



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E  
BIOLÓGICAS – PPGCSB**

**FÁBIA FERREIRA CAMPINA**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E CAPACIDADE  
MODIFICADORA DA AÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE USO  
CLÍNICO DOS EXTRATOS DE *Croton heliotropiifolius* KUNTH E  
*Croton blanchetianus* BAILL**

**PETROLINA-PE**

**2023**

**FÁBIA FERREIRA CAMPINA**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,  
ANTIBACTERIANA E CAPACIDADE MODIFICADORA DA AÇÃO DE  
ANTIBIÓTICOS DE USO CLÍNICO DOS EXTRATOS DE *Croton*  
*heliotropiifolius* KUNTH E *Croton blanchetianus* BAILL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde e Biológicas – PPGCSB, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências das Saúde e Biológicas.

**Orientadora:** Dra. Gabriela Lemos de Azevedo Maia.

**Coorientador interno:** Dr. Felipe Silva Ferreira

**Coorientador externo:** Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

**PETROLINA-PE**

**2023**

C196a Campina, Fábيا Ferreira  
Análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e capacidade modificadora da ação de antibióticos de uso clínico dos extratos de *Croton Heliotropiifolius* Kunth e *Croton Blanchetianus* Baill/ Fábيا Ferreira Campina. - Petrolina, 2023.

xv, 83 f. : il. ; 28 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2023.

Orientador (a): Prof. (a) Dra. Gabriela Lemos de Azevedo Maia.

Inclui referências.

1. Plantas Medicinais. 2. *Croton heliotropiifolius*. 3. *Croton blanchetianus*. 4. Resistência bacteriana. I. Título. II. Maia, Gabriela Lemos de Azevedo. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 581.634

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

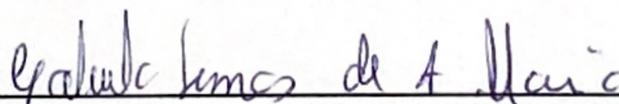
FÁBIA FERREIRA CAMPINA

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-BACTERIANA E CAPACIDADE MODIFICADORA DA AÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DE USO CLÍNICO DOS EXTRATOS DE CROTON HELIOTROPIIFOLIUS KUNTH E CROTON BLANCHETIANUS BAILL

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase na linha de pesquisa: Biodiversidade, Tecnologia e Recursos Naturais, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 15 de março de 2023

**Banca Examinadora**

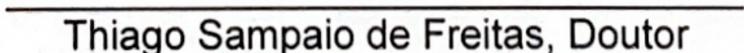


Gabriela Lemos de Azevedo Maia, Doutora  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf



Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo, Doutora  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf

  
Janaína Esmeraldo Rocha, Doutora  
Universidade Regional do Cariri – URCA

  
Thiago Sampaio de Freitas, Doutor  
Universidade Regional do Cariri – URCA

Dedico todo esse trabalho aqueles que em nenhum momento desacreditaram de mim, até mesmo quando eu não acreditava em mim mesma, quando nas angústias das noites em claro, das lágrimas que deixaram por muitas vezes o lençol encharcado, foram a minha força e fortaleza, não me deixando desistir. Meu único bem maior, minha **FAMÍLIA AMADA** (minha mãe [Socorro], meu pai [Francisco] e meu amado irmão [Fábio]).

Obrigada **DEUS** pela minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por ser minha rocha e me agraciado com perseverança e propósito para conquistar meus objetivos. Por me encher de coragem em todas às vezes que pensei em desistir e aquecer meu coração em todos os momentos de solidão. A minha terna mãe, a Virgem de Aparecida, por me embalar em seu manto santo quando a fé queria enfraquecer.

A minha família, que em meio a toda dificuldade sempre acreditou em mim e me proporcionou todas as oportunidades para os meus estudos, além de ter me mostrado que mais importante do que ser melhor que os outros é ser o melhor que você puder ser, sendo sempre meu maior orgulho e exemplo de coragem.

Agradeço a minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dra. Gabriela Lemos de Azevedo Maia** pela paciência, motivação e muita atenção, por me acolher em seu grupo de pesquisa. Um exemplo de ser humano que antes de exercer o papel de orientadora deixou claro para mim e as meninas (**Gabriela, Elaine e Paloma**) do nosso grupo de pesquisa, que somos seres humanos e que em meio a correria do dia a dia poderíamos contar com seu apoio como amiga. Gratidão professora!

Agradeço ao **Prof. Dr. Felipe Silva Ferreira** por aceitar ser meu coorientador-interno.

De maneira particular gostaria também de agradecer ao **Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**, que prontamente aceitou o convite de coorientador externo. Agradeço por todo ensinamento, que desde a graduação me acompanha nesse mundo acadêmico. Sempre fez questão de incentivar e ensinar da melhor forma para todos os seus alunos sempre qual a melhor opção e forma de seguir nessa caminhada acadêmica, um exemplo de pessoa; é como ele mesmo diz “**Aluno descansa carregando pedra**”, ainda vou caminhar um pouquinho carregando essas pedras.

Agradeço a colaboração do Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA) do Departamento de Química Biológica, na Universidade Regional do Cariri (URCA), na pessoa do **Prof. Dr. Francisco Bezerra de Assis Cunha**, por permitir a extração dos extratos.

Agradeço de maneira muito especial a **Gabriela** por ser ponte entre mim e a UNIVASF nos meus testes químicos, por esclarecer minhas dúvidas. Minha gratidão.

Agradeço aos meus amigos que ao longo de minha graduação estiveram comigo e nesse caminho tão árduo e cheio de obstáculos permaneceram: **Socorro** (Corrinha) (minha amiga fiel sempre disposta a me escutar quando a minha insegurança queria tomar conta de mim); **Thiago Sampaio** (amigão) por sempre me ajudar quando preciso (**O Dr. mais fresco da Urca**); a minha eterna amiga **Janaina Esmeraldo** por ser espelho na busca pelos nossos sonhos, mostrando que sempre podemos ser capazes, **OBRIGADA MEUS AMIGOS**. Amo a vida de vocês. Gratidão por permanecerem no meu caminho.

Agradeço a três grandes amigas que no silêncio da minha alma, souberam e sabem me compreender e no silêncio de um coração contrito entregam minha vida para que ela seja guiada pelo Santo Espírito Santo de **DEUS: Adyleia** (a que me conhece), **Andressa** (a que cuida de mim) e **Maria Nadya** (a que reza por mim), vocês são solo santo onde ao pisar sinto a presença de Deus. Gratidão por permanecerem nesse caminho até o topo da montanha.

Agradeço de forma particular a todos (as) que direta e indiretamente torcem por mim, que torceram para que eu conseguisse passar no mestrado, pois a batalha foi árdua, mas os frutos são doces. A minha gratidão.

Agradeço às agências de fomento **FACEPE** e **CNPQ** pelo apoio financeiro.

Agradeço a Universidade Federal do Vale do São Francisco e a Universidade Regional do Cariri, pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

**Gratidão!!!**

“É também nos alegamos nos sofrimentos, pois sabemos que os sofrimentos produzem a paciência, a paciência traz a aprovação de Deus, e essa aprovação cria a esperança. Essa esperança não nos deixa decepcionados, pois Deus derramou o seu amor no nosso coração, por meio do Espírito Santo, que ele nos deu. ”

**(Rm 5, 3-5)**

## RESUMO

O Brasil se destaca por possuir uma das mais importantes biodiversidades do mundo. Dentre os biomas brasileiros está a vegetação de caatinga, onde diversas plantas medicinais são encontradas, dentre estas, espécies da família Euphorbiaceae têm sido relatadas. Pertencentes ao gênero *Croton*, segundo maior desta família, as espécies *Croton heliotropiifolius* Kunth e *Croton blanchetianus* Baill são usadas na medicina popular na forma de infusão ou chá no tratamento de diversas patologias como dor no estômago e diarreia. Com base no potencial terapêutico das plantas medicinais e na necessidade da descoberta de novas substâncias bioativas, o presente trabalho teve por objetivos identificar as classes de metabólitos secundários, quantificar os teores de fenóis e flavonoides, e avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato etanólico das folhas e casca do caule de *C. heliotropiifolius* Kunth e *C. blanchetianus* Baill. Para tal o extrato bruto foi obtido por maceração em etanol (95%). A identificação das classes de metabólitos secundários foi verificada por triagem química. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de sequestro de radical livre (DPPH) e pelo sistema de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido. A atividade antibacteriana foi analisada por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando duas linhagens bacterianas, uma Gram-negativa: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e uma linhagem Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e dois isolados clínicos multirresistentes: *Staphylococcus aureus* (SA 10) e *Escherichia coli* (EC 06) e através do potencial modulador da ação de antibióticos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. A triagem química permitiu identificar diferentes classes de metabólitos como fenóis, taninos e flavonoides. Os resultados obtidos para o teor de fenóis totais variaram de  $21,97 \pm 0,57$  a  $339,33 \pm 9$   $\mu\text{g}$  EAG/mg, sendo que o extrato das folhas do *C. blanchetianus* foi o que apresentou maior teor de fenólicos totais. O teor de flavonoides foi de  $0,29 \pm 0,03$  mg de EqC/g para o extrato das folhas do *C. blanchetianus* e  $0,11 \pm 0,01$  mg de EqC/g para o extrato das folhas do *C. heliotropiifolius*, respectivamente. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, o extrato das cascas do caule de *C. heliotropiifolius* mostrou maior atividade antioxidante no método do DPPH ( $C_{E50} 0,09 \pm 0,09$ ) e o extrato das folhas de *C. heliotropiifolius* apresentou melhor atividade no método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno ( $79,37 \pm 4,62$ ). O efeito antibacteriano foi verificado frente as bactérias *Escherichia coli* (EC 06) e *Staphylococcus aureus* (SA 10) que apresentaram CIM de 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, resultados clinicamente relevantes. As espécies em estudo apresentaram efeito sinérgico frente a *S. aureus* 10 quando associado aos antibióticos Ampicilina, Gentamicina e Norfloxacino. Com bases nos resultados obtidos, *Croton heliotropiifolius* Kunth e *Croton blanchetianus* Baill, podem ser considerados fontes alternativas de compostos bioativos tendo sido detectados no seu extrato a presença de importantes classes de metabólitos secundários, cuja presença destes constituintes químicos pode ser responsável por sua ação antioxidante e atividade antibacteriana.

**Palavras-chave:** *Croton heliotropiifolius*. *Croton blanchetianus*. Compostos fenólicos. Radicais livres. Resistência bacteriana.

## ABSTRACT

Brazil stands out for having one of the most important biodiversity in the world. Among the Brazilian biomes is the *Caatinga* vegetation where several medicinal plants are found, among these, species of the Euphorbiaceae family have been reported. Belonging to the genus *Croton*, the second largest of this family, the species *Croton heliotropiifolius* Kunth and *Croton blanchetianus* Baill are used in medicine. Popular in the form of infusion or tea in the treatment of various pathologies such as pain in the stomach and diarrhea. Based on the therapeutic potential of medicinal plants and the need to discover new bioactive substances, this study aimed to identify the classes of secondary metabolites, quantify the phenolic and flavonoid contents, and evaluate the antioxidant and antibacterial activity of the ethanolic extract of the medicinal plants. leaves and stem bark of *C. heliotropiifolius* Kunth and *C. blanchetianus* Baill. For this purpose, the crude extract was obtained by maceration in ethanol (96%). The identification of classes of secondary metabolites was verified through chemical screening. The extracts were characterized in terms of total phenols and flavonoids, and the antioxidant activity was evaluated using free radical scavenging methods (DPPH) and the  $\beta$ -carotene/acid cooxidation system. The antibacterial activity was analyzed by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using two bacterial strains, a Gram-negative: *Escherichia coli* (ATCC 25922) and a Gram-positive strain: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and two multiresistant clinical isolates: *Staphylococcus aureus* (SA 10) and *Escherichia coli* (EC 06) and through the potential modulator of the action of aminoglycoside antibiotics and fluoroquinolones. Chemical screening allowed identifying different classes of metabolites such as phenols, tannins, and flavonoids. The results obtained for the content of total phenols ranged from  $21.97 \pm 0.57$  to  $339.33 \pm 9$   $\mu\text{g}$  EAG/mg, with the extract of leaves of *C. blanchetianus* having the highest content of total phenolics. The flavonoid content was  $0.29 \pm 0.03$  mg EqC/g for the *C. blanchetianus* leaf extract and  $0.11 \pm 0.01$  mg EqC/g for the *C. heliotropiifolius* leaf extract, respectively. In the evaluation of the in vitro antioxidant activity, the extract of the stem bark of *C. heliotropiifolius* showed greater antioxidant activity in the DPPH method ( $\text{EC}_{50}$   $0.09 \pm 0.09$ ) and the extract of the leaves of *C. heliotropiifolius* showed better activity in the method of co-oxidation of  $\beta$ -carotene ( $79.37 \pm 4.62$ ). The antibacterial effect was verified against the bacteria *Escherichia coli* (EC 06) and *Staphylococcus aureus* (SA 10) that presented MIC of 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, clinically relevant results. The species under study showed a synergistic effect against *S. aureus* 10 when associated with the antibiotic's ampicillin, gentamycin, and norfloxacin. Based on the results obtained, *C. heliotropiifolius* Kunth and *C. blanchetianus* Baill can be considered as an alternative source of bioactive compounds having been detected in their extract the presence of important classes of secondary metabolites, whose presence of these chemical constituents may be responsible for the antioxidant action and antibacterial activity.

**Keywords:** *Croton heliotropiifolius*. *Croton blanchetianus*. Phenolic compounds. Free radicals. Bacterial resistance.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Planta Medicinal .....	22
<b>Figura 2</b> - <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth .....	26
<b>Figura 3</b> - <i>Croton blanchetianus</i> BAILL .....	27
<b>Figura 4</b> - Estrutura básica de um composto fenólico .....	31
<b>Figura 5</b> - Estrutura básica de um flavonoide .....	32
<b>Figura 6</b> - Célula bacteriana gram-positiva e gram-negativa .....	37
<b>Figura 7</b> - Mecanismo de resistência bacteriano .....	39
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática dos efeitos da CPZ em células bacterianas.	41
<b>Figura 9</b> – Área de estudo .....	43
<b>Figura 10</b> - Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Folha de <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH e <i>Croton blanchetianus</i> BAILL Ampicilina+ Sulbactam ....	61
<b>Figura 11</b> - Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Folha de <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH e <i>Croton blanchetianus</i> BAILL Gentamicina + Chlorpromazine .....	62
<b>Figura 12</b> - Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Folha de <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH e <i>Croton blanchetianus</i> BAILL Norfloxacino + Chlorpromazine .....	63
<b>Figura 13</b> - Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Casca do caule de <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH e <i>Croton blanchetianus</i> BAILL Ampicilina+ Sulbactam .....	64
<b>Figura 14</b> - Atividade modificadora dos extratos etanólico da Casca do caule de <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH e <i>Croton blanchetianus</i> BAILL Gentamicina + Chlorpromazina .....	65
<b>Figura 15</b> - Atividade modificadora dos extratos etanólico da Casca do caule de <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH e <i>Croton blanchetianus</i> BAILL Norfloxacina + Chlorpromazina.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Croton</i> citadas na literatura.....	24
<b>Tabela 2 –</b> Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos .....	44
<b>Tabela 3 –</b> Rendimento dos extratos das folhas e cascas do caule de <i>Croton heliotropiifolius</i> e <i>Croton blanchetianus</i> .....	51
<b>Tabela 4 –</b> Classes de metabólitos secundários identificados no extrato de <i>Croton heliotropiifolius</i> e <i>Croton blanchetianus</i> .....	53
<b>Tabela 5 –</b> Determinação do teor de fenóis e flavonoides.....	54
<b>Tabela 6 –</b> Atividade Antioxidante–Sequestro do Radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil) e a Co-Oxidação do Sistema $\beta$ -Caroteno/Ácido Linoleico dos Extratos Etanólico .....	56
<b>Tabela 7 –</b> Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM em $\mu\text{g/mL}$ .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>EEFCB</b>	Extrato etanólico da folha de marmaleiro ( <i>Croton blanchetianus</i> Baill)
<b>EEFCH</b>	Extrato etanólico da folha do velame ( <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth)
<b>EECCB</b>	Extrato etanólico da casca do caule do marmaleiro ( <i>Croton blanchetianus</i> Baill)
<b>EECCH</b>	Extrato etanólico da casca do caule do velame ( <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth)
<b>EEB</b>	Extrato Etanólico Bruto
<b>µg eq.AG/g</b>	Microgramas equivalentes de ácido gálico por grama
<b>µg eq.QC/g</b>	Microgramas equivalentes de quercetina por grama
<b>AA</b>	Atividade antioxidante
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
<b>BHT</b>	Butil-hidroxi-tolueno
<b>BHA</b>	Ácido Beta-Hidróxido
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidraliza
<b>HCDAL</b>	Herbário Cariense Dárdano de Andrade Lima
<b>HIA</b>	<i>Heart Infusion</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	20
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	20
3.2 FAMÍLIA Euphorbiaceae Juss.	22
3.3 GÊNERO <i>Croton</i>	24
3.4 <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	26
3.5 <i>Croton blanchetianus</i> Baill	27
3.6 FITOQUÍMICA	27
3.7 METABOLITOS SECUNDÁRIOS	28
<b>3.7.1 Compostos fenólicos</b>	29
<b>3.7.2 Flavonoides</b>	30
<b>3.7.3 Radicais livres e antioxidantes</b>	31
3.8 RESISTÊNCIA BACTERIANA A MULTIDROGAS	33
<b>3.8.1 Bactérias</b>	35
<b>3.8.2 <i>Sataphylococcus aureus</i></b>	36
<b>3.8.3 <i>Escherichia coli</i></b>	37
3.9 ANTIBIÓTICOS E OS MECANISMOS DE AÇÃO	37
3.10 INIBIDORES DE MECANISMO DE RESISTÊNCIA	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	41
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	41
4.2 SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	41
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	42
4.4 MICRORGANISMOS	42
4.5 ANTIBIÓTICOS E REAGENTES	43

4.6 MEIOS DE CULTURA	43
4.7 ANÁLISE QUÍMICA	44
4.7.1 Determinação De Fenóis Totais	44
4.7.2 Determinação de Flavonoides Totais	45
4.7.3 Atividade Antioxidante – Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e a Co-oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	45
4.7.4 Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1- picrilhidrazil)	46
4.7.5 Co-oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	46
4.8 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	47
4.8.1 Preparação e Padronização do Inoculo Bacteriano	47
4.8.2 Preparação Inicial das Soluções Teste	48
4.8.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Substâncias	48
4.8.4 Teste de Modulação da Ação de Antibióticos	49
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS	51
6.2 SCREENING FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS ETANÓLICO DAS FOLHAS E CASCA DO CAULE DE <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH E <i>Croton blanchetianus</i> BAILL	52
6.3 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA FOLHA E CASCA DO CAULE DE <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH E <i>Croton blanchetianus</i> BAILL	54
6.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – SEQUESTRO DO RADICAL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL) E A CO-OXIDAÇÃO DO SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO DOS EXTRATOS ETANÓLICO DE <i>Croton heliotropiifolius</i> KUNTH E <i>Croton blanchetianus</i> BAILL	55
6.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	58
6.6 EFEITO MODIFICADOR DA AÇÃO DO ANTIBIÓTICO	60
7. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

## 1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, na província de Wuhan, na China, foi registrado o primeiro caso de uma síndrome respiratória com espectro viral inicialmente desconhecido, com características infecciosas, causada pelo vírus identificado como Corona vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (Sars-CoV- 2). Comumente conhecido como Corona vírus. A partir de março de 2020, um grande número de casos se espalhou pelo mundo (DA COSTA GOMES *et al.*, 2021). Nesse período, portanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou uma pandemia global (OMS, 2021).

A pandemia de Covid-19 foi posteriormente declarada uma emergência internacional onde o cenário caótico da pandemia provocou uma busca por cuidados e prevenção não intervencionista, o que levou ao uso de medicamentos sem comprovação científica e ao aumento da automedicação, que neste contexto destaca o uso indiscriminado de antibióticos (SHARMA *et al.*, 2020).

O uso inadequado e excessivo de antibióticos sem avaliação adequada leva à progressão da resistência bacteriana, aquisição de mecanismos de resistências aos antimicrobianos, tornando-se um difícil obstáculo no tratamento de doenças. Este evento é mais comum em áreas hospitalares onde estas substâncias são frequentemente utilizadas. (TEIXEIRA *et al.*, 2019). A resistência bacteriana é um problema de saúde pública agravado pelo uso indiscriminado dos antibióticos em todo o mundo (SILVA *et al.*, 2021)

A busca por antibióticos de origem natural é crescente como alternativa à resistência de patógenos humanos e animais aos antibióticos mais conhecidos (OSTROSKY *et al.*, 2008). Diversos estudos mostram que o uso de extratos de plantas em combinação com antibióticos promove uma significativa redução das concentrações inibitórias mínimas sobre alguns isolados resistentes, o que demonstra ser essa uma fonte de pesquisa promissora especialmente diante da vasta biodiversidade brasileira (DARWISH *et al.*, 2002; AL-HEBSHI *et al.*, 2006; BETONI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; VINOD *et al.*, 2010).

Localizada no sul do estado do Ceará, a Chapada do Araripe é uma das 27 regiões de maior valor biológico do Brasil e as comunidades que vivem na região usam tradicionalmente cerca de 173 espécies de plantas nativas. No entanto, o potencial terapêutico da maioria dessas espécies é desconhecido. Como a exploração irracional de plantas nativas pode levar à perda de espécies nativas biologicamente importantes, a etnofarmacologia é necessária para apoiar a descoberta de novos fitoterápicos e promover seu uso sustentável aliado a pesquisa científica (PEREIRA DA CRUZ *et al.*, 2021).

Nesse sentido, alguns estudos de etnomedicina fornecem informações sobre os usos e propriedades medicinais de plantas utilizadas por muitas comunidades tradicionais da região semiárida do Cariri.

Pesquisas mostram que o perfil fitoquímico das espécies que compõem a família Euphorbiaceae inclui álcoois e hidrocarbonetos, além de compostos fenólicos, como flavonoides, lignina, cumarina, taninos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolato. É considerada uma das famílias mais importantes devido à diversidade de suas substâncias químicas biologicamente ativas (SEEBALUCK-SANDORAM *et al.*, 2017).

O gênero *Croton* é um dos gêneros mais diversos da família Euphorbiaceae. Vários efeitos terapêuticos dos compostos da família do *Croton* têm sido descritos na literatura, incluindo efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios, gastroprotetores, antibacterianos, antiespasmódicos, antimaláricos e antidiabéticos, e estes têm sido utilizados na medicina popular na forma de infusões, sendo constantemente usado para tratamento de doenças de estômago, vômitos, diarreia, hemorragia, hemoptise e edema (JUNIOR *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021; FIRMINO *et al.*, 2019).

Dentre as suas diferentes espécies, podemos citar duas espécies, *Croton heliotropifolius* Kunth e *Croton blanchetianus* Baill, comuns no nordeste do Brasil (MAIA-SILVA, 2012; SILVA *et al.*, 2017). *Croton heliotropifolius* é uma planta medicinal que tem despertado muito interesse devido à presença de compostos bioativos como: compostos fenólicos, flavonoides, cumarinas (DE SOUZA *et al.*, 2020). As seguintes atividades biológicas foram demonstradas para a espécie: atividade antifúngica (QUEIROZ *et al.*, 2014), antioxidante (SILVA *et al.*, 2017), antimicrobiana (ARAÚJO *et al.*, 2017) e larvicida (DORIA

*et al.*, 2010). Firmino *et al.*, (2019) em seus estudos demonstraram atividade antibacteriana em extratos de *C. blanchetianus* contra bactérias comuns na formação de biofilme oral.

Uma vez que as plantas do gênero *Croton* produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, a nossa pesquisa teve como objetivo caracterizar os perfis fitoquímicos de extratos etanólico, folhas e casca do caule de *C. heliotropifolius* Kunth e *C. blanchetianus* Baill e avaliar a atividade antibacteriana frente a bactérias padrões e multirresistente, visando contribuir com o conhecimento da flora brasileira.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição fitoquímica e o potencial antibacteriano dos extratos de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL , em infecções causadas por bactérias resistentes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a triagem fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas e cascas do caule das espécies estudadas e quantificar os fenóis e flavonoides totais;

Determinar a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e a Co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico dos extratos etanolicos de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*;

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos das espécies estudadas frente a bactérias padrões e multirresistente;

Avaliar a capacidade de interferência dos extratos etanólicos de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*, em modificar a ação dos antimicrobianos frente a cepa multirresistentes.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é uma das formas mais antigas de prática médica para tratar, curar e prevenir doenças. Esse uso milenar é resultado de uma busca constante por recursos naturais alternativos para melhorar a qualidade de vida. As plantas são utilizadas como matéria-prima para medicamentos e fitoterápicos ou como substâncias medicinais isoladas (BRAGA *et al.*, 2021).

Plantas medicinais (Figura 1) referem-se a plantas, naturalmente utilizadas ou cultivadas para fins medicinais devido aos seus efeitos benéficos, facilidade de aquisição e baixo custo. Devido ao alto custo das intervenções e tratamentos, os usuários do sistema público de saúde buscam tratamentos alternativos e complementares, destacando-se o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (FONSECA; GIOTTO, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial se beneficia das propriedades das plantas medicinais. No entanto, o desconhecimento sobre as propriedades medicinais e os riscos do uso indevido é um dos principais fatores que contribuem para o uso não regulamentado de ervas medicinais (LIMA; FERNANDES, 2020).

O Brasil é reconhecido mundialmente como um país rico em diversidade vegetal, com aproximadamente 44 mil a 55 mil espécies, ou 20% de todas as espécies vegetais do planeta. A livre troca dessas plantas em mercados e feiras levou a um crescimento anual de 6% a 7% no mercado de fitoterapia (POTSARIS, 2016).

Considerando o papel das plantas medicinais, a pesquisa científica é realizada em diversas partes, começando pela identificação correta da planta, seguida pela identificação e isolamento das substâncias, bem como a determinação de sua atividade em um organismo. Embora as substâncias ativas encontradas nessas plantas estejam geralmente em baixas concentrações, é necessário na utilização (NEDOPETALSKI; KRUPPEK 2020).

Figura 1- Planta Medicinal



Fonte: MARIOTTO, 2021.

Mauad (2016) enfatiza a importância de saber o que se está consumindo e para qual finalidade. A ação de algumas plantas, embora muito conhecidas e utilizadas, ainda não estão cientificamente comprovadas e efeitos danosos não estão livres de acontecer pelo simples fato de se tratar de um produto natural.

O bioma Caatinga, exclusivamente brasileiro, possui uma das vegetações mais ameaçadas do planeta. Embora o número de estudos e publicações científicas sobre o potencial biológico de plantas desse bioma tenha aumentado nos últimos anos (SÁ-FILHO, 2019), ainda existe uma grande lacuna na quantidade de plantas medicinais utilizadas por populações que ainda não passaram por pesquisas científicas que confirmem sua eficácia terapêutica (SILVA, 2015).

Dentre essas plantas, podemos citar duas espécies bastante conhecidas e utilizadas pela população e que por isso são alvo de nossa pesquisa, *C. heliotropiifolius*, conhecido no Brasil popularmente como velame ou velame-de-cheiro (COMPAGNONE, 2010; ANGELICO, 2011) e *C. blanchianus*, conhecido como “marmeleiro preto” (SÁ-FIRMINO *et al.*, 2019).

### 3.2 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE JUSS.

Euphorbiaceae é uma das mais amplas famílias das fanerógamas, compreendendo aproximadamente 300 gêneros e 7.600 espécies, possui

comportamento cosmopolita, com maior afinidade por regiões tropicais e subtropicais (CAVALCANTI *et al.*, 2020).

Estima-se que o Brasil tenha 1.100 espécies e 72 gêneros que podem ser encontrados na mais diversa flora do país (CORADIN, 2011). Existem aproximadamente 211 espécies e 5 gêneros na região nordeste, sendo 17 endêmicos da Caatinga. Euphorbiaceae é uma das seis maiores e mais importantes famílias de Angiospermas (BARROSO *et al.*, 2002; JÚNIOR *et al.*, 2018). Um dos gêneros da família Euphorbiaceae que possui uma variedade ampla de espécies ricas em metabolitos secundários é o gênero *Croton* (BEZERRA *et al.*, 2020).

Euphorbiaceae destacam-se por sua importância econômica no consumo humano (GLEADOW *et al.*, 2016), látex (FRIOLANI *et al.*, 2017) e produção de óleo (ROMÁN-FIGUEROA *et al.*, 2016) e seu amplo uso na medicina popular (RUANGNOO *et al.*, 2017). Muitas plantas pertencentes à família Euphorbiaceae estão incluídas na Lista de Medicamentos de Interesse Nacional (RENISUS) (BRASIL, 2009), relatório do Ministério da Saúde do Brasil que inclui 71 espécies de plantas medicinais, visa orientar pesquisas, apoiar o desenvolvimento e inovação para encontrar possíveis fitoterápicos de interesse para o sistema público de saúde (SILVA, 2019).

Estudos fitoquímicos revelam que a família Euphorbiaceae apresenta compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como flavonoides, saponinas, terpenos (diterpenos e triterpenos), ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (VANDRESEN, 2007; RAJESH *et al.*, 2006).

### 3.3 GÊNERO *Croton*

O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) é composto por cerca de 1200 espécies com distribuição Pantropical, aproximadamente 307 dessas espécies podem ser encontradas no Brasil, das quais 241 são consideradas endêmicas e 161 são consideradas sinônimos (CABRERA *et al.*, 2021), esse gênero coloca o Brasil como o maior representante dentre os mais variados ambientes vegetacionais (SALES; SILVA, 2012; CANEIRO-TORRES, 2009).

Estima-se que a região nordeste tenha um total de 52 espécies distribuídas em 15 secções (SILVA *et al.*, 2017). Na literatura conta que em Pernambuco é possível encontrar cerca de 35 espécies, a maioria delas distribuídas na Caatinga (BRASIL, 2002; SILVA *et al.*, 2020). Cascas e folhas de *Croton* são comumente usadas na medicina popular na forma de chás e infusões para distúrbios gastrointestinais, como diarreia e constipações, dentre outros (DE VASCONCELOS *et al.*, 2021).

A diversidade do gênero *Croton* também se reflete em seus constituintes químicos, a maioria deles ainda desconhecido; diferentes classes químicas de compostos foram identificadas em suas espécies, como terpenos e fenilpropanóides, o que pode estar relacionado as suas atividades biológicas (BRITO *et al.*, 2018).

Devido ao grande número de constituintes presentes nas espécies de gênero, diversas atividades podem ser comprovadas como pode ser visto na **Tabela 1** como: antinociceptivo, anti-inflamatório, gastroprotetor, antimicrobiano, antiespasmódico, antimalárico, antidiabético entre outras (FONTENELLE *et al.*, 2008; JUNIOR, LADIO; ALBUQUERQUE, 2007).

Estudos realizados por Qadir e Asif (2019), demonstraram que *C. heliotropiifolius* apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante (REIS *et al.*, 2018). Nas pesquisas desenvolvidas por Firmino *et al.* (2019) com extratos hidroalcolóico de *C. blanchetianus* comprovou atividade antimicrobiana e propriedades antifúngicas.

**Tabela 1** - Atividades biológicas de espécies do gênero *Croton* citadas na literatura

Espécie	Atividade	Referência
<b><i>Croton celtidifolius</i></b>	Anti-inflamatórias, antioxidantes	Biscaro <i>et al.</i> , 2013.
<b><i>Croton cajucara</i></b>	Antigenotoxicidade, antiaterogênica, antitumoral, antiulcerogênica, hipoglicemiante, hipolipidêmica, antiestrogênica, anti-inflamatória e antinociceptiva, analgésico, hipotensor, atividade vasodilatadora e antimicrobiana	Azevedo <i>et al.</i> , 2021; Braga <i>et al.</i> , 2020.

<b><i>Croton nepetaefolius</i></b>	Tratamento de cólicas intestinais	Mesquita <i>et al.</i> , 2008.
<b><i>Croton urucurana</i></b>	Anti-inflamatória e antinociceptiva, anti-hemorrágica, antifúngica	Cordeiro <i>et al.</i> , 2006.
<b><i>Croton sparsiflorus</i></b>	Antioxidante, antimicrobiana, antirreumática, antipirética, anti-inflamatória	Amit <i>et al.</i> , 2010; Ahmad <i>et al.</i> , 2010; Kumar <i>et al.</i> , 2010.
<b><i>Croton sonderianus</i></b>	Antimicrobiana, inseticida	Araújo, 2018.
<b><i>Croton grewoides</i></b>	Antidiarreica, larvicida	Silva <i>et al.</i> , 2016.

Fonte: Campina, 2023

### 3.4 *Croton heliotropiifolius* KUNTH

*Croton heliotropiifolius* conhecido popularmente como “velame” e “velame-do-cheiro”, é amplamente utilizado na medicina tradicional para tratar dores de estômago, desconforto gástrico, diarreia sanguinolenta e para aliviar a febre. (ANGÉLICO, 2011). Essa espécie (Figura 2), é encontrada em toda região nordeste, principalmente no bioma Caatinga, podendo ocorrer em florestas serranas (Brejos de altitude) restinga e Cerrado (SILVA *et al.*, 2010).

**Figura 2:** *Croton heliotropiifolius* KUNTH



Fonte: CAMPINA,2023

Em um recente estudo etnobotânico realizado na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil, *C. heliotropiifolius* mostrou-se eficaz em vários tratamentos, incluindo o tratamento de sintomas decorrentes de infecções do trato urinário, intestinais e cutâneas (FERNANDES *et al.*, 2021). Em conjunto, estas evidências sugerem que *C. heliotropiifolius* pode ter atividades antibacterianas (QADIR e ASIF, 2019) e antioxidantes (REIS, 2018).

Estudos realizados por Tenório *et al.*, (2017) demonstraram que o extrato hidroalcolólico das folhas de *C. heliotropiifolius* em uma concentração de 100% apresenta atividade carrapaticida sobre o *Anocentor nitens* variante que acomete principalmente equinos.

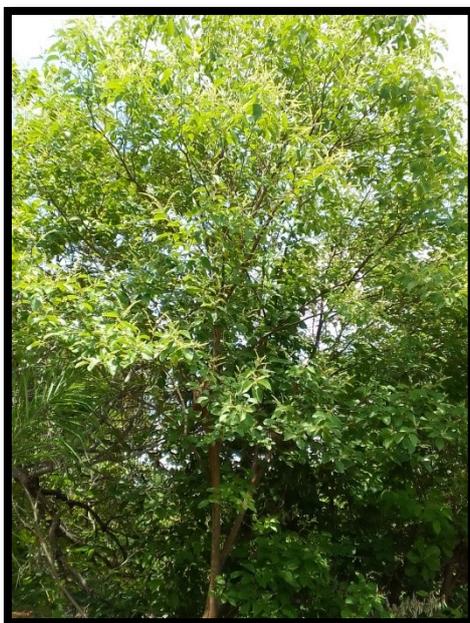
O mesmo também se mostra como um forte aliado da agricultura, no sentido de possuir poder alelopático sobre ervas daninhas, os extratos aquosos e metanólicos a partir da concentração de 0,25 mg/mL conseguiram diminuir a germinação de sementes de *Digitaria insularis* e *Bidens pilosa* em 13%, e quando submetido ao extrato etanólico a inibição chegou a 27% (SILVA, 2018).

De acordo com Navas *et al.* (2016), o efeito alelopático provém de compostos como fenóis, terpenos, alcaloides e poliacetilinas, classes de fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas.

### 3.5 *Croton blanchetianus* BAILL

*Croton blanchetianus* é (Figura 3), uma espécie representativa da família Euphorbiaceae, apresentando ocorrência natural na Caatinga; espécie de arbusto típica do sertão, encontrada em abundância no nordeste brasileiro, popularmente conhecida como marmeleiro (DE VASCONCELOS *et al.*, 2021). As folhas e a casca do caule são utilizadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, reumatismo e dor de cabeça (FIRMINO *et al.*, 2019).

**Figura 3:** *Croton blanchetianus* BAILL



**Fonte:** CAMPINA,2023

O extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* apresenta quantidades significativas de alcaloides, açúcares redutores, flavonoides, saponinas, taninos condensados, terpenos e esteroides (FREITAS *et al.*, 2020). Fenóis e terpenos são os principais compostos responsáveis por propriedades antimicrobianas e antiparasitárias dessa espécie (AQUINO *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2020).

Em seu estudo, Firmino et al. (2019) demonstraram que os extratos de *C. blanchetianus* apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias comuns na formação de biofilme oral. Várias espécies do gênero *Croton* têm

sido alvo de pesquisas científicas devido aos constituintes presentes em suas partes que possuem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos (FONTENELLE, 2008), estudos têm comprovado que os óleos e extratos das essas espécies do gênero *Croton* apresentam efeito potencializador sobre bactérias multirresistentes, isso ocorre devido os princípios ativos presentes nas plantas. (SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). A nomenclatura dessa espécie foi reajustada a partir dos estudos realizados por Govaert, Frodin e Radcliffe-Smith (2000) de *C. sonderianus* para *C. blanchetianus*.

### 3.6 FITOQUÍMICA

A investigação fitoquímica tem por objetivo verificar a presença de compostos bioativos, com funções primordiais na sobrevivência das plantas no meio ambiente (LAGES *et al.*, 2022). É uma etapa importante na identificação das espécies com metabólitos secundários que geralmente são os responsáveis por ações biológicas (DE SÁ-FILHO *et al.*, 2021). Embora muitas espécies já sejam utilizadas popularmente, não se sabe se a planta ou parte dela é efetivamente portadora de compostos bioativos eficazes para as finalidades visadas, assim como, inúmeras espécies vegetais naturais ou introduzidas no bioma Caatinga (SOUZA *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2010). Por isso, é necessário conhecer a composição química por meio técnico eficiente (LIMA; FERNANDES, 2020).

A extração de metabólitos secundários é diretamente afetada por diversos fatores, entre eles o tipo de solvente utilizado (FERRO, 2008; OKAN, 2011). O etanol é anfifílico, permitindo a extração de substâncias com características apolares e polares (OLIVEIRA, 2016), enquanto o metanol pode extrair mais componentes (TIWARI, 2011).

As plantas medicinais podem produzir substâncias ativas chamadas metabólitos secundários. Esta substância ativa existe em quantidades vestigiais com diferentes composições químicas e pode exercer importantes atividades biológicas e farmacológicas. (ULSENHEIMER *et al.*, 2020), tanto em óleos essenciais (SOUZA *et al.*, 2007) como componentes não voláteis (extratos), extraídos de plantas (BALESTRIN *et al.*, 2008, NUNES *et al.*, 2008).

Uma técnica utilizada para obter informações sobre a estrutura química

das plantas é a separação cromatográfica. As separações cromatográficas podem medir a concentração de compostos presentes e os resultados são seguros e confiáveis (OBRADOVIC *et al.*, 2007).

### 3.7 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem dois tipos de metabólitos em seu metabolismo, conhecidos como primários e secundários. Os primeiros são formados principalmente a partir de proteínas, carboidratos e lipídios responsáveis pelo crescimento, reprodução e formação das estruturas de suporte das plantas. Os metabólitos secundários constituem uma forma de comunicação entre as plantas e seu ambiente, na defesa contra a radiação solar (antioxidantes), na defesa contra organismos predadores como fungos, bactérias e insetos, e na produção de feromônios para polinização e meio de sobrevivência das espécies (MORAIS *et al.*, 2021).

Apresentam também, significativos princípios farmacológicos e nutricionais, imprescindíveis na alimentação humana, bem como aditivos aromáticos e corantes naturais. Essas biomoléculas são divididas em três principais classes: terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados, que, são reagrupados em subclasses de acordo com a biossíntese, emprego e relevância específica (BORGES; AMORIM, 2020).

Os principais fatores que podem influenciar a síntese de metabólitos secundários são a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Estes fatores alteram a quantidade e a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido (CALIXTO, 2022).

Por meio da fitoquímica, foi-se descobrindo, isolando e elucidando as estruturas moleculares das substâncias ativas, ou seja, provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo paulatinamente introduzidas na terapêutica e sendo utilizadas na produção de medicamentos de origem natural, em alternativa aos medicamentos de origem puramente sintética (DA SILVA SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Dentre estes metabólitos, apresenta-se com grande relevância aqueles que possuem atividade antioxidante, pois agem como substâncias inativadoras ou redutora de radicais livres. O que é de grande valia, dado que a ação desequilibrada dos radicais livres dentro do organismo, em uma situação de estresse oxidativo, tem-se apresentado altamente prejudicial ao organismo humano, sendo associado a diversas doenças e injúrias celulares tais como alterações no DNA, na estrutura celular e também se encontra associada a casos de câncer, declínio do sistema imune, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, diabete mellitus tipo I, entre outras (DA SILVA SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Os estudos dos constituintes presentes nos extratos botânicos, extratos esses obtidos através de processos de extração já amplamente conhecidos pela ciência e população, são necessários para embasar o início da investigação científica, principalmente em relação aos metabólitos secundários que geralmente são os responsáveis por ações biológicas ligados aos extratos (SONAGLIO *et al.*, 2010).

Outro parâmetro que influencia na extração desses metabólitos secundários das plantas medicinais é o tipo de solvente utilizado, isso terá um íntima relação com o sucesso da abordagem terapêutica. Além disso, existem outros parâmetros básicos que influenciam na qualidade de um extrato como a metodologia de extração e a parte da planta utilizada (DE SÁ-FILHO *et al.*, 2021).

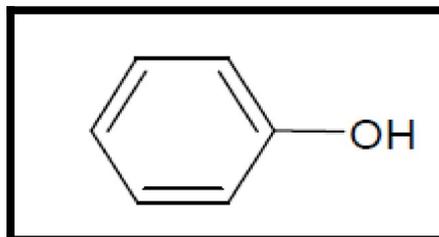
### **3.7.1 Compostos fenólicos**

Compostos fenólicos são aqueles com um ou mais anel aromático acoplado a um ou mais grupos hidroxila (Figura 4). Eles são os mais comuns dentre os metabólitos vegetais secundários com mais de 8000 estruturas conhecidas. Variam desde os fenólicos simples, como os ácidos fenólicos, para os compostos complexos, como taninos. Os compostos participam da defesa da planta contra raios ultravioleta (UV), patógenos e outros predadores (ALARA *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativo. Amplamente distribuídos no reino das plantas,

alterações no sabor de muitos frutos, ocorridas durante seu amadurecimento, estão relacionadas a modificações na concentração destes compostos (CURTY *et al.*, 2022).

**Figura 4** - Estrutura básica de um composto fenólico



Fonte: Campina, 2023.

A biossíntese dos compostos fenólicos nos vegetais é influenciada por fatores abióticos e bióticos. Sendo estes envolvidos no crescimento das plantas, reprodução, pigmentação, além de resistência a microrganismos patogênicos. Este grupo pode se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (ANGELO; JORGE *et al.*, 2007).

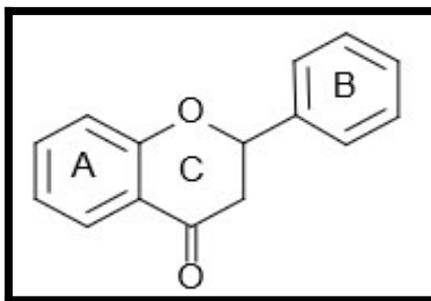
Os compostos fenólicos estão envolvidos em inúmeras atividades biológicas, como antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral, anticancerígena e vasodilatadora devido às suas propriedades antioxidantes (SOBRATTEE *et al.*, 2005). A sua ação antioxidante deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e à sua estrutura química, desempenhando um papel importante na neutralização ou eliminação de radicais livres e metais quelatados, atuando tanto nas fases iniciais como na progressão do processo de oxidação (SOUSA *et al.*, 2007).

### 3.7.2 Flavonoides

Os flavonoides são considerados metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos. Podem ser encontrados em frutas, verduras, hortaliças, sementes e flores, tornando-se importantes componentes da dieta humana. Como compostos fenólicos se diferenciam entre si pela sua estrutura química, apresentando 15 átomos de carbono na forma  $C_6 - C_3 - C_6$  (Figura 3) apoiada no núcleo de dois anéis benzênicos (A e B), sendo esses ligados a um anel pirano (C-1,2) (LOBO *et al.*,

2021.

**Figura 5** - Estrutura básica de um flavonoide.



Fonte: Campina, 2023.

Os flavonoides são produzidos a partir da fenilalanina pela via dos fenilpropanóides, e a fenilalanina é sintetizada pela via do chiquimato (LIU *et al.*, 2021). São encontrados abundantemente em plantas comestíveis e não comestíveis, nas formas aglicosilada (aglicona) e glicosilada, sendo essa última a mais frequente (DE MORAES ARNOSO *et al.*, 2019).

Os flavonoides, apesar de ainda não serem completamente conhecidos, apresentam um importante potencial terapêutico e diferentes atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, atividade imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante (intimamente ligada a estrutura dos flavonoides e ao número de substituintes hidroxilas radicais fenólicos) (MORAES *et al.*, 2022).

A atividade antioxidante dos flavonoides tem sido objeto de estudo nos últimos anos, pois representa uma grande aposta para o futuro desenvolvimento de fármacos e outras formas de tratamento para diversas doenças, como doenças cardiovasculares, doenças genéticas, como câncer e, doenças degenerativas, como o Alzheimer e a doença de Parkinson (MORAES *et al.*, 2022).

### 3.7.3 Radicais livres e substâncias antioxidante

Um radical livre (RL) nada mais é que um átomo ou uma molécula que possui um ou mais elétrons livres não pareados, isto é, possui o orbital externo incompleto, explicando sua instabilidade e elevada reatividade. O orbital externo incompleto permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas,

e assim podem operar como aceptores ou concessores de elétrons causando modificações no ambiente molecular (MARTELLI; NUNES, 2014).

Uma substância antioxidante é uma substância capaz de impedir a oxidação ou que mesmo em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, minimiza ou inibe a oxidação deste substrato. Do ponto de vista biológico, define-se antioxidante como compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos negativos dos processos ou reações que levam à oxidação de moléculas ou estruturas celulares (PREVEDELLO; COMACHIO 2021).

Os antioxidantes presentes nas plantas são substâncias como o ácido ascórbico e tocoferóis, polifenólicos ou terpenos, entre uma ampla variedade. Acredita-se que uma dieta rica nesses alimentos, pode-se minimizar os danos da oxidação e assim a geração excessiva de radicais livres que acabam contribuindo ao aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) — doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas (PREVEDELLO; COMACHIO 2021).

Os compostos bioativos com atividade antioxidante têm despertado interesse, principalmente devido à ação sobre os radicais livres no organismo, mas as formas de interações moleculares e mecanismos de bioatividades ainda proporcionam um desafio para os cientistas (SOBRINHO *et al.*, 2020).

São moléculas produzidas *in vivo*, estão envolvidas em diversos processos como na formação de energia, ajuste do crescimento celular, fagocitose, síntese de substâncias biológicas essenciais e na sinalização intercelular. E além de todos os processos, os RL, ainda reagem com o DNA, RNA, algumas proteínas e outras substâncias oxidáveis, gerando danos que muitas vezes podem colaborar com o processo de envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como aterosclerose, câncer, artrite reumática, entre muitas outras (PREVEDELLO; COMACHIO 2021).

A geração dos radicais livres no organismo pode ser contida por compostos antioxidantes definidos como substâncias que em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem de forma significativa o processo de oxidação do substrato (SOUSA *et al.*, 2007; OROIAN, 2015).

O desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes leva ao estresse oxidativo, processo que provoca a oxidação de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e mitocôndrias, acarretando consequente perda das suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático. Em excesso, os radicais livres levam ao desenvolvimento de enfermidades como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (BARBOSA *et al.*, 2020; MISHRA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2007; DORNAS *et al.*, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006).

Conforme os mecanismos de ação, os antioxidantes são classificados como primários ou secundários. Os antioxidantes primários agem através da transferência de elétrons ou hidrogênio, ao passo que os antioxidantes secundários atuam por meio da complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (DEL RÉ; JORGE, 2012).

### 3.8 RESISTÊNCIA BACTERIANA A MULTIDROGAS

A resistência bacteriana refere-se aos microorganismos cujo crescimento e reprodução no sangue ou tecido não são afetados pela concentração do antimicrobiano correspondente, mesmo aqueles microorganismos que possuem mecanismos de resistência específicos aos medicamentos em investigação, mas não apresentam uma resposta clínica adequada quando administrados. Usado como tratamento, pode ser transferido de várias maneiras, e microrganismos da mesma população ou de populações diferentes podem ser mantidos (VIEIRA e VIEIRA, 2017).

A produção das  $\beta$ -lactamases tem provocado um aumento na resistência bacteriana, constituindo sérios problemas para a prática clínica atualmente. Essas enzimas podem ser produzidas tanto por bactérias Gram-positivas como por Gram-negativas. Elas destroem o núcleo  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, tornando-o inativo através da hidrólise da ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, resultando na produção de derivados ácidos que não possuem propriedades antibacterianas. A falência clínica manifesta-se quando é neutralizado um número suficiente de moléculas de antibiótico (FERREIRA *et al.*, 2006).

As bombas de efluxo são proteínas de membrana que transportam substâncias nocivas do interior da célula bacteriana para o exterior e podem atuar em substratos específicos ou em uma variedade de substratos (ALAV *et al.*, 2018).

Este sistema de bomba é caracterizado pelo efluxo eficiente de antibióticos, penetrando lentamente na membrana externa das bactérias, formando um efeito combinado de efluxo agressivo e uma barreira de membrana que protege a célula de muitos compostos e protege os micróbios. Resiste a agentes antimicrobianos e permite que o ambiente se infiltre ser controlado. Substâncias tóxicas, como metabólitos e antibióticos, entram nas células excretando drogas (que impedem ou restringem o acesso a locais-alvo dentro da célula) (AZAM, KHAN, 2019; MEHLA *et al.*, 2021); UGWANYI *et al.*, 2021).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um grave problema global de saúde pública negligenciado o que vem ocasionando um grande número de mortes todos os anos por infecções. Em consonância, a preocupação atual com esse tema se amplia devido ao uso indiscriminado dos antibióticos durante a pandemia da COVID-19, que vem sendo tratada muitas vezes com antimicrobianos. Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), apenas 15% dos infectados pelo SARS-CoV-2 desenvolvem uma coinfeção bacteriana que justifica o uso da antibioticoterapia (SILVA *et al.*, 2021b).

O uso indevido desses medicamentos representa um risco iminente para a saúde pública global, pois os pacientes infectados com bactérias pan-resistentes (também conhecidas como “superbactérias”), havendo um aumento na ocupação de leitos e um aumento associado no número de mortes e o fechamento de hospitais públicos ou privados (FURTADO *et al.*, 2019)

Atualmente, os antibióticos estão entre os fármacos mais prescritos. Segundo a OMS, cerca de 50% das prescrições não são necessárias (TEIXEIRA, 2019). Considerando o aumento do número de infecções causadas por bactérias multirresistentes, a OMS chama atenção para a pesquisa e desenvolvimento (PeD) de novos antibióticos contra patógenos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

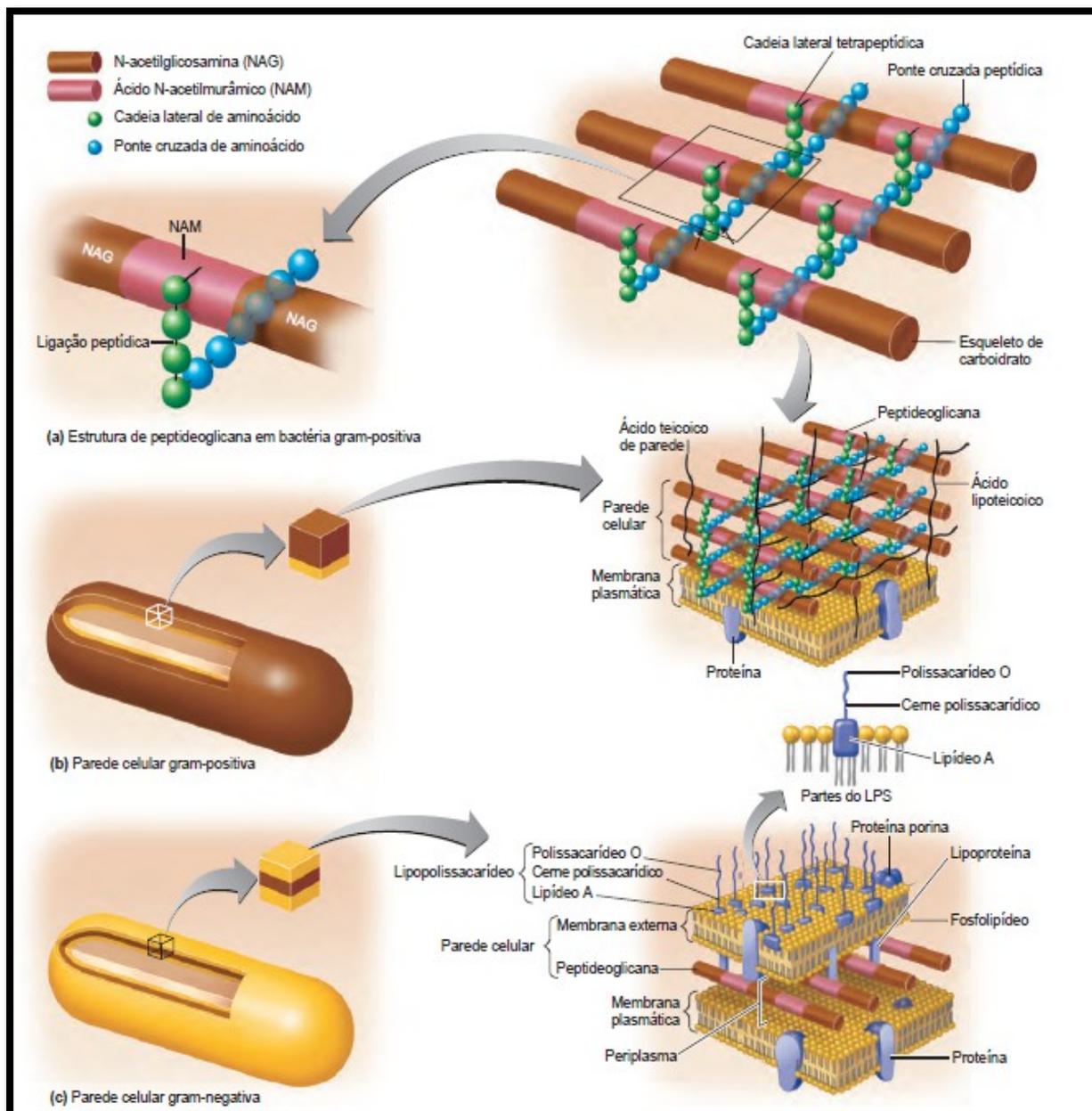
*baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp (TACCONELLI *et al.*, 2018).

No entanto, a descoberta de uma nova substância antimicrobiana é tarefa laboriosa e seguida de avaliações pré-clínicas, clínicas e regulamentações governamentais antes de ser aprovada como um novo fármaco, demandando considerável tempo da descoberta até a utilização clínica (ÅRDAL *et al.*, 2019; THEURETZBACHER *et al.*, 2019; THEURETZBACHER *et al.*, 2020). Entretanto, é entusiasmante a investigação de novos antimicrobianos de origem da natureza, dada a grande biodiversidade do planeta Terra como fonte natural de novas moléculas (por exemplo, de origem de plantas e outros microrganismos).

### 3.8.1 Bactérias

As bactérias são os únicos microrganismos patogênicos procariontes (RIBEIRO *et al.*, 2013). A maioria das bactérias possui uma parede rígida, que constitui o principal suporte mecânico da célula, confere estabilidade e é responsável pela forma das células. A parede celular permite, ainda, fazer a distinção entre dois tipos de bactérias: as bactérias de Gram positiva e as bactérias de Gram-negativa, uma vez que esta estrutura condiciona a coloração de Gram (RIBEIRO *et al.*, 2013). As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa, homogênea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano (Figura 6). Nas bactérias Gram-negativas, a parede é mais complexa e estratificada, em que uma das camadas é constituída por peptidoglicano e a outra – membrana exterior (OM) – constituída por lipopolissacarídeos (LPS), proteínas e fosfolípidos.

**Figura 6:** Célula bacteriana gram-positiva e gram-negativa



Fonte: Tortora 2012

### 3.8.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é um dos patógenos bacterianos mais notórios e prevalentes, causando um número incontável de infecções de pele simples e possivelmente centenas de milhares a milhões de casos mais graves em todo o mundo a cada ano causa infecção invasiva, e uma das principais causas de pneumonia e outras infecções respiratórias, infecções de sítio cirúrgico,

próteses articulares e infecções cardiovasculares e bactéria nosocomial (CHEUNG *et al.*, 2021).

O *S. aureus* é susceptível à ação de várias drogas contra bactéria Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicinas, aminoglicosídeos, tetraciclina e clorafenicóis), é também reconhecida pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a todas. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de susceptibilidade (CUSSOLIM *et al.*, 2021).

A resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* é determinada por mutações em seus genes e/ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie, ou, eventualmente, de outras espécies. Em geral, a resistência por mutação é decorrente de uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve destruição ou inativação do antibiótico. Plasmídeo e transposons contribuem de maneira significativa para o último mecanismo (ALÓS, 2015; RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.*, 2013).

### **3.8.3 *Escherichia coli***

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa anaeróbica predominantemente facultativa que coloniza o trato intestinal de bebês humanos imediatamente após o nascimento e ajuda a manter a homeostase intestinal normal (MIRSEPASI-LAURIDSEN, *et al.* 2019).

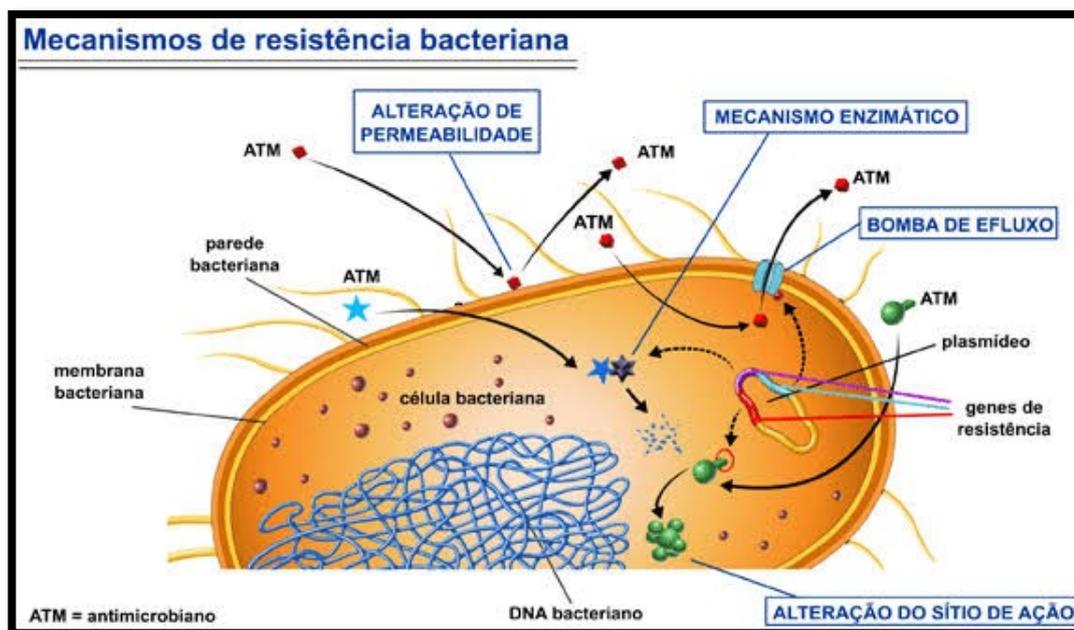
Caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo. Sendo capaz de fermentar, com produção de ácido e gás, a lactose, glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. A fermentação do adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável (QUINN *et al.*, 2005; ANDREATTI – FILHO, 2007).

## **3.9 ANTIBIÓTICOS E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO**

Antibióticos naturais ou sintéticos conseguem inibir o crescimento, ou propiciar a morte de bactérias, são intitulados de bacteriostáticos aqueles que somente inibem o desenvolvimento microbiano, e bactericidas, os que levam à morte da bactéria. Os antibióticos variam em propriedades físicas, químicas, farmacológicas, espectro de ação e mecanismo de ação, podem variar em alvo seletivo, espectro estreito para não afetar a microbiota natural, toxicidade, conteúdo tóxico e altos níveis de agentes terapêuticos, com poucos efeitos, adversa reação, envenenamento ou alergia e possibilidade de administração (SILVA *et al.*, 2021).

Quanto ao mecanismo de ação (Figura 7), os antibióticos inibem a síntese da parede celular, inibição da síntese ou rompem a membrana plasmática, inibem a síntese de proteínas ribossômicas, alteram a síntese de ácidos nucleicos e alteram o metabolismo celular (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

**Figura 7:** Mecanismos de resistência bacteriano



**Fonte:** [anvisa.gov.br](http://anvisa.gov.br)

Os antibióticos aminoglicosídeos apresentam propriedades químicas e farmacológicas semelhantes (LEGGETT, 2017), tendo como vantagens terapêuticas o seu efeito pós-antibiótico, a sua ação bactericida, o seu extenso espectro de ação antibacteriana, o sinergismo com outros antibióticos,

principalmente  $\beta$ -lactâmicos, e os seus raros fenômenos de hipersensibilidade (SOUSA, 2007).

Possuem propriedades que permitem que esses antibióticos interajam com o RNA ribossômico 16S da subunidade 30S do ribossomo bacteriano por meio de pontes de hidrogênio e ligações iônicas, ocasionando interferência estérica no RNA ribossômico e interrompendo a síntese proteica normal. (SOUSA, 2007). Os aminoglicosídeos possuem efeitos tóxicos, seu uso exige bastante cuidado (MURRAY *et al.*, 2010).

Souza (2007) diz que as fluoroquinolonas, apresenta atividade sobre infecções causadas por microrganismos resistentes a outras classes de fármacos. As fluoroquinolonas dividem-se em três gerações, divergem das quinolonas originais por possuírem um átomo adicional de flúor em sua estrutura química (SCHELLACK, 2006). A norfloxacin e o ácido pipemídico representam a classe de antibióticos da segunda geração, produzem mecanismo de ação contra *Pseudomonas* atuando no trato urinário e intestinal (VIEIRA, 2007).

### 3.10 INIBIDORES DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Ampicilina/sulbactam é uma combinação antibiótica composta por ampicilina, um  $\beta$ -lactâmico, e sulbactam, um inibidor de  $\beta$ -lactamase (FERREIRA *et al.*, 2006). Estudos confirmaram a eficácia do sulbactam em altas doses combinado com outros medicamentos antibacterianos no tratamento de pacientes com infecções por microrganismos multirresistentes (MDR) (LIU *et al.*, 2020).

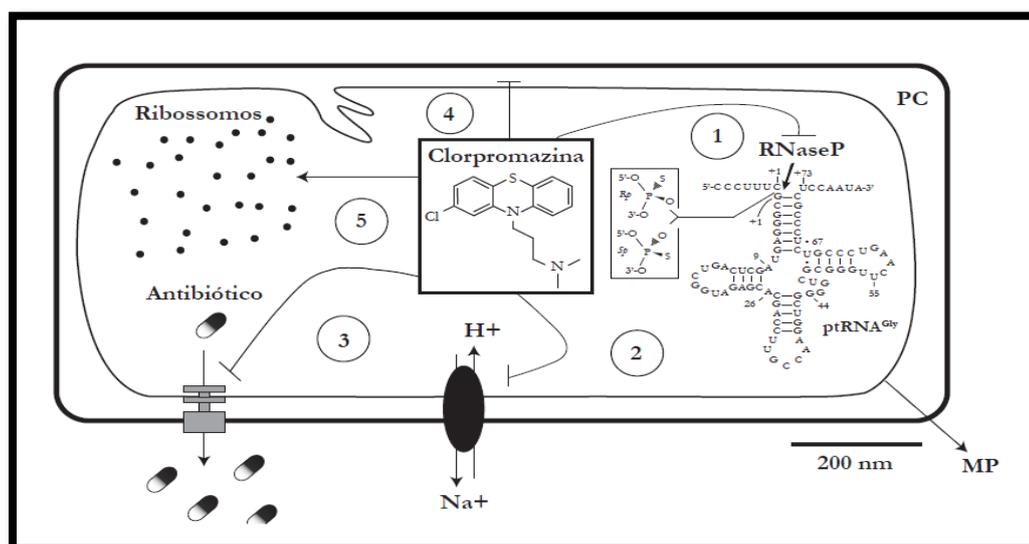
Derivado da ampicilina, o sulbactam é amplamente utilizado como inibidor de  $\beta$ -lactamases. Além disso, possui atividade intrínseca contra *Acinetobacter baumannii*, devido à inibição das proteínas de ligação da penicilina (PBPs) do tipo PBP3, mas altas CIM são geralmente vistos entre isolados que mostram resistência a carbapenênicos (SEIFERT *et al.*, 2020).

A clorpromazina (CPZ), um neuroléptico clássico que inibe os receptores dopaminérgicos (Figura 8) e vários outros efeitos dependentes da calmodulina, tem se mostrado eficaz contra várias espécies de bactérias

Gram-negativas e Gram-positivas clinicamente significativas com atividade antimicrobiana (AMARAL, 2004), bem como contra micobactérias (CLAURE, 1992).

Este composto tem também mostrado a capacidade de reverter à resistência bacteriana a alguns antibióticos (KRISTIANSEN, *et al.*, 2003; KRISTIANSEN, *et al.*, 2006), inibir bombas de efluxo (KRISTIANSEN, *et al.*, 2003; KAATZ *et al.*, 2003), potencializar o efeito antibacteriano dos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, clindamicina, tetraciclina, vancomicina e fluorquinolonas (KRISTIANSEN, 1990; AMARAL *et al.*, 1992), e reduzir a capacidade de formação de biofilmes (BAUGH *et al.*, 2012). A eficácia terapêutica da CPZ em humanos com infecções bacterianas em curso tem também sido demonstrado, comprovando deste modo com os estudos básicos (AMARAL, 2004).

**Figura 8:** Representação esquemática dos efeitos da CPZ em células bacterianas



Fonte: Lima *et al.*, 2010

Em adição, destaca-se também o efeito da CPZ sobre fatores de virulência e mecanismos de resistências que são associados à patogenicidade bacteriana. Portanto, é notável o potencial de reposicionamento dessa droga no tratamento de doenças de diferentes etiologias infecciosas (LIMA *et al.*, 2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

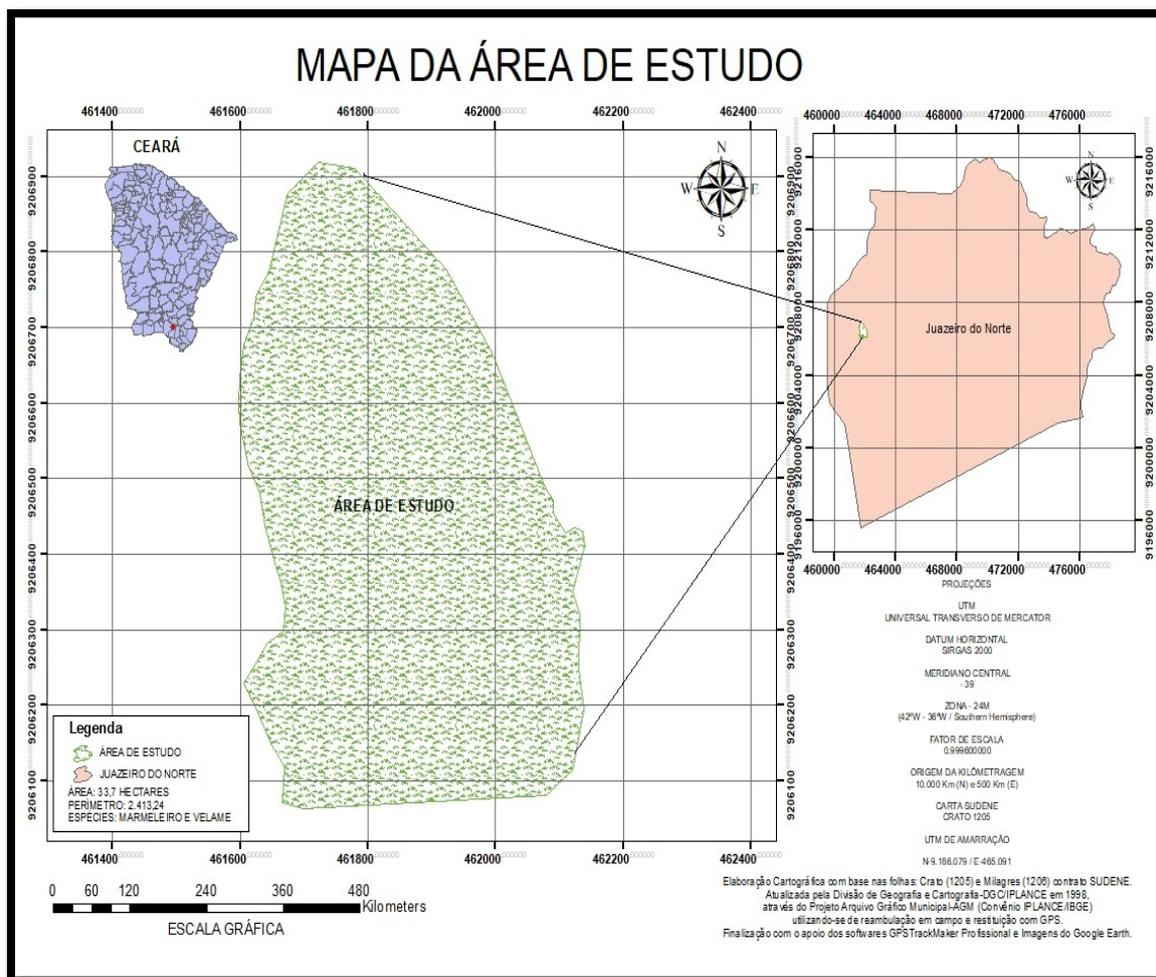
### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os testes fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Química Orgânica na Universidade Federal do Vale do São Francisco - (UNIVASF), Campus Petrolina- Pernambuco. Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) do Departamento de Química Biológica, na Universidade Regional do Cariri (URCA), Campus Pimenta – Crato, pois apresentaram estrutura e equipamentos necessários para o cumprimento dos objetivos referentes ao projeto.

### 4.2 SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Folhas e casca do caule sadias das espécies de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*, foram coletados, em 6 de maio de 2021 (Folhas) e 9 de maio de 2021 (Casca do caule), sob as coordenadas geográficas UTM: N- 9.204.346 E- 461.024 UTM: N- 9.204.342 E- 461.023 ( Figura 9), na Chapada do Araripe no sítio Campinas no município de Juazeiro do Norte, sul do Ceará, Brasil. Foram posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA) do Departamento de Química Biológica, na Universidade Regional do Cariri (URCA), Campus Pimenta, em Crato, Ceará, para preparação dos extratos brutos. As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima -URCA como *Croton heliotropiifolius* Kunth - Nome popular: Velame - Número de tombo 15775 e *Croton blanchetianus* Baill. - Nome popular: Marmeleiro - Número de tombo: 15776. A pesquisa está registrada na plataforma do CNPq no SISGEN pesquisa sob o código A8B8CEA.

Figura 09: Área de estudo



Fonte: Alves (2022)

### 4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O material vegetal coletado (folhas e casca do caule) foram secos à temperatura ambiente por três dias, em seguida, foram triturados e pulverizados em moinho de facas (tipo Willye / SOLAB) para aumento da superfície de contato, e submersos separadamente em etanol P.A. 95% para extração prolongada a frio por um período de aproximadamente 72 horas a temperatura ambiente. A solução extrativa obtida foi submetida à destilação do solvente em evaporador rotativo (modelo SL126 / SOLAB) sob pressão reduzida, a uma temperatura média de 55 °C, obtendo o extrato etanólico bruto (EEB) das espécies em estudo.

### 4.4 MICRORGANISMOS

As linhagens bacterianas utilizadas nos testes foram obtidas através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde (Tabela 2). Para as análises realizadas foram utilizados isolados clínicos: bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* 10 resistentes a diversos aminoglicosídeos (FREITAS *et al.*, 2021; COUTINHO *et al.*, 2008) e sua linhagem padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* 06 resistentes a gentamicina assim como a sua linhagem padrão *Escherichia coli* ATCC 25 922. Antes do ensaio todas as linhagens foram mantidas em *Agar Heart Infusion* (HIA, Difco).

**Tabela 2** – Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos

Bactérias	Origem	Perfil de Resistência
<i>Staphylococcus aureus-10</i>	Swab retal	Sensível: Tec
		Resistente:
		Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Ca, Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Eri, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>Escherichia coli-06</i>	Cultura de urina	Sensível
		Ami, Cip, Etp, Imi, Lev, Mer, Nit,
		Resistente
		Asb, Ca, Cef, Cfo, Cmp, Cro,

**Legenda:** Amc-Amoxicilina + Ac. Clavulâmico, Ami-Amicacina, Amox– Amoxicilina, Amp – Ampicilina, Asb – Ampicilina + Sulbactam, Azi – Azitromicina, Ca – Cefadroxil; Cef – Cefalexina, cfoCefoxitina, Cip – Ciprofloxacino, Cla – Claritromicina, Clin – Clindamicina, Cmp-Cefepime, cro-Ceftriaxona, Ctz-Ceftazidime, Eri – Eritromicina, Etp-Ertapenem, Imilmipenem, Lev-Levofloxacina, Mer-Meropenem, Mox – Moxifloxacino, Nit-Nitrofurantoina, Oxa – Oxacilina, Pen – Penicilina, Pol-Polomixina B, Ptz-Piperacilina, Tazobactam, Tec-Teicoplanina. **Fonte:** Acervo do LMBM.

#### 4.5 ANTIBIÓTICOS E REAGENTES

Os antibióticos utilizados frente as bactérias multirresistentes foram drogas da classe dos aminoglicosídeos (Gentamicina), das penicilinas (Ampicilina) e da classe das Fluoroquinolonas (Norfloxacino). Foram utilizados dois inibidores padrões, a fim de comprovação de possíveis mecanismos de resistência. O Sulbactam inibidor da enzima  $\beta$ -lactamase e a Clorpromazina inibidor de bomba de efluxo. O corante redox, resazurina, que indica a presença de células bacterianas viáveis.

Os mesmos foram obtidos a partir de *Sigma Chemical Co-EUA*, e suas soluções estoque foram preparadas de acordo com as diretrizes do *Clinical*

and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005), chegando a uma concentração final de 1024 µl/mL.

#### 4.6 MEIOS DE CULTURA

Para os ensaios microbiológicos foram utilizados os seguintes meios de cultura bacteriana: *Brain Heart Infusion* – BHI (*Acumedia Manufacturers Inc.*) para bactérias 10%. *Heart Infusion Agar* – HIA (*Difco® Laboratories Ltda.*), preparado segundo as especificações do fabricante; e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

#### 4.7 ANÁLISE QUÍMICA

A triagem fitoquímica preliminar dos extratos foi realizada seguindo a metodologia descrita por Matos (2009), que se baseia na adição de reagentes específicos que provocam mudança de cor e/ou formação de precipitado, permitindo desta forma a identificação das classes de metabólitos secundários presentes no extrato.

##### 4.7.1 Determinação de Fenóis Totais

O teor de fenóis totais foi analisado colorimetricamente usando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2011). Uma alíquota dos extratos e frações diluídas (40 µL) foi adicionada a 3,15 mL de água destilada e 200 µL do reagente, misturados logo em seguida. Logo após adicionou-se a mistura 600 µL de uma solução aquosa estoque de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% e agitou-se novamente.

Após um período de 2 horas, as absorvâncias mensuradas a absorvância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro em 756 nm contra o branco (todos os reagentes, exceto a amostra em análise) e os resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorvância da amostra com sua concentração.

Os resultados de fenóis totais foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g<sup>-1</sup>), obtido por interpolação em uma curva analítica construída com o padrão ácido gálico dissolvido em etanol e água nas concentrações 50, 100, 150, 250, 500 e 1000

mg/L.

A equação da curva foi expressa por  $y = 0,0005x - 0,0076$ , com coeficiente de determinação igual a  $R^2 = 0,9989$ , onde “x” é a concentração de ácido gálico e “y” é absorbância resultante em 756 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.7.2 Determinação de Flavonoides Totais**

A quantificação do teor de flavonoides totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Zhishen *et al.*, (1999), neste experimento foi utilizado como padrão a quercetina. Inicialmente, prepararam-se soluções do padrão dos extratos nas seguintes concentrações: 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L. Em seguida, 300 µL da solução dos extratos do padrão foi adicionada a 1,5 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 90 µL de uma solução de NaNO<sub>2</sub>. Após 6 minutos de reação, 180 µL de uma solução de Cloreto de Alumínio 10% foram adicionados à mistura. Após 5 minutos de reação, 600 µL de uma solução de NaOH 1M foram adicionados à mistura anterior. Finalmente, completou-se o volume com 330 µL de água destilada e o sistema foi homogeneizado por completo. A absorbância foi mensurada contra o branco em 510 nm, em espectrofotômetro. O branco utilizado continha todos os reagentes e, no lugar da amostra, adicionou-se 300 µL de água destilada.

Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por gramas do extrato (mg EqC g<sup>-1</sup>) por meio da interpolação dos dados obtidos das amostras na curva padrão com o padrão catequina dissolvido em metanol e água nas concentrações 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 mg/L

A equação da curva foi expressa por  $y=0,0015x + 0,0618$ , com coeficiente de determinação igual a  $R^2 = 0,9873$ . Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.7.3 Atividade Antioxidante – Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e a Co-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico**

Existem muitos tipos diferentes de radicais livres e eles atuam de maneiras diferentes nos organismos vivos. Conseqüentemente, se faz necessário realizar mais de uma técnica para determinar a atividade

antioxidante. A atividade antioxidante in vitro de extratos etanólicos de folhas e cascas do caule foi determinada pela eliminação de radicais livres DPPH e inibição da co-oxidação pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

#### 4.7.4 Sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

No ensaio de atividade antioxidante, foi utilizado o método seqüestrador de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) descrito por Santana et al. (2012). As soluções estoques (1,0 mg/mL) das amostras e padrões (ácido ascórbico, BHA, BHT e extratos) foram preparadas e diluídas até concentrações finais de 243, 81, 27, 9, 3 e 1  $\mu$ g/mL em etanol. A solução de DPPH na concentração de 50  $\mu$ g/mL foi preparada em etanol. Em cada cubeta foi adicionado 1 mL da solução de DPPH a 2,5 mL das soluções de diferentes concentrações das amostras e padrões, e deixou-se reagir por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os valores de absorbância foram medidos em um espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis a um comprimento de onda em 518 nm e convertida em percentagem da atividade antioxidante (AA), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ AA} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 10$$

**Onde:**

**A controle** = indica a absorbância do controle negativo (1,0 mL DPPH + 2,5 mL de Extratos)

**A amostra** = indica a absorbância para a amostra Os controles positivos foram as soluções dos padrões: ácido ascórbico, butilhidroxi-anisol (BHA) e butilhidroxi-tolueno (BHT).

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em  $CE_{50}$ ,  $\mu$ g/ mL (*GraphPad Prism 5 Demo*).

#### 4.7.5 Co-oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O segundo método utilizado foi o método da inibição da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Esse método é baseado na perda da coloração amarela do  $\beta$ -caroteno, devido à sua reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico através da aeração do meio

(SANTANA *et al.*, 2012). A taxa de  $\beta$ -caroteno pode ser retardada na presença de antioxidantes.

Deste modo preparou-se o meio oxidante, no qual foram dissolvidos 2 mg de  $\beta$ -caroteno em 10 mL de clorofórmio, adicionados a 2 mL desta solução 44 mg de ácido linoleico e 440 mg de *Tween* 40.

O clorofórmio foi evaporado sob vácuo a 40 °C e 100 mL de água destilada foram adicionados. Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente durante 2 minutos, conferindo a oxidação do meio. As soluções padrão (ácido ascórbico, BHA e BHT) e as amostras em estudo foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em etanol. Em seguida, transferir 0,120 mL de solução padrão/extração para a cubeta, seguido da adição de 3,0 mL de meio oxidante. A absorbância foi medida imediatamente a 470 nm, e então a amostra foi incubada em banho-maria a 50°C por 2 horas, e a absorbância foi medida novamente. Os controles positivos para este teste foram os seguintes padrões: ácido ascórbico, BHT e BHA. Nos controles negativos, o extrato foi substituído por igual volume de etanol.

A porcentagem de atividade antioxidante (%) foi avaliada em termos de branqueamento do  $\beta$ -caroteno utilizando a seguinte fórmula:

$$AA \% = 100 \times [1 - \frac{(A_0 - A_1)}{(A_0^0 - A_1^0)}]$$

**AA %** = será avaliada pelo efeito do aditivo em relação ao branco, onde:

**A<sub>0</sub>**= absorbância inicial da amostra e padrões

**A<sub>1</sub>**= absorbância final da amostra e padrões

**A<sub>0</sub><sup>0</sup>**= absorbância inicial do branco

**A<sub>1</sub><sup>0</sup>**= absorbância final do branco

Os dois ensaios de atividade antioxidante foram realizados em triplicata.

## 4.8 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

### 4.8.1 Preparação e Padronização do Inóculo Bacteriano

As culturas bacterianas são inicialmente mantidas em tubos de ensaio contendo HIA inclinado, sob refrigeração (4 °C). Para os testes de Concentração Inibitória Mínima e Teste de modificação da ação antibiótica,

inicialmente os isolados foram cultivados em meio HIA vertido em placa de Petri, a 37 °C por 24h. A partir deste cultivo, foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos de ensaios contendo 3 mL de solução estéril (NaCl a 0,9%). Logo em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho vórtex e cada suspensão tem sua turbidez comparada e ajustada à suspensão de sulfato de bário 0,5, da escala de *McFarland*, a qual a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC) /mL (SOUZA *et al.*, 2007).

#### 4.8.2 Preparação Inicial das Soluções Teste

Para o preparo da solução, pesou-se 10 mg dos extratos brutos que foram posteriormente diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO– Merck, Darmstadt, Alemanha), obtendo-se uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir dessa concentração foi feita uma diluição em água destilada estéril para atingir a concentração de 1024 µg/mL, solução utilizada no teste.

#### 4.8.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição (JAVADPOUR *et al.*, 1996), definida como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realizá-la, foram utilizadas placas de microdiluição estéril com 96 poços e preparado um meio de distribuição em tubos *Eppendorf*<sup>®</sup>: uma solução de 1 mL contendo 900 µL de BHI 10% e 100µL da suspensão bacteriana. Esta placa foi preenchida no sentido numérico, adicionando-se 100µL das soluções de distribuição em cada cavidade. Posteriormente realizou-se a microdiluição seriada com 100 µL da solução teste EEFCB (extrato etanólico da folha do *Croton blanchetianus*), EEFCH (extrato etanólico da folha do *Croton heliotropiifolius* Kunth), EECCCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus*), EECCCH (extrato etanólico da casca do caule do *Croton heliotropiifolius* Kunth e Clorpromazina), com concentrações variando de 512 a 8 µg/mL, até a penúltima cavidade. A última cavidade é destinada ao controle do crescimento microbiano.

A revelação da CIM bacteriana é realizada utilizando-se a resazurina, que apresenta colorações distintas nas formas oxidada e reduzida. A forma

adicionada no poço foi a oxidada (azul). Nos poços em que o crescimento bacteriano superou uma densidade celular acima de  $10^6$  UFC/mL, a resazurina foi reduzida, tornando-se rosa (GALLUCCI *et al.*, 2009).

#### **4.8.4 Teste de modificação da ação antibiótica**

Para avaliar o potencial da substância como modificadora da resistência bacteriana aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.*, (2008). A solução dos extratos etanólicos de EEFCB, EEFCH, EECCCB e EECCCH foram misturados em caldo BHI 10% em concentrações sub-inibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução de extrato foi reduzida oito vezes (CIM/8).

O meio de distribuição foi preparado em tubos de eppendorf® contendo cada um BHI 10% + 150µL da suspensão bacteriana + substância teste, em sua concentração sub-inibitória, atingindo 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,5 mL apresenta apenas BHI 10% + 150µL de suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido alfabético, adicionando 100µL da solução de distribuição em cada cavidade.

Em seguida foi realizada microdiluição seriada (proporção 1:1 ) com 100µL droga (antibiótico) e 100 µL de de cada substância a ser testada até a penúltima cavidade. As placas preenchidas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e após esse período realizou a leitura da mesma forma que no teste de CIM. As concentrações dos antibióticos variaram gradualmente de 512 a 0,5 µg/mL respectivamente.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicatas. Os resultados dos testes foram expressos como média geométrica. Para análise estatística foi utilizado *software Graphpad Prism*, versão 5.0, aplicando a *Two-way ANOVA* seguida do teste post-hoc de Bonferroni. Considerando significância estatística  $p < 0.05$ .

### 6.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Uma vez obtido o extrato da planta pode-se calcular o rendimento do processo de extração por solvente. Os rendimentos dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *C. heliotropiifolius* e *C. Blanchetianus* são apresentados na Tabela 3, o extrato etanólico da casca do caule de *C. blanchetianus* obteve rendimento (13,47%) e o extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius* obteve menor rendimento (7,4%).

O extrato etanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* apresentou rendimento (9,77%) superior ao extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* foi de (10,68%).

Rodrigues *et al.*, (2017) observou em seus estudos que o extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* apresentou rendimento 3,26% e o extrato etanólico de *C. Heliotropiifolius* de 3,29%, embora os nossos extratos tenham sido obtidos pelo mesmo método que o do estudo citado, o fato de termos coletado em maio, enquanto o no referido estudo a coleta foi entre outubro e novembro pode ter influenciado no melhor rendimento que obtivemos.

**Tabela 3** - Rendimento dos extratos etanólico das folhas e cascas do caule de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*

Parte da espécie	Solvente Utilizado	Massa do Extrato	Rendimento (%)
<b><i>Croton heliotropiifolius</i></b>			
Folha	Etanol	17,73 g	10,68 %
Casca do Caule	Etanol	19,4 g	7,4 %
<b><i>Croton blanchetianus</i></b>			
Folha	Etanol	28,27 g	9,77 %
Casca do Caule	Etanol	30,8 g	13,47 %

**Legenda:** Etanol P.A 95%. **Fonte:** CAMPINA, 2023.

## 6. 2 SCREENING FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Croton heliotropiifolius* KUNTE E *Croton blanchetianus* BAILL

As plantas medicinais apresentam diversas ações farmacológicas, isso ocorre devido aos compostos bioativos presentes que exercem funções essenciais para o benefício e equilíbrio homeostático vegetal, agindo na defesa contra insetos e microrganismos patogênicos danosos a planta (CAVALCANTI *et al.*, 2020).

Na avaliação fitoquímica preliminar (*screening*) do extrato etanólico das folhas e casca do caule de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* verificou-se a presença de diversos metabolitos secundários, dentre eles podemos citar: alcaloides, antraquinonas, cumarinas, compostos fenólicos, derivados antracêntrico, lignina, monoterpenos e diterpenos, naftoquinonas, taninos hidrolisáveis e triterpenos e esteroides mostrado na Tabela 4.

No extrato etanólico da folha de *C. blanchetianus* observou a presença de antocianidinas, ausente para os demais extratos da casca do caule de *C. blanchetianus* e *C. Heliotropiifolius*. Antraquinonas esteve ausente apenas no extrato da folha de *C. blanchetianus*. A presença de alcaloides, cumarinas e compostos fenólicos nas folhas de *C. blanchetianus* confirma as descrições feitas por Silva *et al.*, (2021).

Corroborando com o presente estudo Aquino, (2017) relatou a presença de taninos nos extratos etanólico das folhas do *C. Blanchetianus*. Com relação aos alcaloides, a literatura afirma que o *C. blanchetianus* é fonte de alcaloides isoquinolínicos, propondo que a espécie também pode biossintetizar outras classes de alcaloides (FELIPE *et al.*, 2014).

Naftoquinonas SILVA *et al.*, (2017), foram identificadas nos extratos etanólico das folhas e casca do caule de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*; em estudos descritos na literatura, também foi identificado no extrato etanólico da folha de *C. blanchetianus*, quinonas, corroborando assim com os nossos estudos.

Os estudos realizados por Silva *et al.*, (2021) identificaram que os extratos etanólicos de *C. blanchetianus* continham compostos fenólicos e taninos, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Nascimento (2011) observou o potencial terapêutico dos compostos fracionados, como O-glicosídeos, kaempferol e quercetina, flavonoides-C-glicosídeos, taninos e derivados do ácido cinâmico de *Croton cajucara*, sobre o edema de pata em ratos induzido por carragenina, confirmando assim o uso popular desta espécie *Croton* e atribuíram esse resultado aos compostos fenólicos amplamente associados a muitas atividades biológicas e farmacológicas das plantas.

**Tabela 4**-Classes de metabólitos secundários identificados no extrato de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*

Classe Química	EECCCH	EEFCH	EECCCB	EEFCB
Alcaloides	+	+	++	+
Antocianidinas	-	-	-	+
Antraquinonas	+	+	+	-
Cumarinas	+	++	+	+
Compostos Fenólicos	++	++	+	++
Derivados Antracênicos	++	++	+	+
Lignanas	+	+	++	++
Monoterpenos e Diprtenos	++	++	+++	+++
Naftoquinonas	+	+	++	+
Taninos Condensáveis	-	-	-	-
Taninos Hidrolisáveis	+	+	++	+
Triterpenos e Esteroides	+	+	+++	+++

**Legenda:** **EEFCB** (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus*); **EEFCH** (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius*); **EECCB** (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus*) e **EECCH** (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius*); (+) Presença de compostos; (-) Ausência de compostos. **Fonte:** CAMPINA, 2023.

Apesar de os fatores ambientais poderem influenciar na composição química dos vegetais, afetando diretamente a síntese de metabólitos secundários (BUENO; MARTÍNEZ 2016), nossos dados estão em consonância com os achados a literatura.

Alguns autores geralmente afirmam que os extratos de plantas têm efeitos antibacterianos devido à presença de compostos secundários como taninos, terpenóides, saponinas, flavonoides e alcaloides (DE BESSA *et al.*, 2013; SAVOIA, 2012).

### 6.3 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Croton heliotropiifolius* KUNTH E *Croton blanchetianus* BAILL

Os compostos polifenólicos são componentes importantes da alimentação, especialmente por sua ação antioxidante atribuída dentre outras habilidades a sua capacidade em complexar íons metálicos e inativar reações radicalares (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Concentração de fenóis totais para os extratos das folhas foram diferentes entre si e estatisticamente diferentes quando relacionados ao extrato da casca do caule, apesar de ter sido utilizado o mesmo método de extração e dos rendimentos serem semelhantes.

O ensaio de compostos fenólicos totais dos extratos de EEFCB e EECCCH se destacaram em comparação aos outros extratos com valores elevados de fenóis totais  $339,33 \pm 9,49$  mg de Eq.AG/g e  $106,30 \pm 6,34$  mg de Eq. AG/g, respectivamente. O teor de flavonoides foi expresso em  $0,29 \pm 0,03$  mg de Eq. C/g para EEFCB e  $0,11 \pm 0,01$  mg de Eq. C/g para EEFCB conforme mostrado na tabela 5.

**Tabela 5** – Determinação de fenóis totais e flavonoides totais dos extratos etanólico

Amostra	Fenóis totais (mg Eq. AG/g)	Flavonoides totais (mg Eq. QC/g)
EEFCB	$339,33 \pm 9,49$	$0,29 \pm 0,03$
EEFCH	$95,30 \pm 4,35$	$0,11 \pm 0,01$
EECCB	$21,97 \pm 0,57$	$0,01 \pm 0,005$
EECCH	$106,30 \pm 6,24$	$0,05 \pm 0,005$

**Legenda:** EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus*); EEFCH (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius*); EECCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus*) e EECCH (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius*); mg Eq.AG/g (Microgramas equivalentes de ácido gálico por grama); mg Eq. QC/g (Microgramas equivalentes de quercetina por grama). **Fonte:** CAMPINA, 2023

Costa *et al.*, (2011) verificou que para o extrato etanólico do caule de *Croton argyrophyllus*, o valor do teor de fenóis totais foi de  $269,72 \pm 6,25$  mg

EAG/g, um valor superior aos observados no nosso estudo para os extratos de casca do caule.

De Vasconcelos *et al.* (2021) diz em seus estudos com folhas de *C. blanchetianus* que o teor de flavonoides no extrato aquoso de folhas fresca foi de  $33,94 \pm 1,60$  mg EAG/g e do extrato aquoso de folhas secas foi de  $27,67 \pm 0,48$  mg EAG/g, que representam valores inferiores ao observado no presente estudo (Tabela 5).

Dentre os fatores ambientais que influênciam na composição química dos vegetais afetando diretamente a síntese de metabólitos secundários, a sazonalidade é um importante fator que deve ser observado para a coleta ou colheita de plantas medicinais. Uma mesma planta poderá ter diferentes níveis e concentrações de seus metabólitos secundários durante as estações do ano e também durante o dia. (BUENO; MARTÍNEZ, 2016).

Autores mencionam que as condições de temperatura e o tempo de secagem afetam o rendimento de flavonoides (BORGIO *et al.*, 2010; JANSUMA *et al.*, 2020). Estudos realizados por Torres *et al.*, (2020) identificaram a temperatura como um fator de seleção para a extração de diferentes categorias de flavonoides.

#### 6.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – SEQUESTRO DO RADICAL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL) E A CO-OXIDAÇÃO DO SISTEMA $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO DOS EXTRATOS ETANOLICOS DE *Croton heliotropiifolius* KUNTH E *Croton blanchetianus* BAILL

O método do sequestro do radical livre DPPH, consiste em um dos principais métodos adotados para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, apresentando algumas vantagens como boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade (SOUSA *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2015).

Na análise dos resultados da atividade antioxidante (AA%) frente ao radical DPPH, considerou-se como valor de referência a  $CE_{50}$  de  $109,6 \pm 10,32$ /mL do BHT (controle positivo), para comparar com a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas e casca do caule de *C. heliotropiifolius* e *C.*

*Blanchetianus*. O BHT é bastante utilizado como padrão para a atividade antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001).

No método do sequestro do radical DPPH, os extratos das folhas e casca do caule apresentaram o menor valor de  $CE_{50}$  na seguinte sequência: EEFCB  $0,11 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ , EECCCH  $0,09 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$  e EEFCH  $0,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ , o EECCCB não foi determinado conforme descrito na Tabela 6.

No presente estudo três dos extratos testados (EEFCB; EEFCH; EECCCH) demonstraram atividade antioxidante como sequestradores do radical livre DPPH promissora, quando comparados ao BHT. Esses dados estão em acordo com outros presentes na literatura que indicam atividade antioxidantes em diversas espécies do gênero *Croton* (NARDI *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2006; CATUNDA; MORAIS, 2002).

De Menezes Filho *et al.* 2021 diz em seus estudos que inúmeros extratos vegetais apresentam atividade antioxidante na redução de radicais livres como o oxigênio singleto.

No método da inibição da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, os extratos apresentaram inibição da atividade EEFCH  $79,37 \pm 4,62 \text{ mg}$  e EECCH  $45,71 \pm 4,70 \text{ mg}$  quando comparados aos padrões BHA ( $94,69 \pm 0,74 \text{ mg}$ ) e BHT ( $109,6 \pm 10,32$ ) conforme mostra a Tabela 6.

Destacaram-se no método da inibição da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, os extratos das folhas que exibiram expressiva atividade quando comparados ao padrão ácido ascórbico. Este resultado pode ser justificado pela presença na triagem fitoquímica de mono e diterpenos, triterpenos e esteroides, uma vez que esse método de avaliação da atividade antioxidante é mais sensível a amostras de alta lipofilicidade, conforme descrito na literatura (WANNES *et al.*, 2010).

Na literatura descrita por Athayde (2016) observado que os extratos foliares de *C. echinocarpus* possuem maior atividade antioxidante do que os de *C. vulnerarius* em ambos os testes, enquanto para os extratos caulinares é observado o oposto: os extratos de *C. vulnerarius* apresentam maior ação antioxidante do que *C. echinocarpus*.

**Tabela 6** – Atividade Antioxidante–Sequestro do Radical DPPH (2,2-Difenil-1- Picrilhidrazil) e a Co-Oxidação do Sistema  $\beta$ -Caroteno/Ácido Linoleico dos Extratos Etanólico

Amostra	Antioxidante DPPH (CE <sub>50</sub> , µg/mL)	Atividade Antioxidante β-Caroteno (% AA)
AA	2,35 ± 0,09	10,40 ± 1,40
BHA	4,52 ± 0,85	94,69 ± 0,74
BHT	109,6 ± 10,32	97,24 ± 0,07
EEFCB	0,11 ± 0,08	32,81 ± 8,28
EEFCH	0,32 ± 0,05	79,37 ± 4,62
EECCB	ND	10,23 ± 0,91
EECCH	0,09 ± 0,09	45,71 ± 4,70

**Legenda:** EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus*); EEFCH (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius*); EECCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus*) e EECCH (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius*). AA- Atividade antioxidante; BHA-Ácido Beta-Hidróxido; BHT: Butil hidroxitolueno. ND: Não determinado. **Fonte:** CAMPINA, 2023.

Estudos realizados por Aquino et al. (2017) com essas espécies, observaram que os extratos etanólicos das folhas apresentaram atividade antioxidante como sequestradores do radical livre DPPH, sendo que o extrato de *C. blanchetianus* demonstrou uma maior atividade, isto significa um menor valor de CE<sub>50</sub> em comparação ao BHT e ao extrato de *C. heliotropiifolius*.

A diferença na atividade antioxidante observada para os extratos etanólicos das espécies em estudo, seja possivelmente atribuída à presença e a concentração de compostos fenólicos pertencentes as classes dos taninos e flavonoides verificados nos extratos, cuja ação antioxidante é conhecida na literatura. No entanto, a atividade antioxidante desses compostos fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na absorção ou neutralização de radicais livres (BASILE et al., 2007).

As plantas medicinais apresentam em sua composição compostos derivados que possuem atividades antioxidantes isolados das mais diversas famílias de plantas (BOUDET, 2007, RAZAVI et al., 2008) e os flavonoides são, por certo, as substâncias representativas desta atividade (BERG et al., 2000), uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. Contudo, a intensidade da ação antioxidante exibida por estes fitoquímicos é diferenciada, principalmente devido ao número e posição de hidroxilas presentes nas moléculas (MELO et al., 2008).

A atividade antioxidante de várias espécies de *Croton* já foi descrita, como por exemplo *C. celtidifolius* (NARDI *et al.*, 2003), *C. nepetaefolius* (MORAIS *et al.*, 2006) e o *C. argyrophyloides* (CATUNDA; MORAIS, 2002). E os resultados dos testes na presente pesquisa corroboram com esses dados, além de acrescentar informações sobre atividade antioxidante de extratos de caule das espécies *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*.

No estudo realizado por De Vasconcelos *et al.* (2021) tais compostos também foram identificados no extrato aquoso da casca do caule, bem como no extrato metanólico das folhas, de *C. heliotropiifolius*, também correlacionando com as propriedades antioxidantes desta espécie. Além da atividade antioxidante, lignanas como o pinosinol encontrados no presente estudo têm atividade antibacteriana e também pode reduzir o risco de câncer de mama.

Os extratos obtidos de diferentes partes das plantas como caule e folha de espécies do gênero *Croton* apresentaram efeito antioxidante (DE AQUINO *et al.*, 2017; SALATINO *et al.*, 2007). Brito *et al.*, (2018) relatou que os extratos das folhas do *C. argyrophyllus* e *C. heliotropiifolius* tiveram maior ação antioxidante quando comparado ao caule.

## 6.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM é definida como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008).

Conforme a tabela 7 os extratos apresentaram atividades antimicrobianos obtendo CIMs de 16 µg/mL para EEFCH frente a cepa bacteriana *Escherichia coli* 06 a 8 µg/mL para o EEFCB para a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foram considerados extratos etanólico de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* com atividade antimicrobiana aqueles que obtiveram valores abaixo de 1024 µg/mL, tais compostos podem ser classificados como antimicrobianos (BORGES *et al.*, 2012; TEGOS *et al.*, 2002).

Este resultado corrobora com dados da literatura que informam que o extrato aquoso das cascas do caule de *C. blanchetianus* mostrou-se um promissor agente antimicrobiano (FERREIRA *et al.*, 2020).

Os resultados mostraram que o extrato da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* para *Staphylococcus aureus* – 10 e *Escherichia coli* – 06; o EEFCB frente *Staphylococcus aureus* -10 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 não demonstraram atividade clinicamente relevante, obtendo-se uma CIM  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ . Na literatura, Gibbons *et al.*, (2004) descreve que a maioria dos produtos e extratos que apresentam valores de CIM acima de 1000  $\mu\text{g/mL}$  apresentam pouca relevância para aplicação clínica.

Dado semelhante foi encontrado por Da Silva Brito *et al.* (2018) ao estudarem a atividade antibacteriana de extratos metabólicos de folhas e talos de *C. heliotropiifolius* frente a diversas bactérias dentre estas linhagens de *S. aureus* e *E. coli*.

**Tabela 7:** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em  $\mu\text{g/mL}$

Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )			
Bactérias	Extratos Etanólico		Inibidor de Bomba Efluxo
	EECCH	EECCB	CHLOP
SA-10	$\geq 1024$	64	512
SA-ATTCC 25923	512	16	512
EC-06	$\geq 1024$	32	$\geq 1024$
EC-ATTCC 25992	512	32	512
Bactérias	EEFCB	EEFCB	CHLOP
SA-10	$\geq 1024$	64	$\geq 1024$
SA-ATTCC 25923	$\geq 1024$	8	$\geq 1024$
EC-06	16	32	128
EC-ATTCC 25992	32	8	128

**Legenda:** EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus*); EEFCH (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius*); EECCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus*) e EECCH (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius*); CHLOP (Clopromazina). **Fonte:** CAMPINA, 2023.

Ferreira *et al.* 2020, trabalhando com o extrato aquoso do caule do marmeleiro, 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*), com concentrações que variaram de 0,5 a 3 mg/mL para Gram-positivos e 4,3 a 19 mg/mL para Gram-negativas.

Silva *et al.*, (2011) analisou atividade antimicrobiana do extrato de *Croton sonderianus* sobre cepas bacterianas causadoras de cárie dentária.

Para o estudo, todas as linhagens de *Streptococcus* tiveram o crescimento inibido pelo extrato: *Streptococcus salivaris* e *Streptococcus sobrinus* foram sensíveis ao extrato até a diluição de 1:16, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* até a diluição de 1:32 e *Streptococcus mitis* foi a linhagem mais sensível ao extrato com formação de halos de inibição até a diluição de 1:64. A capacidade antimicrobiana do extrato foi atribuída a fitoquímicos presentes como alcaloides, flavonoides, mono e diterpenos comprovando os achados em nossos estudos.

## 6.6 EFEITO MODIFICADOR DA AÇÃO DO ANTIBIÓTICO

O uso indevido de antimicrobianos pode levar ao surgimento de cepas resistentes de bactérias, como mutações cromossômicas e genéticas, permeabilidade da membrana, alterações no local de ação dos antibióticos, desenvolvimento da capacidade de produzir bombas de efluxo e destruição de antibióticos por enzimas (DE SOUZA *et al.*, 2021).

A utilização de extratos como agentes antimicrobianos apresenta um baixo risco ao aumento da resistência microbiana, porque são misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade microbiana (MATIAS *et al.*, 2011). Dentre os principais mecanismos de resistência podemos apontar a inativação enzimática, e alterações no sistema de transporte e bomba de fluxo.

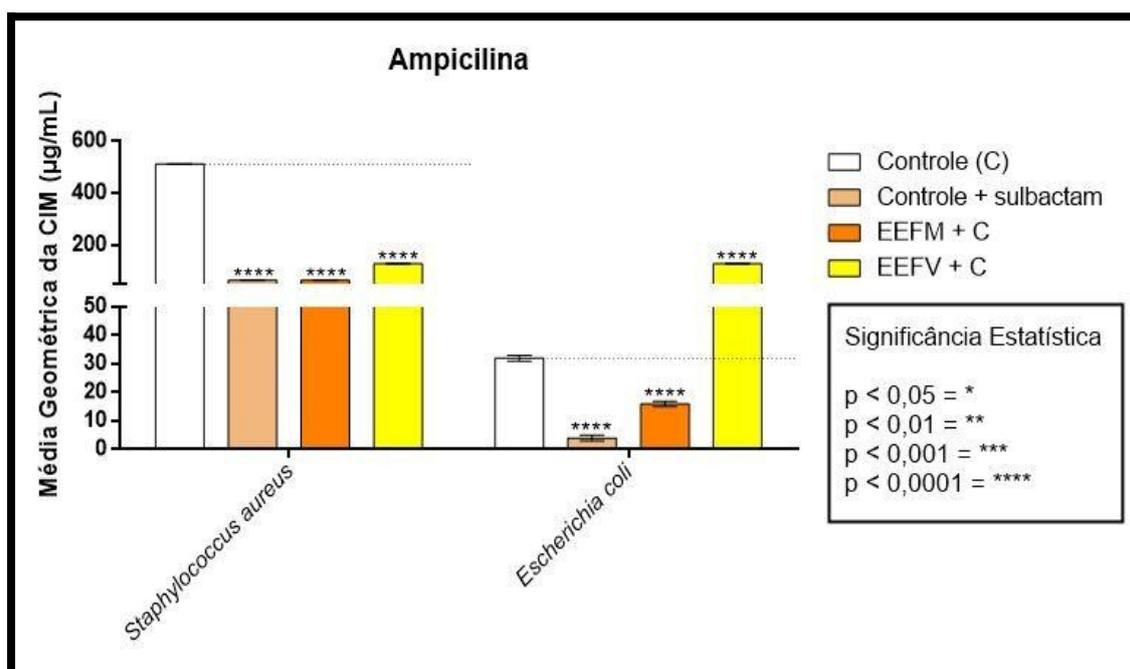
Na atividade modificadora da ação de antibióticos, avaliou-se o efeito extratos de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* em concentrações sub-inibitórias (CIM/8) sobre a atividade de penicilinas, aminoglicosídeos e fluoroquilononas, demonstrando uma interferência na atividade antibiótica sobre algumas cepas bacterianas.

Para investigar a expressão do mecanismo enzimático nas cepas testadas foi usado o sulbactam, um inibidor de  $\beta$ -lactamases. Este quando em associação com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos como a ampicilina, liga-se às  $\beta$ -lactamases e dessa forma, evita a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico e potencializa sua atividade (AMATO NETO *et al.*, 2007).

O resultado apresentado na figura 10 demonstra que o mecanismo de resistência enzimática está expresso, ao avaliar a ação modificadora sobre a

ampicilina + sulbactam, observa-se uma potencialização do EEFCB e EEFCH frente à linhagem bacteriana *S. aureus* 10 e EEFCB para *E. coli* 06 onde a CIM apresentou uma redução significativa. Em contrapartida, observa-se efeitos antagônicos para o extrato EEFCH frente a cepa *E. coli* 06; entre o controle ampicilina onde a CIM foi aumentada de forma isolada.

**Figura 10** - Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Folha de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL Ampicilina+ Sulbactam



**Legenda:** Efeito modulador do extrato EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus* + Ampicilina); EEFCH (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius* + Ampicilina); contra *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06; Controle (Controle do Antibiótico) Antibiótico + sulbactam (Ampicilina+ sulbactam). \*\*\*\* valor estatisticamente significativo com p < 0,0001; ns – não estatisticamente significativo com p > 0,05. **Fonte:** CAMPINA, 2023.

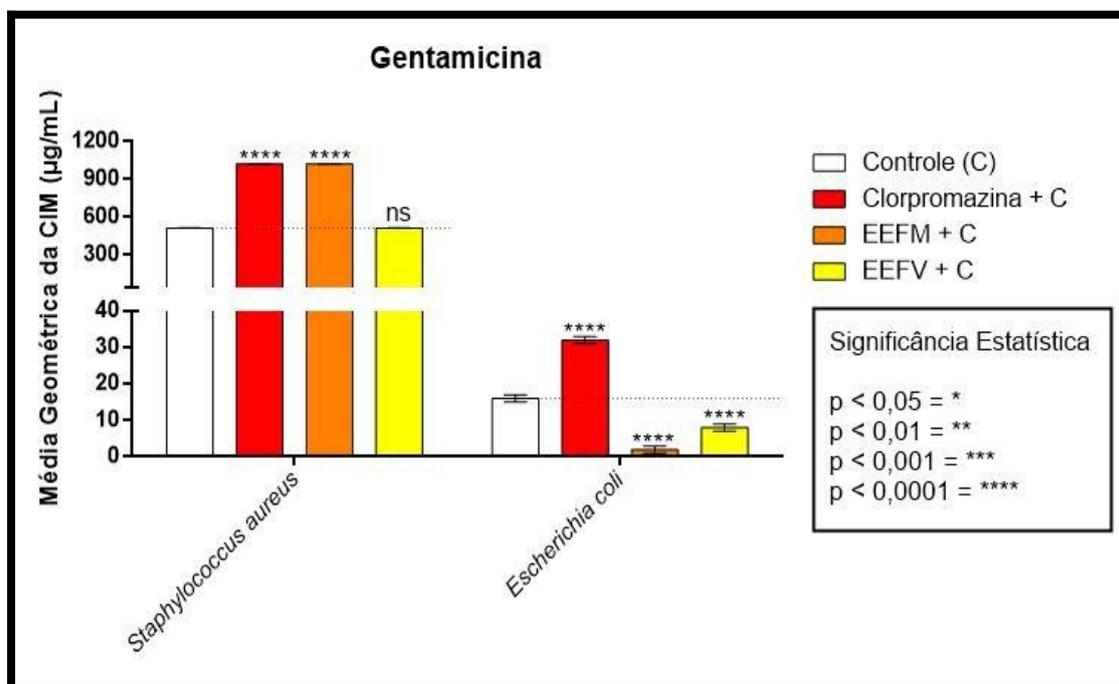
Para esse resultado estudos descritos na literatura afirmam que a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* apresentou um maior índice de inibição quando comparado ao crescimento apresentado pela Gram-negativas *Escherichia coli*. Isto pode ocorrer devido que as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a modulação do que as Gram-negativas. Isto ocorre, pois, as bactérias Gram-negativas são rodeadas por uma membrana externa resistente composta por fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos, que proporcionam uma superfície hidrofílica agindo como uma barreira, conferindo

impermeabilidade a alguns antibióticos (NIKAIDO, 2001; KOJIMA; NIKAIDO, 2013; VARGIU; NIKAIDO, 2012).

Foi realizado teste usando a clorpromazina que tem sido usada como inibidor do sistema de efluxo MDR em *S. aureus*, exibindo ação sinérgica ou aditiva sobre os substratos da bomba (KAATZ *et. al.*, 2003).

Na figura 11 observou-se que as bactérias não expressaram mecanismos de resistência de bomba de efluxo. Porém, foi possível observar presença de um efeito antibiótico quando os extratos foram associados a gentamicina, um antibiótico convencional. Em relação ao antibiótico gentamicina, observa-se que os extratos EEFCB e EEFCB potencializando o efeito do antibiótico apenas contra *E. coli* 06, apresentado um efeito modificador da CIM em relação ao controle. Nas demais cepas, os grupos apresentam efeitos estatisticamente semelhantes entre si, ou não apresentaram significância, como por exemplo, entre o controle gentamicina + EEFCB e EEFCB.

**Figura 11** – Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Folha de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL Gentamicina + Chlorpromazina



**Legenda:** Efeito antibiótico do extrato EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus* + Gentamicina); EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius* + Gentamicina); contra *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06; Controle (Controle do Antibiótico)

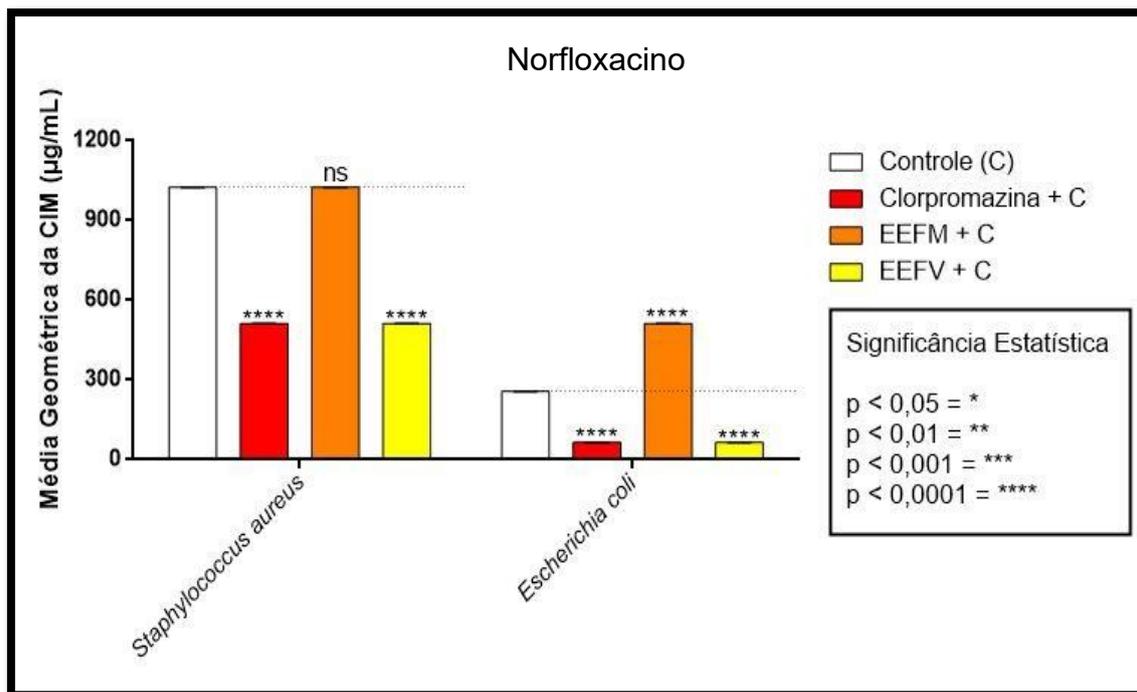
Chlorpromazine + C (Chlorpromazine + Gentamicina). \*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; ns – não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ . **Fonte:** CAMPINA, 2023.

Diversos estudos demonstram que um dos constituintes químicos presentes em diversos estudos com ação antimicrobiana são os taninos. Principais responsáveis por apresentarem atividades bactericidas e fungicidas, devido a sua complexação com íons metálicos e com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos e por ser sequestradora de radicais livres (CASTEJON, 2011).

Ao avaliar o efeito modificador da ação de antibióticos Norfloxacino observa-se efeito de potencialização dos extratos EEFCH frente às cepas *E.coli* 06 e *S.aureus* 10. Em relação ao controle Norfloxacino houve um aumento da CIM frente à cepa *E. coli* 06 para o extrato EEFCB e para o EEFCB frente a cepa *S. aureus* 10 não apresentou significância (Figura 12). Mecanismo de bomba de efluxo foi observado na figura 12, para as duas cepas bacterianas.

Segundo Silva (2011) o extrato etanólico das folhas de *Croton sonderianus* demonstrou atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mitis*, comum colonizador da cavidade bucal, produzindo biofilme dentário.

**Figura 12-** Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Folha de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL Norfloxacino + Chlorpromazina

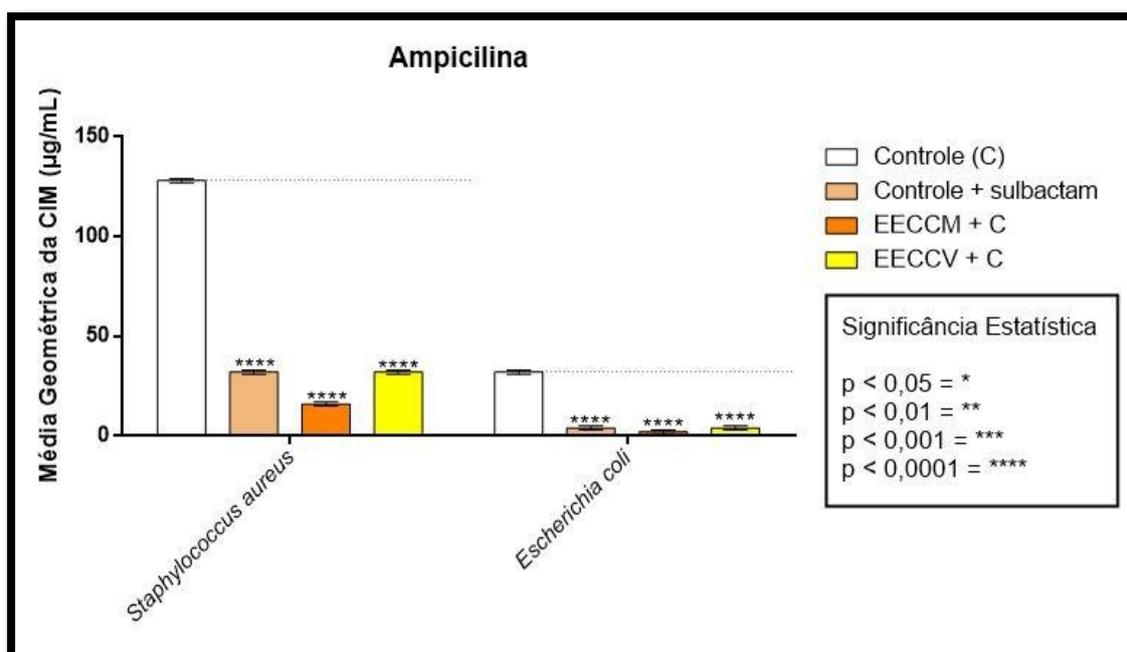


**Legenda:** Efeito modificador do extrato EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton blanchetianus* + Norfloxacino); EEFCB (extrato etanólico da folha *Croton heliotropiifolius* + Norfloxacino); contra *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06; Controle (Controle do Antibiótico) Chlorpromazine + C (Chlorpromazine + Norfloxacino). \*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; ns – não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ . **Fonte:** Campina, 2023.

Com base em estudos anteriores, a atividade sinérgica observada em diferentes estudos, está associada a constituição de metabólitos secundários tipo, taninos, flavonoides e terpenos da espécie do gênero *Croton*, em resposta a infecções microbianas (KUETE *et al.*, 2011). Estes, segundo autores, possuem a capacidade de destruir a membrana plasmática da bactéria ou até mesmo alterá-la, facilitando, deste modo, a absorção das drogas (TSACHEVA *et al.*, 2004). O que se pode inferir que tal substância testada no presente estudo, pode modificar a estrutura bacteriana, facilitando e potencializando a ação dos antimicrobianos.

Testes semelhantes foram realizados com os extratos da casca do caule das duas espécies, sendo possível observar na figura 13 a expressão do mecanismo de resistência enzimática, ao mostrar redução de CIM da associação do antibiótico (ampicilina) com o sulbactam quando comparado ao antibiótico isolado.

**Figura 13** – Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Casca do Caule de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL Ampicilina+ Sulbactam



**Legenda:** Efeito modulador do extrato EECCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus* + Ampicilina) e EECCH (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius* + Ampicilina) contra *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli*,06; Controle (Controle do Antibiótico) Antibiótico + sulbactam (Ampicilina+ sulbactam). \*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; ns – não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ . **Fonte:** CAMPINA, 2023

Ambos os extratos, EECCM e EECCV demonstraram capacidade de potencializar a atividade do antibiótico frente as cepas testadas, sugerindo sua atuação em diminuir o mecanismo de resistência enzimática.

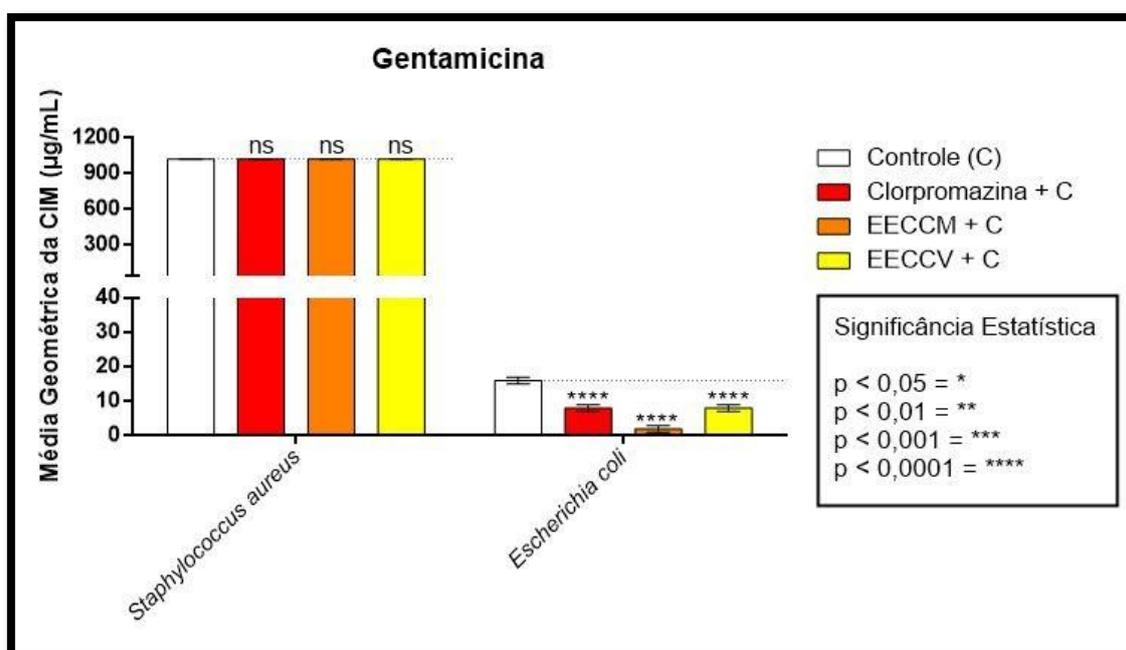
Para os estudos realizado por ALMEIDA *et al.* 2013, tais resultados significativos podem estar associados aos constituintes como os compostos fenólicos presentes nas espécies em estudos pois abordagens terapêuticas têm demonstrado que, o uso de extratos etanólicos, associados de forma sinérgica a antibioticoterapia, é muito promissor para o tratamento de doenças bacterianas e pode ajudar a reduzir os mecanismos de resistência bacteriana induzidos por drogas.-

Ao analisar a figura 14 observa-se que o mecanismo de bomba de efluxo não foi expresso para a cepa bacteriana *S. aureus* 10, os extratos não apresentaram significância quanto ao mecanismo, nem efeito modulador para Gentamicina. Já para *E. coli* 06 o mecanismo de bomba de efluxo foi bloqueado pelos extratos em *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton*

*blanchetianus* diminuído a CIM e potencializando a ação da gentamicina sob a bactéria.

Notavelmente, outros estudos têm mostrado que microrganismos Gram-positivos são mais suscetíveis aos efeitos antibacterianos de extratos vegetais (ASKARI *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010), o que corrobora os achados do resultado deste estudo.

**Figura 14** - Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Casca do Caule de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL Gentamicina + Chlorpromazina



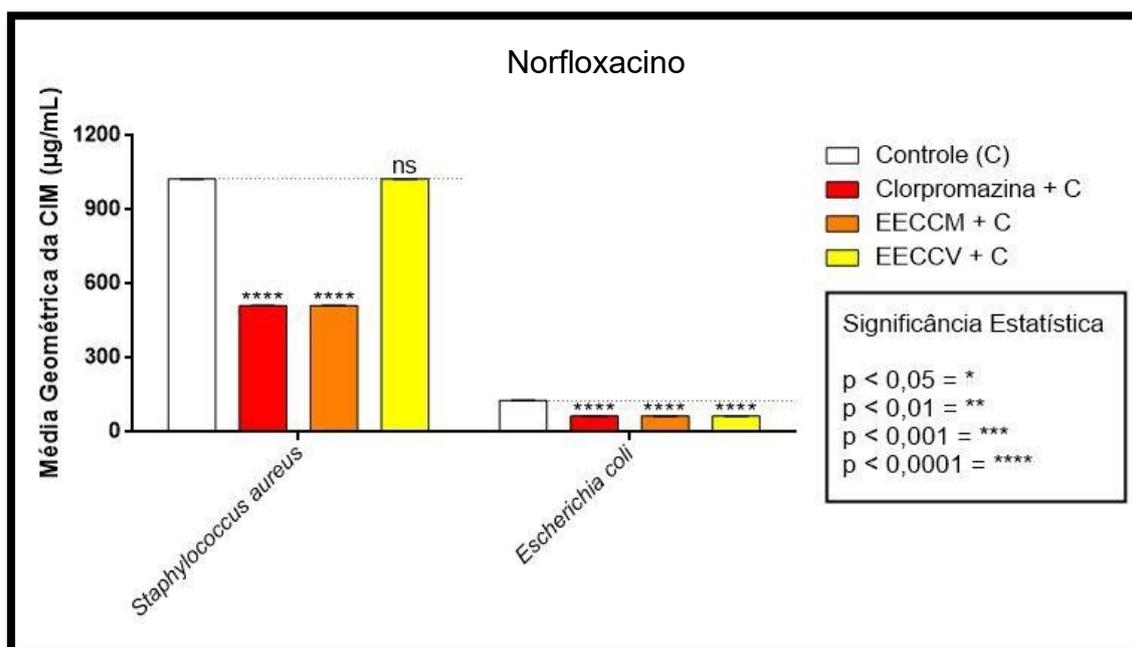
**Legenda:** Efeito modulador do extrato EECCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus* + Gentamicina) e EECCH (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius* + Gentamicina) contra *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli*,06; Controle (Controle do Antibiótico) Chlorpromazine + C (Chlorpromazine + Gentamicina). \*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; ns – não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ . **Fonte:** CAMPINA, 2023.

A alta sensibilidade da *E. coli* frente a gentamicina, pode estar associado ao seu mecanismo de ação, diferente dos  $\beta$ -lactâmicos. Este fármaco pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, constituído por fármacos altamente efetivos contra bacilos Gram-negativos. São fármacos primariamente bactericidas por causarem alterações em proteínas sintetizadas pela bactéria, ao ligarem-se irreversivelmente aos ribossomos bacterianos. Podem também atuar de forma bacteriostática ao inibirem a síntese de proteínas (BOLLELA *et*

al., 2018). No entanto, a sua principal limitação é a nefrotoxicidade e ototoxicidade, que devem sempre ser monitoradas (GONÇALVES, 2019).

Na figura 15 pode ser observado expressão do mecanismo de bomba de efluxo nas duas bactérias. O extrato EECCM frente a *S. aureus* 10, potencializou a ação do norfloxacino.

**Figura 15** – Atividade modificadora dos extratos etanólicos da Casca do Caule de *Croton heliotropiifolius* KUNTH e *Croton blanchetianus* BAILL Norfloxacino + Chlorpromazina



**Legenda:** Efeito modulador do extrato EECCB (extrato etanólico da casca do caule do *Croton blanchetianus* + Norfloxacino) e EECCM (extrato etanólico da casca do *Croton heliotropiifolius* + norfloxacino) contra *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli*,06; Controle (Controle do Antibiótico) Chlorpromazine + C (Chlorpromazine + Norfloxacino). \*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; ns – não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ . **Fonte:** CAMPINA, 2023.

A maioria dos estudos realizados sobre atividade modificadora de antibióticos com gênero *Croton* e de suas espécies é sobre seus óleos essenciais, com constituição química bem diferente dos extratos reportados na nossa pesquisa inviabilizando um estudo comparativo.

Relatos de estudo com extratos hexânico e metanólico das folhas *C. campestris*, onde se observou que estes extratos tiveram sinergismo quando combinados com gentamicina e amicacina frente a linhagens de *S. aureus* e *E. coli*. Segundo os autores, os resultados obtidos indicaram que *C. campestris* poderia servir como fonte de produtos naturais derivados de plantas que

modificam a resistência aos antibióticos para utilização contra bactérias multirresistentes (MATIAS *et al.*, 2011).

Diante da crescente resistência a antibacterianos, o reforço da atividade dos antibióticos comercialmente disponíveis com diferentes tipos de produtos naturais é uma estratégia antimicrobiana bem-sucedida e os seus mecanismos de ação estão começando a ser determinados (NITSCHVELASQUEZ *et al.*, 2022). A atividade antibacteriana observada para as bactérias Gram-negativas pode ser decorrente do ambiente em que esta planta foi coletada, pois plantas medicinais de diferentes ambientes produzem diversificados teores de compostos bioativos, resultando em respostas terapêuticas e atividades farmacológicas diversas (PERIM *et al.*, 2019).

Os resultados da presente pesquisa mostram que os extratos das folhas e cascas do caule de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* apresentaram atividades antibacterianas e moduladora de antibióticos que colocam as espécies como fonte de moléculas úteis na luta contra a resistência bacteriana.

A atividade antibacteriana de vários extratos da folha de *C. bonplandianum* contra isolados bacterianos tiveram melhores resultados na concentração de 7,5 mg/μl. O extrato aquoso da folha apresentou zona máxima de inibição 15±2 mm contra *S. aureus* enquanto a zona mínima de inibição 10±1 mm contra *P. aeruginosa* quando comparado a outros isolados bacterianos. O extrato de acetona de folha mostrou uma zona máxima de inibição 19±2 mm contra *E. aerogenes* e *E. coli* enquanto a zona mínima de inibição 10±1 mm contra *P. aeruginosa*. O extrato de clorofórmio da folha mostrou 19±2 mm de inibição contra *S. aureus* e *E. aerogenes* e o extrato benzênico de folha apresentou 20±2 mm de inibição contra *S. aureus* (GHOSH *et al.*, 2018).

A produção de enzimas β-lactamases tem sido relatada como um importante mecanismo de resistência a antibióticos β-lactâmicos, hidrolisando o anel β-lactâmico pela quebra da ligação amídica perdendo assim, a capacidade de inibir a transpeptidase, sendo esta responsável pela síntese da parede celular (DE SOUSA; EDINELSON *et al.*, 2022).

Ostrosky *et al.*, (2008) relataram a importância de desenvolver e produzir medicamentos a partir de extratos de plantas com efeitos

antimicrobianos. Portanto, o estudo de plantas oferece um caminho promissor e eficiente para a descoberta de novos fármacos, sendo necessária a elucidação dos princípios ativos nelas presentes e seus mecanismos de ação (DE VASCONCELOS *et al.*, 2021).

## 7 CONCLUSÃO

A análise fitoquímica de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* permitiu determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides, onde os resultados obtidos corroboram significativamente com os estudos encontrados na literatura.

Os extratos vegetais de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* demonstraram atividade antioxidante, provavelmente atribuída à presença de compostos fenólicos encontrados em análises fitoquímicas de extratos etanólicos de ambas as plantas.

Na CIM os extratos demonstraram uma promissora atividade inibitória contra as cepas *E. coli* 06 e *S. aureus* 10, para a casca do caule e folhas de *C. blanchetianus*. Para o extrato da folha de *C. heliotropiifolius* resultados significativos foram demonstrados para *E. coli* 06 e sua padrão *E. coli* ATCC 25992.

Os extratos potencializaram a ação de antibióticos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas contra as bactérias multirresistentes, que parecem ser dependentes do tipo de droga e da linhagem bacteriana.

Para contribuir com os resultados aqui expostos, outras pesquisas devem ser realizadas comprovando que as espécies testadas são promissores agentes moduladores da atividade antibacteriana em combinação com antibióticos comerciais.

A possibilidade de utilização desses compostos no combate à resistência microbiana eleva os produtos naturais a uma posição de valorização, estimulando o investimento em pesquisas dessa área.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, Elizabeth A.; GILLESPIE, Kelly M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.
- ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- ALAV, Ilyas; SUTTON, J. Mark; RAHMAN, Khondaker Miraz. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- AL-HEBSHI, Nezar; AL-HARONI, Mohammed; SKAUG, Nils. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. **Archives of oral biology**, v. 51, n. 3, p. 183-188, 2006.
- ALMEIDA, JRG da S. et al. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, 2011.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2015.
- AMARAL, LEONARD; KRISTIANSEN, JETTE; LORIAN, VICTOR. Synergic effect of chlorpromazine on the activity of some antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 556-558, 1992.
- AMARAL, Leonard; VIVEIROS, Miguel; MOLNAR, Joseph. Antimicrobial activity of phenothiazines. **in vivo**, v. 18, n. 6, p. 725-732, 2004
- AMATO NETO, V.; Nicodemo A.C.; Lopes, H.V. **Antibióticos na prática clínica**. 6ª ed. São Paulo: Sarvier Editora; 2007.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. IN: ANDREATTI FILHO, RL Saúde aviária e doenças. **Rocca Ltda, São Paulo, 2007a, cap**, v. 6, p. 41-51, 2007.
- ANGÉLICO, Elissandra Couras et al. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* Kuntze e *Croton blanchetianus* Baill.** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Patos-PB, 2011.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos— Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

- AQUINO, Vitória Viviane Ferreira et al. Metabólitos secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28-31, 2017.
- ARAÚJO, Floricéa M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial crops and products**, v. 105, p. 203-206, 2017.
- AZAM, Mohd W.; KHAN, Asad U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug discovery today**, v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019.
- BALESTRIN, Luciana et al. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 230-235, 2008.
- BARREIROS, André LBS; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARROSO, Graziela Maciel et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1978.
- BASILE, Adriana et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.
- BAUGH, Stephanie et al. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2409-2417, 2012.
- BETONI, Joyce Elaine Cristina et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.
- BEZERRA, Antônia Jaqueline Nobre et al. Avaliação da segurança não clínica do triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA) isolado de *Croton zehntneri* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55932-55940, 2020.
- BORGES, Anabela; SAAVEDRA, Maria J.; SIMÕES, Manuel. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 755-767, 2012.
- BORGES, Larissa Pacheco; AMORIM, Víctor Alves. Metabólitos secundários de plantas secondary plant metabolites. **Revista Agrotecnologia, Ipameri**, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BORGO, Jackson et al. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 12-17, 2010.

BRAGA, Joelma Correia Beraldo; DA SILVA, Luan Ramos. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2009) **Plantas de Interesse ao SUS**. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Universidade Federal de Pernambuco, 2002. 36p.

BRITO, S. S. S. et al. ***Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties**. *Industrial Crops and Products*, v. 113, p. 308-315, 2018.

CALIXTO, Mariana Gaião. Extração de metabólitos secundários da espécie *Schinopsis brasiliensis* Engler utilizando diferentes solventes. 2022.

CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M. Atividade antioxidante de óleo essenciais de plantas do nordeste do Brasil. **Ciência e tecnologia**, v. 4, p. 23-29, 2002.

CAVALCANTI, Denis Florêncio Gomes; DA SILVEIRA, Diocielma Maria; DA SILVA, Gabriela Cavalcante. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 45931-45946, 2020.

CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.  
CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

COSTA, Ana Carolyny Vieira da et al. Perfil químico e atividade antibacteriana in vitro e em matriz alimentar do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. 2011.

COUTINHO, Henrique DM et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

CURTY, T. A. et al. **Revisão integrativa**: compostos fenólicos em plantas da família Apiaceae. v. 2, n. 11, p. 170-184, 2022.

- CUSSOLIM, Phylipe Adrian et al. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. **Revista faculdades do saber**, v. 6, n. 12, p. 831-843, 2021.
- DA COSTA GOMES, Jhemerson; DA SILVA, Joyce Caroline Araujo; BATALHA, Sarah Suely Alves. Ocorrência de automedicação na pandemia da COVID-19: uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e308101624049-e308101624049, 2021.
- DA SILVA BRITO, Sara Samanta et al. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial crops and products**, v. 113, p. 308-315, 2018.
- DA SILVA LOBO, Viviane et al. Quantificação de flavonoides totais da *Eruca vesicaria* (L.) Cav. cultivada de forma hidropônica na região oeste do Paraná. **Revista Fitos**, v. 15, n. Supl 1, p. 79-92, 2021.
- DA SILVA SIQUEIRA, Jéssica et al. Prospecção fitoquímica e avaliação dos potenciais citotóxico e antioxidante do extrato das folhas de *Microgramma vaccinnifolia*/Phytochemical prospection and evaluation of the cytotoxic potentials and antioxidants of the *Microgramma vaccinnifolia* leaves extract. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 20318-20331, 2020.
- DA SILVA, Antonia Isabelly Bezerra et al. Perfil Fitoquímico De Extratos Etanólicos E Metanólicos Do *Croton Blanchetianus*/Phytochemical Profile Of Ethanollic And Methanolic Extracts Of The "Marmeleiro" (*Croton Blanchetianus*). **Revista Brasileira Multidisciplinar (ReBram)**, v. 24, n. 1, p. 134-143, 2021.
- DA SILVA, Antonielson Bezerra et al. Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 450-455, 2020.
- DA SILVA, Gibbely Cavalcante et al. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017.
- DARWISH, Rula M. et al. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 359-364, 2002.
- DE BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde-Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 692-707, 2013.
- DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira; SANTOS, Mariana Chaves; DE SOUZA CASTRO, Carlos Frederico. Avaliação fitoquímica, físico-química e atividades antioxidante, hemotóxi-ca e antibacteriana do extrato de *Protium*

spruceanum (Benth.) Engl. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 9, n. 1, p. 048-059, 2021.

DE MENEZES TORRES, Maria da Conceição et al. Composição química dos óleos essenciais de *Croton sonderianus* Muell.Arg.(Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81493-81503, 2020.

DE MORAES ARNOSO, Bernardo Junqueira; DA COSTA, Giselle França; SCHMIDT, Betina. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

DE SÁ-FILHO, Geovan Figueirêdo et al. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, society and development**, v. 10, n. 13, p. e140101321096-e140101321096, 2021.

DE SOUSA BARBOSA, Edinelson et al. Prevalência e perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de infecções do trato urinário. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e0611124280-e0611124280, 2022.

DE SOUZA, C. P. R. et al. **Perfil de infecção e resistência bacteriana de uroculturas em uma instituição hospitalar no município de mineiros-goiais**. Unifunec científica multidisciplinar, v. 10, n. 12, p. 1-13, 2021.

DE SOUZA, Mary Regina 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**, v. 8, n. 3, p. 329-335, 2020.

DE VASCONCELOS, Elayne Cardoso 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, 2021.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, p. 389-399, 2012.

DÓRIA, Grace AA et al. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

FELIPE, A. K. F.; ALMEIDA, M. V.; GIORDANI, R. B. 2. **Análise dos alcaloides de *Croton blanchetianus* Bail**. 37ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

FERNANDES, Priscilla Augusta de Sousa et al. Chemical constituents and biological activities of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1074, 2021.

FERREIRA, Helder; LALA, Eliane Raquel Peres. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev Panam Infectol**, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.

FERREIRA, João Batista et al. Eficácia e segurança de Sultamicilina (Ampicilina/Sulbactam) e Amoxicilina/Clavulanato no tratamento das infecções de via aéreas superiores em adultos: um estudo multicêntrico, aberto e randomizado. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 104-111, 2006.

FERREIRA, Maria Jaiana Gomes et al. Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e153953295-e153953295, 2020.

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

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

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.

FREITAS, Thiago S. et al. UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of the *Manilkara zapota* (L.) P. Royen against *Escherichia coli* and other MDR bacteria. **Cellular and Molecular Biology**, v. 67, n. 1, p. 116-124, 2021.

GHOSH, Tanmay et al. A review on traditional and pharmacological uses of *Croton bonplandianum* with special reference to phytochemical aspect. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 22, n. 4, p. 1-10, 2018.

GIBBONS, Simon. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.

GONÇALVES, Mariana Domingues. **Impacto clínico da monitorização farmacocinética de gentamicina, amicacina e vancomicina e a sua relação com a função renal.** 2019. Tese de Doutorado.

JANSUMA, S. et al. Effects of drying temperatures and times on antioxidant contents and their activities of *Centella asiatica* (L.) urb. Leaves. **Thai Science and Technology Journal (TSTJ)**. v. 12, p. 2261-71, 2020.

- JAVADPOUR, Maryam M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.
- JÚNIOR, George do Nascimento Araújo et al. Espécies da família Euphorbiaceae na alimentação animal. **Pubvet**, v. 12, p. 133, 2018.
- JUNIOR, José Israel Guerra et al. Croton sp.: a review about Popular Uses, Biological Activities and Chemical Composition. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e57311225306-e57311225306, 2022.
- KAATZ, Glenn W. et al. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 719-726, 2003.
- KRISTIANSEN, Jette Elisabeth. The antimicrobial activity of psychotherapeutic drugs and stereo-isomeric analogues. **Danish Medical Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 165-182, 1990.
- KRISTIANSEN, Malthe M. et al. Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) to oxacillin in vitro. **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 3, p. 250-253, 2003.
- KRISTIANSEN, Malthe M. et al. Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump. **in vivo**, v. 20, n. 3, p. 361-366, 2006.
- LAGES, Luana Pinheiro et al. Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico da folha de *Anacardium occidentale* Linn (Cajueiro). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e267111131780-e267111131780, 2022.
- LEE, Y. et al. Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Microbiology**, v. 46, p. 283-288, 2008.
- LEGGETT, J. E. **Aminoglycosides**. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, v. 2, p. 1233-1238, 2017.
- LIMA, Bruno Barbosa; FERNANDES, Felipe Pereira. Uso e diversidade de plantas medicinais no município de Aracati-CE, Brasil. **Journal of Applied Pharm. I Sciences**, n. 7, p. 24-42, 2020.
- LIMA, William Gustavo; RAMOS-ALVES, Maria Cristina; SOARES, Adriana Cristina. Dos distúrbios psiquiátricos à antibioticoterapia: reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 48, n. 1, p. 5-28, 2019.
- LIU, Weixin et al. The flavonoid biosynthesis network in plants. **International**

**journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12824, 2021.

LIU, Xi et al. Efficacy of chloroquine versus lopinavir/ritonavir in mild/general COVID-19 infection: a prospective, open-label, multicenter, randomized controlled clinical study. **Trials**, v. 21, p. 1-9, 2020.

MAIA-SILVA, Camila et al. Guia de plantas: visitadas por abelhas na Caatinga. 1 ed. Fortaleza (CE): Fundação Brasil Cidadão;2012.

MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis Morais Franco. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

MATIAS, E. F. F. et al. **Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A.** *Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 305-309, 2011.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 3 ed. Fortaleza: Editora UFC. 2009.

MEHLA, Jitender et al. Predictive rules of efflux inhibition and avoidance in *Pseudomonas aeruginosa*. **MBio**, v. 12, n. 1, p. e02785-20, 2021.

MENSOR, Luciana L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MIRSEPASI-LAURIDSEN, Hengameh Chloé et al. *Escherichia coli* pathobionts associated with inflammatory bowel disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. e00060-18, 2019.

MISHRA, Krishnanand; OJHA, Himanshu; CHAUDHURY, Nabo Kumar. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MORAES, Giovanna Vizzaccaro et al. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e238111436225-e238111436225, 2022.

MORAIS, Selene M. de et al. Gênero *Cryptostegia*: fitoquímica, atividades biológicas e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 44, p. 709-716, 2021.

MORAIS, Selene Maia de et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Microbiologia médica.* Tradutor et al: Carlos Pelleschi Taborda et al. 2010.

NARDI, G. M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 176-184, 2003.

NASCIMENTO, Jéferson Chagas do. Estudo químico e avaliação biológica de *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae) e *Croton grewoides* Baill (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado em Química), **Instituto de Química**, Universidade Federal da Bahia, 2011.

NAVAS, Rafael; PEREIRA, Maria Renata Rocha. Efeito alelopático de *Raphanus sativus* em *Urochloa decumbens* e *Lactuca sativa*. **Revista Agro@mbiente. On-line**, v. 10, n. 3, p. 228-234, 2016.

NCCLS - National Comitee for Clinical Laboratory Standards. 2008. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, v. 56, 2008.

NIKAIDO, H. Prevenção do acesso de drogas a alvos: Barreiras de permeabilidade da superfície celular e efluxo ativo em bactérias. **Semin. Célula Dev. Biol.** 2001, 12, 215-223.

NITSCH-VELASQUEZ, Lucia et al. Perspectives on the enhancement of commercially available antibiotics by natural products. **medRxiv**, p. 2022.08.22.22279086, 2022.

NUNES, Xirley P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

OBRADOVIČ, Marko et al. A new method for the authentication of plant samples by analyzing fingerprint chromatograms. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 18, n. 2, p. 123-132, 2007.

OLÁ, Juan-Ignacio. Resistência bacteriana aos antibióticos: uma crise global. **Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica**, v. 33, nº. 10, pág. 692-699, 2015.

OLIVEIRA, Alane Cabral de et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, George Layson da Silva. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

OMS. (2020). Folha Informativa-Covid-19. (Doença causada pelo novo coronavírus). [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875).

OROIAN, Mircea; ESCRICHE, Isabel. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PEREIRA DA CRUZ, Rafael et al. Effect of  $\alpha$ -bisabolol and its  $\beta$ -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 28, 2020.

PESSUTO MB, Da Costa IC, De Souza AB, Nicoli FM, De Mello JCP, Petereit F, Luftmann H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

PREVEDELLO, Maiara Trindade; COMACHIO, Gabrieli. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e Doenças Crônicas Não Transmissíveis: uma revisão de literatura Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 55244-55285, 2021.

QADIR, Muhammad Imran; ASIF, Hira. An overview to candidiasis-a *Candida* infection. **International Journal of Advanced Research in Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 31-33, 2020.

QUEIROZ, Marcos Marçal Ferreira et al. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. lxxxviii-xciii, 2014.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

RAJESH, R. et al. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313–1322, 2006.

REIS, Luã Tainã Costa et al. Estrogen and thyroid hormone receptor activation by medicinal plants from Bahia, Brazil. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 8, 2018.

RODRIGUES, Christianne EC; ARACAVALA, Keila K.; ABREU, Fernanda N. Thermodynamic and statistical analysis of soybean oil extraction process using renewable solvent. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 11, p. 2407-2414, 2010.

RODRIGUES, Onaldo Guedes et al. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropiifolius Kunth*. e *Croton blanchetianus* Baill. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2017.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, Eduardo et al. A evolução da resistência bacteriana no México, 1973-2013. **Biomédica**, v. 34, pág. 181-190, 2014.

SÁ-FILHO, G. F. et al. LEVANTAMENTO DA PRESENÇA DE POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO EM PLANTAS NATIVAS DA CAATINGA BRASILEIRA. **The Brazilian Journal of Development (BJD)**, v. 5, n. 10, 2019.  
SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria L. Faria; NEGRI, Giuseppina. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 18, p. 11-33, 2007.

SALES, Laís Monteiro; SILVA, Tatiane Mendes. Staphylococcus aureus meticilina resistente: um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2012.

SANTANA, Clara et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of Encholirium spectabile (Bromeliaceae). **International Journal of Sciences**, 2012.

SEEBALUCK-SANDORAM, Roumita et al. Antibiotic-potential, antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase potential of Antidesma madagascariense Lam.(Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 194-201, 2017.

SHARMA, Samriti; SHARMA, Manik; SINGH, Gurvinder. A chaotic and stressed environment for 2019-nCoV suspected, infected and other people in India: fear of mass destruction and causality. **Asian journal of psychiatry**, v. 51, p. 102049, 2020.

SILVA, A. I. B. et al. **Perfil fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do Croton blanchetianus**. Revista Brasileira multidisciplinar, v. 24, n. 1, p. 134-142, 2021.

SILVA, Antonia Isabelly et al. Perfil fitoquímico de extratos etanólicos e metanólicos do Croton blanchetianus. **Revista Brasileira Multidisciplinar-ReBraM**, v. 24, n. 1, p. 134-142, 2021.

SILVA, J. A. G. et al. **Atividade tóxica in vitro de Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae)**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 112-115, 2018.

SILVA, J. A. G. et al. **Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae)**. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017.

SILVA, J. A. G. et al. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae) frente a Artemia salina Leach, **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 934–941, 2017.

SILVA, J. D. A. G. **Investigação fitoquímica e biológica de folhas do Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae) - Recife**: Dissertação

(Mestrado em Morfotecnologia) Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

SILVA, J. S. et al. **Sinopse das espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco**, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA, J. S.; SALES, M.F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. **O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema**, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia*, v. 60, n. 4, p. 879-901, 2019.

SILVA, J.A.G. et al. **Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente a *Artemia salina* Leach**, *Revista Virtual de Química*, v. 9, p. 934–941, 2017.

SILVA, Jéssica de Andrade Gomes. **Investigação fitoquímica e biológica de folhas do *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae)**. 2017.

Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, Juliana Santos et al. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, p. 441-453, 2010.

SILVA, Juliana Santos; SALES, Margareth Ferreira de; CARNEIRO-TORRES, Daniela Santos. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia*, v. 60, p. 879-901, 2009.

SILVA, L. N. et al. **Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation**. *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015.

SILVA, Laura Nunes et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVA, V. A. et al. **Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. Sobre bactérias causadoras da cárie dentária**. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 40, n. 2, p. 69-72, 2011.

SILVA, Viviane Araújo da et al. Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. Sobre bactérias causadoras da cárie dentária. *Rev. odontol. UNESP (Online)*, p. 69-72, 2011.

SOBRINHO, Alessandra Carla Guimarães et al. Determinação de compostos bioativos e capacidade sequestradora de radicais livres em extratos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 6, p. 34954-34969, 2020.

SOBRATTEE, Muhammed Asin et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis*, v. 579, n. 1-2, p. 200-213,

2005.

SOUSA, C.M.M. et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, Erlânio Oliveira et al. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. Na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, 2011.

SOUZA, E. L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA, E. O. et al. **Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* Linn e *Lantana montevidensis* Briq na resistência de aminoglicosídeos**. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, p. 1-5, 2010.

SOUZA, E.L. et al. **Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts**. *Food Control*, v. 18, p. 409-413, 2007.

SOUZA, T.J.T. et al. **Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 368-372 2007.

SOUZA, Tiago JT et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 368-372, 2007.

TACCONELLI, Evelina et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

TEGOS, George et al. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3133-3141, 2002.

TEIXEIRA<sup>1</sup>, Alysson Ribeiro et al. **Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos**. *Revista Saúde em Foco*, 11<sup>a</sup> ed. 2019.

TENÓRIO, R. F. L. **Atividade biológica *in vitro* de extratos de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett, *Ziziphus joazeiro* Mart., *Croton heliotropiifolius* Kunth, *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes e *Eugenia uniflora* L. contra ixodídeos, culicídeos e nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes**. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

THEURETZBACHER, Ursula et al. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 286-298,

2020.

THEURETZBACHER, Ursula et al. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 275-285, 2020.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 2012. p. 934-934.

UGWUANYI, Florence Chijindu et al. Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 20, p. 1-7, 2021.

ULSENHEIMER, Bruna Carolina et al. Determinação do Potencial Antimicrobiano de Óleos Essenciais de Lavanda (*Lavandula Dentata* L.) e Manjeriço (*Ocimum Basilicum* L.) Sobre Cepas de *Pseudomonas Aeruginosa* Isolada de Leite Mastítico Bovino. **Revista Contexto & Saúde**, v. 20, n. 40, p. 209-214, 2020.

VANDRESEN, Júlia et al. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 753-765, 2007.

VIEIRA, Priscila Noemi; VIEIRA, Suellen Lais Vicentino. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 21, n. 3, p. 1-4, 2017.

VIEIRA, Roberto Fontes et al. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2018., 2018.

VINOD, N. V. et al. Inhibition of beta-lactamase by 1, 4-naphthalenedione from the plant *Holoptelea integrifolia*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, p. 1752-1759, 2010.

ZHISHEN, Jia; MENGCHENG, Tang; JIANMING, Wu. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.