
17	E-Cariofileno	1413	1420	11,13	10,79	8,89
18	β-Copaeno	1424	1433	0,68	0,57	0,80
19	Aromadendreno	1433	1441	1,53	1,36	2,14
20	α-Humuleno	1448	1453	2,41	2,27	1,77
21	allo-Aromadendreno	1455	1460	1,05	0,98	1,12
22	cis-Cadina-1(6),4-diene	1459	1463	0,30	0,32	-
23	γ-Muuroleno	1476	1476	3,20	3,54	-
24	β-Selineno	1481	1486	0,85	1,16	-
25	Biciclogermacreno	1490	1494	13,04	13,66	10,15
26	Isodauceno	1500	1500	0,54	0,64	-

Tabela 1 – Comparação da composição química do óleo essencial das folhas frescas (FF), folhas secas, sem armazenamento (FS1) e das folhas secas, extraído o óleo essencial de *C. blanchetianus* após armazenamento de 8 meses (FS2).
(conclusão)

N	Componentes	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Área (%) ^c		
				FF ^c	FS1 ^{c*}	FS2 ^{c*}
27	γ-Cadineno	1509	1513	0,46	0,51	1,29
28	Cubebol	1513	1515	0,70	0,54	-
29	δ-Cadineno	1518	1523	1,38	1,36	1,68
30	Germacreno B	1551	1551	1,20	1,64	0,88
31	Espatuleno	1572	1576	9,99	6,21	9,92
32	Óxido de cariofileno	1577	1580	2,55	3,26	3,74
33	Viridiflorol	1598	1591	1,10	0,82	-
34	p-Cimeno	1029	1024	-	-	1,46
35	Limoneno	1033	1029	-	-	3,39
36	α-Terpineol	1192	1188	-	-	1,03
37	γ -Terpineno	1063	1059	-	-	0,53
38	Terpinen-4-ol	1181	1177	-	-	0,84
39	γ -Muuroleno	1483	1476	-	-	3,68
40	Mirtenol	1198	1195	-	-	0,62
41	α-Cadinol	1656	1654	-	-	0,84
Total				89,29	92,86	93,52

^aIR: Índice de Retenção obtido em coluna HP-5 MS; ^bIRlit: Dados da literatura (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011); ^cÁreas relativas determinadas em CG-EM.

FS1* – folha seca 1 – óleo essencial extraída de folhas seca não armazenadas. FS2* – folha seca 2 – óleo essencial extraído das folhas secas armazenadas por 8 meses.

Angélico et al. (2011) identificaram 14 constituintes químicos do óleo essencial das folhas frescas de *C. blanchetianus*, correspondendo a 79,4% do total, nos quais os compostos majoritários foram cedrol (28,4%), eucaliptol (17,4%) e α-pineno (10,5%). Estudando os componentes químicos da espécie *C. blanchetianus*, Melo (2011) identificou 14 compostos químicos a partir do óleo essencial das folhas frescas de *C. blanchetianus*, entretanto os majoritários: limoneno (25,70%), α-pineno (16,32%) e biciclogermacreno (13,00%). Outros autores encontraram os compostos biciclogermacreno (16,29%), β-phellandrene (15,42%) e β-cariofileno (13,82%) como

os principais constituintes do óleo essencial da mesma espécie (Pinho-da-Silva et al. 2010). A composição química do óleo essencial de outras espécies de *Croton* foi analisada por outros autores e mostraram ter os constituintes majoritários semelhantes aos dos óleos essenciais de *C. blanchetianus* do presente estudo. Desta forma, Torres et al. (2021) identificaram os compostos majoritários biciclogermacreno (19,04%), *E*-cariofileno (18,51%), limoneno (15,65%) e α -pineno (13,24%) na composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth. O óleo essencial das folhas secas *Croton argyrophyllus* Kunth é constituído principalmente por biciclogermacreno (14,0%), β -pineno (8,9%), espathulenol (8,7%) e cariofileno (7,6%) (Brito et al. 2018). Quantidade similares do composto biciclogermacreno foi observado no presente estudo para o óleo essencial das folhas frescas (FF – 13,04%) e secas (FS – 13,66%) do *C. blanchetianus*. No óleo essencial de *C. heliotropiifolius*, os compostos cariofileno (12,1%) e biciclogermacreno (10,3%) apresentaram teores similares aos verificados neste estudo (Brito et al. 2018). Das partes aéreas, caule e folhas frescas, o *E*-cariofileno ($23,85 \pm 0,36\%$) foi o componente majoritário que Araújo et al. (2017) obtiveram na extração do óleo essencial de *C. heliotropiifolius*, o qual está presente nos compostos majoritários do óleo essencial do *C. blanchetianus* apresentados nesse estudo. O óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas frescas do *Croton adenocalyx* Baill apresentou como principais constituintes: α -pineno (32,63%); bicyclogermacrene (13,96%); trans-cariofileno (10,23%); germacrene D (10,14%); β -pineno (10,11%) e β -elemene (8,31%) (Lima et al. 2010), sendo que alguns desses também estavam presentes no *C. blanchetianus*, como observados neste estudo. A literatura reporta ação antimicrobiana dos compostos majoritários identificados no óleo essencial das folhas frescas e secas do *C. blanchetianus* (Chaibub et al. 2013; Pires et al. 2013; Barbosa, 2021). Sendo um dos mecanismo de ação descrito, por exemplo do α -Pineno isolado, a destruição da integridade celular (Bakkali et al. 2008; Silva et al. 2012; Mora et al. 2015).

Em geral, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a literatura das espécies de *Croton*. No entanto, para cada espécie, a composição química dos óleos essenciais pode variar, sendo que essas diferenças observadas podem ser atribuídas a vários fatores, como a origem geográfica das plantas, características do solo e condições climáticas, época de coleta de amostras, dentre outros (Sangwan et al. 2001; Morais et al. 2009; Alencar Filho et al. 2017). Segundo

Ribeiro et al. (2018) a composição química dos óleos essenciais de *C. blanchetianus*, *Croton nepetifolius* Baill e *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm sofreram influências do ciclo circadiano e da sazonalidade, constatando-se variação na percentagem dos constituintes em horário e estação específicos, podendo até mesmo estarem ausentes. Ainda, conforme os autores, o espatulenol é um dos constituintes majoritários presente no *C. blanchetianus* em coletas realizadas no turno da manhã.

Variações no perfil químico podem afetar a bioatividade dos óleos essenciais (Khorsandi et al. 2018). De acordo com Bhavaniramy et al. (2019) vários tipos de óleos essenciais e seus componentes individuais são usados como compostos antimicrobianos naturais, a fim de reduzir o impacto das atividades microbianas em produtos alimentícios. Porto et al. (2021) o *C. blanchetianus* provou ser uma fonte viável para a obtenção de substâncias com potencial efeito antifúngico, como α -pineno.

3.3 Atividade antimicrobiana por difusão em ágar

Os resultados mostraram que o óleo essencial das folhas frescas apresentou ação inibitória contra *S. aureus*, em todas as concentrações de óleo essencial testadas, com formação de halo de inibição de no mínimo 9 mm para todas as concentrações de óleo essencial. No caso do óleo essencial proveniente de folhas secas, apenas as concentrações acima de 450 mg/mL apresentaram atividade antimicrobiana para a referida bactéria. Todas as concentrações de óleo essencial testadas, provenientes de ambas as folhas de *C. blanchetianus*, apresentaram efeito antimicrobiana para *L. monocytogenes*. O óleo essencial das folhas frescas nas concentrações de 902,5 e 680 mg/mL e para todas as concentrações de óleo essencial das folhas secas testadas mostraram efeito antimicrobiano para a *E. coli*. As soluções de óleo essencial das folhas frescas mostraram ausência de atividade antimicrobiana para *S. Enteritidis* em todas as concentrações de óleo essencial avaliadas e uma atividade antimicrobiana nas concentrações de 680 e 450 mg/mL do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*.

Como não há uma norma de regulação oficial que relacione o diâmetro padrão de halo para indicar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais como os usados para antimicrobianos convencionais, que relacionam o diâmetro do halo de inibição à

sensibilidade da amostra bacteriana e as categorizam em ausência ou diferentes graus de sensibilidade; alguns autores reportam a relação entre a formação de halos e o efeito da amostra sobre o crescimento dos microrganismos. Assim, Alves (2000) propôs uma classificação da ação para os extratos, na qual considera como inativo aquele produz um halo menor que 9 mm; enquanto que resultados de 9 a 12 mm indicam extratos ativos, e finalmente halos de 13 a 18 mm, ou maiores, correspondem a extratos muito ativos. Puškárová et al. (2017) reportam que óleos essenciais com atividade antimicrobiana geram halos de inibição de crescimento de 8-14 mm.

Portanto, com base no halo de inibição formados nesse estudo, pelas ações das diferentes concentrações do óleo essencial (902,5, 680, 450 e 220 mg/mL) de *C. blanchetianus* frente bactérias patogênicas estudadas *in vitro*, podemos classificar as mesmas em níveis de sensibilidades, ou seja, quanto maior o halo, maior a sensibilidade da bactéria a óleo essencial de *C. blanchetianus* (Tabela 2).

Tabela 2 – Diâmetros dos halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de *C. blanchetianus* frente as bactérias patogênicas estudadas.

Diâmetro do halo de inibição(mm)	Níveis de sensibilidade
≤ 8	não sensível
9 – 14	sensível
15 -19	muito sensível
≥ 20	extremamente sensível

Fonte: Elaborada pela autora.

Desta forma, a bactéria *S. aureus* é classificada como muito sensível (902,5 mg/mL), e sensível (680 mg/mL, 450 mg/mL, 220 mg/mL), a depender da concentração do óleo essencial de *C. blanchetianus*, extraído de ambas as folhas, com exceção da menor concentração estudada (220 mg/mL), do óleo essencial das folhas secas, a qual não foi verificada atividade antimicrobiana; *L. monocytogenes* muito sensível e extremamente sensível, sob a ação do óleo essencial das folhas frescas e secas, respectivamente; *E. coli* sensível para os óleos essenciais de ambas as folhas e *S. Enteritidis* não sensível sob a ação do óleo essencial das folhas frescas e apresentou sensibilidade, em concentração igual ou acima de 450 mg/mL ao óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*.

De modo geral, o óleo essencial extraído das folhas secas de *C. blanchetianus* apresentou halos de inibição maiores, refletindo assim uma maior atividade antimicrobiana desse do que o óleo extraído das folhas frescas.

Melo (2011) por meio do teste de difusão de disco em ágar para a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas frescas de *C. blanchetianus*, observou que este apresentou um grau variável de atividade antimicrobiana contra as Gram-positivas (*L. Monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*E. Coli* e *S. Enteritidis*) com halos de inibição variando de 10 – 12 mm para *S. Enteritidis*, até ausência de atividade inibitória para *E. Coli*. 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 a 24,0 mg/mL, não produziram halos de inibição em nenhuma das concentrações testadas frente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* (Fernandes, 2016).

A variação na atividade antimicrobiana do óleo essencial, que ocorre de acordo com sua concentração e tipo de bactéria testada, pode ser atribuída a alteração na penetração dos componentes presentes no óleo essencial através da parede celular e estrutura da membrana celular dos microrganismos (Cox et al. 2000).

As bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *L. monocytogenes* são menos resistentes ao óleo essencial de *C. blanchetianus*, quando comparadas com as bactérias Gram-negativas *E. coli*, *S. Enteritidis*, já que, para essas últimas, em algumas concentrações de óleo essencial testadas, não foi observada atividade antimicrobiana.

De acordo com Calo et al. (2015) muitos óleos essenciais exibem atividade contra microrganismos deteriorantes e patogênicos *in vitro* e, em menor grau, em alimentos e organismos Gram-positivos parecem ser muito mais suscetíveis aos óleos essenciais do que aos organismos Gram-negativos. Pombo et al. (2018) concluíram que as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) foram mais susceptíveis aos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (cravo) e *Origanum vulgare* (orégano) comparadas às Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*). A estrutura celular de bactérias Gram-positivas é menos complexa, enquanto que as Gram-negativas possuem uma dupla camada constituída por uma membrana externa com lipopolissacarídeos e proteínas que envolvem a parede celular, e uma camada interna de lipopolissacarídeos que lhes conferem uma barreira

de permeabilidade às substâncias, sobretudo substâncias de caráter hidrofílico (Simonetti et al. 2016).

Em trabalhos realizados com o óleo essencial de *C. blanchetianus* foram identificados diterpenos na sua constituição química, os quais exibem atividade antimicrobiana (Firmino et al. 2019). A correlação entre a composição química e as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais revelaram a significativa contribuição positiva de alguns compostos químicos, como fenóis, aldeídos, terpenos, cetonas, ácidos e ésteres (Machado et al. 2011). Além disso, o efeito antimicrobiano dos componentes de óleos essenciais selecionados variou dependendo do tipo de microrganismos, por exemplo, o efeito antimicrobiano dos fenóis foi mais forte contra *E. Coli* e *S. enterica*, enquanto o efeito dos aldeídos foi mais significativo contra *Listeria innocua* (Bagheri et al. 2020).

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Na avaliação da concentração inibitória mínima (CMI) do OECB, através do método quantitativo de microdiluição em caldo para as bactérias Gram-positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus*, verificou-se que o óleo essencial das folhas secas (FS1) de *C. blanchetianus* apresentou CIM com 2,26 mg/mL e 1,35 mg/mL, respectivamente, e apresentou ausência CBM, dentro da faixa das concentrações estudadas para as referidas bactérias. Não foi observado efeito antimicrobiano do óleo essencial nas concentrações estudadas frente a *S. Enteritidis* e *E. coli*, sendo esse resultado similar ao encontrado para as Gram negativas, *S. choleraesuis* e *E. coli*, sobre a ação do óleo essencial de folhas de *C. heliotropiifolius*, coletadas em Amargosa Bahia, Brasil (Araújo et al. 2017).

No presente estudo foi observado ausência do efeito bactericida para a *L. monocytogenes* e *S. aureus* na faixa das concentrações do óleo essencial estudadas. A literatura relata diversos estudos da atividade antimicrobiana com várias espécies de *Croton*. A CIM do óleo essencial de *C. blanchetianus*, tendo como compostos majoritários: cedrol (28.4%), eucaliptol (17, 4%) e α -pineno (10.5%), para *S. aureus* foi de 64 mg/mL (Angélico et al. 2014). Araújo et al. (2017), estudando o efeito antibacteriano do óleo essencial das folhas de *C. heliotropiifolius*, (compostos majoritários: (E)- cariofileno, γ - muurolene e viridifloreno) observaram efeito

bacteriostático no óleo avaliado para bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis*, com valores de CIM de 0,5 mg/mL e 0,0625 mg/mL, respectivamente, e ausência do efeito bactericida nas concentrações estudadas.

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais estão associadas à composição química, à proporção dos compostos, além do efeito sinérgico entre os componentes (Mutlu-Ingok et al. 2020; Veloso et al. 2020). De acordo com Cavalcanti et al. (2020) o gênero *Croton* apresenta diversas espécies correlacionadas com atividades biológicas, algumas com fins terapêuticos promissores abrangendo diferentes áreas.

A CIM do óleo essencial de *C. blanchetianus* para as bactérias ácido-lácticas (BAL) foi 2,71 mg/mL e 6,77 mg/mL e a CBM foi 6,77 mg/mL e 13,54 mg/mL para *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, respectivamente. Esses resultados podem estar relacionados à característica de hidrofobicidade dos óleos essenciais e seus constituintes que lhes conferem capacidade para alterar a permeabilidade da membrana celular e mitocondrial, tornando-as mais permeáveis com consequentes perdas de íons e moléculas. Carson et al. (2002) ressaltam, no entanto, que parece improvável que haja apenas um mecanismo de ação ou que apenas um componente seja responsável pela ação antimicrobiana.

O presente estudo corrobora com os achados da literatura quanto à atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre as BAL estudadas, em que os compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* apresentou atividade bacteriostática para a *W. viridescens* e *L. mesenteroides* e bactericida para a *W. viridescens*, podendo se inferir que a ação antibacteriana se deva a presença dos compostos químicos majoritários, eucaliptol (32,94%) e D- α -pineno (29,43%) identificados no vapor do óleo essencial de *C. blanchetianus* (Vasconcelos et al. 2022).

3.5 Toxicidade do óleo essencial

O teste de toxicidade sobre o cultivo de espécies de *Artemia salina* Leach (salmoura), é utilizado para detectar compostos bioativos em extratos vegetais e óleo essenciais, exibindo uma boa correlação com atividade antitumoral, atividade antiplasmódica (Meyer et al. 1982; Amarante et al. 2011; Adeogun et al. 2018). Estudo realizado por Meyer et al. (1982) considera tóxica as substâncias que apresentam

valores de dose letal abaixo de 1000 µg/mL em *Artemia salina*. Amarante et al. (2011) concluíram que, quando a CL₅₀ for maior do que 1000 µg/mL, o extrato é considerado atóxico, entre 500 e 1000 µg/mL apresenta baixa toxicidade, entre 100 e 500 µg/mL moderada toxicidade e menor que 100 µg/mL, alta toxicidade. Neste estudo foi observado CL₅₀ na concentração de 326 µg/mL, apresentando assim um efeito moderadamente tóxico. Ambos os controles positivos foram associados a 100% de sobrevivência. A Equação 1 representa a porcentagem de sobreviventes de *A. salina* frente às soluções do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* nas concentrações de 10, 100 e 500 µg/mL.

$$y = 111,8e^{-0,009x} \quad (R^2 = 0,9999) \quad (1)$$

Sendo que:

x = concentração do óleo essencial (µg/mL);

y = porcentagem de *A. salina* sobreviventes (%).

Medeiros et al. (2014) observaram CL₅₀ do óleo essencial de marmeleiro (*Croton blanchetianus*) ao mesmo microcrustáceo no valor de 10,6 µg/mL, podendo ser utilizado abaixo desta concentração em segurança. Sendo que o valor da CL₅₀ citado pode está relacionado aos compostos majoritários, D-limoneno (24%), Cariofileno (19%), δ-elemeno (17%) e α-pineno (15%), identificados no óleo essencial extraído das folhas frescas de marmeleiro. Segundo Costa et al. (2008), a avaliação da toxicidade óleo essencial de *C. zehntneri* sobre *A. salina* apresentou resultado considerado ativo, com CL₅₀ < 100 µg/mL. Cavalcanti et al. (2020) encontraram que os óleos essenciais de *C. heliotropiifolius*, *Croton sonderianus* Müll.Arg. (Sinonímia: *C. blanchetianus* Govaert et al. 2000) e *Croton grewoides* Baill. possuem toxicidade moderada à grave, o que as tornam potencialmente perigosas se utilizados indiscriminadamente. A literatura reporta também a alta toxicidade dos extratos metanólicos do caule, flores e folhas da espécie *C. heliotropiifolius* frente a *A. salina* (Silva et al. 2017).

Segundo Silveira et al. (2008), os princípios ativos dos vegetais são compostos químicos secundários sintetizados pelas plantas e podem provocar reações nos microrganismos, alguns podem ser tóxicos, dependendo da dosagem utilizada. Considerando que o ensaio toxicológico é de fundamental importância na triagem de produtos naturais, Souza (2014) verificou a atividade citotóxica do óleo

essencial de *C. blanchetianus* sobre macrófagos imortalizados (RAW 269,7) pelo teste colorimétrico da redução do sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio) ou teste do MTT com perspectivas na doença periodontal. Os autores observaram que a concentração de 50 µg/mL permitiu a viabilidade de 98,63% dos macrófagos. Ainda é preciso realizar testes complementares mais específicos para verificar a toxicidade do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* e ainda a realização de ensaios, com a adição de óleo essencial de *C. blanchetianus* numa matriz alimentar e estabelecer as condições nas quais podem ser ingeridos sem causar danos.

4. CONCLUSÃO

A análise da composição química do óleo essencial das FF, FS1 e FS2 de *C. blanchetianus* apresenta os seguintes compostos majoritários: eucaliptol, biciclogermacreno, E-cariofileno, α -pineno, espatulenol e Sativeno. Os componentes químicos do óleo essencial de *C. blanchetianus* obtidos das FF, FS1 E FS2 não apresentaram grandes variações.

De modo geral, as bactérias patogênicas estudadas no presente trabalho apresentam menor resistência ao óleo essencial proveniente das folhas secas. Com base nos diâmetros dos halos de inibição formados foi possível classificar as bactérias patogênicas do presente estudo em diferentes níveis de sensibilidade.

As bactérias Gram-positivas apresentam uma menor resistência ao óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* quanto comparadas as bactérias Gram-negativas testadas.

A avaliação da toxicidade do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* pelo bioensaio frente aos náuplios *Artemia salina* Leach apresentou efeito considerado moderadamente tóxico ($CL_{50} = 326 \mu\text{g/mL}$), porém é necessário a realização de testes adicionais nas diversas áreas, incluído química, biologia, farmacologia, medicina, sobre a toxicologia, afim de se esclarecer os possíveis eventos adversos e identificar as principais contraindicações do óleo essencial de *C. blanchetianus*.

O presente trabalho fornece dados de grande interesse para o uso do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*, contudo, estudos complementares a respeito da aplicação do mesmo em uma matriz alimentar são necessários.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Doutorado Institucional (DINTER/IFCE/UFSC), a Universidade Federal do Ceará (UFC) e a Embrapa Agroindústria Tropical pela CG/EM.

Referências

- A.S. Barbosa, A.P. Andrade, L.P. Félix, Í.S. Aquino and J.H.C.S. Silva, *Composição, similaridade e estrutura do componente arbustivoarbóreo de áreas de Caatinga*. *Nativa*, Sinop, 8(3), 314-322 (2020). doi:10.31413/nativa.v8i3.9494.
- M.R. Souza, M.B. Ferreira, G.G. Sousa, A.R. Alves and A.C. Holanda, *Caracterização florística e fitossociológica do componente lenhoso de um fragmento florestal de Caatinga em Serra do Mel, Rio Grande do Norte, Brasil*. *Nativa*, Sinop, 8(3), 329-335 (2020). doi:10.31413/nativa.v8i3.9136.
- C.M. Silva, C.I. Silva, M. Hrcir, R.T. Queiroz and V.L.I. Fonseca, *Guia de plantas: visitadas pelas abelhas na Caatinga*. 1. Ed. Editora Fundação Brasil Cidadão, pp. 40-41. Fortaleza (2012).
- A. Salatino, M.L.F. Salatino and G. Negri, Traditional uses, *Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae)*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(1), 11-33 (2007).
- C.B. Santos and M.A.T. Pereira, *O uso de plantas medicinais da Caatinga: As concepções dos moradores da fazenda em Curaçá – ba*. *Revista Científica do UniRios*, 18(1), 194-225 (2020).
- C.A. Coy Barrera, D.C. Gómez and F.A. Castiblanco, *Importancia medicinal del género Croton (euphorbiaceae)*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234-247 (2016).
- N.C.S. Firmino, F.S.O. Alexandre, M.A. Vasconcelos, A.A. Pinheiro, F.V.S. Arruda, M.L.S. Guedes, E.R. Silveira and E.H. Teixeira, *Diterpenes isolated from Croton blanchetianus Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral Streptococci biofilms*. *Industrial Crops & Products*, 131, 371–377 (2019). doi: 10.1016/j.indcrop.2019.01.062.
- E.C. de Vasconcelos, M. J. G. Ferreira, R. C. de S. Menezes; C. R. Muniz, L. M. R. da Silva, E. A. T. de Figueiredo and G. M. F. de Aragão. *Potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano do extrato aquoso do processo de extração do óleo essencial de folhas de Croton blanchetianus Baill*. *Scientia Plena*. 17(12), 1-8 (2021). doi: 10.14808/sci.plena.2021.121501

G.F.A. Melo, A.C.V. Costa, F. Garino Junior, R.S. Medeiros, M.S. Madruga and V. Queiroga Neto, *The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to Croton blanchetianus Baill essential oil*. Brazilian Journal of Microbiology. 44(4), 1189-1194 (2013).

A.B. da Silva, C.R.F. de Oliveira, C.H.C. Matos, P.É.M. dos Santos and C.R.I.M. Lira. *Bioatividade do óleo essencial de Croton blanchetianus Baill (Euphorbiaceae) sobre Callosobruchus maculatus Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Nativa, Sinop, 8(4), 450-455, jul./ago. (2020). doi: 10.31413/nativa.v8i4.8456

A.E. Frutuoso, N.T. Nascimento, T.L.G. Lemos, E.L. Coelho and D.M.A. Teixeira, *Óleos essenciais aplicados em alimentos: uma revisão*. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, 4(2), 69-81 (2013). doi:10.14685/rebrapa.v4i2.134.

A. Khorsandi et al. *Antibacterial Effect of Essential Oils against Spoilage Bacteria from Vacuum-Packed Cooked Cured Sausages*. Journal of Food Protection, 81(8), 1386–1393 (2018).

M.A. Ootani, R.W. Aguiar, A.C.C. Ramos, D.R. Brito, J.B. Silva and J.P. Cajazeira, *Use of Essential Oils in Agriculture*. Journal of Biotechnology and Biodiversity, 4(2), 162-174 (2013).

L.D. Nascimento, A.A.B. Moraes, K.S. Costa, J.M.P. Galúcio, P.S. Taube, C.M.L. Costa, J.N. Cruz, E.H.A. Andrade and L.J.G. Faria, *Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications*. Biomolecules, 10(988), 1-35, (2020). doi:10.3390/biom10070988

A.F.S. Freitas, W.K. Costa, J.C.B. Machado, M.R.A. Ferreira, P.M.G. Paiva, P.L. Medeiros, L.A.L. Soares, A.M. Oliveira and T.H. Napoleão, *Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from Croton blanchetianus (Euphorbiaceae) leaves*. South African Journal of Botany, 133, 30-39 (2020). doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.015.

D.F.G. Cavalcanti, D.M.Silveira and G.C. da Silva. *Aspectos e potencialidades biológicas do gênero Croton (Euphorbiaceae)*. Brazilian Journal of development, 6(7), 45931-45946 (2020). doi: 10.34117/bjdv6n7-280

R. Govaerts, D.G. Frodin and A. Radcliffe-Smith, *A. Croton. In: World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)*. London: Royal Botanic Gardens Kew. V.2.(2000).

M.J. Figueiredo, C.V.B. Grisi, A.M. Santiago, E.A. Vieira, A.M.T.M. Cordeiro., A.F. Vilela, A.D. Viana, S. Sousa and L.S. Conrado, *Characterization and application of Croton blanchetianus Baill extract for lamb ribs preservation*. Food Chemistry, 373 2022. doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131404, p 1-11.

J.S. Lima, P.A.M. Farias, I.A. Silva, I.C.S. Muniz, I.I.S. Muniz, C.H.P. Silva, T.T.C. Silva, E.M. Lima, R.P. Cordeiro and C.G.O. Coimbra, *Análise toxicológica e microbiológica do extrato bruto seco do marmeleiro (Croton sonderianus Muell. Arg)*.

Revista Eletrônica Acervo Científico. REAC, 39, 1-8 (2021).
doi:10.25248/REAC.e9338.2021

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4. Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. P. 1020.

O.R. Gottlieb and M.T. Magalhães. *Modified distillation trap*. *Chemist Analyst*. 4th edn. Pp 114-116, 49 (1960).

BRASIL. *Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. 6. Ed. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 874 p. 2019.

A.S. Santos, S.M. Alves, F.J.C. Figueirêdo and O.G. Rocha Neto, *Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório*. Belém (PA): Ministério da Agricultura e Pecuária; 2004. (Comunicado Técnico, 99).

D.F. Ferreira. *Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons*. [on line]. *Ciênc. Agrotec.* 38(2), 109-112 (2014). Accessed Novemb 25, 2019. doi: 10.1590/S1413-70542014000200001.

Association of Official Analysis Chemists International (AOAC), *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Association of Official Analysis Chemists International, 9, 471 (2000). doi:10.3109/15563657608988149.

J. K Branen and P.M. Davidson, *Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin*. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 63–74 (2004). doi:10.1016/S0168-1605(03)00172-7.

A.L. Brandt, A.Castillo, K.B. Harris, J.T. Keeton, M.D. Hardin and T.M. Taylor. *Inhibition of Listeria mmonocytogenes by food antimicrobials applied singly and in combination*. *Journal of Food Science*, 75(9), 557-563 (2010). doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01843.x.

B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin, *Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents*. *Journal of Medical Plant Research*, 45(1), 31-34 (1982).

E.C. Angélico, J.G.M. Costa, O.G. Rodrigues, E.Q. Lima and R.S. Medeiros, *Composição química do óleo essencial das folhas de Croton blanchetianus (Baill): Resultados Preliminares*. *Revista de Biologia e Farmácia*, 5(2), 44-49 (2011).

D. N. M. Fernandes. *Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de Croton tetradenius Baill (Euphrbiaceae)*. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

R.P. Adams. *Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed. Allured Publ.: Carol Stream, IL, 2017.

V. I. Babushok, V. I.; P.J. Linstrom and I. G. Zenkevich. *Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, [s.l.], 40(4), 043101 1-043101 47(2011).

G.F.A Melo. A. *Estudo da composição química e da atividade antibacteriana in vitro e em alimentos do óleo essencial de Croton blanchetianus Baill.* 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

L. Pinho-da-Silva, P.V. Mendes-Maia, T.M.N. Garcia, J.S. Cruz, S.M. Morais, A.N. Coelho-de-Souza, S. Lahlou and J.H. Leal-Cardoso, *Croton sonderianus essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle*. Phytomedicine, 17(10), 721–725 (2010). doi: 10.1016/j.phymed.2010.01.015.

M.C.M. Torres, M.A. Luz, F.B. Oliveira, A.J.C. Barbosa and L.G. Araújo, *Composição química do óleo essencial das folhas de Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae)*. Brazilian Journal of Development, 7(2), 15862-15872 (2021). doi: 10.34117/bjdv7n2-284.

S.S.S. Brito, F. Silva, R. Malheiro, P. Baptista and J.A. Pereira, *Croton argyrophyllus Kunth and Croton heliotropiifolius Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties*. Industrial Crops & Products, 113, 308–315 (2018). doi: /10.1016/j.indcrop.2018.01.044.

F.M. Araújo, M.C.S.M. Dantas, L.S. Silva, L.Y.S. Aona, I.F. Tavares and L.C. Souza-Neta, *Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Croton heliotropiifolius Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil*. Industrial Crops & Products, 105, 203–206 (2017). doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.016.

S.G. Lima, A.M.G.L. Citó, J.A.D. Lopes, J.M.M. Neto and M.H. Chaves and E.R. Silveira, *Fixed and volatile constituents of genus Croton plants: C. adenocalyx Baill – Euphorbiaceae*. Revista Latinoamericana de Química, 38(3), 133-144 (2010).

C.H. Pires et al. *Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de Callistemon viminalis (sol. Ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae)*, Rev Ciênc Farm Básica Apl. 34(4), 597-601 (2013).

B. A. Chaibub. et al. *Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de Spiranthera odora.tissima A. St.-Hil.* Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, 15(2) 225-229, (2013).

A. J. C. Barbosa. *Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Croton urticifolius LAM. E Croton adamantinus MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae)*. 2021. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual da Paraíba – Campina Grande. 2021. 70 f.

F. Bakkali. et al. *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology, 46, 446–475(2008).

F.R. Silva et al. *Chemical composition of essential oil from the bark of Croton cajucara Benth.* Acta Scientiarum. Technology, 34(3)325-329(2012).

F. D. Mora et al. *Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of Verbesina negrensis from the Venezuelan Andes.* Natural product communications, 10(7)1309-1310(2015). doi:10.1177/1934578X1501000743

J.M.T. Alencar Filho, L.C. Araújo, A.P. Oliveira, A.L. Guimarães, A.G.M. Pacheco, F.S. Silva, L.S. Cavalcanti, A.M. Lucchese, J.R.G.S. Almeida and E.C.C. Araújo, *Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of Croton heliotropiifolius in diferente seasons of the year.* Revista Brasileira de Farmacognosia, 27(4), 440-444 (2017). doi: 0.1016/j.bjp.2017.02.004.

L.A.S. Morais, *Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais.* Horticultura Brasileira, 27(2), Supl.– CD Rom S4050-S4063 (2009).

N.S. Sangwan, A.H.A. Farooqi, F. Shabih and R.S. Sangwan, *Regulation of essential oil production in plants.* Plant Growth Regulation, 34,3–21 (2001).

S.M. Ribeiro, O.H. Bonilla and E.M.P. Lucena, *Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de Croton spp. da Caatinga.* Iheringia-Série Botânica, 73(1), 31-38 (2018). doi:10.21826/2446-8231201873104.

S. Bhavaniramy, S. Vishnupriya, M.S. Al-Aboody, R.Vijayakumar and D. Baskaran, *Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications.* Grain & Oil Science and Technology, 2, 49-55 (2019). doi: 10.1016/j.gaost.2019.03.001.

J.C.S. Porto, F.A. Coelho, F.V.B. Oliveira, S.G. Lima and M. Mobin, *Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil.* Rev Interd. 13(1801), 1-11 (2021).

E.C. Angélico, O.G. Rodrigues, J.G.M. Costa, M.F.A. Lucena, V. Queiroga Neto and R.S. Medeiros, *Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and Croton's varieties modulator in the Brazilian's Northeast semiarid.* Afr. J. Plant Science, 8(7), 392–397 (2014). doi: 10.5897/AJPS2014.1198.

A. Mutlu-Ingok et al. *Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review.* Molecules, 25(20), 1-49(2020). doi:10.3390/molecules25204711

C.A.G. Veloso, P.H.S. Souza, F.P. Nóbrega, A.C.D. Medeiros and I.M. Fachine, *Composição química do óleo essencial de Varronia dardani (Taroda) J.S. Mill e sua atividade antibiofilme.* Brazilian Journal of Development, 6(3), 12887-12898 (2020). doi: 10.34117/bjdv6n3-232.

C.F. Carson, B.J. Mee and T.V. Riley, *Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage,*

and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(6), 1914–1920 (2002). doi:10.1128/AAC.46.6.1914–1920.2002.

E.C. de Vasconcelos, C.C. Paganini, E.A.T. de Figueiredo and G.M.F. de Aragão. *Ação antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de Croton blanchetianus Baill.* Research, Society and Development. 11(1), 1-10 (2022). doi: 10.33448/rsd-v11i1.24785

O.O Adeogun, A. Maroyi and A.J. Afolayan, *Variation in the chemical composition of essential oils from Artemisia afra (Jacq) ex-Wild leaf obtained by different methods and the effect of oil extracts on Artemia salina L.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 17(3), 519-528 (2018.). doi: 10.4314/tjpr.v17i3.19.

C.B. Amarante, A.H. Müller and M.M. Póvoa, M.F. Dolabela, *Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (Montrichardia linifera).* Acta Amazonica, 41(3), 431-434 (2011).

MEYER, B. N. et al. *Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.* Journal of Medical Plant Research, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

J.A.M. Medeiros, G.S. Silva, I.S.A. Silva, A.M. Melo, S.G. Lima, E.M. Beltrão Filho and M.R. Quirino, *Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de marmeleiro (Croton blanchetianus Baill) e avaliação de sua atividade citotóxicopotencial frente a Artemia salina Leach.* In: Congresso Brasileiro de Química. 54. Rio Grande do Norte, Brasil (2014).

J.G.M. Costa, F.F.G. Rodrigues, E.C. Angélico, C.K.B. Pereira, E.O. Souza, G.F. R. Caldas, M.R. Silva, N.K.A. Santos, M.L. Mota and P.F. Santos, *Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de Croton zehntneri (variedade estragol).* Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(4), 583-586 (2008). doi:10.1590/S0102-695X2008000400015.

J.A.G. Silva, I.R. Lima, M.A.N. Santana, T.M.S. Silva, M.I.A.G. Silva, S.P. Leite. *Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae) frente à Artemia salina Leach.* Rev. Virtual Quim. 9(3), 934-941 (2017). doi: 10.21577/1984-6835.20170060.

P.F. Silveira, M.A.M. Bandeira and P.S.D, Arrais. *Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade.* Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(4), 618-626 (2008).

E.A. Souza. *Avaliação das potencialidades farmacológicas em periodontia de extratos e óleos essenciais de Croton blanchetianus Baill.* 2014. 160 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

5.3.1 Informação complementar

O cromatograma dos óleos essenciais das folhas frescas (FF) e secas (FS1) do *C. blanchetianus* obtido em CG-EM estão dispostos no APÊNDICE A e os números sobre os picos referentes aos compostos estão listados no APÊNDICE B.

No APÊNDICE C está disposta a composição química do óleo essencial das folhas secas (FS2) de *Croton blanchetianus*, que foram armazenadas por 8 meses, para então serem submetidas ao processo de extração do óleo essencial e no APÊNDICE D o cromatograma deste referido óleo essencial, sendo os números sobre os picos referentes aos compostos listados no APÊNDICE C.

Os resultados do teste de difusão em ágar para avaliar a atividade antimicrobiana das soluções de óleo essencial em Tween 80 1%, nas concentrações de óleo testadas (902,5, 680, 450 e 220 mg/mL) frente os microrganismos patogênicos *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis* são apresentados na APÊNDICE E. Os resultados foram expressos pela medida dos halos de inibição formados pela ação do óleo essencial das folhas frescas e secas do *C. blanchetianus* sobre as bactérias, como apresentados no APÊNDICE F.

Nos APÊNDICES G, H e I estão, a figura dos cistos de *A. salina* para eclosão, os náuplios em diferentes concentrações de solução OECEB e o gráfico que apresenta a porcentagem de sobreviventes do microcrustáceo para determinação da toxicidade do OECEB, respectivamente.

5.4 MODELING THE EFFECT OF *Croton blanchetianus* BAILL ESSENTIAL OIL ON PATHOGENIC AND SPOILAGE BACTERIA

Abstract

This study aimed to evaluate and model the antimicrobial action of different concentrations of *Croton blanchetianus* essential oil (CBEO) on the behavior of six bacterial species *in vitro*. CBEO extraction was performed by hydrodistillation and characterized by GC-MS. CBEO solutions in culture media were tested at 0.90, 1.80, 2.71, and 4.51 mg of CBEO/mL, against foodborne bacteria: pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis), a non-pathogenic *Escherichia coli*, and spoilage bacteria (*Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*) at optimum growth temperature. The CBEO major compounds were eucalyptol, α -pinene, sativene, *E*-caryophyllene, bicyclogermacrene, and spatulenol. Baranyi and Roberts (growth) and Weibull (inactivation) primary models, along with power and hyperbolic secondary models were able to describe the data. CBEO inactivated *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides* and *W. viridescens* at all applied concentrations. CBEO did not inactivate *S. Enteritidis* and *E. coli*, but their growth rates were reduced.

Keywords: microbial growth, bacterial inactivation, parameter estimation, food microbiology, GC-MS, *marmeleiro*.

1. Introduction

Croton blanchetianus Baill (Euphorbiaceae), popularly known as *marmeleiro* tree, is a shrub found in the Caatinga biome and widespread in northeastern Brazil (Angélico et al., 2014; Cordeiro et al., 2015). It is often used in traditional folk medicine as infusions and other preparations as healing and antimicrobial agents (Costa et al., 2008; Coy Barrera, 2016).

Essential oils from plants have been studied as natural antimicrobial agents, being considered a promising alternative to the synthetic compounds (Moarefian et al., 2013; Trindade et al., 2021). These oils exhibit activity against foodborne pathogens and spoilage microorganisms (Calo et al., 2015; Ghabraie et al., 2016; Tintino et al., 2014). *C. blanchetianus* essential oil (CBEO) has demonstrated antimicrobial action against *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides* (Vasconcelos et al., 2022). Aqueous extracts from *C. blanchetianus* Baill leaves showed antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* (Vasconcelos et al., 2021).

Foods that are improperly preserved and managed can carry various microorganisms pathogenic for humans (Ríos-Castillo et al., 2021; Rosberg et al., 2021). For instance, the presence of lactic acid bacteria (LAB) in foods, in some situations, may cause their deterioration, mainly in refrigerated and vacuum-packed meat products (Bruno, 2011; Koutsoumanis et al., 2020). Thus, the search for mechanisms to limit the growth or inactivate these microorganisms is increasing in food industry.

Predictive microbiology mathematical models are applied to describe and predict the microbial growth and inactivation under certain combinations of intrinsic and extrinsic factors (Koutsoumanis et al., 2020). According to Whiting and Buchanan (1993), the traditional approach in predictive microbiology follows a two-step procedure: primary and secondary modeling. In the first step, primary models can describe the microbial growth and/or inactivation over time under constant environmental conditions (McKellar and Lu, 2004). The primary models are fitted to the experimental data for estimating kinetic parameters of growth or inactivation (Dalcanton et al., 2013; Fernández et al., 2007; Longhi et al., 2013; Menezes et al., 2018; Peleg, 2006). In the second step, an appropriate secondary model is used to

describe the effect of environmental changes (e.g., essential oil concentration) on the parameters of the primary models (Huang, 2017; Ross and Dalgaard, 2004).

The motivations of this study include the abundance of the *Croton* genus in the Brazilian Northeast region, the impact of microorganisms contaminating food, and the scarce reports about the use of predictive microbiology in modeling the effect of CBEO on microorganisms of food interest. Then, this study aimed to evaluate and model the *in vitro* antimicrobial action of different concentrations of the essential oil from the leaves of *C. blanchetianus* on the behavior of six bacterial species.

2. Material e methods

2.1 Collection and preparation of plant material

C. blanchetianus leaves were collected in the rainy season, in the morning, from five trees at the Experimental Research and Extension Unit (UEPE) of the Federal Institute of Education, Science, and Technology of Ceará (IFCE), Campus Limoeiro do Norte (geographic coordinates 05°10825' S and 38°00717' W). The SisGen registration is AC5ED78. A sample was collected for identification, and the exsiccate was deposited in the Herbarium Prisco Bezerra of the Federal University of Ceará (UFC) (# 62200).

The leaves were naturally dried at room temperature (31 ± 1 °C), up to approximately 9% humidity. The determination of the moisture content was performed according to the procedure recommended by the Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.2 Essential oil extraction

The essential oil extraction from the *C. blanchetianus* dried leaves was performed using the hydrodistillation technique in a modified Clevenger apparatus (Gottlieb and Magalhães, 1960) coupled to a 5 L round-bottomed flask and a thermal blanket as a generating source of heat, according to the model cited in the Brazilian Pharmacopoeia (Brazilian Health Regulatory Agency, 2019). For each extraction process, 300 g of the sample were weighed, and 2.5 L of distilled water was added, then subjected to an extraction temperature of 100 °C for 2 hours, counted from the moment of condensation of the first drop of oil. After extraction, the oil was collected, and approximately 5 g of anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) was added to remove

the residual water. The essential oil was separated using a Pasteur pipette, which removed only the oil phase. The collected oil (CBEO) was placed in amber glass flasks and stored under refrigeration until the analyses.

2.3 Chemical composition of the essential oil

The chromatographic analyses of the CBEO were carried out at Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA, CE) by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for two different samples. The first sample corresponds to dry leaves freshly harvested. The second sample corresponds to dry leaves stored in the dark for eight months (B) at an average ambient temperature of 35 ± 3 °C.

GC-MS analyses were performed on GC-7890B/MSD-5977A Agilent chromatograph equipped with a HP-5MS methylpolysiloxane column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Agilent), using electron impact at 70 eV, helium carrier gas at a flow of 1.00 mL/min (8.8 psi) and constant linear velocity of 36.8 cm/s, inlet temperature of 250 °C, detector temperature of 150 °C, and transfer line temperature of 280 °C. The chromatographic oven was set for an initial temperature of 70 °C, with heating ramp from 4 °C/min to 180 °C and increment of 10 °C/min to 250 °C at the end of the run (34.5 min). The compounds identification was achieved by analyzing the fragmentation patterns displayed in the mass spectra with those present in the database provided by the equipment (NIST version 2.0 of 2012 – 243,893 compounds) and from literature data.

2.4 Bacterial species, inoculums, and pre-cultivation preparations

The reference strains of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC-27664, *Listeria monocytogenes* ATCC-19115, and *Salmonella* Enteritidis IAL-1132 were used, as well as the spoilage lactic acid bacteria (LAB) *Weissella viridescens* ATCC 12706 and *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293, and a non-pathogenic strain of *Escherichia coli* ATCC-25922.

The bacterial concentration of each inoculum in the pre-culture was 10^7 CFU/mL. It was obtained by serial dilutions of each pathogenic bacteria (and *E. coli*) inoculum in 9 mL of tryptone soy broth – TSB medium (Difco™, Sparks EUA) and each lactic acid bacteria in 9 mL of De Man, Rogosa e Sharpe – MRS medium (Difco™,

Detroit, EUA). For *L. monocytogenes*, TSB was added with 0.1% yeast extract (YE) (TSB+YE) (Difco™, Detroit, USA).

The pre-cultivations were done in 50 mL Erlenmeyer flasks with the following compositions: culture medium, inoculum, and CBEO solutions in 5% (v/v) dimethyl sulfoxide solution (DMSO). CBEO solutions were used at concentrations of 0.90, 1.80, 2.71 and 4.51 mg/mL (for *L. mesenteroides*, 1.80 mg/mL was not tested). The CBEO used with pathogenic (and *E. coli*) and lactic acid bacteria were from samples A (from dry leaves freshly harvested) and B (from dry leaves stored for eight months), respectively. The initial bacterial suspensions of 10^5 CFU/mL were obtained by adding 250 μ L of each inoculum (10^7 CFU/mL) to a total medium volume of 25 mL. A control sample was obtained by 5% (v/v) DMSO solution without CBEO in the culture medium with 250 μ L of each inoculum. The pre-cultivation with pathogenic (and *E. coli*) and lactic acid bacteria were incubated at 35 °C in BOD (model Q316-M26, Quimis, Diadema, SP, Brazil) and 30 °C in BOD (model TE 390, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil), respectively.

2.6 Experimental data of the bacterial kinetics

Experimental kinetic data of each bacterial species were obtained by the spread plate technique on TSA agar for *S. aureus*, *E. coli*, and *S. Enteritidis* (Difco™, Sparks, EUA), on TSA+YE agar for *L. monocytogenes* (Difco™, Detroit, EUA); and on MRS agar for *W. viridescens* and *L. mesenteroides* (Difco™, Detroit, EUA). Samples were taken at predetermined time intervals based on the CBEO concentration and bacterial species. For the control samples, the time intervals were based on the growth of bacteria until reaching the stationary phase.

Aliquots of 100 μ L of culture medium sample were collected at each predetermined time, followed by serial dilutions in peptone water and then spread plating. The plates containing the pathogenic (and *E. coli*) and lactic acid bacteria were incubated at 35 °C for 24 h in a BOD (model Q316-M26, Quimis, Diadema, SP, Brazil) and at 30 °C for 48 h in a BOD (model TE 390, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil), respectively. Each experiment was performed in duplicate. Plates with 25 to 250 colonies grown were selected for counting. The results were expressed in Colony Forming Units per milliliter of the sample (CFU/mL) from the average of the counts at

each time point. The kinetic curves were constructed for each microbial species with data from the logarithm of bacterial counts (log CFU/mL) along the time (h).

2.7 Mathematical modeling of bacterial kinetics

The well-known modified Gompertz (Zwietering et al., 1990), Equation (1), and the Baranyi and Roberts (1994), Equations (2) to (4), primary models were fitted to the growth data, while the log-linear with shoulder (Geeraerd et al., 2005), Equation (5), and the Weibull (Mafart et al., 2002), Equation (6), inactivation models were fitted to the inactivation data. In Equations (1) to (6), $y = \log N(t)$ (log CFU/mL) describes the logarithm of the microbial concentration over time t (h), y_0 (log CFU/mL) is the logarithm of the initial microbial concentration, μ_{max} (1/h) is the maximum specific growth rate, y_{max} (log CFU/mL) is the logarithm of the maximum microbial concentration, λ (h) is the duration of the adaptation phase, $F(t)$ is a function related to the physiological state of the cells, h_0 is related to the initial physiological state of the cells, D (h) is the decimal reduction time, i.e., the time required for the inactivation of 90% of the microbial population, S (h) is the shoulder length; p (dimensionless) is a form factor, and δ (h) is the time for the first decimal reduction (a scale factor). The time for five decimal reductions (5DR) were additionally calculated with the inactivation model parameters.

$$y = y_0 + (y_{max} - y_0) \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{max} \exp(1)}{y_{max} - y_0}(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (1)$$

$$y = y_0 + \mu_{max} F(t) - \log\left(1 + \frac{\exp(\mu_{max}) F(t) - 1}{\exp(y_{max} - y_0)}\right) \quad (2)$$

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \log(\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max} t - h_0)) \quad (3)$$

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{max}} \quad (4)$$

$$y = y_0 - \frac{t}{D} \frac{1}{(1 + (\exp(S/D) - 1)(\exp(-t/D)))} \quad (5)$$

$$y = y_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (6)$$

The Baranyi and Roberts growth model was fitted to the experimental data of each microbial species in two steps (Baranyi and Roberts, 1995). In the first step, the value of the h_0 parameter was estimated for each kinetic dataset; then, an average of

all h_0 values were calculated ($h_{0,av}$) for each microbial species. In the second step, the model was fitted again to each kinetic dataset with a fixed h_0 value ($h_{0,av}$), and then the parameters μ_{max} , y_0 , and y_{max} were estimated.

Two-parameters equations (square root, hyperbolic, exponential, and power equations, shown in Equations (7) to (10), respectively) were fitted for establishing secondary models to describe the dependence of the parameters μ_{max} , D and δ (denoted by k) with the CBEO concentration ($[CBEO]$) for each bacterial species. In Equations (7) to (10), a , b , c , d , e , f , g , h , and i are empirical parameters.

$$\sqrt{k} = a[CBEO] + b \quad (7)$$

$$k = c + \frac{1}{[CBEO]-d} \quad (8)$$

$$k = e \exp(f[CBEO]) \quad (9)$$

$$k = g[CBEO]^h \quad (10)$$

The fitting procedures were performed in Matlab R2013a software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA), in which the model parameters ($\pm 95\%$ confidence intervals) were estimated, and the goodness-of-fit indexes (R^2 and $RMSE$) were calculated. The R^2 and $RMSE$ resulting from the model fitting to the data were compared to select the primary and secondary models that better describe the experimental data.

3. Results and discussion

3.1 Chemical composition

Table 1 shows the CBEO chemical composition based on GC-MS analysis. For samples A and B, it were identified 33 and 28 constituents, corresponding to 92.86% and 93.52% of their total peak area, respectively. The major compounds of both samples were α -pinene, eucalyptol, sativene, *E*-caryophyllene, bicyclogermacrene, and spatulenol. Eucalyptol represented more than 16% of the present compounds ($16.95\% \pm 1.12\%$), and there was no high variation (maximum of $\pm 2.62\%$) in the concentrations of the main compounds between the two analyzed oils.

Table 1. Main components present in the *C. blanchetianus* essential oil (CBEO) from the dried leaves. Analyzes performed of CBEO extracted from dry leaves freshly harvested (sample A) and from dry leaves stored in the dark, at room temperature (35 ± 3 °C) for eight months (sample B).

Chemical components	Area (%)*		Average	Standard deviation
	A	B		
α -Thujene	1.06	0.94	1.00	0.08
α -Pinene	9.84	8.44	9.14	0.99
Sabinene	1.46	1.00	1.23	0.33
β -Pinene	1.28	0.92	1.10	0.25
Myrcene	2.96	2.74	2.85	0.16
p-Cymene	-	1.46	-	-
Pseudolimonene	0.52	-	-	-
Limonene	-	3.39	-	-
δ -3-Carene	0.69	-	-	-
Eucalyptol	17.74	16.16	16.95	1.12
γ -Terpinene	-	0.53	-	-
Terpinen-4-ol	-	0.84	-	-
α -Terpineol	-	1.03	-	-
Myrthenol	-	0.62	-	-
α -Copaene	0.67	0.79	0.73	0.08
β -Bourbonene	0.64	1.35	1.00	0.50
Sativene	5.33	6.41	5.87	0.76
E-Caryophyllene	10.79	8.89	9.84	1.34
β -Copaene	0.57	0.80	0.69	0.16
Aromadendrene	1.36	2.14	1.75	0.55
α -Humulene	2.27	1.77	2.02	0.35
Allo-aromadendrene	0.98	1.12	1.05	0.10
γ -Muurolene	3.54	3.68	3.61	0.10
Bicyclogermacrene	13.66	10.15	11.91	2.48
γ -Cadinene	0.51	1.29	0.90	0.55
β -Selinene	1.16	-	-	-
δ -Cadinene	1.36	1.68	1.52	0.23
Germacrene B	1.64	0.88	1.26	0.54
Isodaucene	0.64	-	-	-
Spathulenol	6.21	9.92	8.07	2.62
Caryophyllene oxide	3.26	3.74	3.50	0.34
Cubebol	0.54	-	-	-
α -Cadinol	-	0.84	-	-
Viridiflorol	0.82	-	-	-
Other	1.36	-	-	-
TOTAL	92.86	93.52	93.19	0.47

*Relative areas determined by GC-MS.

Angélico et al. (2014) identified 14 chemical constituents of a CBEO from fresh leaves, corresponding to 79.4% of the total, in which the major compounds were cedrol (28.4%), eucalyptol (17.4%), and α -pinene (10.5%). Melo (2011) also identified 14 chemical compounds of a CBEO from fresh leaves, however the major compounds

were limonene (25.70%), α -pinene (16.32%), and bicyclogermacrene (13.00%). Pinhoda-Silva et al. (2010) found the compounds bicyclogermacrene (16.29%), β -phellandrene (15.42%), and β -caryophyllene (13.82%) as the main constituents of the essential oil of the same species.

Earlier, essential oils of other *Croton* species showed to have the main compounds similar to those of the CBEO studied. For instance, Torres et al. (2021) identified the main compounds of the essential oil of *C. heliotropiifolius* leaves as bicyclogermacrene (19.04%), *E*-caryophyllene (18.51%), limonene (15.65%), and α -pinene (13.24 %). According to Ribeiro et al. (2018), the chemical composition of the essential oils of *C. blanchetianus*, *Croton nepetifolius*, and *Croton zehntneri* was influenced by the circadian cycle and seasonality, with a variation in the percentage of constituents at specific times and seasons. They found spathulenol as the main constituent in leaves of *C. blanchetianus* collected in the morning.

3.2 Modeling the effect of CBEO on pathogenic and spoilage bacteria

3.2.1 Primary modeling

The experimental kinetic data of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* in the control sample (without CBEO) and in the samples with different concentrations of CBEO are shown in Figure 1. All bacteria grew up in the control sample. *E. coli* and *S. Enteritidis* also grew up at all the tested concentrations of CBEO. On the other hand, the addition of CBEO inactivated *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* species. For all these inactivation cases, the effect of CBEO on bacteria increased with the tested concentrations of the CBEO. The inhibition was more intense for some bacteria than others, which will be discussed later.

Figure 1. Kinetic experimental data (symbols) of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* in the control samples (without addition of *C. blanchetianus* essential oil – CBEO, unfilled symbols) and in samples with different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO, filled symbols), and the fitting (continuous lines) of the Baranyi and Roberts growth and Weibull inactivation primary models. Filled symbols: squares, diamonds, triangles, and circles represent samples with 0.9 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.71 mg/mL, and 4.51 mg/mL of CBEO, respectively.

(continua)

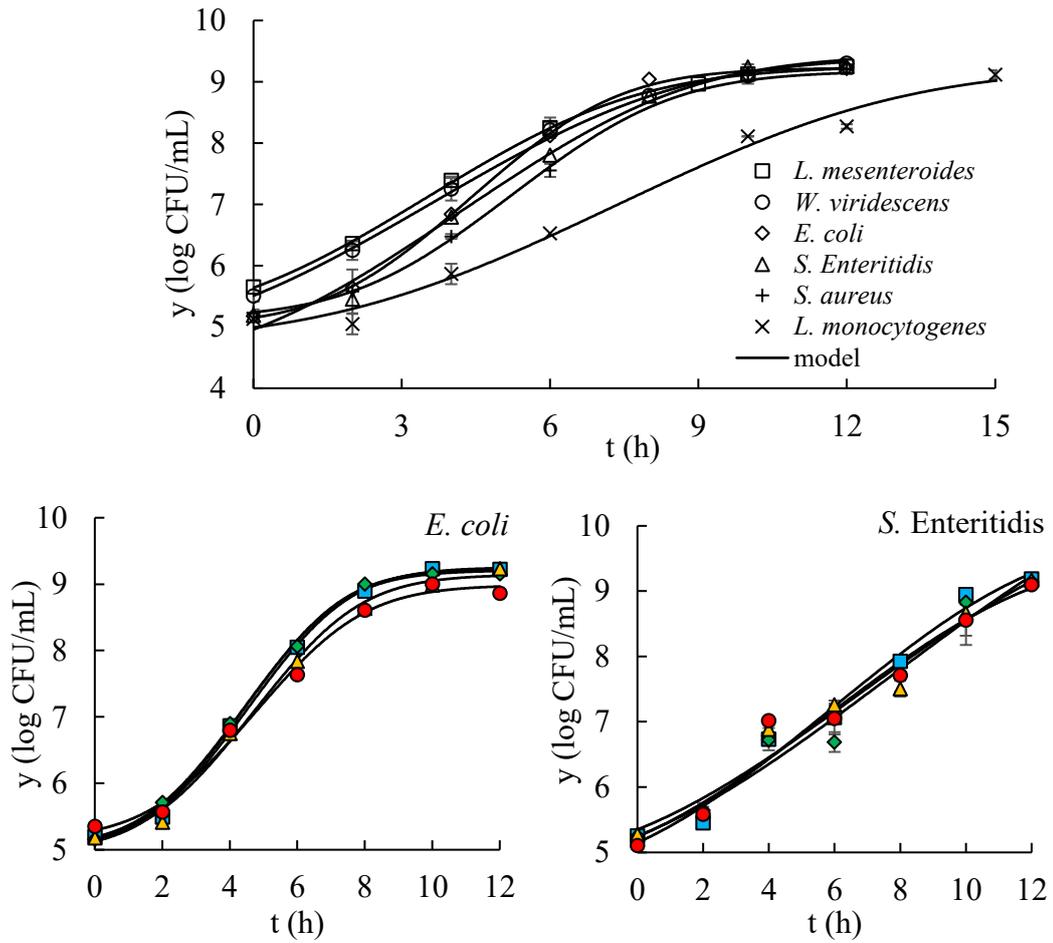
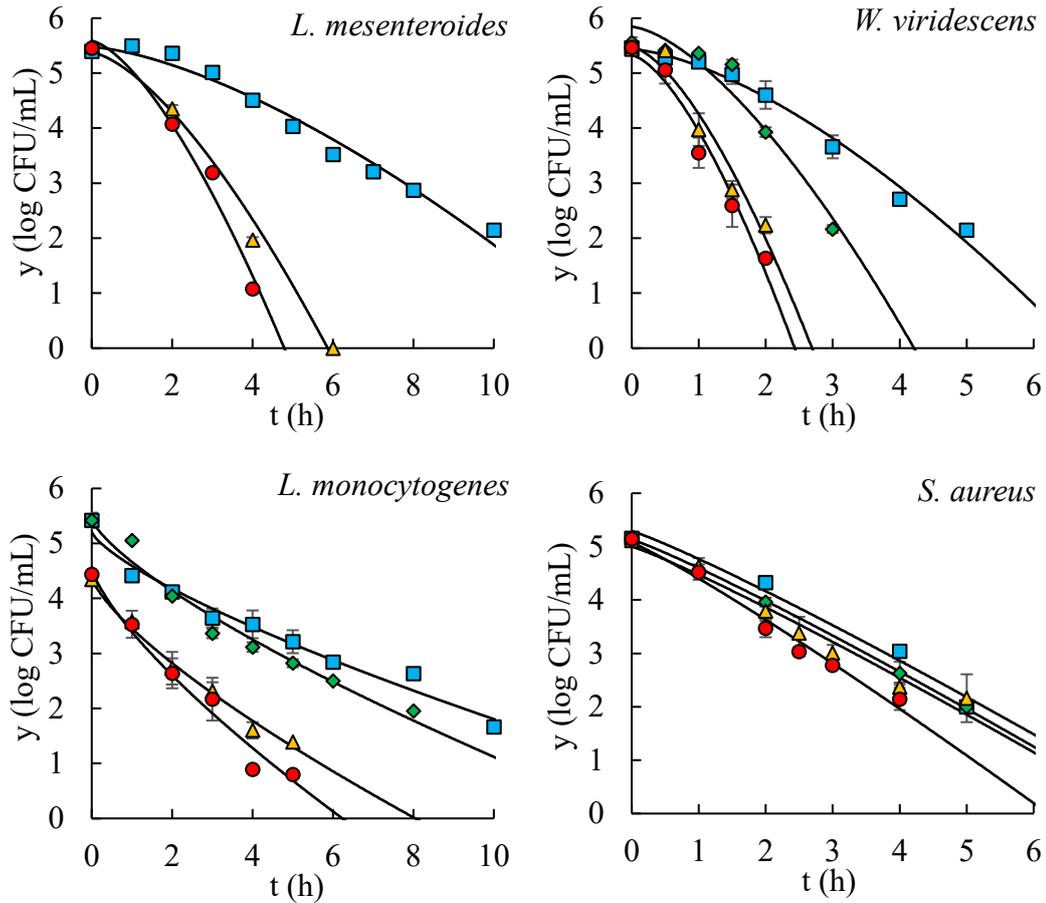


Figure 1. Kinetic experimental data (symbols) of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* in the control samples (without addition of *C. blanchetianus* essential oil – CBEO, unfilled symbols) and in samples with different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO, filled symbols), and the fitting (continuous lines) of the Baranyi and Roberts growth and Weibull inactivation primary models. Filled symbols: squares, diamonds, triangles, and circles represent samples with 0.9 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.71 mg/mL, and 4.51 mg/mL of CBEO, respectively.

(conclusão)



Modeling the kinetic data is critical to evaluate the effect of antimicrobial agents on the microbial population over time. Different primary models were tested and compared, the models with the best performance were chosen, and their parameters were estimated. The log-linear with shoulder and Weibull primary models were fitted to the inactivation experimental kinetic data, and the Baranyi and Roberts and modified Gompertz primary models were fitted to the growth experimental kinetic data of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* at different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO). For most cases of the microbial growth responses, the Baranyi and Roberts model, Equations (2) to (4),

fitted better to the experimental data than the modified Gompertz, Equation (1), since R^2 values were higher and closer to one, and $RMSE$ values were smaller and closer to zero. All results of R^2 and $RMSE$ statistical indices of the fitting of the primary models are shown in Table 2. For most cases of microbial inactivation responses, the Weibull model, Equation (6), fitted better to the experimental data than the log-linear with shoulder model, Equation (5), based again on the R^2 and $RMSE$ values. Therefore, Baranyi and Roberts, and Weibull primary models were selected for the growth and the inactivation modeling, respectively.

Table 2. Statistical indexes of the fitting of different primary models to the kinetic data of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* at different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO).

Microbial specie	CBEO (mg/mL)	Response	R^2		RMSE	
			M1 ^a	M2 ^b	M1 ^a	M2 ^b
<i>E. coli</i>	0.00	growth	0.999	0.997	0.067	0.126
	0.90	growth	0.998	0.999	0.099	0.082
	1.80	growth	0.999	0.997	0.069	0.138
	2.71	growth	0.996	0.999	0.137	0.087
	4.51	growth	0.993	0.993	0.153	0.181
<i>S. Enteritidis</i>	0.00	growth	0.996	0.997	0.147	0.133
	0.90	growth	0.982	0.982	0.255	0.296
	1.80	growth	0.972	0.972	0.308	0.309
	2.71	growth	0.973	0.967	0.289	0.318
	4.51	growth	0.972	0.964	0.299	0.337
<i>L. monocytogenes</i>	0.00	growth	0.976	0.981	0.311	0.277
	0.90	inactivation	0.986	0.989	0.169	0.149
	1.80	inactivation	0.972	0.953	0.241	0.314
	2.71	inactivation	0.991	0.985	0.144	0.179
	4.51	inactivation	0.978	0.975	0.278	0.294
<i>S. aureus</i>	0.00	growth	0.998	0.995	0.109	0.176
	0.90	inactivation	0.997	0.995	0.123	0.174
	1.80	inactivation	1.000	1.000	0.029	0.020
	2.71	inactivation	0.981	0.978	0.188	0.202
	4.51	inactivation	0.989	0.988	0.155	0.162
<i>L. mesenteroides</i>	0.00	growth	0.999	1.000	0.048	0.017
	0.90	inactivation	0.983	0.987	0.175	0.151
	2.71	inactivation	0.995	0.999	0.311	0.110
	4.51	inactivation	0.989	0.980	0.327	0.455
	0.00	growth	0.998	0.999	0.094	0.068
<i>W. viridescens</i>	0.90	inactivation	0.989	0.993	0.157	0.122
	1.80	inactivation	0.980	0.984	0.246	0.219
	2.71	inactivation	0.961	0.968	0.407	0.367
	4.51	inactivation	0.985	0.989	0.285	0.245

^aWeibull for inactivation and Baranyi and Roberts for growth.

^blog-linear with shoulder for inactivation and modified Gompertz for growth.

In the first step of the fitting of the Baranyi and Roberts model to the growth kinetics data, the estimated values of the h_0 parameter of *S. Enteritidis* were 1.81, 0.96, 0.80, 0.00 and 0.00, with a mean value ($h_{0,av}$) equal to 0.71 (± 0.68), and of *E. coli* were 2.16, 2.07, 1.79, 1.78 and 1.97, with $h_{0,av}$ equal to 1.96 (± 0.17). Then, with the fixed $h_{0,av}$, the other growth parameters were estimated (μ_{max} , y_0 , and y_{max}) and their

values are shown in Table 3. The kinetic growth datasets with the fitting of the Baranyi and Roberts model are shown in Figure 1.

Table 3 shows the effect of CBEO application on *E. coli* and *S. Enteritidis* has low significance, i.e., these bacterial species maintained their growth capacity, regardless of the presence and amount of essential oil in the culture medium at the concentrations studied (0.9 to 4.51 mg/mL). The maximum specific growth rate of *S. Enteritidis* in the control sample (without CBEO) was higher (0.628 1/h) than curves in which CBEO was added (0.433 1/h \pm 0.027). For *E. coli*, the maximum specific growth rates in the control sample and samples with lower concentrations of CBEO (0.9 and 1.8 mg/mL) were similar (0.883 1/h \pm 0.008) and higher than samples in which CBEO was added in higher concentrations (0.825 and 0.785 1/h to 2.71 and 4.51 mg/mL, respectively). The values of y_{max} follow a similar trend of μ_{max} values as a function of CBEO concentrations. Microbial species reached the maximum concentration of cells in all samples (control and added of CBEO) in approximately 12 hours of cultivation.

Table 3. Calculated time for five decimal reductions (5DR) and estimated parameters (δ , μ_{max} , and y_{max}) (\pm 95% confidence intervals) of the fitting of Weibull and Baranyi and Roberts primary models to the kinetic inactivation and growth data of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* at different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO).

(continua)

Microbial specie	CBEO (mg/mL)	Inactivation parameters			Growth parameters	
		y_0	δ	5DR	μ_{max}	y_{max}
<i>E. coli</i> ($h_{0,av} = 1.96$)	0.00	5.15 (\pm 0.14)	-	-	0.891 (\pm 0.052)	9.23 (\pm 0.13)
	0.90	5.13 (\pm 0.21)	-	-	0.875 (\pm 0.075)	9.25 (\pm 0.20)
	1.80	5.19 (\pm 0.15)	-	-	0.884 (\pm 0.055)	9.21 (\pm 0.14)
	2.71	5.16 (\pm 0.32)	-	-	0.825 (\pm 0.100)	9.14 (\pm 0.29)
	4.51	5.29 (\pm 0.32)	-	-	0.785 (\pm 0.115)	8.99 (\pm 0.33)
<i>S. Enteritidis</i> ($h_{0,av} = 0.71$)	0.00	4.96 (\pm 0.46)	-	-	0.628 (\pm 0.135)	9.45 (\pm 0.58)
	0.90	5.15 (\pm 0.53)	-	-	0.467 (\pm 0.141)	9.88 (\pm 1.96)
	1.80	5.25 (\pm 0.63)	-	-	0.409 (\pm 0.165)	10.84 (\pm 8.71)
	2.71	5.35 (\pm 0.65)	-	-	0.412 (\pm 0.177)	10.17 (\pm 4.44)
	4.51	5.24 (\pm 0.70)	-	-	0.443 (\pm 0.196)	9.63 (\pm 2.60)
<i>L. monocytogenes</i> ($h_{0,av} = 1.44$, $p_{av} = 0.74$)	0.00	4.99 (\pm 0.71)	-	-	0.468 (\pm 0.340)	9.25 (\pm 1.46)
	0.90	5.21 (\pm 0.24)	1.91 (\pm 0.27)	16.8	-	-
	1.80	5.45 (\pm 0.39)	1.38 (\pm 0.33)	12.1	-	-
	2.71	4.39 (\pm 0.28)	1.09 (\pm 0.20)	9.59	-	-
	4.51	4.57 (\pm 0.57)	0.80 (\pm 0.25)	7.04	-	-

Table 3. Calculated time for five decimal reductions (5DR) and estimated parameters (δ , μ_{max} , and y_{max}) (\pm 95% confidence intervals) of the fitting of Weibull and Baranyi and Roberts primary models to the kinetic inactivation and growth data of *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* at different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO).

(conclusão)

Microbial specie	CBEO (mg/mL)	Inactivation parameters			Growth parameters	
		y_0	δ	5DR	μ_{max}	y_{max}
<i>S. aureus</i> ($h_0 = 2.22$, $p_{av} = 1.11$)	0.00	5.24 (\pm 0.32)			0.791 (\pm 0.300)	9.18 (\pm 0.24)
	0.90	5.29 (\pm 0.86)	1.80 (\pm 0.68)	7.69	-	-
	1.80	5.13 (\pm 0.15)	1.77 (\pm 0.11)	7.55	-	-
	2.71	5.00 (\pm 0.38)	1.78 (\pm 0.34)	7.59	-	-
	4.51	5.07 (\pm 0.35)	1.44 (\pm 0.25)	6.14	-	-
<i>L. mesenteroides</i> ($h_0 = 0.71$, $p_{av} = 1.49$)	0.00	5.64 (\pm 0.15)			0.619 (\pm 0.122)	9.26 (\pm 0.15)
	0.90	5.47 (\pm 0.22)	4.24 (\pm 0.36)	12.5	-	-
	2.71	5.37 (\pm 1.00)	1.90 (\pm 0.40)	5.60	-	-
	4.51	5.58 (\pm 1.21)	1.51 (\pm 0.47)	4.45	-	-
<i>W. viridescens</i> ($h_0 = 0.52$, $p_{av} = 1.52$)	0.00	5.51 (\pm 0.26)			0.560 (\pm 0.138)	9.42 (\pm 0.20)
	0.90	5.43 (\pm 0.19)	2.19 (\pm 0.17)	6.31	-	-
	1.80	5.84 (\pm 0.57)	1.32 (\pm 0.29)	3.81	-	-
	2.71	5.47 (\pm 0.79)	0.88 (\pm 0.24)	2.54	-	-
	4.51	5.32 (\pm 0.72)	0.81 (\pm 0.18)	2.34	-	-

The increase in concentrations from 1% to 2% (v/v) of the active components carvacrol, cinnamaldehyde, and thymol present in the essential oil was not associated with a significant decrease in the concentration of *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *E. coli* in chicken tawook stored at 4 °C (Osaili et al., 2021). Complementarily, food matrices and microbial interactions are factors that can influence the probability of *Salmonella* cell growth (Carrasco et al., 2012). Gomes (2017) modeled the growth kinetics of *Salmonella* spp. in the presence of subinhibitory concentrations of carvacrol and observed synergism between carvacrol and the temperature of 15 °C since at that the increase in carvacrol concentration was proportional to the decrease in the growth rate. Melo et al. (2013) evaluated the effectiveness of the essential oil from *C. blanchetianus* leaves on *S. Enteritidis* and observed an exponential reduction in the microbial population between 0 to 8 h of application, followed by a lower reduction effect. Yilmaz (2011) observed remarkable delaying effects on the growth of *Salmonella* Typhimurium in rainbow trout added to the essential oils of oregano and thyme and stored under aerobic, modified atmosphere, and vacuum packaging conditions.

The values of the p parameter of the Weibull inactivation model, which corresponds to the form factor, were estimated for each inactivation curve. The estimated p values at concentrations of 0.90, 1.80, 2.71, and 4.51 mg/mL were: 1.37, 2.28, 1.27, and 1.16, respectively, for *W. viridescens*; 0.67, 0.68, 0.76, and 0.85, respectively, for *L. monocytogenes*; and 1.55, 1.06, 0.88, and 0.93, respectively, for *S. aureus*. For *L. mesenteroides*, p values of 1.27, 1.27, and 1.93 were estimated by the fits in concentrations of 0.90, 2.71, and 4.51 mg/mL, respectively.

When the values of the p parameter are similar, the arithmetic mean can be applied in the modeling. Haberbeck et al. (2012) modeled the thermochemical inactivation (oregano essential oil and heat) of *Bacillus coagulans* spores in nutrient broth, and they observed that the p values were close, and calculated a mean value for it. Thus, the mean (\pm standard deviation) of the p values (p_{av}) of 1.52 (\pm 0.44), 0.74 (\pm 0.07), 1.11 (\pm 0.27), and 1.49 (\pm 0.31) were calculated for *W. viridescens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *L. mesenteroides*, respectively. Then, the Weibull model was fitted to the inactivation data with the fixed value of p , and δ and y_0 parameters were estimated again. The results are shown in Table 3, in which the higher the CBEO concentration, the shorter the time required for the first decimal reduction (δ) of the microorganisms studied.

The inactivation curves (Figure 1) of *W. viridescens*, *S. aureus*, and *L. mesenteroides* showed a downward concavity ($p > 1$). It indicates that the time required to inactivate an equal fraction of microorganisms decreases over time, i.e., the resistance of these bacteria to the CBEO is progressively lower (Aragão et al., 2007; Peleg, 2006). On the other hand, the inactivation curves of *L. monocytogenes* showed an upward concavity ($p < 1$), indicating that the resistance of this species to the CBEO is progressively higher, which means a further concern for food safety.

The values of the δ parameter of *L. mesenteroides* were higher than those for *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *W. viridescens* at all concentrations (Table 3), indicating this species has higher initial resistance to the CBEO. *L. monocytogenes* and *W. viridescens* showed similar values of the δ parameter, with lower initial resistance to the CBEO than *S. aureus*. On the other hand, the calculated times for five decimal reductions (5DR) of *L. monocytogenes* were higher than those for *L. mesenteroides*, *S. aureus*, and *W. viridescens* at all concentrations (Table 3), indicating that *L. monocytogenes* showed higher resistance along the inactivation time. These four species were reduced by five log cycles in less than seventeen hours of contact with CBEO, even at the lowest concentration (0.90 mg/mL). *L. mesenteroides* has a more efficient energy metabolism when compared to *W. viridescens* (Diez et al., 2009), which may also provide this species with higher resistance to inactivation.

The inactivation of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in whole milk were observed in the first hours of contact (up to ten hours) with the microencapsulated pink pepper oil, with reductions of 2 and 5 log CFU/mL, respectively (Locali-Pereira et al., 2020). Buldain et al. (2021) modeled the effect of *Melaleuca armillaris* essential oil on *S. aureus* responses under different pH conditions; they found that the essential oil has good antimicrobial activity against *S. aureus*.

De Oliveira et al. (2013) used the Weibull model to model the inactivation of *S. Enteritidis* with the addition of natural antimicrobials, such as oregano (*Origanum vulgare*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils, from *in vitro* tests and a food model (ground meat) during refrigerated storage (4 ± 2 °C). The authors pointed out that essential oils did not provide complete protection against *Salmonella*, but oils can be used in synergy with other preservation techniques, such as refrigeration, to increase the barrier to bacterial growth.

Plant-derived active antimicrobials used against *L. monocytogenes* (Kawacka et al., 2020) and *S. aureus* (Buldain et al., 2021) have been reported in food model

systems, and the results of the present study indicate the antimicrobial potential of CBEO to the control of *L. monocytogenes* and *S. aureus in vitro*.

Essential oils have been applied in products subjected to different processing technologies. Haberbeck et al. (2012) observed increased inactivation of *B. coagulans* spores through the application of oregano essential oil and heat compared to only thermal treatments. Evrendilek and Balasubramaniam (2011) evaluated the combined effect of high-pressure processing and the addition of peppermint essential oil for inactivation of *L. monocytogenes* and *Listeria innocua* in dairy beverages, concluding that the addition of the oil increased the inactivation of pathogens and helped to preserve products sensitive to temperature and pressure. Yousefi et al. (2020) pointed out that essential oils could potentially be used as a substitute for chemical preservatives in meat and poultry products to mitigate or inhibit the growth of *L. monocytogenes*. However, the negative effect of high concentrations of essential oils on the organoleptic properties of meat and poultry products must be carefully considered. Thus, the effect of CBEO on bacterial inactivation can be potentiated with the application of other treatment technologies, which can be used as an even more effective barrier against bacteria.

3.2.2 Secondary modeling

The square-root, hyperbolic, exponential, and power equations (secondary models), Equations (7) to (10), respectively, were fitted to the data to describe the influence of the CBEO concentrations on the δ parameter of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens*. The secondary models were not fitted to the μ_{max} parameter values of *E. coli* and *S. Enteritidis*, considering the discussion of the previous section. The statistical results of all the fits are shown in Table 4.

Table 4. Model parameters (\pm 95% confidence intervals) and statistical indexes of the fitting of different secondary models to the δ parameter of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* at different concentrations of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO).

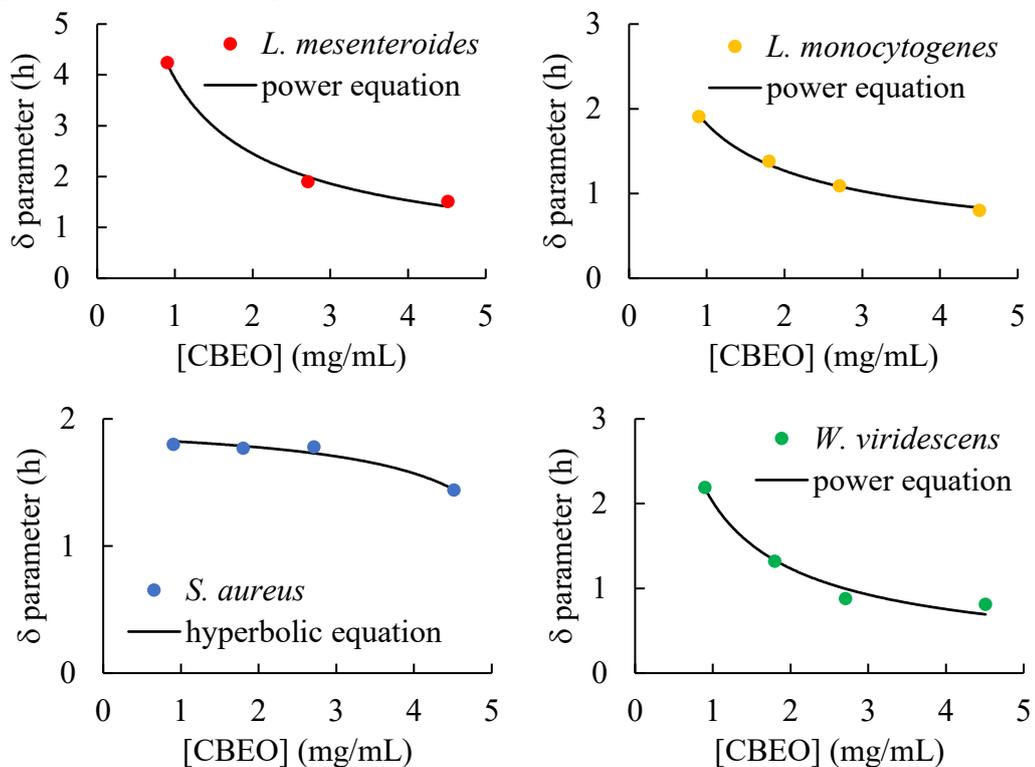
Microbial specie	Model	Parameters		Statistical indexes	
		<i>par</i> ^a	<i>par</i> ^b	<i>R</i> ²	<i>RMSE</i>
<i>L. monocytogenes</i>	Square-root	-0.13 (\pm 0.10)	1.45 (\pm 0.29)	0.939	0.063
	Hyperbolic	1.75 (\pm 0.96)	5.53 (\pm 1.98)	0.634	0.351
	Exponential	2.34 (\pm 0.75)	-0.26 (\pm 0.16)	0.969	0.101
	Power	1.82 (\pm 0.13)	-0.52 (\pm 0.11)	0.996	0.037
<i>S. aureus</i>	Square-root	-0.04 (\pm 0.06)	1.40 (\pm 0.17)	0.805	0.037
	Hyperbolic	2.01 (\pm 0.13)	6.28 (\pm 0.77)	0.962	0.041
	Exponential	1.96 (\pm 0.50)	-0.06 (\pm 0.10)	0.782	0.098
	Power	1.84 (\pm 0.48)	-0.11 (\pm 0.29)	0.582	0.136
<i>L. mesenteroides</i>	Square-root	-0.23 (\pm 1.07)	2.18 (\pm 3.31)	0.881	0.216
	Hyperbolic	3.43 (\pm 14.1)	5.02 (\pm 6.41)	0.469	1.521
	Exponential	5.65 (\pm 11.8)	-0.34 (\pm 1.13)	0.952	0.460
	Power	3.93 (\pm 1.51)	-0.68 (\pm 0.64)	0.996	0.138
<i>W. viridescens</i>	Square-root	-0.15 (\pm 0.25)	1.49 (\pm 0.71)	0.767	0.157
	Hyperbolic	1.76 (\pm 1.64)	5.51 (\pm 3.25)	0.402	0.601
	Exponential	2.89 (\pm 2.42)	-0.37 (\pm 0.47)	0.881	0.268
	Power	2.02 (\pm 0.41)	-0.71 (\pm 0.35)	0.978	0.117

^aParameters *a*, *c*, *e*, or *g*, according to the secondary model.

^bParameters *b*, *d*, *f*, or *h*, according to the secondary model.

The power equation fitted better to the data of the δ parameter of *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* than square-root, hyperbolic, and exponential equations (Table 4), with higher R^2 and lower $RMSE$ values, and narrower confidence intervals of model parameters. For the δ parameter of *S. aureus*, the hyperbolic equation fitted better to the data than the others. Therefore, these equations that fitted better to the data were established as secondary models of the δ parameter. The data and the fitted curves are shown in Figure 2.

Figure 2. δ parameter values (symbols) of *L. mesenteroides*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *W. viridescens* at different concentrations (0.9 to 4.51 mg/mL) of *C. blanchetianus* essential oil (CBEO), and the fitting (continuous lines) of the power and hyperbolic secondary models.



The fitted curves of the power equation to the values of the δ parameter of *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* showed an upwards concavity ($h < 0$). Then, the time for the first decimal reduction of these bacteria is progressively lower with higher CBEO concentration. Thus, CBEO concentrations higher than 4.51 mg/mL would not result in a significant decrease in the δ parameter values.

4. Conclusion

Croton blanchetianus essential oil (CBEO) showed an inactivation inhibitory effect against pathogenic (*L. monocytogenes* and *S. aureus*) and spoilage (*W. viridescens* and *L. mesenteroides*) bacterial species at all applied concentrations (0.90 to 4,51 mg/mL). For *S. Enteritidis* and *E. coli* species, the CBEO inhibitory effect was less pronounced. Although the growth rates of these species were reduced, the application of CBEO was not able to inactivate them at the applied concentrations.

The primary models of Baranyi and Roberts, and Weibull were able to describe better the experimental kinetic curves of microbial growth and inactivation, respectively, in all conditions tested than the log-linear with shoulder and modified Gompertz models. The impact of the CBEO concentration on the estimated values of the δ parameter was better described by the empirical power equation (for *L. mesenteroides*, *L. monocytogenes*, and *W. viridescens*) and hyperbolic equation (for *S. aureus*) than other empirical ones, being these equations established as secondary models.

The calculated times for five decimal reductions (5DR) of *L. mesenteroides* were higher than *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *W. viridescens* at all concentrations of CBEO tested, indicating this species is more resistant to the CBEO. *L. monocytogenes* and *W. viridescens* showed similar values of the δ parameter and the 5DR times, with lower resistance to the CBEO than *S. aureus*. In general, these four species were reduced by five log cycles in less than seventeen hours of contact with CBEO, even at the lowest concentration (0.90 mg/mL).

The developed predictive models should be useful in spoilage and safety analysis on CBEO addition in foods. The effect of CBEO on bacterial inactivation can be potentiated with the application of other treatment technologies, which can be used as an even more effective barrier against bacteria. Furthermore, the negative effect of high concentrations of essential oils on the organoleptic properties of meat and poultry products must be carefully considered.

References

- Angélico, E., Rodrigues, O., Costa, J., Lucena, M., Queiroga Neto, V., Medeiros, R., 2014. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and *Crotons* varieties modulator in the Brazilians Northeast semiarid. *African Journal of Plant Science* 8, 392–397. <https://doi.org/10.5897/AJPS2014.1198>
- Aragão, G.M.F., Corradini, M.G., Normand, M.D., Peleg, M., 2007. Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 119, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.004>
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26, 199–218. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Brazilian Health Regulatory Agency, 2019. Determination of volatile oils. Brazilian Pharmacopoeia.
- Bruno, L.M., 2011. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias ácido-Lácticas. Brasília, DF.
- Buldain, D., Gortari Castillo, L., Marchetti, M.L., Julca Lozano, K., Bandoni, A., Mestorino, N., 2021. Modeling the Growth and Death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* Essential Oil at Different pH Conditions. *Antibiotics* 10, 222. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020222>
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control* 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Carrasco, E., del Rosal, S., Racero, J.C., García-Gimeno, R.M., 2012. A review on growth/no growth *Salmonella* models. *Food Research International* 47, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.006>
- Cordeiro, I., Secco, R., Carneiro-Torres, D., Lima, L., Caruzo, M., Berry, P., Riina, R., Silva, O., Silva, M., Sodr e, R., 2015. *Croton*. Rio de Janeiro/RJ.
- Costa, J.G.M. da, Rodrigues, F.F.G., Angélico, E.C., Pereira, C.K.B., Souza, E.O. de, Caldas, G.F.R., Silva, M.R., Santos, N.K.A., Mota, M.L., Santos, P.F. dos, 2008. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 583–586. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400015>
- Coy Barrera, C.A., 2016. Importancia medicinal del género *Croton* (*euphorbiaceae*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; Vol. 21, No. 2 (2016): Abril-Junio.

- Dalcanton, F., Pérez-Rodríguez, F., Posada-Izquierdo, G.D., de Aragão, G.M.F., García-Gimeno, R.M., 2013. Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* and shelf life of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures. *International Journal of Food Science & Technology* 48, 2580–2587. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12252>
- de Oliveira, T.L.C., Soares, R. de A., Piccoli, R.H., 2013. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science* 93, 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.004>
- Diez, A.M., Björkroth, J., Jaime, I., Rovira, J., 2009. Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de Burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Food Microbiology* 131, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.019>
- Evrendilek, G.A., Balasubramaniam, V.M., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. *Food Control* 22, 1435–1441. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.005>
- Fernández, A., López, M., Bernardo, A., Condón, S., Raso, J., 2007. Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* 24, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.017>
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., van Impe, J.F., 2005. GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038>
- Ghabraie, M., Vu, K.D., Tata, L., Salmieri, S., Lacroix, M., 2016. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology* 66, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>
- Gomes, E., 2017. Cinética do crescimento de *Salmonella* spp. na presença de concentrações subinibitórias de carvacrol.
- Gottlieb, O.R., Magalhães, M.T., 1960. Modified distillation trap. *Chemist Analyst* 4, 49–114.
- Haberbeck, L.U., Alberto da Silva Riehl, C., de Cássia Martins Salomão, B., Falcão de Aragão, G.M., 2012. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Science and Technology* 46, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.021>
- Huang, L., 2017. IPMP Global Fit – A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 262, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.010>
- Instituto Adolfo Lutz, 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz.

- Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., Sip, A., 2020. Natural Plant-Derived Chemical Compounds as *Listeria monocytogenes* Inhibitors In Vitro and in Food Model Systems. *Pathogens* 10, 12. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010012>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., de Cesare, A., Herman, L., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jacxsens, L., Skjerdal, T., da Silva Felicio, M.T., Hempen, M., Messens, W., Lindqvist, R., 2020. Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). *EFSA Journal* 18. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6306>
- Locali-Pereira, A.R., Lopes, N.A., Menis-Henrique, M.E.C., Janzantti, N.S., Nicoletti, V.R., 2020. Modulation of volatile release and antimicrobial properties of pink pepper essential oil by microencapsulation in single- and double-layer structured matrices. *International Journal of Food Microbiology* 335, 108890. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108890>
- Longhi, D.A., Dalcanton, F., Aragão, G.M.F.D., Carciofi, B.A.M., Laurindo, J.B., 2013. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. *Journal of Theoretical Biology* 335. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.06.030>
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00624-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00624-9)
- McKellar, R., Lu, X., 2004. Primary models, in: McKellar, R., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Foods*. CRC Press, Boca Raton, pp. 33–74.
- Melo, G., 2011. Estudo da composição química e da atividade antibacteriana in vitro e em alimentos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill.
- Melo, G.F. do A., Costa, A.C.V. da, Garino Junior, F., Medeiros, R.S., Madruga, M.S., Queiroga Neto, V., 2013. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 1189–1194. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000009>
- Menezes, N.M.C., Martins, W.F., Longhi, D.A., de Aragão, G.M.F., 2018. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. *Meat Science* 139. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.017>
- Moarefian, M., Barzegar, M., Sattari, M., 2013. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. *Journal of Food Biochemistry* 37, 62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00600.x>
- Osaili, T.M., Hasan, F., Dhanasekaran, D.K., Obaid, R.S., Al-Nabulsi, A.A., Ayyash, M., Karam, L., Savvaidis, I.N., Holley, R., 2021. Effect of active essential oils added to chicken tawook on the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during storage. *International Journal of Food Microbiology* 337, 108947. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108947>

Peleg, M., 2006. Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation, Taylor & F. ed. Boca Raton.

Pinho-da-Silva, L., Mendes-Maia, P.V., do Nascimento Garcia, T.M., Cruz, J.S., de Moraes, S.M., Coelho-de-Souza, A.N., Lahlou, S., Leal-Cardoso, J.H., 2010. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine* 17, 721–725. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.01.015>

Ribeiro, S.M., Bonilla, O.H., Lucena, E.M.P., 2018. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. *Iheringia, Série Botânica*. 73, 31–38.

Ríos-Castillo, A.G., Ripolles-Avila, C., Rodríguez-Jerez, J.J., 2021. Evaluation of bacterial population using multiple sampling methods and the identification of bacteria detected on supermarket food contact surfaces. *Food Control* 119, 107471. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107471>

Rosberg, A.K., Darlison, J., Mogren, L., Alsanius, B.W., 2021. Commercial wash of leafy vegetables do not significantly decrease bacterial load but leads to shifts in bacterial species composition. *Food Microbiology* 94, 103667. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103667>

Ross, T., Dalgaard, P., 2004. Secondary models, in: McKellar, R., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Foods*. CRC Press, Boca Raton, pp. 75–162.

Tintino, S., Lucena, B., Figueiredo, F., Oliveira, C., Aguiar, J., Cardoso, E., Aquino, E., Andrade, J., Coutinho, H., Matias, E., 2014. Evaluation of Antibacterial Activity of Aminoglycosides and Modulating the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Acta Biológica Colombiana* 20, 39–45. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673>

Torres, M. da C. de M., Luz, M.A. da, Oliveira, F.B. de, Barbosa, A.J.C., Araújo, L.G. de, 2021. Chemical composition of essential oil from *Croton heliotropiifolius* Kunth (*euphorbiaceae*) leaves. *Brazilian Journal of Development* 7, 15862–15872. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-284>

Trindade, J.K.M., Trindade, Í.T.M., Abegg, M.A., Corrêa, G.M., Carmo, D.F. de M. do, 2021. Perfil químico e atividade antimicrobiana do óleo essencial de variedades de *Psidium guajava* L. (*Myrtaceae*). *Research, Society and Development* 10, e211101018794. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18794>

Vasconcelos, E.C. de, Ferreira, M., Menezes, R., Muniz, C., da Silva, L., Figueiredo, E., Aragão, G., 2022. Potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano do extrato aquoso do processo de extração do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* Baill. *Scientia Plena* 17. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.121501>

Vasconcelos, E.C. de, Paganini, C.C., Figueiredo, E.A.T. de, Aragão, G.M.F. de, 2021. Ação antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill. *Research, Society and Development* 11, e28011124785. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24785>

Whiting, R., Buchanan, R., 1993. A classification of models in predictive microbiology - a reply to K. R. Davey. *Food Microbiology* 10, 175–177.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1017>

Yilmaz, M., 2011. Identifiability of Baranyi model and comparison with empirical models in predicting effect of essential oils on growth of *Salmonella* Typhimurium in rainbow trout stored under aerobic, modified atmosphere and vacuum packed conditions. *African Journal of Biotechnology* 10, 7468–7479.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.823>

Yousefi, M., Khorshidian, N., Hosseini, H., 2020. Potential Application of Essential Oils for Mitigation of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Products. *Frontiers in Nutrition* 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577287>

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56, 1875–81.
<https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>

5.4.1 Informação complementar

5.4.1.1 Resultado e discussão

5.4.1.1.1 Índice estatístico

Na Tabela 5.4.1.1 mostra os índices estatísticos fator tendência e fator exatidão (Equações 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente), calculados para avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais da ação do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* a capacidade preditiva do modelo primário Weibull com fator de forma fixo igual das bactérias, *W. viridescens* ($p = 1,52$), *L. mesenteroides* ($p = 1,49$), *L. monocytogens* ($p = 0,76$), *S. aureus* ($p = 1,11$) e os índices estatísticos da amostra controle ajustado pelo modelo Baranyi e Roberts.

Tabela 5.4.1.1 – Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Weibull p fixo aos dados experimentais sob diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* e do modelo Baranyi e Roberts aos dados do controle, sobre *W. viridescens* ($p = 1,52$), *L. mesenteroides* ($p = 1,49$), *L. monocytogenes* ($p = 0,76$), *S. aureus* ($p = 1,11$).

Microrganismo	Óleo essencial (mg/mL)	Índices estatísticos	
		Fator bias	Fator exatidão
<i>W. viridescens</i>	0,00	1,000	1,001
	0,90	0,999	1,036
	1,80	0,998	1,046
	2,71	0,997	1,079
	4,51	0,990	1,085
<i>L. mesenteroides</i>	0,00	1,000	1,003
	0,90	0,995	1,052
	2,71	1,032	1,038
	4,51	1,016	1,069
<i>L. monocytogenes</i>	0,00	1,004	1,015
	0,90	0,996	1,061
	1,80	0,974	1,056
	2,71	1,023	1,053
	4,51	1,011	1,042
<i>S. aureus</i>	0,00	0,999	1,008
	0,90	1,006	1,054
	1,80	0,999	1,010
	2,71	0,997	1,060
	4,51	0,998	1,042

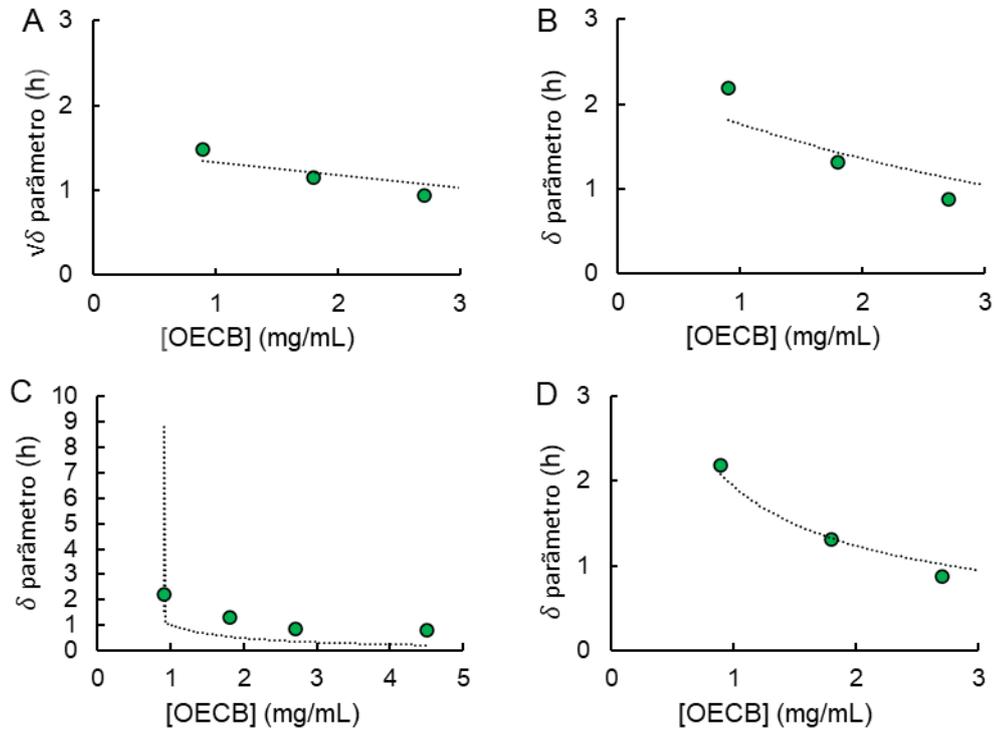
Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores demonstram que os modelos apresentam um bom ajuste, além de uma alta capacidade preditiva, com valores de fator bias e exatidão muito próximos de um, indicando que os valores preditos são praticamente iguais, ou muito próximos, dos valores observados, para as bactérias estudadas.

5.4.1.1.2 Modelo secundário

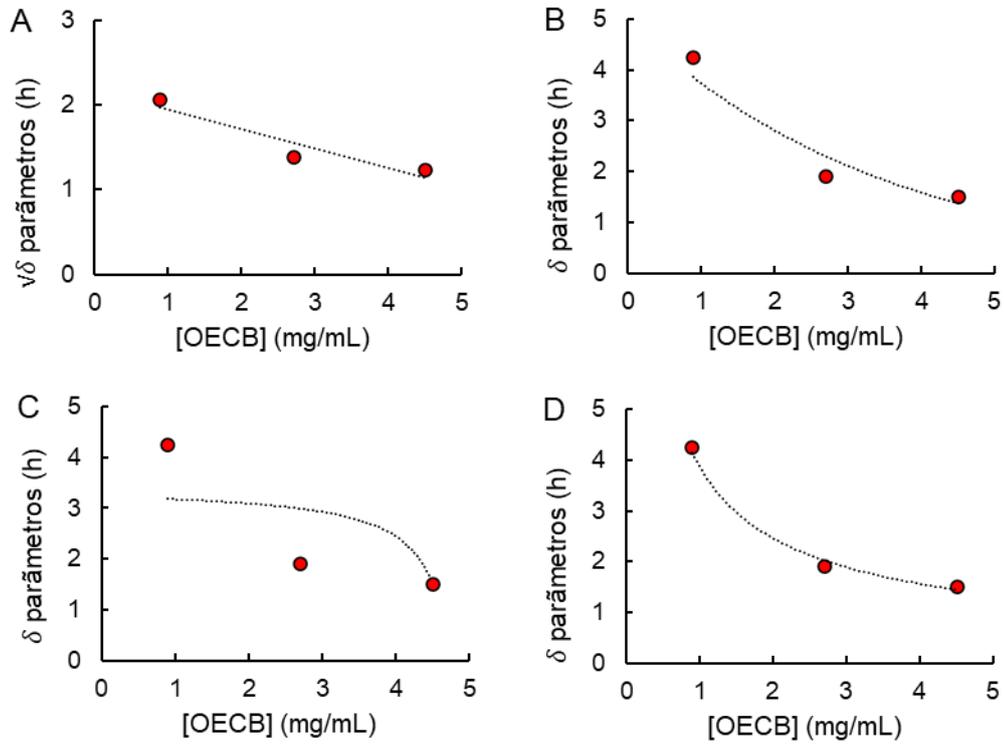
Para a escolha do modelo secundário, que descreve como o δ varia em função da concentração do óleo essencial, comparou-se o ajuste dos modelos raiz quadrada, exponencial, hiperbólica e potência, equações descritas no item 3.4.2, aos dados experimentais de *W. viridescens* (Figura 5.4.1.1), *L. mesenteroides* (Figura 5.4.1.2), *L. monocytogenes* (Figura 5.4.1.3) e *S. aureus* (Figura 5.4.1.4) ao parâmetro do modelo.

Figura 5.4.1.1 – Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o parâmetro primário δ (h) da *W. viridescens*. Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* as linhas contínuas o ajuste dos modelos.



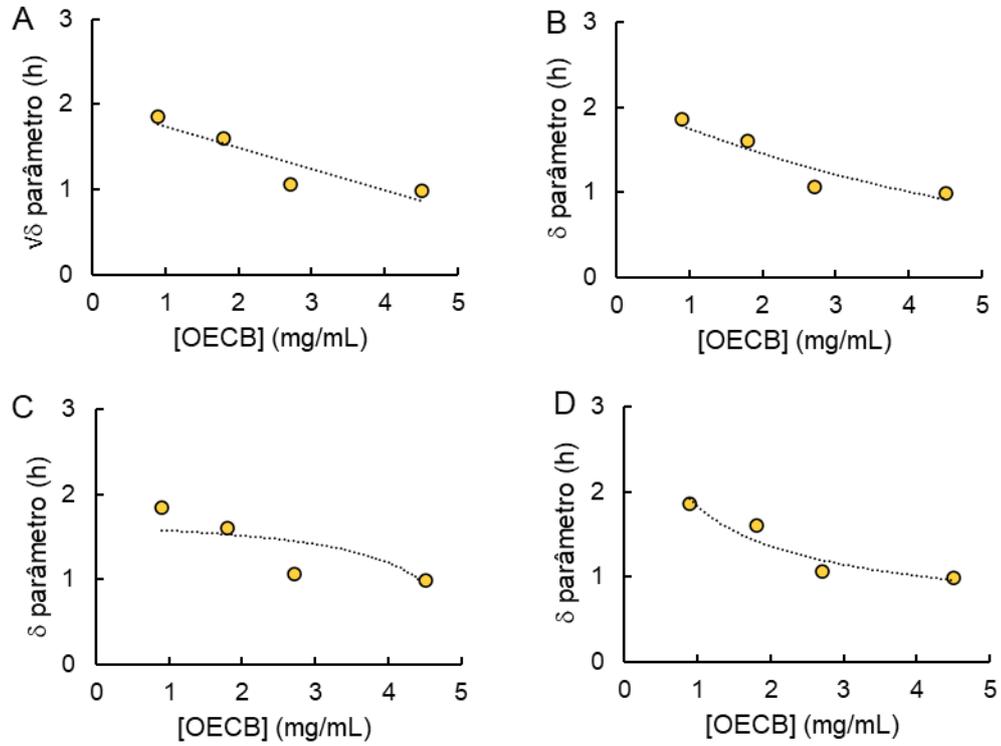
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.4.1.2 – Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o parâmetro primário δ (h) da *L. mesenteroides*. Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* as linhas contínuas o ajuste dos modelos.



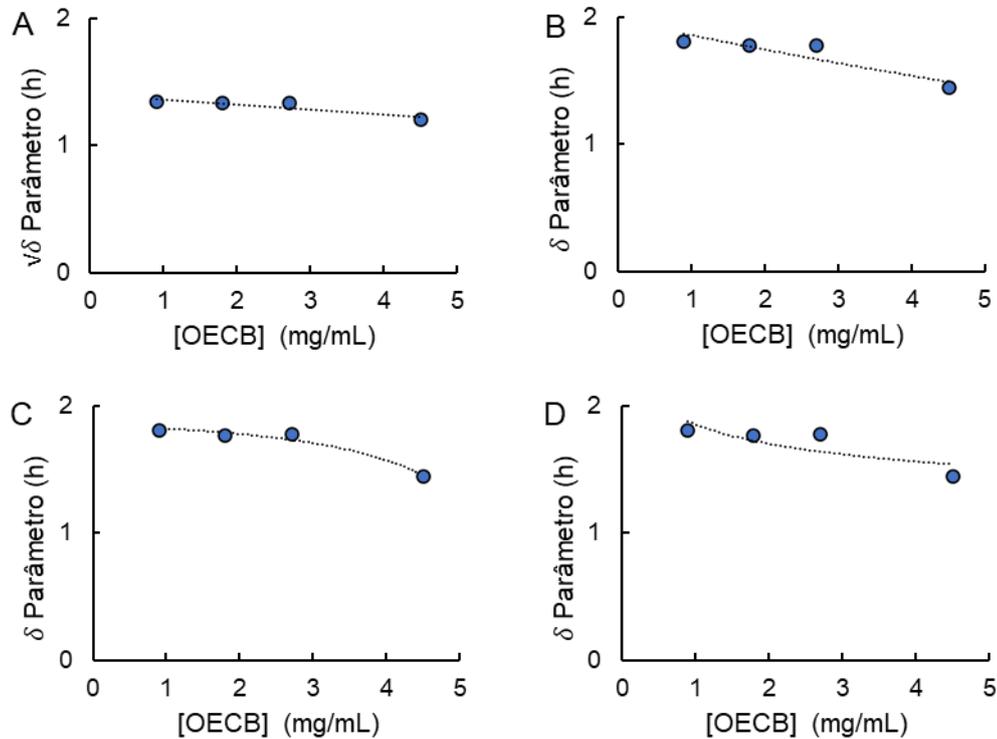
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.4.1.3 – Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o parâmetro primário δ (h) da *L. monocytogenes*. Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* as linhas contínuas o ajuste dos modelos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.4.1.4 – Ajuste do modelo secundário (A) raiz quadrada, (B) exponencial, (C) hiperbólica e (D) potência, para descrever a influência da concentração do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre o parâmetro primário δ (h) da *S. aureus*. Os marcadores representam as diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* as linhas contínuas o ajuste dos modelos.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.1.1.3 Avaliação do pH

O pH inicial do meio MRS é aproximadamente de $6,5 \pm 0,2$ (ZIMBRO et al., 2009) e os valores do pH final dos meios de cultivos das BAL em diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus*, bem como do meio de cultivo controle estão apresentados na Tabela 5.4.1.2.

Tabela 5.4.1.2 -- Média dos valores de pH e seus respectivos desvio padrão, dos meios de cultivos da *W. viridescens* e *L. mesenteroides* com diferentes concentrações do óleo essencial de *C. blanchetianus* e do meio de cultivo controle.

Microrganismo	Óleo essencial (mg/mL)	pH
<i>W. viridescens</i>	0,00	4,67 ± 0,230
	0,90	6,07 ± 0,460
	1,80	6,31 ± 0,071
	2,71	6,23 ± 0,072
	4,51	6,25 ± 0,067
<i>L. mesenteroides</i>	0,00	4,97 ± 0,520
	0,90	6,30
	2,71	6,16 ± 0,134
	4,51	6,23

Fonte: Elaborada pela autora.

O valor do pH final do meio de cultivo adicionado do óleo essencial de *C. blanchetianus* ficou em torno de 6,0, para ambas as BAL estudadas, o que reflete o efeito inibitório das diferentes concentrações do óleo essencial no crescimento da *W. viridescens* e da *L. mesenteroides*. E o valor baixo, de pH 4,67 para a *W. viridescens* e 4,97 para *L. mesenteroides*, no meio de cultivo controle mostra o crescimento microbiana da BAL inoculada.

5.4.1.2 Conclusão

A ação do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre as bactérias deteriorantes, *W. viridescens* e *L. mesenteroides* apresentou uma cinética de inibição, em todas as concentrações de óleo essencial testada (0,90 a 4,51 mg/mL). O fato do valor do pH final do meio de cultivo está em torno de 6, o que reflete o efeito inibitório do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre a *W. viridescens* e *L. mesenteroides*.

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do potencial bioativo, especialmente antimicrobiano, do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* BAILL

O material botânico utilizado foi identificado como *C. blanchetianus* Baill, popularmente conhecido como “marmeleiro” e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, da UFC (# 62200).

O óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*, extraído pela técnica de hidrodestilação, e o extrato aquoso, coletado durante a extração, caracterizam-se pela presença dos compostos bioativos: fenólicos, taninos e flavonoides, tanto nos extratos aquosos obtidos das folhas frescas como nos obtidos das folhas secas do *C. blanchetianus*. O extrato aquoso proveniente das folhas frescas e secas apresenta atividade antimicrobiana sobre os microrganismos Gram-positivos (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e ausência de atividade antimicrobiana sobre os microrganismos Gram negativos (*S. Enteritidis* e *E. coli*). A concentração bactericida mínima do extrato de *C. blanchetianus* provocou uma alteração na morfologia das células de *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

A determinação da composição química do óleo essencial de *C. blanchetianus* mostra a presença dos mesmos compostos majoritários (eucaliptol, biciclogermacreno, E-cariofileno, α -pineno, espatulenol e sativeno) nos óleos essenciais proveniente das folhas frescas, secas, com e sem armazenamento. Há uma predominância dos compostos químicos voláteis eucalyptol e o D- α -pineno no óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*, na análise por CG MS (*headspace*).

De modo geral, as bactérias patogênicas estudadas no presente trabalho apresentam menor resistência ao óleo essencial proveniente das folhas secas, quando analisado pela técnica da difusão em ágar. A CMI da *L. monocytogenes* e *S. aureus*, foi 2,26 mg/mL e 1,35 mg/mL, respectivamente. Não foi observado do efeito bactericida para a *L. monocytogenes* e *S. aureus* e atividade antimicrobiana para *E. coli* na faixa das concentrações do OECEB estudadas. Foi evidenciada atividade

antimicrobiana, bacteriostática e bactericida do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* frente as BAL *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, tanto na fase líquida como na de fase vapor. A CIM do OECB para as BAL foi 2,71 mg/mL e 6,77 mg/mL e a CBM foi 6,77 mg/mL e 13,54 mg/mL para *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, respectivamente. A DMI para ambas as BAL estudadas foram de 0,32 g/mL.

A avaliação da toxicidade do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* pelo bioensaio frente aos náuplios *Artemia salina* Leach mostra efeito considerado moderadamente tóxico ($CL_{50} = 326 \mu\text{g/mL}$). Assim, é preciso realizar testes complementares mais específicos para a determinação das concentrações consideradas seguras para uso do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*.

Os modelos primários de Baranyi e Roberts e Weibull são capazes de descrever as curvas cinéticas experimentais de crescimento e inativação microbiana, respectivamente, em todas as condições testadas, comparados aos modelos log-linear com ombro e Gompertz modificado.

Os resultados apresentados nesse trabalho contribuem para mostrar a potencialidade de aplicação do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas do *C. blanchetianus* como fontes alternativas de compostos antimicrobianos e compostos bioativos com ação antioxidante no extrato aquoso, destacando-se por serem produtos naturais.

Como indicação de trabalhos futuros, sugere-se o estudo da ação do óleo essencial e o extrato aquoso de *C. blanchetianus* sobre os microrganismos sobre os quais quase que apresentaram efeito inibitório, numa matriz alimentar, na forma de microemulsão ou nanopartículas.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, E. et al. Predictive modeling of survival/death of *Listeria monocytogenes* in liquid media: Bacterial responses to cinnamon essential oil, ZnO nanoparticles, and strain. **Food Control**, v. 73, p. 954-965, 2017.

ABREU, A. S. et al. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton Pullei* var. *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**. v. 1, n. 2, p. 1-9, jul. 2001. Disponível em: <http://www.ufpa.br/revistaic>. Acesso em: 18 jul. 2019.

ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: Importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 398-406, ago./dez. 2013.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed. Allured Publ.: Carol Stream, IL, 2017.

ADEOGUN, O. O.; MAROYI, A.; AFOLAYAN, A. J. Variation in the chemical composition of essential oils from *Artemisia afra* (Jacq) ex-Wild leaf obtained by different methods and the effect of oil extracts on *Artemia salina* L. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 3, p. 519-528, Mar. 2018.

AJOURLOO, M. et al. Combined effects of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and lysozyme to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in Balkan-style fresh sausage. **Food Science & Nutrition**, v. 9, p. 1665–1675, 2021.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants and animals of an importante seasonal dry forest in Brazil. **Ethnobiology and Conservation**, v. 9, n. 8, p. 1-53, mar. 2020.

ALENCAR FILHO, J. M. T. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in diferente seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2017.

ALEXANDRE, F. C. O. ***Croton Blanchetianus* Baill: Variação intraespecífica da composição química volátil e não-volátil**. 2017. 378 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2017.

ALMEIDA, G. D. et al. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 487-492, 2013.

ALMEIDA, P. et al. Antioxidant and antifungal properties of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and mint (*Mentha arvensis*) against *Aspergillus flavus* and *Penicillium commune* for use in food preservation. Food Sci. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1-42, 2022. doi: 10.1590/fst.64921

- ALMEIDA, P.P. **Desenvolvimento de sistema de embalagem ativo antimicrobiano para pães de forma**. 2017. 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2017.
- ALMEIDA, R. L. J. et al. Evaluation of thermodynamic properties and antioxidant activities of Achachairu (*Garcinia humilis*) peels under drying process. **Flavour Fragr J.**, v. 36, p. 213-222, 2021.
- ALVES, G.S. et al. Contribuição do *Croton blanchetianus* Baill na produção de serrapilheira e ciclagem de nutrientes em área do Seridó da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 50-57, 2014.
- ALVES, J. E. et al. Biologia floral do marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell.: Euphorbiaceae) e comportamento de seus visitantes florais. E. Ciências Agrárias - 6. Zootecnia - 1. Ecologia dos Animais Domésticos e Etologia 2016. CONGRESSO.
- ALVES, R. N. et al. A. Biodegradable films with *Brassica Oleracea Capitata* extract as a quality indicator in sheep meat. **Journal of Food Processing Preservation**, p. 2–12, out. 2020.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, May/Jun. 2000.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- AMIRI, A. et al. Antimicrobial Potency of Major Functional Foods' Essential Oils in Liquid and Vapor Phases: A Short Review. **Applied. Sciences**, v. 10, p; 1-12, 2020.
- ANASTÁCIO, A. Microbiologia preditiva alimentar, as sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação. **Segurança e qualidade alimentar**, n. 7, dez. 2009.
- ANGÉLICO, E. C. et al. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* (Baill): Resultados Preliminares. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 44-49, 2011.
- ANGÉLICO, E.C. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and Croton's varieties modulator in the Brazilian's Northeast semiarid. **Afr. J. Plant Science**, v. 8, n. 7, p. 392–397, Jul. 2014.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 17th ed. Virginia, 2000.
- APARICIO-ZAMBRANO et al. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). **Revista peruana de biología**, v. 26, n. 1, p. 95-100. 2019 doi:10.15381/rpb.v26i1.15912

AQUINO, N. C. **Aplicação de técnicas espectrométricas e cromatográficas na caracterização de seis tipos químicos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem (Aroeira do sertão)**. 2013, 112 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

AQUINO, V. V. F. et al. Metabólitos secundários e ação antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 7-10, 2017.

ARAGÃO, G. M. F. et al. Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 243-257, 2007.

ARAÚJO, A. C. J. et al. Essential Oil of *Croton ceanothifolius* Baill. Potentiates the Effect of Antibiotics against Multiresistant Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 27; p. 1-8, 2020b.

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

ARAÚJO, K. D. et al. Levantamento florístico do estrato arbustivo arbóreo em áreas contíguas de Caatinga no Cariri Paraibano. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 63-70, jan./mar. 2010.

ARAÚJO, L. G. et al. Chemodiversity and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Leaves of *Croton argyrophyllus*. **Chem. Biodiversity**, v. 17, p. 1-9, 2020a.

ARAÚJO, V. G. **Estudo preditivo da sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas em queijo de coalho**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição – Universidade Federal da Paraíba, 2016.

ARIOLI, S. et al. Modelling of *Listeria monocytogenes* Scott A after a mild heat treatment in the presence of thymol and carvacrol: Effects on culturability and viability. **Journal of Food Engineering**. v. 240, p. 73–82, 2019.

ARRAIS, L. G. et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 316-322, 2014. Supl. 1.

ASKARI, G. A. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 12, n. 1, p. 85-90, 2012.

AZEREDO, H. M. C. Fundamentos de estabilidade de alimentos. 2. ed. Brasília: Ed. Técnica - Embrapa, 2012. 328p.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 043101 1-043101 47, dez. 2011.

- BADIA, V. **Modelagem do efeito da aplicação de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e orégano (*Origanum vulgare*) sobre a vida útil de linguiça toscana embalada a vácuo**. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos). Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2018.
- BAGHERI, L. et al. Correlation between chemical composition and antimicrobial properties of essential oils against most common food pathogens and spoilers: In-vitro efficacy and predictive modelling. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 1-10, 2020.
- BAHADOR, N.; BASERISALEHI, M. The effect of *Quercus castaneifolia* extract on pathogenic enteric bacteria. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 358-360, 2011.
- BHAVANIRAMYA, S.; VISHNUPRIYA, S.; AL-ABOODY, M. S.; VIJAYAKUMAR, R.; BASKARAN, D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidante Applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, p. 49–55, 2019.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p. 446–475. 2008.
- BALLEN, S. C. et al. Determination of antioxidant potential (DPPH) and antimicrobial activity of vegetable extracts and essential oil of laurel (*Laurus nobilis*). **PERSPECTIVA**, Erechim, v. 43, n. 163, p. 61-70, set. 2019.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p.199–218. 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- BARANYI, J.; SILVA, N. B. S. The use of predictive models to optimize risk of decisions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 19-23, 2017. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.016
- BARBOSA, A. .J. C. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Croton urticifolius* LAM. E *Croton adamantinus* MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae). 2021. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual da Paraíba – Campina Grande. 2021. 70 f.
- BARBOSA, A. S. et al. Composição, similaridade e estrutura do componente arbustivoarbóreo de áreas de Caatinga. **Nativa, Sinop**, v. 8, n. 3, p. 314-322, mai./jun. 2020.
- BARRETO, M. B. et al. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.

- BARROS, I. O.; SOARES, A. A. Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga brasileira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 1, p. 192-198, jan./mar. 2013.
- BARROS, D. B. S. et al. Tempo de extração para óleo essencial de *Croton* spp. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 3, n. 1. p. 037-040, 2018.
- BASAK, S. Modelling the effect of betel leaf essential oil on germination time of *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* spore population. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 361-366, 2018.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BELASLI, A. et al. Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.): Potential use as wheat preservative. **Food Science & Nutrition**, v. 8, p. 4717–4729, 2020.
- BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 149–154, 2006.
- BLACKBURN, W.C. Modelling shelf life, In: Kilcast, D.; Subramaniam, P. The stability and shelf life of food. Cambridge, England: CRC Press LLC, Cap. 3. 2000.
- BORGES, L. S. Perfil cromatográfico do óleo essencial de jambu identificados por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. **Cultivando o Saber**, v. 7, n. 3, p. 254-266, 2014.
- BOUKHATEM, M. N. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, p. 1-10, 2014.
- BRANDT, A. L. et al. Inhibition of *Listeria mmonocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **Journal of Food Science**, Malden, v. 75, n. 9, p. 557-563, 2010.
- BRANEN, J. K; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 63–74, 2004.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6. ed. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 874 p. 2019.
- BRITO, S. S. S. et al. A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 308–315, 2018.
- BRUNO, L. M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. 1. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 14 p.

BULDAIN, D. et al. Modeling the Growth and Death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* Essential Oil at Different pH Conditions. **Antibiotics**, v. 10, n. 222, p. 1-14, 2021.

BUNGENSTOCK, L.; ABDULMAWJOOD, A.; REICH, F. Suitability of lactic acid bacteria and deriving antibacterial preparations to enhance shelf-life and consumer safety of emulsion type sausages. **Food Microbiology**, v. 94, p. 1-9, nov. 2021.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

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

CAMPÊLO, M. C. S.; MEDEIROS, J. M. S.; SILVA, J. B. A. Natural products in food preservation. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 1, p. 41 – 46, Feb. 2019.

CARRASCO, E. et al. A review on growth/no growth *Salmonella* models. **Food Research International**. v. 47, p. 90-99, 2012.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n. 6, p. 1914–1920, Jun. 2002.

CARTAXO, A. L. et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342. 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.07.003

CAVALCANTI, D. F. G.; SILVEIRA, M. S.; SILVA, G. C. S. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of development**, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 45931-45946, jul. 2020.

CAVALCANTI, J. M. et al. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Ethnopharmacol**, v. 144, n. 2, p. 240–247.2012. doi:10.1016/j.jep.2012.08.030

CHAIBUB, B. A. et al. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odora*.tissima A. St.-Hil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.2, p. 225-229, 2013.

CHAVES, S. A. M.; REINHARD, K. J. Palespharmacology and Pollen: Theory, Method and Application. **Memoirs Intitute de Oswaldo Cruz**. Rio de janeiro, v. 98, p. 207-211, 2003. Supl. 1.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute, 27th. ed., Jan. 2017.

CORDEIRO, I. et al. *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>. Acesso em: 18 fev. 2018.

COSTA, D. F. N. **Potencial imunomodulador e antimicrobiano do (+)- α -pineno e (+)- β -pineno.** 2017. 53 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

COSTA, J. C. C. P. **Efeito do tratamento termoquímico (óleo essencial e calor) no crescimento microbiano durante a vida útil de mexilhões (*Perna perna*) processados em embalagens flexíveis.** 2013. 186 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, out./dez. 2008.

COSTA, M. A. R. et al. Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* KUNTH (Euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, v.14, n. 25; p. 687 -701, 2017.

COX, S. D. et al. Mode os anyimicrobial action of essencial oil of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

COY BARRECA, C.A. Importancia medicinal del género *Croton* (euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**; v. 21, n. 2, abr./Jun, 2016.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**. Santana do Ipanema, v. 1, n. 2, p. 175-181, mai./ago. 2016.

DALCANTON, F. et al. Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* and shelf life of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 2580–2587. 2013. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12252>

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p. 389-399, 2012.

DIEZ, A. M. et al. Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de Burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 168–177, 2009.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316. Feb. 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**. v. 17, Jan./Feb. 2005.

DUHAN, N.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Bioactive Lipids: Chemistry & Health Benefits. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 6676-6687, 2020.

DUNN, L. L.; DAVIDSON, P. M.; CRITZER, F. J. Antimicrobial Efficacy of an Array of Essential Oils Against Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 2, p. 438-444, 2016.

ENGEL, G. et al. Conservação de salsichas utilizando biofilme de quitosana. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 7, n. 1, p. 42-57, jan./abr. 2016.

EVRENDILEK, G. A.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. **Food Control**, v. 22, p. 1435-1441, 2011.

FALLEH, H.; et al. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, v. 330, p. 1-8, jun. 2020.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, p. 373–380, 2006.

FARIAS, M. S. Q. **Efeito do óleo essencial do *Croton Argyrophyloides* Muell. Arg. e do β -cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta de ratos.** 2006. 127 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

FELIPE, L.; BICAS, J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Quím. nova esc.**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 120-130, maio 2017.

FENNELL, C.W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205–217, 2004.

FERNANDES, D. N. M. **Composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill (Euphrbiaceae).** 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2016.

FERNANDES, L. C. B. et al. Sciatic nerve-conditioned medium with the addition of *Croton blanchetianus* Baill essential oil promotes morphological plasticity in spinal cord cultured cells. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 5, p. 1-12, 2021.

FERNÁNDEZ, A. et al. Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. **Food Microbiology**, v. 24, p. 372–379. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.017>

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. [on line]. **Ciênc. agrotec.** v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>. Acesso 25 nov. 2019.

FERREIRA, M. J. G. et al. Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. 1-14, 2020.

FIGUEIREDO, M.J. et al. Characterization and application of *Croton blanchetianus* Baill extract for lamb ribs preservation. **Food Chemistry**, v. 373, p 1-11. 2022. doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131404

FIRMINO, N. C. S. et al. Antimicrobial Activity of 3,4-*seco*-Diterpenes Isolated from *Croton blanchetianus* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus parasanguinis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 29, n. 4, p. 814-822, 2018.

FIRMINO, N. C. S. et al. Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. **Industrial Crops & Products**, v. 131, p. 371–377, 2019.

FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. Isolados de cães.** 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2013. 594p.

FREITAS, A.F.S. et al. Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 30-39. 2020. doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.015.

FRUTUOSO, A.E. et al. Óleos essenciais aplicados em alimentos: uma revisão. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 4, n.2, p. 69-81. 2013. doi:10.14685/rebrapa.v4i2.134.

GALVÃO, G. C. **Efeito da secagem no rendimento de flavonoides contidos na *Plectranthus amboinicus* (Lour).** 2016. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

GARCIA, A. Á.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009. (Série Fisiologia vegetal).

GEERAERD, A. H., VALDRAMIDIS, J. F., VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 95-105, 2005.

GHABRAIE, M. et al. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science and Technology**, n. 66, p. 332–339. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 101-110, 1998.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOMES, E. R. **Cinética do crescimento de *Salmonella* spp. na presença de concentrações subinibitórias de carvacrol**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

GOMES, L. L.C. et al. Análise *in silico* da toxicidade do monoterpeno eucaliptol. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. 1-11, 2020

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M.T. Modified distillation trap. *Chemist Analyst*. 4th. p. 49-114, 1960.

GOVAERTS, R., FRODIN, D.G. e Radcliffe-Smith, A. A. Croton. In: World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). London: Royal Botanic Gardens Kew. v.2, 2000.

GUIMARÃES, T. L. F. et al. Antimicrobial activity of microcapsules with aqueous extract of chambá (*Justicia pectoralis* Jacq). **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, n. 3, p. 1-8, 2020.

HABERBECK, L. U. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano**. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

HABERBECK, L. U. et al. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 267-273, 2012.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 5, p. 1-11, dez. 2013. Edição especial.

HUANG, L. IPMP Global Fit – A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, p. 38–48. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.010>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.

JACOBSEN, C.; PAIVA-MARTINS, F.; SCHWARZ, K. Lipid oxidation and antioxidants in food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, v. 119, p. 1-2, 2017.

JESUS, A. S.; BLANK, A. F.; ALVES, M. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; LIMA, R. N.; ALVES, P.B. Influence of storage time and temperature on the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. Poit. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 18, n. 1, p. 336-340, 2016. supl. I.

JOSHI, R. K. Role of Natural Products against Microorganisms. **American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, n. 1, p. 1-5, Feb. 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2012, 376p. 2012.

KARNOVSKY, M. J. A. Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 137-138. 1965. Disponível em: <https://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AEP1600001.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2019.

KAWACKA, I. et al. Natural Plant-Derived Chemical Compounds as *Listeria monocytogenes* Inhibitors In Vitro and in Food Model Systems. **Pathogens**, n. 10, v. 12. 2020. p. 1-35. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010012>

KHORSANDI, A. et al. Antibacterial Effect of Essential Oils against Spoilage Bacteria from Vacuum-Packed Cooked Cured Sausages. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 8, p. 1386–1393, 2018.

KIM, S.; FUNG, D. Y. C. Antibacterial effect of crude water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on food-borne pathogens in liquid médium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 319-325, 2004.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, May/Aug. 2010.

KOUTSOUMANIS, K; LAMBROPOULOU, K.; NYCHAS, G. J. E. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 63–74, 1999.

KOUTSOUMAS, K. P.; LIANOU, A.; GOUGOULI, M. Latest developments in foodborne pathogens modeling. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 89–98, 2016.

KOUTSOUMANIS, K. et al. Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). **EFSA Journal**, v. 18, n. 12, p. 1-74, 2020.

KOZLOWSKA, M. et al. Antioxidant properties and effect on lactic acid bacterial growth of spice extracts. **Journal of Food**, v. 13, n. 4, p. 573–577, 2015.

LABUZA, T.P., FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p. 309–323, 1993.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 169–174, 2011.

LAROQUE, D. A. et al. Active cellulose acetate-carvacrol films: Antibacterial, physical and thermal properties. *Packaging Technology Science*, v. 34, p. 463-474. 2021. doi: 10.1002/pts.2570

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURACALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390-1393, 1997.

LEBERT, I., LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, p. 968-984, 2006.

LEE, S. et al. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. **Food Microbiology**, v. 90, p. 1-7, 2020.

LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, jan./mar. 2007.

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

LIRA, A. L. et al. Uso da Microbiologia Preditiva na Segurança Alimentar de Produtos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n.12, p. 104223-104237, dec. 2020.

LI, Y. et al. Application of digital PCR and next generation sequencing in the etiology investigation of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Microbiology**. v. 84, p. 1-6, 2019.

LIMA, J.S. Lima et al. Análise toxicológica e microbiológica do extrato bruto seco do marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell. Arg). **Revista Eletrônica Acervo Científico. REAC**, v. 39, p. 1-8. 2021. doi:10.25248/REAC.e9338.2021

LIMA, S. G. et al. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill – Euphorbiaceae. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 38, n. 3, p. 133-144, 2010.

LOCALI-PEREIRA, A. R. et al. Modulation of volatile release and antimicrobial properties of pink Pepper essential oil by microencapsulation in single- and double-layer structured matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 1-12, 2020.

LONGHI, D.A. et al. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335. n. 21, p. 88 – 96. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.06.030>

LOPES, E. L. et al. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2169-2172, 2012.

LÓPEZ-GÓMEZ, A.; et al. Fresh culinary herbs decontamination with essential oil vapours applied under vacuum conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 1-8, 2019.

LÓPEZ-GÓMEZ, A.; SOTO-JOVER, S.; ROS-CHUMILAS, M. New technology for enhancement of the food safety of minimally processed fruits and vegetables. **Acta Horticulturae**, v. 1194, p. 545–552, 2018.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011, 32p.

MACHADO, T. F. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da erva-cidreira. 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012, 15p.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107-113, 2002.

MARCHI, M. M. et al. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 401-407, jul/set 2011.

MARTÍNEZ- PABÓN, M. C.; ORTEGA-CUADROS, M. Thymol, menthol and eucalyptol as agentes for microbiological control in the oral cavity: A scoping review. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, v. 49, n. 1, p. 44-69, 2020.

MARTINS, R. P.; GOMES, R. A. S.; MALPASS, A. C. G.; OKURA, M. H. Chemical characterization of *Lavandula dentata* L. essential oils grown in Uberaba-MG. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49, n. 8, p. 1-7, 2019.

- MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) POIT., sob condições de cultivo. **Quim. Nova**. v. 29, n.6, p.1203-1209, 2006.
- McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sondericus*, L, Hardwickic and 3,4-Secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**. v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.
- McCLURE, P. J. et al. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, Nov. 1994.
- McKELLAR, R., Lu, X. Primary models, in: McKellar, R., Lu, X. (Eds.), Modeling Microbial Responses in Foods. CRC Press, Boca Raton, pp. 33–74. 2004.
- McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513 – 524, 1998.
- McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a Knowledge-based framework or change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.
- MEDEIROS, V. M. et al. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewioides*. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 468–471, 2017.
- MEDEIROS, J.A.M. et al. Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill) e avaliação de sua atividade citotóxicopotencial frente a *Artemia salina* Leach. In: Congresso Brasileiro de Química. 54. Rio Grande do Norte, Brasil. 2014.
- MELO, A. D. B. et al. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. **Rev. Acad.**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 227-232, jul./set. 2014.
- MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193-201, abr./jun. 2008.
- MELO, G. F. A. **Estudo da composição química e da atividade antibacteriana in vitro e em alimentos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- MELO, G. F. A. et al. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1189-1194, 2013.
- MENEZES, M. F. C. et al. Microbiota e Conservação do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, Santa Maria, v. 18, p. 76-89, 2014. Edição especial.

MENEZES, N.M.C. **Inativação de fungos filamentosos termorressistentes em sucos de maça por luz ultravioleta (UV-C)**. 2020. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

MENEZES, N.M.C. et al. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, n. 139. P. 113 – 119. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.017>

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MOAREFIAN, M. et al. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 62–69.2013. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00600.x>

MOHAN, C. C. et al. Active compound diffusivity of particle size reduced *S. aromaticum* and *C. cassia* fused starch edible films and the shelf life of mutton (*Capra aegagrus hircus*) meat. **Meat Science**, v. 128, p. 47–59, 2017.

MORA, F. D. et al. Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Verbesina negrensis* from the Venezuelan Andes. **Natural product communications**, v. 10, n. 7, p. 1309-1310. 2015. doi:10.1177/1934578X1501000743

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, ago. 2009. Supl. – CD Rom.

MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORALES-UBALDO, A. et al. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitária. **Abanico Veterinario**, v. 10, n. 1, p. 1-10, enero/dic. 2020.

MOSAVINEZHAD, K. et al. Antimicrobial and Antioxidant Effects of *Thymus daenensis* and *Camellia sinensis* Ethanolic Extracts of Chicken Meat During Frozen Storage. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, v. 1, p. 17-27, 2020.

MOURA, F. M. L. et al. Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – uma revisão. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 125- 136, 2013.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145–171, 2001.

MUNHÖZ-BONILLA, A.; CERRADA, M.; FERNÁNDEZ-GRACÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity: from synthesis to applications. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. 414p.

MUNIZ, C. R. et al. Preparo de amostras para observação de nanoestruturas em microscópio eletrônico de varredura acoplado a detector STEM. Comunicado Técnico, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 248, 2019. 6p.

MUTLU-INGOK, A. et al. Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 1-49, 2020. doi:10.3390/molecules25204711

MUZOLF-PANEK, M. et al. Oxidative and microbiological stability of raw ground pork during chilled storage as affected by plant extracts. **International Journal of food properties**, v. 22, n. 1, p. 111–129, 2019.

NARDI, G. M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v. 10, p. 176–184, 2003.

NASCIMENTO, A. M. et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 821–830. 2017.

NASCIMENTO, L.D. et al. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 988, p. 1-35, 2020. doi:10.3390/biom10070988

NAZIR, F. et al. Natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v. 6, n. 6, p. 2078-2082, 2017.

NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, Dec. 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). Mass Spectrometry Data Center.
<https://www.nist.gov/system/files/documents/srd/NIST1a11Ver2-0Man.pdf>

NETOPILOVA, M. et al. *In vitro* antimicrobial combinatory effect of *Cinnamomum cassia* essential oil with 8-hydroxyquinoline Against *Staphylococcus aureus* in liquid and vapour phase. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 906-915, 2020.

OLIVARES-TENORIO; KLOTZ-CEBERIO. Avaliação do efeito antifúngico de metabólitos de culturas bioprotetoras: sua aplicação em derivados lácteos. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 18, n. 2, jul./dic. 2020.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, p. 3, p. 279-285, 2010a.

OLIVEIRA, A. P. et al. Microbiologia Preditiva. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, Centro Científico Conhecer: v. 9, n. 17, p. 1909-1928, 2013a.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, p. 645–651, 2013b.

OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA, J. P. Jr.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.7, n.1, p. 9-15, jan./mar., 2012.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010b.

OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n. 1, p. 230-239, 2016a. Supl. 1.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, p. 645–651. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.004>

OLSZEWSKA, M. A.; GEDASA, A.; SIMÕES, M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. **Food Research International**, v. 134, p. 1-15, 2020.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, May 2013.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 2015.

OSAILI, T. M. et al. Effect of active essential oils added to chicken tawook on the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 1-7, 2021.

OSTROSKY, E. A et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn.** Abr/Jun v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OUSSALAH, M.; et al. Inhibitory effects of selected plant essencial oils on growth of four pathogenic bacterium: *E. coli* O157:H7, *Samonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), Cássia (*Senna siamea*) e Ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, n.1, p.135-144, jan./dez. 2002.

PAGANINI, C. C. **Ação Antimicrobiana de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano no crescimento de *Weissella viridescens* e *Pseudomonas fluorescens***. 2017. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PAGANINI, C. C. et al. Shelf-life extension of meat products by cellulose acetate antimicrobial film incorporated with oregano's essential oil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. 1-12. 2021.

PARIS, M. J. et al. Modelling release mechanisms of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil encapsulated in alginate beads during vapor-phase application. **Journal of Food Engineering**, v. 282, p. 1-9. 2020.
doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110024

PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 1, n. 172, p. 462-468. abr. 2015.

PELEG, M. Calculation of the non-isothermal inactivation patterns of microbes having sigmoidal isothermal semi-logarithmic survival curves. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 645-658, 2003.

PELEG, M. Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation. Boca Raton: Taylor & Francis, 417p. 2006.

PELEG, M; COLE; M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical Review Food Science**, v. 38, n.5, p. 353-380, 1998.

PEREIRA JÚNIOR, L. R. et al. Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509–520, 2014.

PEREIRA, M. A. A. **Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor do óleo essencial *Hesperozygis mirtoides* (St. Hiy ex. Benth.) Epling**. 2016. 96 f. Tese (Doutorado em farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

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

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p. 01–26.

PINHO-DA-SILVA, L. et al. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 721–725. 2010.

PIRES, C. H. et al. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex Loudon (Myrtaceae), **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n.4, p. 597-601. 2013.

PIRES, R. P. S. et al. Microbiologia Preditiva: Conceitos e aplicação em produtos lácteos. Food Safety Brazil, 2019. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/microbiologia-preditiva-conceitos-e-aplicacao-em-produtos-lacteos/>. Acesso em: 21 out. 2019.

POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69–78. 2016. .doi:10.1016/j.fpsl.2016.07.001

POMBO, J. C. P. et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segur. Aliment. Nutr.**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 108-117, maio/ago. 2018.

PORTO, J. C. S.; COELHO, F. A.; OLIVEIRA, F. V. B.; LIMA, S. G.; MOBIN, M. Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. **Rev Interd.** v.13, n. 1180, p. 1-11, 2021.

POSSAS, A. et al. Application of predictive models to assess the influence of thyme essential oil on *Salmonella* Enteritidis behaviour during shelf life of ready-to-eat turkey products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 40–46, 2017.

POSSAS, A. M. M. et al. Modeling the transfer of *Salmonella* Enteritidis during slicing of ready-to-eat turkey products treated with thyme essential oil. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 11, 2016.

PUŠKÁROVÁ, A. et al. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 8211, p. 1-11, 2017.

RAMOS, L. V. **Inativação de *Weissella viridescens* in vitro por radiação ultravioleta**. 2017. 44 f. Trabalho Conclusão do Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 73, n. 1, p. 31-38, maio, 2018. (Série Botânica).

RIOS-CASTILLO, A. G.; RIPOLLES-AVILA, C.; RODRIGUEZ-JEREZ, J. J. Evaluation of bacterial population using multiple sampling methods and the identification of bacteria detected on supermarket food contact surfaces. **Food Control**, v. 119, p. 1-8, 2021.

ROBAZZA, W. S. et al. Modelagem do crescimento de *Salmonella* Enteritidis em maionese adicionada de óleo essencial de orégano. **Vetor**, Rio Grande, v. 26, n. 2, p. 51-60, 2016.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiocologia. São Paulo: Premir, 1997, 372p.

ROCHA, R. R. **Estudo comparativo sobre a composição química, atividade antibacteriana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Croton tetradenius* Baill. e *C. pulegioides* Baill. contra isolados de *Staphylococcus aureus*.** 2020. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2020.

RODRIGUES, G. et al. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* BENTH (Sacada) in diabetic rats. **Arq Gastroenterol**, v. 47, n 3, p. 301–305, jul./set. 2010.

RODRIGUES, O. G. et al. *In vitro* biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 55-58, Mar./Apr. 2019.

ROSBERG, A. K. et al. Commercial wash of leafy vegetables do not significantly decrease bacterial load but leads to shifts in bacterial species composition. **Food Microbiology**, v. 94, p. 1-12, 2021.

ROSS T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of applied bacteriology**, v..81, n. 5, p. 501-508, 1996.

ROSS, T., McMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p. 241-264, 1994.

ROSS, T., DALGAARD. Secondary models, in: McKellar, R., Lu, X. (Eds.), Modeling Microbial Responses in Foods. CRC Press, Boca Raton, pp. 75–162. 2004.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 217, jul. 2007a. 4p.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado Técnico. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 128, jul. 2007b. 4p.

RUFINO, M. S. M et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem**. Aug ,v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SADGROVE, N. J.; MADELAEY, L. G.; WYK, B E. Volatiles from African species of *Croton* (Euphorbiaceae), including new diterpenes in essential oil from *Croton gratissimus*. **Heliyon**. v. 5, p. 1-7, 2019.

SAGDIC, O., OZTURK, I. Kinetic modeling of *Escherichia coli* O157:H7 growth in rainbow trout fillets as affected by oregano and thyme essential oils and different packing treatments. **International Journal of Food Properties**, v. 17, p. 371–385, 2014.

SAKURAI, F. N. et al. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. **Demetra: alimentação, nutrição & saúde**, v.11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.

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

SANGWAN, N. S.; et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34; p. 3–21, 2001.

SANTANA, J. A. da. Padrão de distribuição e estruturas diamétrica de *Croton sonderianus* Mell. Arg. (marmeleiro) na Caatinga da estação Ecológica de Seridó. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.4, n. 3, p. 85-90. jul./set. 2009. Disponível em: <http://revista.gvaa.com.br>. Acesso em: fev. 17, 2018.

SANTOS, C. C. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Erthroxylum barbatum* O.E. Schulz, *Erythroxylum amplifolium* (Mart) O.E. Schulz (Erythoxylaceae) e *Croton sonderianus* Muell. Arg. (Euphorbiaceae)**. 2007. 306 f. Tese (Doutorado em Química orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SANTOS, C.B. e PEREIRA, M.A.T. O uso de plantas medicinais da Caatinga: As concepções dos moradores da fazenda fagundes em Curaçá – ba. **Revista Científica do UniRios**, v. 8, n. 1, p. 194-225. 2020.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Belém (PA): Ministério da Agricultura e Pecuária; 2004. (Comunicado Técnico, 99).

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2004. 1102p.

SCHAFFNER, D. W.; LABUZA, T. P. Predictive microbiology: where are we and where are we going? **Food Technology**. Chicago, v. 51, p. 95-99, 1997.

SCHLEI, K. P. et al. Microbiologia preditiva: Aspectos gerais e tendências. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.10. 2018.

SEO, H.-S. et al. Development of an experimental apparatus and protocol for determining antimicrobial activities of gaseous plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol**, v. 215, p. 95–100, Dec. 2015.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHNIA, M. et al. Modeling the growth of *Escherichia coli* under the effects of *carum copticum* essential oil, pH, temperature and NaCl using response surface methodology. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 415–425, 2012.

SHAKERI, G. et al. Modeling of *Salmonella typhimurium* growth under the effects of *Carum copticum* essential oil, temperature, pH and inoculum size. **Veterinary Research Forum**. v. 8, n. 1, p. 59 -65, 2017.

SILVA, A. B. Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa, Sinop**, v. 8, n. 4, p. 450-455, jul./ago. 2020.

SILVA, A. F. G. et al. Antioxidante activity and total phenol, flavonoid and tanin contents of *Croton floribundus* and *Croton urucurana*. **Encicl Biosf: Centro Científico Conhecer**. v. 16, n. 30, 2019.

SILVA, A. I. et al. Perfil fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do *Croton Blanchetianus*. **Rev Bras Multidiscip**. v. 24, n. 1, p. 134-142. 2021.

SILVA, C. M. et al. Guia de plantas: visitadas pelas abelhas na Caatinga. 1. ed. Fortaleza: Editora Fundação Brasil Cidadão, 2012a, 99p.

SILVA, C. T. et al. Rendimento de Peito de Frango Alimentado com Óleo Essencial de Marmeleiro em Substituição aos Antimicrobianos. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, v.12, n.1, p. 56-59, 2010a.

SILVA, F. R. et al. Chemical composition of essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 3, p. 325-329, July/Sept. 2012b.

SILVA, J.A.G. et al. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Rev. Virtual Quim**. v. 9, n. 3, p. 934-941. 2017. doi: 10.21577/1984-6835.20170060.

SILVA, M. C. **Óleos essenciais: caracterização, aplicações e métodos de extração**. 2018. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia química) – Universidade de Fortaleza, Fortaleza, 2018a.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010b.

SILVA, S. C. S. et al. Perfil fitoquímico, susceptibilidade antibacteriana e capacidade antioxidante das folhas de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Infarma, Ciências farmacêuticas**, v. 29, p. 264-270. 2017a.

SILVA, V. A. et al. Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 40, n. 2, p. 69-72, mar./abr. 2011.

SILVA-ALVES, K. S. et al. Essential oil of *Croton zehntneri* and its main constituent anethole block excitability of rat peripheral nerve. **Planta Med**, v. 81, n. 4, p. 292-297. 2015. doi:10.1055/s-0034-1396309

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutidos cárneos frescal**. 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SILVEIRA, S. M. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento (6^o ed.). Porto Alegre: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. 2011.

SIMONETTI, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n. 1, p. 9-18, 2016.

SMÂNIA, A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136–141, 2012.

SOUSA, C. B. C. et al. Greener ultrasound-assisted extraction of bioactive phenolic compounds in *Croton heliotropiifolius* Kunth leaves. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 1-7, 2020.

SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A. Metabólicos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal - PB, v. 11, n. 1, p. 01-08, jan./dez. 2017.

SOUTO, E. B. et al. *Croton argyrophyllus* Kunth Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Evaluation of Release Profile, Antioxidant Activity and Cytotoxicity in a Neuroblastoma Cell Line. **Sustainability**, v. 12, p. 1-12, 2020.

SOUZA, A. V. V. et al. Influence of season, drying temperature and extraction time on the yield and chemical composition of 'marmeleiro (*Croton sonderianus*) essential oil. **Journal of essential oil research**, v. 29, n. 1, p. 76-84, 2017a.

SOUZA, B. A. et al. Aditivos Alimentares: Aspectos Tecnológicos e Impactos na Saúde Humana. **Revista Contexto & Saúde**, Ed. Unijuí, v. 19, n. 36, p. 5 - 13, jan./jun. 2019.

SOUZA, E.A. **Avaliação das potencialidades farmacológicas em periodontia de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill.** 2014. 160 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SOUZA, G. S. et al. Chemical composition and yield of essential oil from three *Croton* species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 8, 2017b.

SOUZA, M. R. et al. Caracterização florística e fitossociológica do componente lenhoso de um fragmento florestal de Caatinga em Serra do Mel, Rio Grande do Norte, Brasil. **Nativa, Sinop**, v. 8, n. 3, p. 329-335, mai./jun. 2020.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137-159, 2004.

TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. *Software* for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 *Software Fair*. **Food Microbiology**, v. 45, p. 290–299, 2015.

TIMICH, M.; SANTOS, D.Y.A.C. Effect of *Croton urucurana* Baill. Extracts against *Atta Sexdens Ruprobilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 33, p. 1-5, 2015.

TINTINO, S. et al. Evaluation of Antibacterial Activity of Aminoglycosides and Modulating the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, p. 39–45. 2014. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673>

TORRES, D. S. et al. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Quim. Nova**, v. 41, n. 7, p. 743-747, 2018.

TORRES, M. C. M. et al. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 2, p.15862-15872. feb. 2021.

TOSCAN, C. M. 2010. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, 2010. 84 f.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 169–177, 2012.

TRINDADE, J. K. M. et al. Perfil químico e atividade antimicrobiana do óleo essencial de variedades de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. 1-11. 2021. doi:10.33448/rsd-v10i10.18794

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (UFC). Herbário Prisco Bezerra (EAC). 2019 (*online*). Disponível em: <https://herbario.ufc.br/acervo/>. Acesso em 28/08/2019.

VALDRAMIDIS, V. P. et al. Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 80–87, 2006.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 97–105, 2005.

VAN IMPE, J. F. et al. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 227-249, 1995.

VASCONCELOS, E.C. de, et al. Potencial bioativo, antioxidante e antimicrobiano do extrato aquoso do processo de extração do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* Baill. **Scientia Plena**, v. 17, n. 12, p. 1 -12, 2021. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.121501>

VASCONCELOS, E.C. de, et al. Ação antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1. p. 1 -10, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24785>

VASCONCELOS, E.C. de et al. Modeling the effect of *Croton blanchetianus* Baill essential oil on pathogenic and spoilage bacteria. (submetido).

VASCONCELOS, I. R. A. **Investigação dos efeitos antibacteriano, antioxidante, citotóxico e genotóxico do óleo essencial do caule de *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill.** 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VEECK, A. P. L et al. Estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados tratados com extratos *Lippia alba*. **Cienc Rural**, v. 45, n. 6, p. 1113-1119. Jun. 2015.

VELÁZQUEZ-NUÑEZ, M. J. et al. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. **Food Control**, v. 31, p. 1-4, 2013.

VELOSO, C. A. G. et al. Composição química do óleo essencial de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill e sua atividade antibiofilme. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 12887-12898, mar. 2020.

VENCATO, A. A et al. Salt and crude plant extracts as preservatives in a meat model system (ground pork shoulder). **Rev Caatinga**, v. 33, n. 2, p. 562-570, Abr-Jun. 2020. doi: 10.1590/1983-21252020v33n229rc

VERAS, F. E. L. et al. Intoxicação com aditivos alimentares. **Revinter**, v. 14, n. 1, p. 05-10, fev. 2021.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. K.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p.

WHITING, R.C. Microbiological modeling. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 35, 467-494, 1995.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A. Classification of Models for Predictive Microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p. 175-177, 1993.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105. 1998.

XING, K. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 17–22, 2009.

YILMAZ, M. T. Identifiability of Baranyi model and comparison with empirical models in predicting effect of essential oils on growth of *Salmonella typhimurium* in rainbow trout stored under aerobic, modified atmosphere and vacuum packed conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 38, p. 7468-7479, July, 2011.

YOUSEFI, M.; KHORSHIDIAN, N.; HOSSEINI, H. Potential Application of Essential Oils for Mitigation of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Products. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 1-16, Nov. 2020.

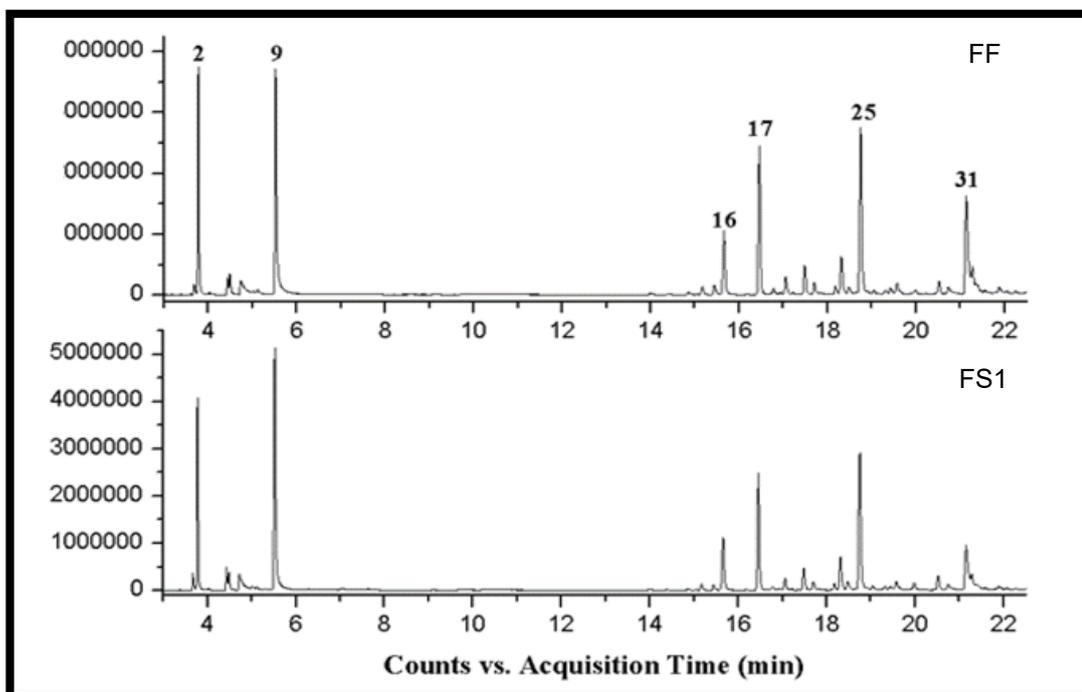
ZAMYAD, M. et al. The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 77, n. 2, p. 106-114.2019. doi:10.1590/0004-282X20180147

ZIBETTI, A. W.; CLAUMANN, C., A.; BOLZAN, A.; MACHADO, R., A., F. Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas durante a vida de prateleira de presunto cozido fatiado embalado a vácuo tratado com extrato supercrítico de *Rosmarinus officinalis*. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX., 2014, Florianópolis, **Anais**...Florianópolis: Blucher, 2014, v. 1, n. 2 p. 4058-4064.

ZIMBRO, M. J. et al. Difco™ & BBL™ Manual: Manual of microbiological culture media. 2 ed. Sparks: BD, 2009.

ZWIETERING, M. H. et a. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 1875-1881, 1990.

APÊNDICE A – Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas frescas (FF) e secas (FS1) de *Croton blanchetianus* obtido em CG-EM. Os números sobre os picos são referentes aos compostos listados na APÊNDICE B.



Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE B – Composição química do óleo essencial das folhas frescas (FF) e secas (FS1) de *C. blanchetianus*.

Nº Pico	Componente	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Área (%) ^c	
				FF	FS1
1	α-Tujeno	924	928	0,56	1,06
2	α-Pineno	930	936	9,32	9,84
3	Canfeno	946	950	0,10	0,10
4	Sabineno	971	973	0,85	1,46
5	β-Pineno	974	978	1,20	1,28
6	Mirceno	990	989	2,37	2,96
7	Pseudolimoneno	1006	1004	0,44	0,52
8	δ-3-Careno	1010	1011	0,72	0,69
9	Eucaliptol	1027	1032	14,30	17,74
10	Terpinoleno	1094	1087	-	0,43
11	δ-Elemeno	1333	1337	0,24	0,23
12	α-Cubebeno	1346	1351	0,10	0,06
13	Ciclosativeno	1361	1368	0,25	0,22
14	α-Copaeno	1371	1376	0,70	0,67
15	β-Bourboneno	1380	1384	0,87	0,64
16	Sativeno	1387	1391	5,16	5,33
17	E-Cariofileno	1413	1420	11,13	10,79
18	β-Copaeno	1424	1433	0,68	0,57
19	Aromadendreno	1433	1441	1,53	1,36
20	α-Humuleno	1448	1453	2,41	2,27
21	allo-Aromadendreno	1455	1460	1,05	0,98
22	cis-Cadina-1(6),4-diene	1459	1463	0,30	0,32
23	γ-Muuroleno	1476	1476	3,20	3,54
24	β-Selineno	1481	1486	0,85	1,16
25	Biciclogermacreno	1490	1494	13,04	13,66
26	Isodauceno	1500	1500	0,54	0,64
27	γ-Cadineno	1509	1513	0,46	0,51
28	Cubebol	1513	1515	0,70	0,54
29	δ-Cadineno	1518	1523	1,38	1,36
30	Germacreno B	1551	1551	1,20	1,64
31	Espatulenol	1572	1576	9,99	6,21
32	Óxido de cariofileno	1577	1580	2,55	3,26
33	Viridiflorol	1598	1591	1,10	0,82
Total				89,29	92,86

^aIR: Índice de Retenção obtido em coluna HP-5 MS; ^bIR_{lit}: Dados da literatura (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011); ^cÁreas relativas determinadas em CG-EM.

Fonte: Elaborada pela autora.

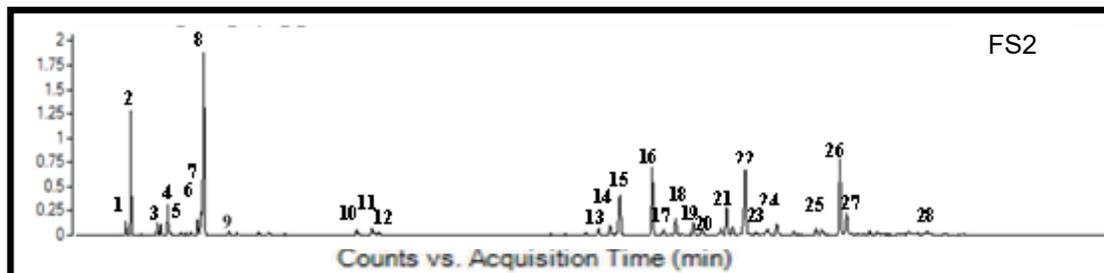
APÊNDICE C - Composição química do óleo essencial das folhas secas (FS2) de *Croton blanchetianus*, que foram armazenadas por 8 meses, para então serem submetidas ao processo de extração do óleo essencial.

N° Pico	Componente	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	FS2 (%) ^c
1	α-Tujeno	931	928	0,94
2	α-Pineno	939	936	8,44
3	Sabineno	978	973	1,00
4	β-Pineno	982	978	0,92
5	Mirceno	992	989	2,74
6	p-Cimeno	1029	1024	1,46
7	Limoneno	1033	1029	3,39
8	1,8-Cineol	1036	1032	16,16
9	Y-Terpineno	1063	1059	0,53
10	Terpinen-4-ol	1181	1177	0,84
11	α-Terpineol	1192	1188	1,03
12	Mirtenol	1198	1195	0,62
13	α-Copaeno	1378	1376	0,79
14	β-Bourboneno	1387	1384	1,35
15	Sativeno	1394	1391	6,41
16	E-Cariofileno	1421	1420	8,89
17	β-Copaeno	1431	1433	0,80
18	Aromadendreno	1441	1441	2,14
19	α-Humuleno	1456	1453	1,77
20	allo-Aromadendreno	1463	1460	1,12
21	Y-Muuroleno	1483	1476	3,68
22	Biciclogermacreno	1496	1494	10,15
23	Y-Cadineno	1516	1513	1,29
24	δ-Cadineno	1525	1523	1,68
25	Germacreno B	1559	1551	0,88
26	Espatuleno	1579	1576	9,92
27	Óxido de cariofileno	1584	1580	3,74
28	α-Cadinol	1656	1654	0,84
Total				93,52

^aIR: Índice de Retenção obtido em coluna HP-5 MS; ^bIRlit: Dados da literatura (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011); ^cÁreas relativas determinadas por CG-EM.

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE D – Cromatogramas do óleo essencial das folhas secas (FS2) de *C. blanchetianus*, (armazenadas por 8 meses, para então serem submetido ao processo de extração do óleo essencial) obtidos em CG-EM. Os números sobre os picos são referentes aos compostos listados no APÊNDICE C.



Fonte: Elaborado pela autora.

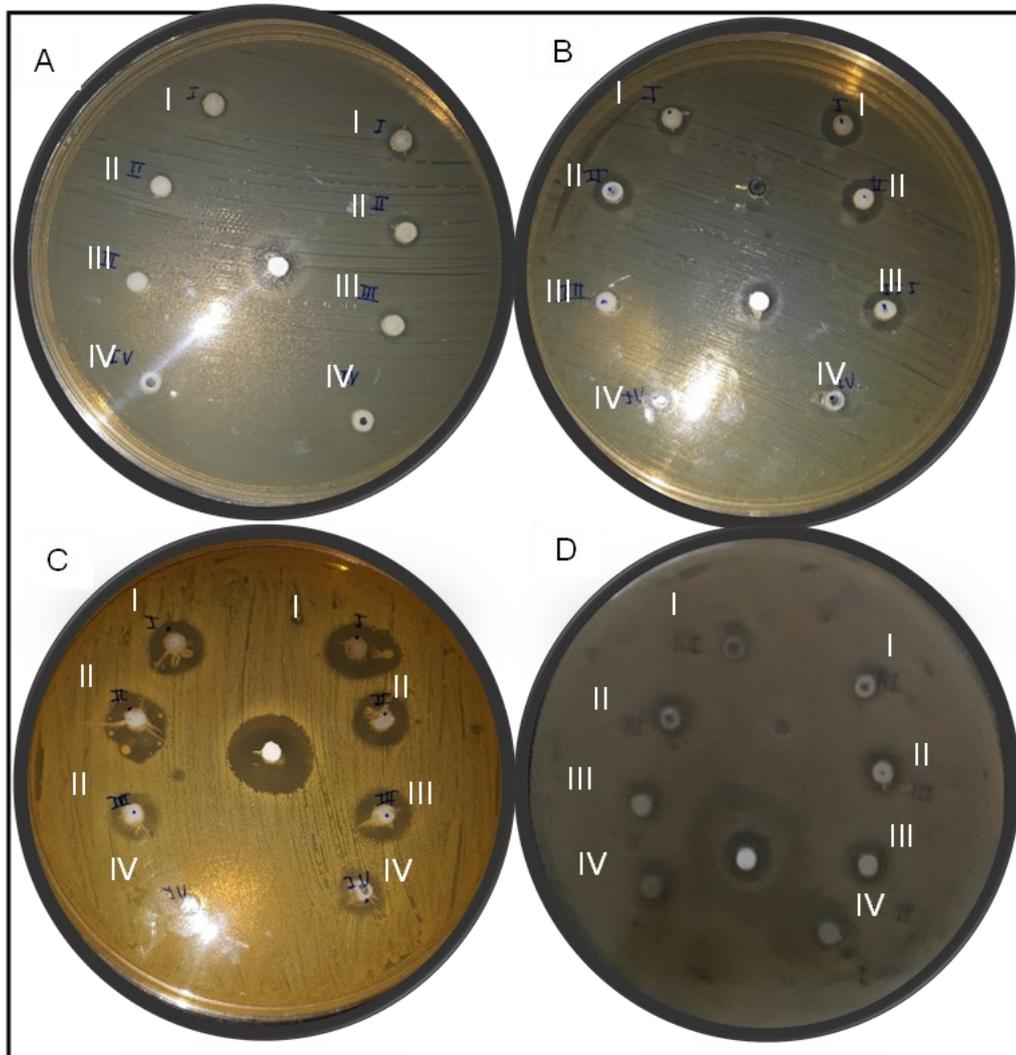
APÊNDICE E – Atividade antimicrobiana representada pela técnica de difusão em ágar (poço), por meio da medida do halo de inibição formado, em ágar em diferentes concentrações do óleo essencial das folhas frescas e secas (FS1) de *C. blanchetianus* frente a microrganismos patogênicos.

Microrganismos	Identificação	Folhas	Halo de inibição (mm)				Antibiótico*
			902,5 mg/mL	680 mg/mL	450 mg/mL	220 mg/mL	
<i>S. aureus</i>	ATCC 27664	Fresca	14 ± 0,7	11 ± 2,3	9 ± 1,5	9	16 ± 1,5
		Seca	15 ± 3,8	12 ± 1,0	11 ± 2,1	7 ± 0,6	
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115	Fresca	18 ± 1,0	17 ± 1,5	15 ± 4,0	13 ± 2,0	25 ± 7,2
		Seca	22 ± 6,2	18 ± 1,0	16 ± 1,0	13 ± 0,6	
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	Fresca	9 ± 0,6	10 ± 1,5	8 ± 0,6	6 ± 0,6	11 ± 1,0
		Seca	12 ± 0,6	12 ± 1,7	11 ± 1,7	9 ± 1,2	
<i>S. Enteritidis</i>	IAL 1132	Fresca	0	0	0	0	14 ± 2,6
		Seca	8 ± 0,6	9 ± 1,2	9 ± 0,6	0	

Antibiótico* benzetacil® (300.000 U/mL) controle positivo.

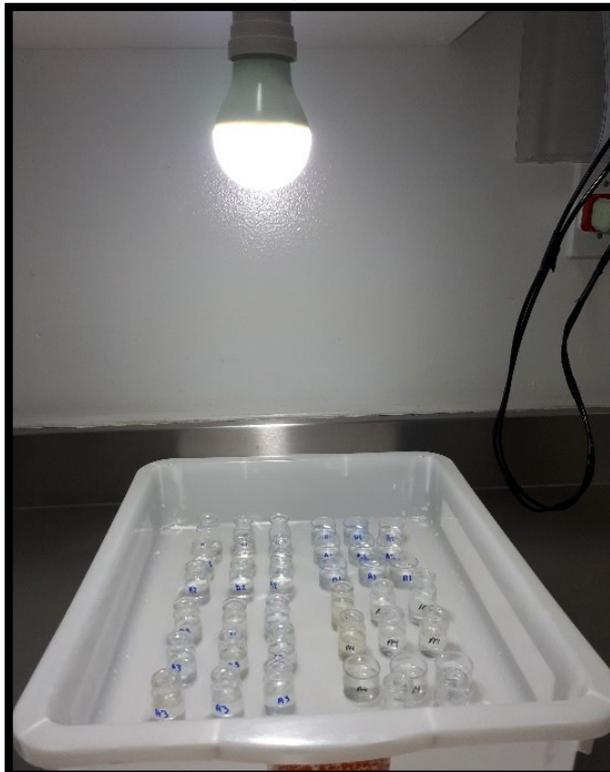
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE F – Halo de inibição formados pelas bactérias patogênicas: A - *S. Enteritidis*, B – *E. coli*, C – *L. monocytogenes*, D – *S. aureus*, nas concentrações 902,5 (I), 680 (II), 450 (III), 220 (IV) mg/mL, do lado esquerdo das placas de Petri estão representados os poços com óleo essencial das folhas frescas e do lado direito com o óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus*. No centro da placa de Petri o controle.



Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE G – Cistos de *Artemia salina* em solução salina, sob iluminação artificial (100 watts), aeração constantes e temperatura em torno de 25 °C, até a eclosão.



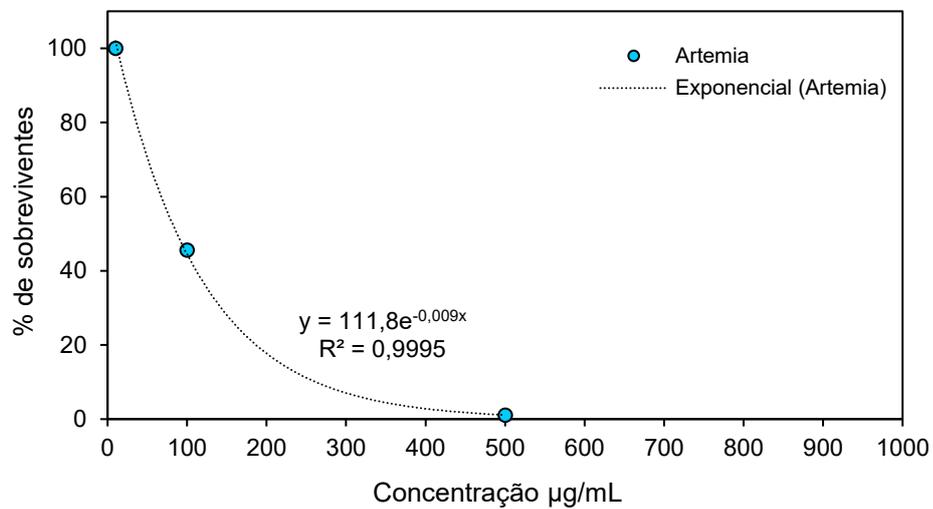
Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE H – Bioensaio com náuplios de *Artemia salina* em diferentes concentrações de solução do óleo essencial das folhas secas de *C. blanchetianus* em DMSO 5%.



Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE I – Porcentagem de sobreviventes de *Artemia salina* Leach frente às soluções do óleo essencial de *C. blanchetianus* nas concentrações de 10, 100, 500 µg/mL. A linha pontilhada representa o ajuste do modelo exponencial aos dados experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora.