



UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

AMANDA MALINI ROCHA SALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
DE *Croton antisiphiliticus* Mart.**

BRASÍLIA, DF
2018

AMANDA MALINI ROCHA SALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
DE *Croton antisiphiliticus* Mart.**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Paula Melo Martins

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF
2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SAM484a Sales, Amanda
Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de
Croton antisyphiliticus Mart / Amanda Sales; orientador
Paula Martins; co-orientador Izabel Silva. -- Brasília, 2018
40 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. maceração. 2. polifenóis totais. 3. atividade
antimicrobiana. 4. citotoxicidade. 5. delineamento
fatorial. I. Martins, Paula, orient. II. Silva, Izabel, co
orient. III. Título.

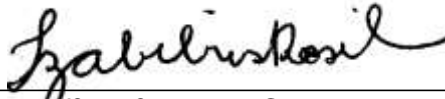
AMANDA MALINI ROCHA SALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
DE *Croton antisiphiliticus* Mart.**

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Melo Martins
(Faculdade de Ceilândia/UnB)



Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Faculdade de Ceilândia/UnB)

Prof. Dr. Christopher William Fagg
(Faculdade de Ceilândia/UnB)

Prof. M.e Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, por eu ter chegado até aqui e por me dar forças para continuar.

À minha família: meu pai, Luiz Claudio; minha mãe, Josélia; e minha irmã, Luísa. Vocês são minha base, obrigada pelo apoio, incentivo e por todo amor e carinho que vocês têm comigo. Eu amo vocês.

Às minhas avós, Hildenê e Delzuita, por me ensinarem a gostar das plantinhas e das coisas simples da vida. Todo amor e saúde do mundo para vocês. Não posso esquecer-me de agradecer a minha madrinha, Sueli, e meu primo, João, vocês também fazem parte dessa conquista.

À minha amiga, Ludmilla, quase uma irmã. Obrigada pela amizade, suporte, seja em momentos bons ou ruins.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, Adones, Ana Luíza, Karen, Luciana, Morgana e Vanessa, por todos os momentos juntos. Agradeço especialmente meus migs Ana, Bruna, Camila, Fernanda, Gabriela, Jade, Ivan e Victor, sou grata pela vida de cada um, grata por todos os momentos que passamos juntos. Agradeço, também, aos meus amigos do PG, obrigada pelas orações e pelo apoio.

Agradeço a Prof^a Dr^a Paula Melo Martins, obrigada pela orientação, pela disponibilidade e por todo conhecimento passado.

Ao Prof. M.e. Daniel Oliveira e Prof^a Dr^a Izabel Cristina, obrigada pela paciência e pela grande ajuda. Agradeço também ao Prof. Dr. Christopher William, Matheus Eça, Sayuri, Luan e os técnicos do laboratório da FCE/UnB, obrigada pela parceria na conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos que me acompanharam nessa jornada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Delineamento fatorial 3^2 para os experimentos de maceração com as partes aéreas e partes subterrâneas de <i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.....	20
Tabela 2 – Caracterização dos extratos de partes aéreas e partes subterrâneas de <i>C. antisiphiliticus</i> Mart.....	25
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima de partes aéreas e partes subterrâneas de <i>C. antisiphiliticus</i> Mart.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Croton antisyphiliticus</i> Mart.....	14
Figura 2 – Estruturas moleculares dos principais componentes fitoquímicos presentes em <i>Croton antisyphiliticus</i> Mart.....	15
Figura 3 – Pó das partes aéreas (a) e partes subterrâneas (b) de <i>Croton antisyphiliticus</i> Mart.....	20
Figura 4 – Teor de sólidos totais dos extratos das partes aéreas e partes subterrâneas de <i>Croton antisyphiliticus</i> Mart.....	24
Figura 5 – Gráfico de Pareto representando a influência dos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias) sobre o teor de sólidos totais (a), teor de ácido gálico (b), teor de polifenóis totais (c), concentração inibitória mínima de <i>E. coli</i> (d) e concentração inibitória mínima de <i>S.aureus</i> dos extratos de partes aéreas de <i>C. antisyphiliticus</i> Mart. (e).....	27
Figura 6 – Gráfico de Pareto representando a influência dos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias) sobre o teor de sólidos totais (a), teor de ácido gálico (b), teor de polifenóis totais (c), concentração inibitória mínima de <i>E. coli</i> (d) e concentração inibitória mínima de <i>S.aureus</i> dos extratos de partes subterrâneas de <i>C. antisyphiliticus</i> Mart. (e).....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3	Linhagem de células de fibroblastos de camundongos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B-16	Linhagem de células de melanoma murino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HeLa	Linhagem de células de câncer cervical humano
IC₅₀	Concentração inibitória de 50%
IC₉₉	Concentração inibitória de 99%
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MBC	Concentração bactericida mínima
MCF-7	Linhagem de células de câncer de mama humano
MIC	Concentração inibitória mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina
TK-10	Linhagem de células de câncer renal humano
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Tuberculose multi-droga resistente

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos fatores proporção droga/solvente e tempo no processo extrativo da maceração de *Croton antispyhiliticus* Mart. sobre a atividade antimicrobiana e obtenção de compostos polifenólicos. O delineamento fatorial 3^2 possibilitou a obtenção de variados extratos das partes aéreas e partes subterrâneas, produzidos por maceração. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de sólidos totais, teor de polifenóis totais e teor de ácido gálico. Os extratos também foram avaliados em relação à atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizando o teste de microdiluição. Os extratos das partes aéreas demonstraram maiores quantidades de ácido gálico comparado aos extratos de partes subterrâneas. Em relação à atividade antimicrobiana, os extratos tanto das partes aéreas quanto subterrâneas apresentaram inibição considerada moderada e fraca para *E.coli*. Já para *S. aureus*, ambos os extratos apresentaram bons valores de concentração inibitória mínima (MIC). De maneira geral, os extratos das partes subterrâneas revelaram um potencial antimicrobiano mais constante e efetivo.

Palavras-chave: maceração; polifenóis totais; atividade antimicrobiana; citotoxicidade; delineamento fatorial

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate the influence of factors solid-solvent ratio and time in extractive process of *C. antisiphiliticus* Mart.'s maceration on antimicrobial activity and polyphenolics content. Through a 3² factorial design various extracts from aerial parts and underground parts were produced. Those extracts were evaluated in terms of total solids, total polyphenols and total gallic acid. The extracts were also evaluated in terms of antimicrobial activity with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, using microdilution broth method. Aerial parts' extracts shown higher quantities of gallic acid compared to underground parts' extracts. About antimicrobial activity, both extracts shown moderated to weak inhibition against *E. coli*. For *S. aureus*, both extracts shown good minimum inhibition concentration (MIC) results. In general, underground parts' extracts shown better constant and effective antimicrobial potential than aerial parts' extracts.

Key-words: maceration; total polyphenols; antimicrobial activity; cytotoxicity; factorial design

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	Cerrado	12
1.1.1	Plantas medicinais do Cerrado	12
1.2	<i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.....	13
1.3	Polifenóis	16
1.4	Resistência bacteriana e a busca por novas alternativas.....	16
1.5	Delineamento fatorial: ferramenta de avaliação multifatorial	17
2.	JUSTIFICATIVA	18
3.	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral.....	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Obtenção da droga vegetal e extratos	20
4.2	Caracterização da droga vegetal e dos extratos	21
4.3	Determinação de polifenóis totais	21
4.4	Determinação de ácido gálico.....	22
4.5	Determinação da atividade antimicrobiana	22
4.5.1	Preparo dos inóculos	22
4.5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	23
4.6	Análise Estatística	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Caracterização da droga vegetal e dos extratos	24
5.2	Atividade antimicrobiana.....	29
6.	CONCLUSÃO	33
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cerrado

O Cerrado é a maior região de savana tropical da América do Sul e o segundo maior bioma brasileiro, distribuindo-se pelos estados de Minas Gerais, Tocantins, Bahia, Maranhão, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e o Distrito Federal. Segundo Carvalho (2013), nenhum outro bioma sul-americano possui tantas zonas de contatos biogeográficos tão distintos, conferindo-lhe um aspecto ecológico único.

Também conhecido como o “Planalto Central”, o Cerrado contém nascentes que formam grandes rios brasileiros: o Rio Amazonas, o Rio São Francisco e o Rio Paraná. A esse fato, atribui-se a esse bioma elevado potencial aquífero, o que favorece a sua biodiversidade (BRASIL, 2012). Contendo apenas duas estações bem definidas: uma seca e outra chuvosa, a terra de solos pobres e ácidos do Cerrado abriga grande diversidade de animais e plantas. A heterogeneidade do Cerrado faz com que haja espécies particulares de cada território em que está presente.

Apesar de ser uma extensa área, o Cerrado vem perdendo espaço para as práticas de agricultura e pecuária que, junto às queimadas, contribuem para a perda de um bioma tão rico e vasto que serve de abrigo para plantas e animais e, também, ajuda o homem na cura de doenças com seu potencial terapêutico de suas plantas medicinais.

1.1.1 Plantas medicinais do Cerrado

Segundo GENEVA (2003 apud PALOMA, 2016), planta medicinal é definida como uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósito terapêutico, podendo estar no estado fresco e seco quando foi procedida a secagem.

As plantas medicinais podem ser encontradas em todos os biomas brasileiros, dos Pampas a Caatinga. No Cerrado, várias espécies são utilizadas por conta de suas propriedades terapêuticas, como, por exemplo:

- Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville): é usado como cicatrizante de feridas da pele, para tratar gastrite, úlcera, infecção no útero, corrimento vaginal, coceira e sangramento proveniente de extração de dente.
- Chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.)): As suas diferentes formas de utilização têm propriedades diuréticas, tônicas e depurativas, além disso, combate hérnias, dores reumáticas e nevralgias.
- Ipê-Roxo (*Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.)): A entrecasca seca do ipê-roxo é utilizada para tratar inflamações, câncer de útero e próstata, problemas de pele, doenças do coração e doenças sexualmente transmissíveis.
- Paratudo-do-campo (*Gomphrena macrocephala* A.St.-Hil.): possui ações antitérmica, antidiarreico, febrífuga, tônica, aromática, entre outras.
- Araticum do campo (*Annona coriacea* Mart.): as sementes trituradas são utilizadas no tratamento de ectoparasitas.

Esses são alguns dos exemplos da flora do Cerrado que apresentam propriedades medicinais e são muito utilizados nas comunidades que habitam esse bioma. (JANUÁRIO; SILVÉRIO-LOPES, 2014; OLIVEIRA, 2012)

1.2 *Croton antisiphiliticus* Mart.

Croton antisiphiliticus Mart., da família Euphorbiaceae, popularmente conhecida como pé de perdiz ou curraleira, é um subarbusto neotropical, medindo em torno de 30 a 40 centímetros. Essa espécie está distribuída em todas as regiões do Brasil, tendo como domínio fitogeográfico: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. (CORDEIRO et. al, 2015)

A folha de pé de perdiz é comprida, coberta por pelos finos amarelados e suas bordas são serradas com glândulas evidentes e pateliformes. A face adaxial das folhas é áspera, já a face abaxial apresentam nervuras salientes. Não possui cheiro e sua consistência é dura e áspera. As flores de pé de perdiz, que aparecem entre os meses de maio e novembro, são pequenas, vistosas e possuem cor branco-amarelada. Há flores que se abrem e produzem pequenos frutos que quando secam liberam as sementes. A

espécie apresenta xilopódio bem desenvolvido, sendo fino e quebradiço, difícil de ser retirado da terra por possuir um sistema subterrâneo xilopodífero que adentra o solo. (CORDEIRO et. al, 2015; DIAS, 2009) (Figura 1)

Figura 1 – *Croton antisiphiliticus* Mart.



Fonte: Dias (2009)

A espécie é utilizada como anti-inflamatório, depurativo do sangue, tratamento de infecções, reumatismo e doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis. A decocção é diurética. (AMERICANO, 2015; BRANDÃO; PIGNAL, 2009)

A principal indicação de pé de perdiz para mulheres é o tratamento de infecções do útero e ovário, já para os homens é indicada para tratar inflamação da próstata. Não se tem muito conhecimento sobre o pé de perdiz, por isso recomenda-se cautela no uso, evitando doses excessivas. (DIAS, 2009)

Em estudos sobre a atividade da biológica de *Croton antisiphiliticus*, os extratos clorofórmicos e hexânicos apresentaram atividade bactericida *in vitro* para *Staphylococcus aureus* (NADER et al., 2010) e a experimento clorofórmio da partes subterrâneas da planta apresentou ação antimicrobiana para cepa da *American Type Cell Culture* (ATCC) 6583, *S. aureus*. (PEREIRA et al., 2012)

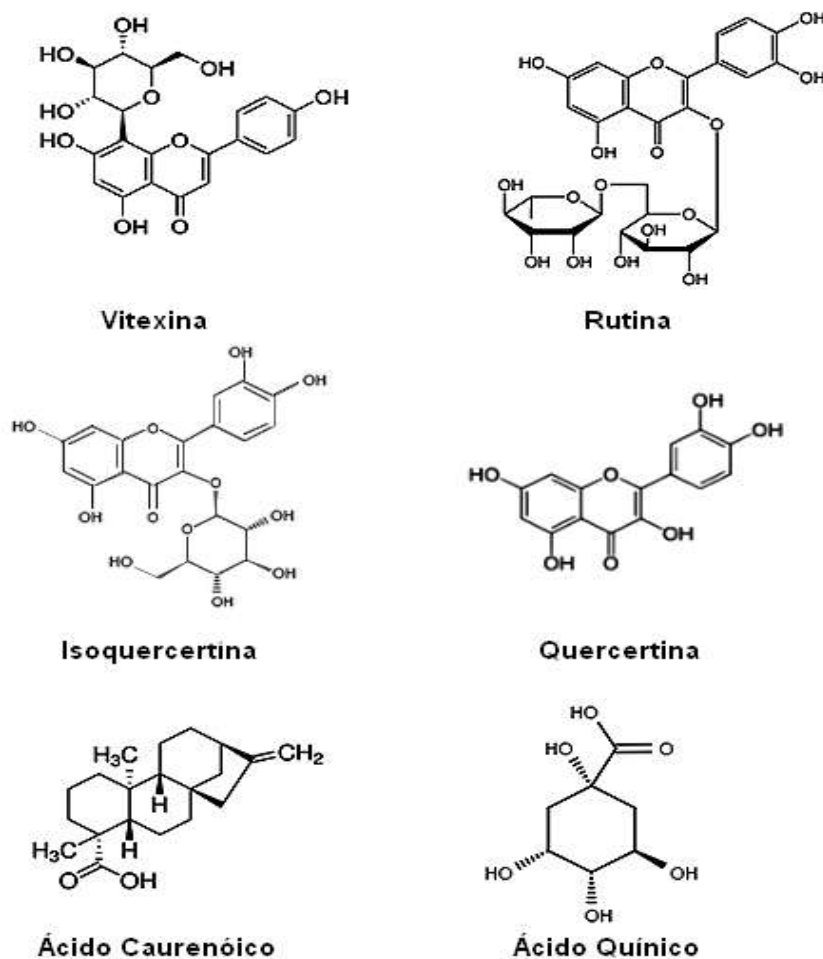
Fernandes et al. (2013) realizaram um estudo sobre a atividade citotóxica e apoptótica de *C. antisiphiliticus* sobre as células HeLa (linhagem

de célula de câncer cervical humano), B-16 (linhagem de células de melanoma murino) e 3T3 (linhagem de células de fibroblastos de camundongos). Os resultados demonstraram que o composto isolado, ácido caurenóico, não foi seletivo entre as células cancerígenas e normais, mas induziu a apoptose.

Os extratos de *C. antisyphiliticus* também foram avaliados quanto à ação sobre as células MCF-7 (linhagem de células de câncer de mama humano) e TK-10 (linhagem de células de câncer renal), mostrando efeito citostático e citotóxico, respectivamente. (CARVALHO, 2013)

As principais substâncias encontradas na espécie são flavonoides O-glicosilados rutina, isoquercitina, quercetina, C-glicosilado vitexina, ácido quínico e o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico (CARVALHO, 2013; REIS et al., 2013; PEREIRA et al., 2012), que são considerados polifenóis. (Figura 2)

Figura 2 – Estruturas moleculares dos principais componentes fitoquímicos presentes em *Croton antisyphiliticus* Mart.



1.3 Polifenóis

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, produzidos pela via do ácido chiquímico de plantas, que contêm anéis de benzeno, com um ou mais substituintes hidroxila. (DERONG et al, 2016) Os polifenóis constituem um grupo composto de várias classes de substâncias com propriedade antioxidante, os quais estão presentes em várias espécies vegetais. (ANGELO; NEUZA, 2006)

Os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e; reparando a lesão de moléculas atacadas por radicais livres. (SUCUPIRA et al, 2015)

Dentre os compostos fenólicos estão os fenóis simples, os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, taninos, ligninas, flavonoides e derivados, ácidos fenólicos e cumarinas. (CARVALHO, 2013)

1.4 Resistência bacteriana e a busca por novas alternativas

A resistência bacteriana é um processo natural que ocorre quando um microorganismo que causa infecção sobrevive a um medicamento que o mataria ou cessaria seu crescimento. (REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016) Esse fato é datado desde o início da era dos antibióticos, mas somente nos últimos vinte anos o surgimento de cepas resistentes como ocorreu com uma maior frequência. (FAIR; TOR, 2014)

A cada ano nos Estados Unidos ao menos 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias que se tornam resistentes aos antibióticos e cerca de 20 mil morrem a cada ano como resultado dessas infecções. (CDC, 2017) As bactérias resistentes mais comumente relatadas são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, seguidas por *Salmonella* spp. (GENEVA, 2018)

O uso exacerbado de antimicrobianos leva ao aumento de bactérias resistentes e, infelizmente, não há novos medicamentos para trata-las. Dessa

forma, buscam-se alternativas ao tratamento medicamentoso, como o uso de plantas, que, por meio da produção de metabólitos secundários conseguem resistir ao ataque de microorganismos, incluindo bactérias, parasitas, fungos e vírus.

Estudos realizados por Abdallah (2011) demonstram algumas plantas com potencial antimicrobiano, como *Psidium guajava* (atividade antimicrobiana contra *MRSA*); *Caesalpinia coriaria* (atividade antimicrobiana contra *K. pneumoniae*) e; *Allium sativum* (atividade antimicrobiana contra tuberculose multi-droga resistente (*XDR-TB*)).

1.5 Delineamento fatorial: ferramenta de avaliação multifatorial

O uso de ferramentas de avaliação é aplicado à otimização de métodos analíticos por suas vantagens em reduzir o número de experimentos que precisam ser executados, resultando no menor consumo de reagente e menor trabalho laboratorial, além de otimizar o processo e minimizar erros experimentais. Esses métodos, como experimento composto central e Box-Behnken, possibilitam, também, o desenvolvimento de modelos matemáticos a fim de avaliar os fatores em estudo e os efeitos de interação entre os fatores. (MARTINS, et al. 2013; FERREIRA, et al. 2007)

2. JUSTIFICATIVA

O uso de plantas para fins medicinais é uma fonte recorrente para o tratamento de doenças. Apesar do grande número de estudo sobre plantas medicinais, ainda há outras plantas os quais suas atividades biológicas não foram totalmente elucidadas.

Estudos sobre a espécie *Croton antisiphiliticus* Martius demonstram seu potencial anti-inflamatório, anticancerígeno e antimicrobiano, além dos compostos fitoquímicos possui. Entretanto, não se encontra na literatura estudos detalhados sobre qual parte da planta possui maior atividade biológica e influência do processo extrativo.

Com isso, o presente estudo pretende caracterizar os extratos de partes aéreas e partes subterrâneas de *Croton antisiphiliticus* Mart. para melhor conhecimento dos seus compostos fitoquímicos e propriedades antibacterianas, e, assim, contribuir com a comprovação da utilização do seu potencial terapêutico na medicina popular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do estudo é avaliar a influência de fatores no processo extrativo da maceração de *Croton antisyphiliticus* Mart. sobre a atividade antimicrobiana e obtenção de compostos polifenólicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter diferentes extratos macerados de *Croton antisyphiliticus* Mart.
- Caracterizar os extratos obtidos da espécie;
- Avaliar o potencial antimicrobiano em bactérias gram positivas e gram negativas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da droga vegetal e extratos

A espécie pé-de-perdiz foi coletada no Centro Olímpico da Universidade de Brasília, segundo as coordenadas geográficas 15°45'52.6"S e 47°51'22.7"W. A espécie teve uma exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília sob o *voucher* UB 24044. O projeto tem cadastro SisGen nº A7B10E5.

O material foi limpo, separado em partes aéreas e partes subterrâneas, secado em estufa de secagem (modelo Q316M, Quimis Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura de $50 \pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante e moído em moinho de facas (modelo SL32, Prismalab Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 3).

Figura 3 – Pó das partes aéreas (a) e partes subterrâneas (b) de *Croton antisiphiliticus* Mart.



No total 18 extratos foram produzidos por maceração, utilizando etanol 70%, como solvente extrator, seguindo o planejamento fatorial 3^2 , demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Delineamento fatorial 3^2 para os experimentos de maceração com as partes aéreas e partes subterrâneas de *Croton antisiphiliticus* Mart.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Proporção droga/solvente (X_1)	1:30	1:20	1:10
Tempo (min) (X_2)	7	10	13

4.2 Caracterização da droga vegetal e dos extratos

A determinação de resíduo seco em extratos fluidos e moles, teor de água e teor de cinzas totais, seguiram a metodologia preconizada na Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição (BRASIL, 2010).

A determinação de cinzas totais foi realizada com 3 g da droga vegetal que foi transferida para um cadinho e incinerada em mufla, aumentando-se gradualmente a temperatura até, no máximo, $600 \pm 25^{\circ}\text{C}$, até a completa remoção do carvão.

Para a determinação de teor de água foram transferidos 3 g da droga vegetal para pesa-filtro que foram dessecados previamente a 100°C durante 5 horas.

Na determinação de resíduo seco foram adicionados 2 mL do extrato em placa de Petri e colocados em banho-maria microprocessado (modelo Q334M, Quimis Ltda., São Paulo, Brasil) a 70°C até *secura*. Depois foram dessecados em estufa de secagem (modelo Q316m, Quimis Ltda., São Paulo, Brasil) a 105°C por 3 horas.

Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3 Determinação de polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais seguiu a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu.

Em um tubo, foram adicionados 50 μL das amostras diluídas (1:10), 3,95 mL de água destilada, 250 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e após 3 minutos foi adicionado 750 μL da solução de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os tubos foram homogeneizados e armazenados por 2 horas. Após esse intervalo, a leitura foi feita em 750 nm no espectrofotômetro (modelo U-3900, Hitachi Ltda., Tóquio, Japão).

A curva padrão foi realizada com solução de ácido gálico nas concentrações de 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400; e 500 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g de amostra seca (mg GAE/g).

4.4 Determinação de ácido gálico

A determinação de ácido gálico foi realizada utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por meio do aparelho de CLAE (modelo LaChrom Elite L-2130, Hitachi Ltda., Tóquio, Japão). A metodologia aplicada foi uma adaptação da descrita por Savietto et. al (2013).

Foi utilizada, como fase móvel, um gradiente linear de 20 minutos, partindo da proporção de 5% de ácido acético a 0,1% (fase A) e 95% de acetonitrila (fase B) até a proporção de 80% da fase A mais 20% da fase B. A temperatura da coluna ACE 5 C-18, de 150 x 4,6 mm, com tamanho da partícula de 5µm, foi ajustada para 40°C e a detecção feita em 352 nm. O fluxo e o volume de injeção foram iguais a 0,5 mL/min e 3 µL, respectivamente.

A curva padrão foi realizada com solução de ácido gálico em água nas concentrações de 10; 50; 100; 250; 500; 750 e; 1000 µg /mL. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g da amostra seca (mg GAE/g).

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana dos extratos das partes aéreas e partes subterrâneas de *Croton antisiphiliticus* foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade LS, Taguatinga, Distrito Federal, Brasil.

4.5.1 Preparo dos inóculos

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) foram cultivadas em ágar sangue e mantidas em estufa bacteriológica a 36,5C^o por 18 horas. As colônias isoladas foram suspensas em solução salina 0,85% e ajustadas a turbidez de uma solução padrão de McFarland de 0,5. O procedimento de diluição foi realizado conforme descrito na *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)* (2015).

4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

O MIC foi determinado pelo teste de microdiluição em placa de 96 poços. Concentrações variadas dos extratos, diluídos com DMSO 2,5% e caldo Müller-Hinton, foram adicionadas aos poços contendo caldo e bactéria totalizando 200 μ L de volume final. O controle negativo foi o caldo puro e o controle positivo, as bactérias e caldo puro. As placas foram incubadas a \pm 37°C por 24h em estufa bacteriológica (modelo Q316m, Quimis Ltda., São Paulo, Brasil). As microplacas foram lidas, no comprimento de onda de 630 nm, em leitora de placa de Elisa (modelo Polaris, Celer Ltda., São Paulo, Brasil).

4.6 Análise Estatística

A metodologia do ajuste à curva de dose-resposta sigmoideal foi aplicada para cálculo do IC₅₀ e foi realizada a análise da repetibilidade dos dados por meio do intervalo de correlação intraclassa a 95%.

As variáveis do estudo foram expressas por meio da média \pm desvio padrão. Para a análise dos fatores escolhidos sobre as variáveis, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Os *softwares* estatísticos utilizados foram Statistica[®] 10 (Dell Software Inc., Texas, EUA) e GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., Califórnia, EUA), considerando o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

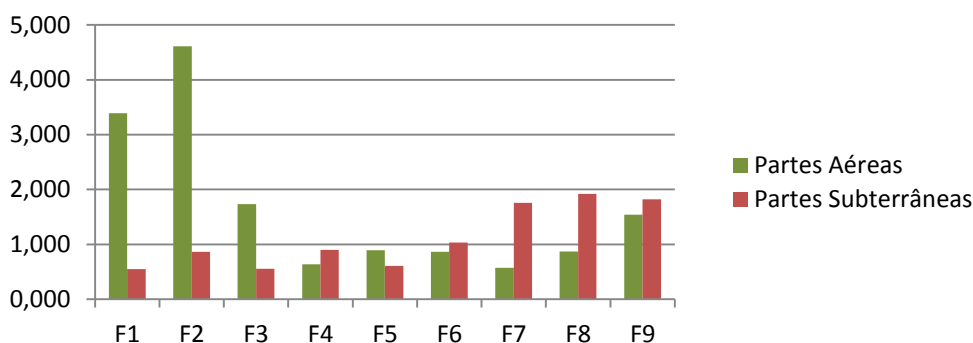
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da droga vegetal e dos extratos

Seguindo o preconizado na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010) foram obtidos os valores de teor de cinzas igual a 12,10% para partes aéreas e 8,78% para partes subterrâneas de *C. antisiphiliticus* Mart. Já os valores de teor de água foram 7,76% e 9,15% para partes aéreas e partes subterrâneas, respectivamente.

Como demonstrado na Figura 4, a experimento F2 (10 dias/1:30 p/v) dos extratos de partes aéreas e a experimento F8 (13 dias/1:10 p/v), obtiveram o maior teor de sólidos totais.

Figura 4 – Teor de sólidos totais dos extratos das partes aéreas e partes subterrâneas de *Croton antisiphiliticus* Mart.



No geral, os extratos das partes aéreas obtiveram maior teor de sólidos totais do que os extratos de partes subterrâneas, com valores bem superiores como os experimentos F1 (7 dias/1:30 p/v) e F2 (10 dias/1:30 p/v) de extratos das partes aéreas.

O reagente Folin-Ciocalteu, utilizado para a determinação de polifenóis totais, consiste numa mistura de molibdato de sódio (Na_2MoO_4), tungstato de sódio (Na_2WO_4) e outros reagentes. A cor azul produzida, absorvida em 750 nm, é formada pela reação do reagente com os polifenóis (EVERETTE et al., 2010), e, por meio da equação da reta $y = 0,9891x + 35,074$ ($R^2 = 0,9978$), foi feita a quantificação do polifenóis presente nos extratos. Os maiores valores de polifenóis totais obtidos para os extratos foram iguais a 411,37 mg nas partes aéreas GAE/g (experimento F3) e

227,65 mg GAE/g nas partes subterrâneas (experimento F2), respectivamente.

(Tabela 2)

Tabela 2 – Caracterização dos extratos de partes aéreas e partes subterrâneas de *C. antisiphiliticus* Mart.

Experimento	Tratamento		TST (%)	F (mg GAE/g)	G (mg GAE/g)
	P (p/v)	T (dias)			
Partes aéreas					
F1	1:30	7	3,39 ± 0,15	162,30 ± 6,65	48,73 ± 6,12
F2	1:30	10	4,60 ± 0,08	195,68 ± 9,26	57,71 ± 0,56
F3	1:30	13	1,73 ± 0,06	411,37 ± 8,23	75,97 ± 0,37
F4	1:20	7	0,63 ± 0,02	88,49 ± 1,20	66,81 ± 0,89
F5	1:20	10	0,89 ± 0,03	161,29 ± 34,65	79,07 ± 0,30
F6	1:20	13	0,86 ± 0,02	206,50 ± 39,95	68,25 ± 0,76
F7	1:10	7	0,57 ± 0,07	63,31 ± 11,31	32,69 ± 0,39
F8	1:10	10	0,87 ± 0,01	85,95 ± 26,11	25,60 ± 0,23
F9	1:10	13	1,53 ± 0,06	155,24 ± 0,85	17,22 ± 0,32
Partes subterrâneas					
F1	1:30	7	0,54 ± 0,03	195,96 ± 17,00	162,77 ± 0,58
F2	1:30	10	0,86 ± 0,01	227,65 ± 12,90	166,15 ± 0,95
F3	1:30	13	0,55 ± 0,01	145,09 ± 11,35	90,63 ± 0,18
F4	1:20	7	0,89 ± 0,02	200,82 ± 3,56	99,38 ± 0,2
F5	1:20	10	0,60 ± 0,05	85,58 ± 0,55	27,92 ± 0,04
F6	1:20	13	1,03 ± 0,06	182,31 ± 15,82	177,79 ± 0,66
F7	1:10	7	1,75 ± 0,04	156,73 ± 6,05	87,17 ± 0,93
F8	1:10	10	1,92 ± 0,08	198,61 ± 10,85	198,37 ± 0,01
F9	1:10	13	1,81 ± 0,07	140,73 ± 13,92	47,33 ± 0,7

Resultados expressos em média ± desvio padrão de três repetições. P= proporção droga/solvente, T= tempo; TST= teor de sólidos totais; F= polifenóis totais; G= ácido gálico.

A determinação de ácido gálico por CLAE foi possível por meio da equação da reta $y = 127,443x - 10,160$ ($R^2 = 0,990$). O experimento F5 obteve maior quantidade de ácido gálico, com valor igual a 79,07 mg GAE/g, já para os extratos de partes subterrâneas o maior valor foi obtido pelo experimento F8, com valor igual a 198,37 mg GAE/g. (Tabela 2)

É importante ressaltar que para as determinações de polifenóis totais e ácido gálico foi levado em consideração o teor de água presente na droga

vegetal, tanto das partes aéreas quanto partes subterrâneas. Os cálculos foram realizados em mg de polifenóis por mL e quantificados em mg de ácido gálico por grama da droga vegetal utilizada no preparo dos extratos.

Carvalho (2013) realizou um estudo sobre a quantidade de polifenóis totais do extrato bruto de partes aéreas de *C. antisiphiliticus*, produzido por maceração com etanol hidratado 96% durante 21 dias. Utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, a quantidade de polifenóis no extrato foi igual a $91,03 \pm 0,82$ mg de ácido gálico por grama do extrato.

Em comparação com os valores obtidos para os extratos de partes aéreas analisados neste trabalho, pode-se dizer que, no geral, foram obtidos maiores quantidades de polifenóis totais, comparado com o trabalho de Carvalho (2013). A diferença nos resultados pode ter sido pelo uso de delineamento fatorial para a produção dos extratos, além da época e local de coleta de *C. antisiphiliticus* diferentes de Carvalho (2013).

Na literatura não há estudos que possam ser comparados com os resultados de polifenóis totais para os extratos de partes subterrâneas de *C. antisiphiliticus*. Comparando os polifenóis totais obtidos pelos extratos de partes aéreas e partes subterrâneas, a quantidade de polifenóis totais obtida pelos extratos de partes subterrâneas foi superior.

O gráfico de Pareto, demonstrado na Figura 5, para os extratos de partes aéreas, não houve nenhuma influência dos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias) para as variáveis estudadas, exceto para a concentração inibitória mínima dos extratos analisados com *E. coli* e *S.aureus*. Para essas variáveis, os fatores mostraram ter um efeito positivo separadamente, com um efeito ligeiramente maior para o fator de proporção droga/solvente. Foi observado que quanto menor a proporção droga/solvente (1:30 e 1:20 p/v) e maior o tempo de extração (10 e 13 dias), melhores valores de MIC para *S. aureus* e *E.coli* são obtidos quando testados com os extratos de partes aéreas.

Resultado semelhante foi encontrado para os extratos de partes subterrâneas de *C. antisiphiliticus*, o qual pelo gráfico de Pareto (Figura 6) foi demonstrado que apenas para a variável de concentração inibitória

mínima dos extratos analisados com *E. coli* foi observado influência do fator proporção droga/solvente.

O ajustamento dos dados nas análises das partes aéreas foi, no geral, igual a 0,9. Já para os extratos de partes subterrâneas esse valor de R^2 foi inferior a 0,5 nos estudos com as variáveis: polifenóis totais e ácido gálico. Justifica-se a ocorrência desse fato à queda de energia provocada por chuvas fortes na faculdade de Ceilândia – UnB, o que alterou a temperatura da geladeira, de 2-8°C para 40 °C, onde estavam armazenados os extratos.

Figura 5 – Gráfico de Pareto representando a influência dos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias) sobre o teor de sólidos totais (a), teor de ácido gálico (b), teor de polifenóis totais (c), concentração inibitória mínima de *E. coli* (d) e concentração inibitória mínima de *S.aureus* dos extratos de partes aéreas de *C. antisiphiliticus* Mart. (e)

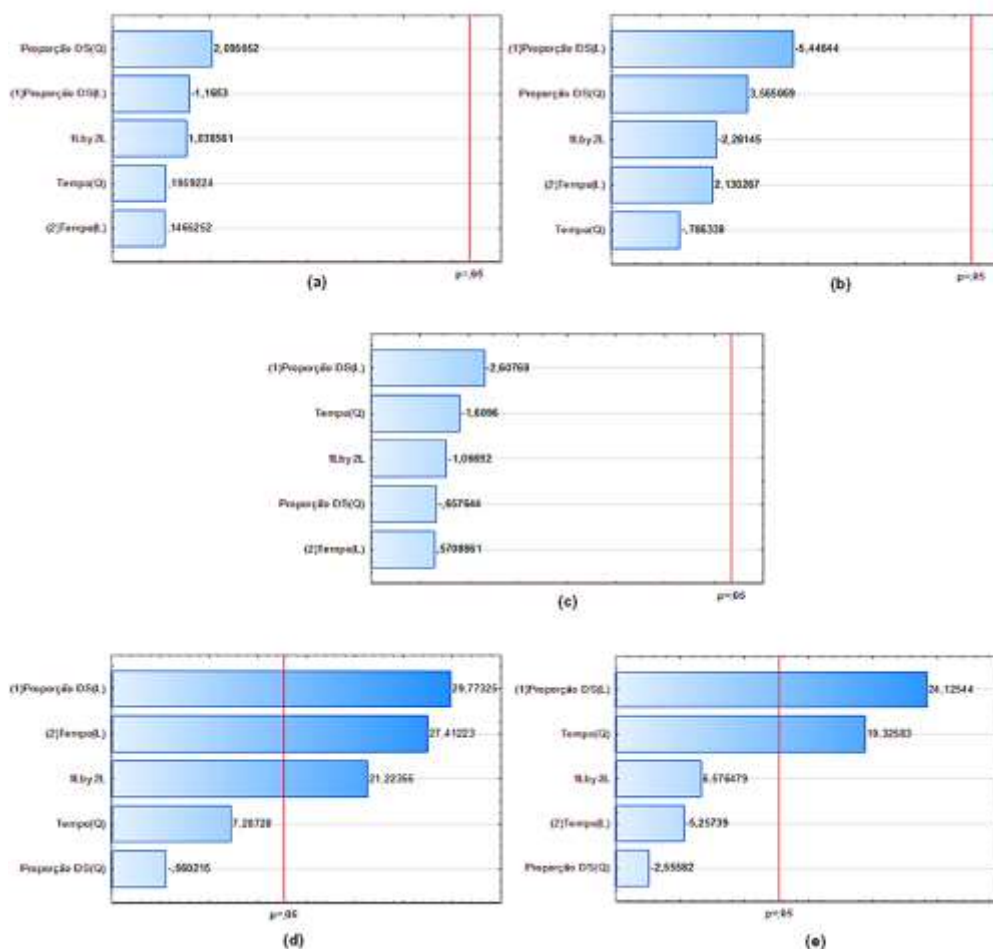
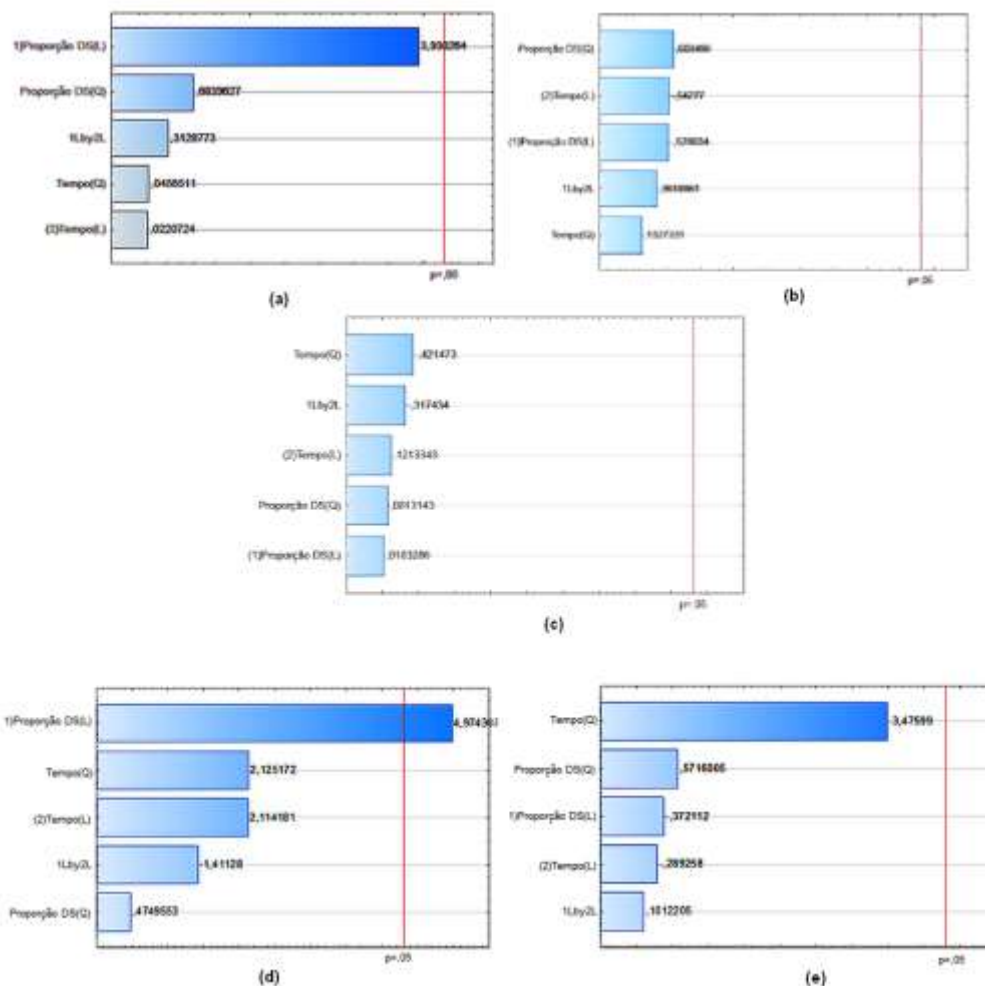


Figura 6 – Gráfico de Pareto representando a influência dos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias) sobre o teor de sólidos totais (a), teor de ácido gálico (b), teor de polifenóis totais (c), concentração inibitória mínima de *E. coli* (d) e concentração inibitória mínima de *S.aureus* dos extratos de partes subterrâneas de *C. antisiphiliticus* Mart. (e)



5.2 Atividade antimicrobiana

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) foram avaliadas em relação a IC₅₀ e IC₉₉ (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (MIC) de partes aéreas e partes subterrâneas de *C. antisyphiliticus* Mart

Experimento	IC ₅₀ (mg/mL)		IC ₉₉ (mg/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Partes aéreas				
F1	0,19 (0,09–0,40)	0,23 (0,10–0,53)	19,18	22,77
F2	2,45 (2,6.10 ⁻⁹ –2,45)	ND	251,76	ND
F3	0,12 (0,03–0,35)	1.10 ⁻³ (1.10 ⁻³ –6,95)	11,58	0,13
F4	0,29 (0,17–0,48)	0,33 (4.10 ⁻³ –6,21)	28,75	32,88
F5	0,71 (0,14–3,60)	4.10 ⁻³ (1.10 ⁻⁴ –0,13)	70,56	0,45
F6	2,79 (1,68–6,36)	0,17 (0,06–0,47)	275,72	16,98
F7	0,83 (0,19–3,48)	0,50 (0,30–0,81)	81,86	49,58
F8	4,25 (3,56–5,06)	0,29 (0,17–0,48)	420,75	28,78
F9	0,55 (0,27–1,21)	ND	54,91	ND
Partes subterrâneas				
F1	ND	0,21 (0,14–0,30)	ND	20,72
F2	0,05 (0,03–0,07)	0,36 (0,18–0,71)	5,31	35,82
F3	0,55 (0,15–1,97)	0,013 (0,04–0,05)	54,09	1,38
F4	0,25 (0,01–4,38)	0,045 (2.10 ⁻³ –0,01)	25,23	4,94
F5	0,05 (0,01–0,17)	0,19 (0,14–0,25)	4,90	18,92
F6	0,68 (0,01–426,6)	0,08 (0,06–0,12)	67,58	8,14
F7	0,94 (0,58–1,52)	0,05 (0,02–0,15)	93,18	4,99
F8	0,90 (0,70–1,18)	0,30 (0,24–0,40)	89,30	30,46
F9	0,99 (0,70–1,40)	0,02 (0,01–0,06)	98,21	2,52

IC₅₀= concentração inibitória em 50% (MIC); IC₉₉= concentração inibitória em 99% (MBC); ND = não determinado

Não há um consenso sobre a classificação da concentração inibitória mínima, mas para este trabalho foi adotado o critério utilizado por Machado et. al (2005). Esta classificação considera a atividade antibacteriana dos extratos excelente para valores abaixo de 10 µg/mL; boa de 10 a 100 µg/mL; moderada de 100 a 500 µg/mL; fraca de 500 a 1000 µg/mL e; acima de 1000 µg/mL os extratos são considerados inativos.

Os extratos das partes aéreas e partes subterrâneas apresentam variação quanto ao resultado da concentração inibitória mínima. Os extratos das partes aéreas de *C. antisyphiliticus*, testados com *S. aureus*, apresentaram resultados de MIC excelentes para os experimentos F3 e F5, com valores iguais a 0,001 mg/mL (1 µg/mL) e 0,004 mg/mL (4 µg/mL), respectivamente. Os demais resultados foram considerados moderados. Os testes com *E. coli* apresentaram valores considerados moderados e fracos.

Os experimentos F3 e F5, que obtiveram bons valores de MIC para *S. aureus*, também obtiveram os maiores valores de ácido gálico, iguais a 75,95 mg GAE/g e 79,07 mg GAE/g, respectivamente, comparado com outras experimentos. Isso sinaliza para uma possível atividade antimicrobiana do ácido gálico presente em maiores concentrações nesses extratos. Lembrando que dentre as várias propriedades do ácido gálico, uma delas é a ação antimicrobiana. (WOLF, 2017)

Carvalho (2013) realizou um estudo com as partes aéreas de *C. antisyphiliticus* em relação à atividade antimicrobiana para *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), obtendo valores iguais a 250 µg/mL, para as duas bactérias testadas, sendo o extrato considerado inativo. No presente trabalho, os valores de MIC para partes aéreas foram considerados melhores que os apresentados por Carvalho (2013). Dessa forma, atribui-se ao método extrativo utilizado o sucesso na obtenção de melhores valores de MIC.

Para os extratos das partes subterrâneas de *C. antisyphiliticus* testados com *S. aureus*, o MIC apresentou, em sua maioria, resultados considerados bons, com valores de MIC igual a 0,013 mg/mL (13 µg/mL) e 0,02 mg/mL (20 µg/mL) para os experimentos F3 e F9, respectivamente. O restante apresentou valores classificados como moderado. Já os testes realizados com *E. coli* demonstrou que grande parte das experimentos testadas apresentou MIC classificado como moderado e fraco, com exceção dos experimentos F2 e F5 que apresentaram MIC igual a 0,05 mg/mL (50 µg/mL), sendo considerados bons.

Em estudo realizado por Pereira et. al (2012) com extrato das partes subterrâneas de *C. antisyphiliticus*, produzido por maceração CHCl₃, foi observado que o MIC para *S. aureus* (ATCC 6538) foi igual a 2,5 mg/mL e

para *E. coli* (ATCC 25999) foi igual a 2 mg/mL. Em comparação com os resultados obtidos pelo presente estudo, os valores de MIC tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli* foram melhores. A esse fato atribui-se o método extrativo utilizado que apresentou maior sucesso.

A mesma correlação feita entre os extratos de partes aéreas e a quantidade de ácido gálico não foi possível para os extratos de partes subterrâneas, visto que, os extratos podem ter sofrido alteração em sua composição após a queda de energia e alteração na temperatura de geladeira onde estavam armazenados, levando a dados incorretos sobre a quantidade de ácido gálico e polifenóis totais.

Apesar dos extratos de partes aéreas terem obtidos valores excelentes de MIC, no conjunto os extratos de partes subterrâneas foram melhores apresentando menores valores de MIC e MBC, tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli*.

Os extratos, tanto de partes aéreas como de partes subterrâneas, apresentam MIC classificado como moderado e fraco quando testados com *E. coli*. Isso pode ser explicado pela diferença na estrutura das bactérias Gram-negativas, visto que, estas apresentam uma parede celular composta de peptidoglicano, uma membrana externa contendo lipopolissacarídeo e um espaço periplasmático contendo enzimas capazes de destruir moléculas estranhas. (ASKARI et al., 2012; DUFFY; POWER, 2002)

Segundo Ostrosky et al. (2008) as variações nos valores da concentração inibitória mínima (MIC) de extratos de plantas podem ser devido à técnica aplicada, linhagem dos microrganismos, a origem da planta e época da colheita, tipo de material vegetal utilizado e a quantidade de extrato testada. Além disso, atribuem-se as variações dos valores de MIC, o método extrativo e o solvente de extração.

Foi observado que os extratos com maiores concentrações não apresentaram bons resultados por obterem valores de MIC elevado. Em contrapartida, os extratos com menores concentrações tiveram melhores resultados no teste. Acredita-se que esse fato ocorreu porque em concentrações menores, mais moléculas de água estão ligadas às substâncias fitoquímicas com ação antimicrobiana. Já os extratos com

concentrações maiores, não possuem moléculas de água disponíveis como ligantes, sendo assim, os compostos reagem entre si, formam dímeros ou se ligam a outras moléculas, reduzindo sua eficácia.

6. CONCLUSÃO

É possível concluir que foram obtidos extratos bem variados entre si e apresentaram resultados satisfatórios em relação ao estudo da determinação de polifenóis totais, ácido gálico e da concentração inibitória mínima. Sendo que os extratos das partes aéreas demonstraram melhores valores de teor de ácido gálico e os extratos de partes subterrâneas mostraram melhores resultados quanto ao teor de polifenóis totais e concentração inibitória mínima para as duas bactérias testadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, Emad M. Plants: An alternative source for antimicrobials. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, Saudi Arabia, v. 6, n. 1, p.16-20, jul. 2011.

AMERICANO, Túlio. **Fitoterapia Brasileira**. Brasília: Cidade Gráfica Editora, 2015.

ANDRE, Ana Claudia Garcia Medeiros; SILVA, Ana Paula Freitas da; VASCONCELOS, Eduardo Motta de. Caracterização físico-química do material vegetal e dos extratos de *Cestrum laevigatum* Schltld (Solanaceae). **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde Fits**, Maceió, v. 1, n. 12, p.11-19, maio 2013

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 1, n. 66, p.1-9, jul. 2006.

ASKARI, Galal Al et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **American- Eurasian Journal Of Agricultural & Environmental Sciences**, [S.I.], v.12, n. 1, p. 85-90, 2012.

ASLAN, N.; CEBECI. Y. Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. **Fuel**, [S.I.], v. 86, n. 1-2, p.90-97, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2006.06.010>.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BRANDÃO, Maria das Graças Lins; PIGNAL, Marc (Org.). **Plantas usuais dos brasileiros**. [S.l.], IDM, 2009. 392 p.

BRASIL. ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. 525 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**, 2012. <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> (acesso em 02 maio 2018).

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado – PPCerrado**, 2009. http://www.mma.gov.br/estruturas/182/_arquivos/ppcerrado_consultapublica_182.pdf (acesso em 21 maio 2018).

CARVALHO, Francieli Kanumfre de et al. **Análise fitoquímica e atividade biológica de *Croton antisiphiliticus* Martius e *Croton heterodoxus* Baillon**. 2013. 224 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **About Antimicrobial Resistance**, 2017. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> (acesso em 27 maio 2018).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CORDEIRO, I et al. **Croton** in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2018. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17501> (acesso em 05 dezembro 2018).

DIAS, Jaqueline Evangelista. **Farmacopéia popular do cerrado**. Articulação Pacari, 2009.

DUFFY, C. F; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v .17, n.6, p. 527-529, jun. 2001. Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00326-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00326-0)

EVERETTE, Jace D. et al. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the *Folin-Ciocalteu* Reagent. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.l.], v. 58, n. 14, p.8139-8144, 28 jul. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf1005935>.

FAIR, Richard J.; TOR, Yitzhak. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 6, p. PMC. S14459, 2014.

FERNANDES, V. C. et. al. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1005-1011, 2013.

FERREIRA, S.L.C et al. **Box-Behnken design: An alternative for optimization of analytical Methods**. *Analytica Chimica Acta*: 597 (2007) 179–186

GENEVA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**: Volume 1, 1999.

GENEVA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**, 2003.

GENEVA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows**, 2018.

GREENWALL, M.; RAHMAN, P.K.S.M. Medicinal Plants: Their Use In Anticancer Treatment. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.4103-4112, 1 nov. 2015. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. [http://dx.doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.6\(10\).4103-12](http://dx.doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.6(10).4103-12).

JANUÁRIO, Sônia Regina; SILVÉRIO-LOPES, Sandra. O poder terapêutico do ipê roxo e seu uso na terapia complementar ao tratamento de neoplasias. **Revista Brasileira de Terapia e Saúde**, [S.l.], v. 1, n. 5, p.9-14, jan. 2014.

LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.77-84, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>.

MACHADO, K.E. et al. Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.636-639, jan. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200500303817>.

MARTINS, Rodrigo Molina et al. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, [S.l.], v. 50, n. 2, p.657-663, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.030>

MORE: Mecanismo online para referências, versão 2.0. Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013. <http://www.more.ufsc.br/> (acesso em 26 maio 2018).

NADER, Talita T. et al. Avaliação in vitro da eficácia de extratos de plantas medicinais do Cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.l.], v. 77, n. 3, p. 429-433, jul/ago. 2010.

OLIVEIRA, Hans Werner Castro; VIVEIRO, Alessandra Aparecida. Cerrado e plantas medicinais: algumas reflexões sobre o uso e a conservação. **Ensino, Saúde e Ambiente**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 102-120, 2012.

OLIVEIRA, Taíce Gonçalves de et al. Micropropagação de *Croton antisyphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 41, n. 10, p.1712-1718, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782011001000006>.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 301-307, abr/jun. 2008

PEREIRA, Sarazete et al. An ent-kaurane-type diterpene in *Croton antisyphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 8851-8858, 2012.

REIS, Gustavo Oliveira dos. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *Croton antisyphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) no modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.** 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE (United Kingdom). **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**, 2016. 84 p.

SAVIETTO, Joice P. et al. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, [S.l.], v. 23, n. 4, p.662-667, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2013005000058>.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SODRÉ, Rodolfo Carneiro; SILVA, Marcos José da; SALES, Margareth Ferreira de. *Croton L.* (Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, [S.l.], v. 65, n. 1, p.221-234, mar. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-78602014000100015>.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

THE PLANT LIST: A working list of all plants, versão 1.1, 2013. <http://www.theplantlist.org/> (acesso em 20 novembro 2018).

WILLMER, Edward Nevill (Ed.). **Cells and Tissues in Culture: Methods, Biology and Physiology**. London: American Press, 1996. 842 p

WOLF, Vanessa Gonçalves. **Ácido gálico e seus ésteres como agentes sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos**. 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Araraquara, 2017.