

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THALIA CRISTINA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
METANÓLICOS DE DIFERENTES ÓRGÃOS DE *Croton antisiphiliticus* Mart.**

PATOS DE MINAS - MG
OUTUBRO DE 2021

THALIA CRISTINA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
METANÓLICOS DE DIFERENTES ÓRGÃOS DE *Croton antisiphiliticus* Mart.**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal
de Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

**Prof. Dr. Guilherme Ramos de
Oliveira e Freitas.**

**PATOS DE MINAS
OUTUBRO DE 2021**

THALIA CRISTINA TEIXEIRA

**Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de diferentes
órgãos de *Croton antispyhiliticus* Mart.**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal
de Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas
Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - UFU
Presidente



Dra. Daiane Silva Resende
Laboratório de Microbiologia Molecular (MicroMol/ICBIM) - UFU
Membro



Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira
Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - UFU
Membro

Patos de Minas, MG, 22 de outubro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado o dom da vida, por ser meu confidente e amigo, sem ele esse trabalho jamais seria possível.

A todos os professores que contribuíram para formação acadêmica, vocês são heróis e contribuem imensamente na criação de um mundo melhor, cheio de paz e harmonia, pois o conhecimento é chave de uma humanidade unida e solidária.

Agradeço imensamente pelo apoio da minha família, aos meus pais Maria Sebastiana Silva Teixeira e Adailton José Teixeira, que sempre lutaram muito para dar o melhor para seus filhos, me ensinaram a levantar a cabeça a cada queda, a correr atrás dos meus sonhos e objetivos, entretanto com simplicidade e respeito ao próximo.

Aos meus irmãos Michely Cristina, Maria Isabel, Luam Artur e Stefani de Lara por estarem serem ao meu lado, em especial minha irmã Stefani por ter me apresentado a Biotecnologia, ser meu apoio psicológico e sempre me oferecer os melhores conselhos. As minhas sobrinhas Gabrielly Paula e Ana Paula por terem tornado meus dias mais leves e felizes.

Aos meus cunhados Abelar Henrique, Kamilla de Paula, Luís Fernando e Reinaldo Paula por terem me apoiado, por iluminarem a vida dos meus irmãos, pois a felicidade deles é a minha. Em especial ao meu cunhado Abelar Henrique, por toda sua ajuda durante a realização deste trabalho, por ter sido meu “técnico de informática” sempre que necessário.

Ao meu tio João Ramos, por sempre me incentivar a estudar, a acreditar que a educação é a chave para um mundo próspero, que sempre alegrava a todos com seu jeito contagiante e espontâneo de ser. Tenho certeza que o senhor está num lugar melhor alegrando todos que estão a sua volta, que descanse em paz.

Aos meus amigos Carina Cordeiro, Letícia Godinho e Gabriel Oliveira pela imensa amizade que nos foi conferida ao longo da graduação que me propiciou tranquilidade em situações caóticas e extrema felicidade nos demais momentos.

Aos técnicos de laboratórios da UFU- Campus Patos de Minas pela ajuda prestada no decorrer desta pesquisa, em especial a técnica Carla de Lima Ferreira que me ajudou imensamente na reação deste trabalho, assim como, no meu aprendizado em técnicas laboratoriais.

Ao meu querido orientador Prof. Dr Guilherme Ramos de Oliveira e Freitas por toda a paciência e disposição não só na realização deste trabalho, bem como, em todos os outros requisitos acadêmicos.

A Prof.a Dra Daiane Silva Resende e a Prof.a Dra Teresinha Aparecida Teixeira por terem aceitado participar da minha banca e ajudado na realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Maicon Natan Moura por todo amor, apoio, carinho e conforto. Por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando nem eu mesma acredito, por me consolar em momentos de crise emocional e sempre me proporcionar os momentos mais incríveis, mesmo que estejamos a centenas de quilômetros.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho, meu sincero muito obrigado!

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é propiciada pela vasta variabilidade genética dos microrganismos, entretanto, o uso indiscriminado e/ou inadequado dos antimicrobianos contribui na amplificação desta característica. A descoberta de novos fármacos antibacterianos é demorada e dispendiosa em relação ao surgimento de novas cepas resistentes, mesmo assim, a busca por novos princípios ativos com capacidade antimicrobiana é necessária. Plantas medicinais do Cerrado podem ser fontes de compostos bioativos a serem explorados, como por exemplo a espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. que é utilizada popularmente para tratar reumatismo, sífilis e outras infecções. Apesar de sua atividade antimicrobiana já ter sido avaliada por outros autores, o potencial antibacteriano da flor nunca foi investigado, e seus quatro órgãos também não foram testados contra cepas de microrganismos resistentes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos (EMs) das raízes, caules, folhas e flores da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. contra *Staphylococcus aureus* (uma cepa sensível e um isolado resistente a meticilina – MRSA), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os EMs apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas analisadas, entretanto nenhum apresentou atividade contra as espécies Gram-negativas em estudo. Em relação a capacidade bacteriostática, o EM da raiz foi mais eficiente para as cepas de *S. aureus* e, os do caule e da folha foram mais eficazes para as cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Em relação a ação bactericida, o EM da raiz foi o melhor para todas as bactérias analisadas. No nosso conhecimento, foi a primeira vez que potencial antibacteriano da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. foi avaliado contra uma cepa resistente de *S. aureus*, e os resultados demonstram atividade significativa. Futuramente, essa planta poderá contribuir na descoberta de novos compostos antimicrobianos, ou mesmo potencializar os já existentes, entretanto mais estudos devem ser realizados.

Palavras-chave: Cerrado. Produtos naturais. *Croton antisiphiliticus* Mart. Concentração inibitória mínima. Concentração bactericida mínima.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials is provided by the vast genetic variability of microorganisms, however, the indiscriminate and/or inappropriate use of antimicrobials contributes to the amplification of this characteristic. The discovery of new antibacterial drugs is time consuming and expensive compared to the emergence of new resistant strains, even so, the search for new active principles with antimicrobial capacity is necessary. Medicinal plants from the Cerrado may be sources of bioactive compounds to be explored, such as the species *Croton antisiphiliticus* Mart. which is popularly used to treat rheumatism, syphilis and other infections. Although its antimicrobial activity has already been evaluated by other authors, the flower's antibacterial potential has never been investigated, and its four organs have not been tested against resistant microorganism strains either. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of methanol extracts (MEs) from roots, stems, leaves and flowers of the *Croton antisiphiliticus* Mart. against *Staphylococcus aureus* (a sensitive strain and an isolate resistant to methicillin – MRSA), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. All EMs showed antimicrobial activity against the Gram-positive bacteria analyzed, however none showed activity against the Gram-negative species under study. In relation to bacteriostatic capacity, root ME was more efficient for *S. aureus* strains, and those of stem and leaf were more effective for *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains. Regarding bactericidal action, root ME was the best for all analyzed bacteria. To our knowledge, it was the first time that the antibacterial potential of the species *Croton antisiphiliticus* Mart. was evaluated against a resistant strain of *S. aureus*, and the results demonstrate significant activity. In the future, this plant may contribute to the discovery of new antimicrobial compounds, or even enhance existing ones, however, more studies must be carried out.

Keywords: Cerrado. Natural products. *Croton antisiphiliticus* Mart. Minimum inhibitory concentration. Minimal bactericidal concentration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: microlitros

Amp: ampicilina

ATCC: marca registrada da *American Type Culture Collection*

AZL: azitromicina

CBM: concentração bactericida mínima

CIM: concentração inibitória mínima

DMSO: dimetilsulfóxido

EM: extratos metanólicos

ERI: eritromicina

Gen: gentamicina

mL: mililitros

MH: Mueller-Hinton

mm: milímetros

MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina

MTT: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]

Pen G: penicilina G

TSA: agar triptona de soja

TSB: caldo triptona de soja

UFC: unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Bactérias patogênicas.....	9
1.2	Antimicrobianos e resistência bacteriana	11
1.3	Plantas medicinais e o Cerrado.....	15
1.4	Cerrado	16
1.5	<i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.....	17
2	OBJETIVO.....	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Obtenção do material vegetal	19
3.2	Preparação dos extratos metanólicos (EMs).....	20
3.3	Espécies bacterianas	22
3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana pelo Teste de difusão em ágar.....	22
3.5	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias patogênicas

As bactérias são microrganismos ubíquos, já que podem ser encontradas em praticamente todos os ambientes (GHUNEIM et al., 2018). Sendo consideradas essenciais para a manutenção da vida, a maioria das espécies não são patogênicas, como por exemplo, as que compõem nossa microbiota, que quando em situações de equilíbrio, podem ser responsáveis pela produção de substâncias úteis (como as vitaminas B e K), pela degradação de substâncias tóxicas ao organismo do hospedeiro, ou ainda inibir a instalação de outros patógenos (LEVISON, 2010; MACHADO, 2019)

Entretanto, alguns desses microrganismos são responsáveis por quadros de infecções quando há uma alteração na homeostase do hospedeiro e, estes encontram-se numa posição favorável que propicia sua multiplicação e permanência no organismo infectado. As bactérias provocam patologias seja pela produção de toxinas ou pela invasão do organismo hospedeiro. As toxinas se dividem entre exotoxinas (polipeptídeos celulares) e endotoxinas (LPS- lipopolissacarídeos), ambas possuem a capacidade de induzir à produção de citocinas inflamatórias e não necessitam da presença do microrganismo para provocar sintomas. As endotoxinas estão presentes apenas em bacilos e cocos Gram-negativos e proporcionam febre, choque e outros sintomas. Já as exotoxinas são secretadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e estão frequentemente associadas a intoxicações alimentares. As bactérias que causam infecções, se multiplicam num determinado tecido e provocam a resposta imune do hospedeiro, iniciada por uma reação inflamatória (LEVISON, 2010; CAVAILLON, 2018; DUPORT; ALPHA-BAZIN; ARMENGAUD, 2019).

Staphylococcus aureus é um coco Gram-positivo oportunista que provoca inúmeras infecções, que vão desde a formação de espinhas, e furúnculos, até quadros graves de pneumonia e meningite. É também um dos principais patógenos isolados de infecções hospitalares. Sua capacidade de gerar diversas doenças é o reflexo de seus fatores de virulência que propiciam sua multiplicação em circunstâncias críticas e são fundamentais para que essa bactéria possa se espalhar pelo organismo (KONG; NEOH; NATHAN, 2016; SANTOS et al., 2007). Em relação aos seus fatores de virulência,

podemos citar às toxinas citolíticas, como as hemolisinas e leucotoxinas, causadoras de lise celular em hemoglobinas e leucócitos, respectivamente, em que, merece destaque α -hemolisina formadora de poros de barril β , também chamada de toxina α , uma das mais prejudiciais num quadro infeccioso provocado por *S. aureus*, que causa a morte celular de monócitos, células B e T (OTTO, 2014; BERUBE; WARDENBURG, 2013; NYGAARD et al., 2014). A β -toxina e as toxinas esfoliativas provocam morte celular, inflamação e ruptura de tecidos em mamíferos, através de citotoxicidade causada em suas células. Proteases, como metaloprotease aureolisina e nucleases características de *S. aureus*, são responsáveis pela clivagem e inativação de diversos aparatos do sistema imune, como peptídeos antimicrobianos, fatores de complemento e proteínas de superfície imprescindíveis para a locomoção dos leucócitos ao foco infeccioso (TAM; TORRES, 2019).

Enterococcus também são cocos Gram-positivos, comumente encontrados na microbiota intestinal humana, bem como, na microbiota de praticamente todos os animais que habitam o planeta (FIORE; VAN TYNE; GILMORE, 2019). Podem causar endocardite bacteriana, infecções no sistema urinário e no sangue, bem como infecções de origem cirúrgica ou intra-abdominais, sendo as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, as bactérias que mais merecem destaque dentro do gênero (ANVISA, 2008a). Além disso, os enterococcus resistentes a vancomicina, denominados VRE, são uma grande preocupação médica, tendo em vista que estes microrganismos são multirresistentes, oportunistas e, cada vez mais estão presentes nos ambientes hospitalares, sendo associados a altas taxas de mortalidade (AHMED; BAPTISTE, 2018; SANTOS; PAIVA; ANDRADE, 2021; RAZA et al., 2018).

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, aeróbio facultativo, e está entre os microrganismos mais comuns da microbiota intestinal, sendo possivelmente, o mais estudado. Quando está presente nos alimentos e na água, é um indicativo de contaminação fecal e, é a razão mais frequente de doenças infecciosas no sistema urinário. Além disso, cepas virulentas dessa espécie, como a produtora da toxina Shing (STEC), podem provocar intoxicações alimentares graves (JANG et al., 2017; ODONKOR; AMPOFO, 2013; FLORES-MIRELES, 2015; OMS, 2018).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, com variada disposição ambiental, podendo ser encontrada tanto em ambientes aquáticos, como nos terrestres. Considerado um patógeno oportunista, já que dificilmente desencadeia um

processo infeccioso em pessoas saudáveis, infecta principalmente indivíduos com o sistema imunológico debilitado, como pacientes com câncer, fibrose cística, portadores do HIV com manifestação clínica, dentre outras enfermidades (LOPES et al., 2020; DIGGLE; WHITELEY, 2020).

1.2 Antimicrobianos e resistência bacteriana

Os antimicrobianos são compostos obtidos sinteticamente ou naturalmente a partir de microrganismos, plantas ou animais, podendo sofrer pequenas modificações como forma de potencializar sua atividade, sendo assim classificados como semissintéticos. Seu mecanismo de ação baseia-se na toxicidade seletiva sobre os microrganismos, podendo ser classificados como bactericidas, quando provocam a morte das bactérias, ou bacteriostáticos, quando apenas impedem o crescimento desses microrganismos (MACHADO, 2019; SILVA et al., 2018; LOBRITZ et al., 2015).

Esses compostos transformaram a medicina moderna a aproximadamente 100 anos, aumentando a expectativa de vida dos seres humanos em 23 anos. O primeiro antimicrobiano foi a arsfenamina, também denominado de composto 606 ou salvarsan, inserido no sistema de saúde em 1910. Criado por Paul Ehrlich, este composto sintético foi a primeira droga utilizada no tratamento da sífilis e foi o pontapé para Ehrlich tivesse seu conceito de “bala mágica” popularizado, termo que conceitua um composto que tem por objetivo eliminar um patógeno sem que haja dano nas células hospedeiras normais, conhecido atualmente como antimicrobiano e que foi extremamente importante na posterior criação destes (GENSINI; CONTI; LIPPI, 2007; VALENT et al., 2016).

Em 1928, a penicilina foi descoberta, dando início à descrição de vários compostos com atividade antimicrobiana obtidos através dos produtos naturais, que alcançou seu auge por volta da década de 1950. Após esse período, houve uma queda gradual na descoberta e elaboração dos antibióticos e, em contrapartida, a resistência dos microrganismos a estes fármacos aumentou drasticamente, contribuindo para a preocupante resistência bacteriana atual (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

A resistência bacteriana a um antimicrobiano ocorre quando este é incapaz de interromper ou reduzir o crescimento bacteriano mesmo na presença da droga em concentrações terapêuticas (OLIVEIRA, 2015). É extremamente preocupante, uma vez

que é correlacionada a altos índices de mortalidade. Sendo o perfil de multirresistência em bactérias Gram-positivas e em Gram-negativas, uma forte adversidade, já que doenças causadas por estas bactérias são difíceis de tratar, podendo até ser intratáveis utilizando os antibióticos usuais. Dentre as bactérias Gram-positivas, as que apresentam maior resistência antimicrobiana são bactérias do gênero *Enterococcus* e da espécie *Staphylococcus aureus*. Já em relação às Gram-negativas, merecem destaque, as bactérias da ordem *Enterobacterales*, bem como às espécies *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2016; LOUREIRO et al., 2016; MCADAM, 2020).

De acordo com Magiorakos e colaboradores (2012), bactérias multirresistentes são aquelas que não possuem sensibilidade a pelo menos um antibiótico de 3 ou mais classes antimicrobianas normalmente utilizadas em seu tratamento. Já as bactérias pan-resistentes possuem resistência a todas as classes de antibióticos disponíveis. A análise de sensibilidade a um antimicrobiano deve ser sempre realizada conforme padrões estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), FDA (*Food and Drug Administration*) e EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

S. aureus resistente a metilina/oxacilina (MRSA) é um dos microrganismos resistentes aos antimicrobianos que mais tem preocupado pesquisadores de diversas partes do mundo nos últimos anos (BAYAT et al., 2017). Esse patógeno apresenta resistência à classe dos β -lactâmicos, que ocorre devido à produção de uma transpeptidase modificada conhecida como PBP2a, codificada pelo gene *mecA*, que possui baixa afinidade a estes compostos (CDC, 2019; HIRAMATSU et al., 2002). O gene *mecA* está localizado no cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), um elemento genético móvel, que é classificado em diferentes tipos de acordo com seus dois complexos principais, complexo *mec* e *ccr* e sua resistência aos β -lactâmicos. Sete principais tipos de SCC*mec* já foram descobertos (I a VII) e cada um apresenta suas individualidades (SABER et al., 2017; REITER, 2009).

Segundo a ASCOM/ANVISA (2018) o uso inadequado de antibióticos contribui para uma crescente resistência bacteriana, haja vista que, a seleção de bactérias resistentes, pode ser explicada pela teoria da “Seleção natural das espécies”, proposta por Charles Darwin. Uma vez em contato com os antimicrobianos, uma pequena parte desses microrganismos, primariamente resistentes, pode sobreviver e, conseqüentemente, essa

porcentagem dará origem a mais bactérias resistentes. Infelizmente a resistência bacteriana possui alto impacto em todo o mundo, sendo um agravante em todos os países, tanto desenvolvidos, quanto em desenvolvimento, causando uma preocupação maior nos locais que possuem um consumo de antimicrobianos descontrolado e pouco orientado.

A mutação é uma mudança na sequência nucleotídica de uma pequena região de um material genético, sendo que as consequências dessa alteração podem ser benéficas, danosas ou neutras, dependendo do local e do tipo de troca realizada. Pode ocorrer por meio de erros durante a replicação do material genético ou através de agentes mutagênicos, químicos e físicos. Apesar dos mecanismos de transferência horizontal serem imprescindíveis na perpetuação de genes de resistência aos antimicrobianos, é importante considerar que as mutações podem ser a origem desses genes (FIOCRUZ, 2021; LI; LYNCH, 2020; STOCZYNSKA, 2014; WOODFORD; ELLINGTON, 2007).

A transferência horizontal de genes é o processo de transferência de material genético entre indivíduos não aparentados. De grande importância para a evolução bacteriana, esse processo está diretamente relacionado a resistência de microrganismos aos antimicrobianos, bem como, a sua patogenicidade. Dentre os mecanismos de transferência horizontal de genes estão a transformação, transdução e conjugação. (SOUZY; HUANG; GOGARTEN, 2015; BRIGULLA; WACKERNAGE, 2010).

A transformação consiste na captura e integração de material genético exógeno (fragmentos de DNA advindos do meio ambiente) através de recombinação homóloga, por bactérias competentes. O estado de competência bacteriana é transitório, grande parte das bactérias transformáveis não expressam constantemente as proteínas necessárias para a transformação, haja vista que são necessárias condições apropriadas para o desenvolvimento desse estado. A transformação é de grande valia no processo evolutivo bacteriano pois, por meio dela bactérias podem adquirir características genéticas favoráveis que propiciam resistência aos antimicrobianos e adaptação as condições ambientais que estão submetidas (JOHNSTON et al., 2014).

A transdução é o processo de transferência de material genético de um microrganismo para outro, realizado por bacteriófagos (MACEDO, 2018). Esses vírus podem causar a transferência gênica por meio dos seus ciclos lítico e lisogênico. No ciclo lítico, os bacteriófagos são mais virulentos, se replicam utilizando o maquinário celular de bactérias infectadas, entretanto ao realizarem o empacotamento de seu material genético, acidentalmente podem encapsidar também uma parte do DNA bacteriano.

Nesse ciclo há o rompimento celular e a liberação de novos fagos para o ambiente. Já no ciclo lisogênico, os bacteriófagos são menos invasivos, infectam células bacterianas, entretanto não causam o rompimento celular, apenas inserem seu material genético no DNA bacteriano e se replicam conforme a replicação bacteriana. Por meio desses dois ciclos, caso os vírus tenham adquirido genes de resistência, estes podem ser transmitidos a novas bactérias (CHIANG; PENADÉS; CHEN, 2019; BRIGULLA; WACKERNAGE, 2010).

A conjugação é o mecanismo transferência gênica mais importante na propagação de genes de resistência antimicrobiana entre as bactérias, bem como, de fatores de virulência (GOESSWEINER-MOHR, 2014). Na conjugação, DNA plasmidial é transposto de uma bactéria doadora para uma receptora através da interação de suas superfícies celulares por meio de um aparelho de conjugação, um agregado de várias proteínas específicas. Inicialmente o DNA é processado na bactéria doadora por um complexo chamado de relaxossomo, posteriormente ele é encaminhado ao sistema T4SS para sua transferência à bactéria receptora. Os T4SSs são complexos multifuncionais que transportam DNA, entretanto podem transportar também toxinas e proteínas efetoras. São formados por três classes principais de proteínas, as do canal de translocação, do pilus e ATPases, fornecedoras de energia para o sistema (GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003; ILANGO VAN; CONNERY; WAKSMAN, 2015).

É evidente que os antimicrobianos revolucionaram a medicina e propiciaram a salvação de inúmeras vidas nas últimas décadas. Entretanto, infelizmente, a disponibilidade desses compostos para o tratamento de infecções bacterianas está cada vez menor devido a evolução dos microrganismos, sendo, o uso indiscriminado desses fármacos na agricultura, pecuária, piscicultura, assim como seu uso inadequado e excessivo para o tratamento de doenças humanas, um forte agravante para o avanço da resistência bacteriana (SILVA; AQUINO, 2018). Ao contrário do surgimento acelerado de cepas de microrganismos resistentes, existe um número limitado de novos fármacos sendo descritos. Determinadas bactérias que provocam graves quadros clínicos em humanos já apresentam resistência a maior parte ou a praticamente todos os tratamentos a disposição, e infelizmente existem limitadas alternativas em fase de desenvolvimento para uso clínico (OPAS/OMS, 2017; OMS, 2017).

1.3 Plantas medicinais

Utilizados pela sociedade desde os primórdios, os produtos naturais têm sido uma fonte vital no descobrimento de componentes bioativos utilizados na criação de medicamentos. Dentre estes, os antibióticos, graças a imensa heterogeneidade de recursos naturais ainda inexplorados, encontrados tanto no ambiente aquático, como no terrestre (SILVA; ALQUINO, 2017; RODRIGUES, 2018). Acredita-se que possivelmente folhas e ervas foram os primeiros produtos naturais usados para aliviar sintomas de enfermidades e porventura curá-las. Nas civilizações oriental e ocidental, destaque para as civilizações egípcias, greco-romanas e chinesas, podem ser encontrados vários exemplos da utilização desses produtos, na medicina, na agricultura, para combater pragas ou até mesmo como forma de proteção (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

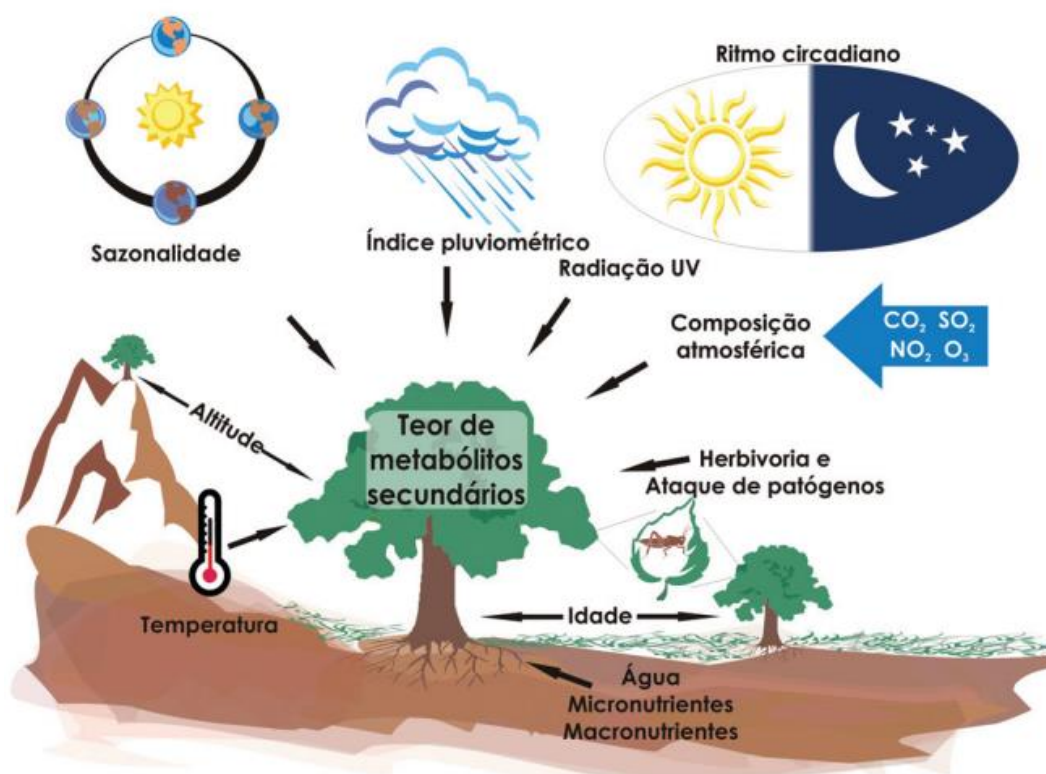
Dentre os produtos naturais estão as plantas medicinais, que contribuem para assegurar uma vida saudável à sociedade. A terapia com plantas é parte da cultura de uma nação, sendo aplicada pelas populações no decorrer de muitas gerações, e atualmente, alguns aspectos positivos de muitas espécies vegetais utilizadas já foram cientificamente comprovados (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). Segundo a Anvisa (2008b) a elaboração de antibióticos demanda muito tempo, é cara e imprevisível, devido a rápida expansão da resistência microbiana quando o antibiótico começa a ser comercializado. Contudo, espécies vegetais podem colaborar na criação de novos antibióticos, uma vez que estas podem sintetizar princípios ativos com atividade antibacteriana com um intuito profilático ou mesmo para atacar prováveis microrganismos prejudiciais que porventura, provocarão uma infecção (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Derivados de inúmeras plantas, principalmente seus metabólitos secundários, têm se mostrado promissores em relação à atividade antibacteriana, apresentando propensão a influenciar na capacidade antibiótica e consequentemente, na melhoria de antimicrobianos. Esse sinergismo tem sido alvo de estudos com resultados promissores (SAIRAIVA, 2010). Os metabólitos secundários são biomoléculas sintetizadas por plantas com o propósito principal de proteger contra estresses bióticos e abióticos. 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 por sua vez, são reagrupados em subclasses de acordo com a biossíntese, emprego e relevância específica (BORGES; AMORIM, 2020).

Produzidos pelas plantas medicinais, os metabólitos secundários são os principais responsáveis por suas características farmacológicas, sendo importantes indicadores na avaliação de seu potencial. Entretanto, a produção, o tipo e o armazenamento desses compostos naturais, mostram-se extremamente complicados, já que podem sofrer interferência de acordo com a espécie, fisiologia, genótipo, etapa de desenvolvimento, aspectos ambientais, tais como a luz, temperatura, quantidade de água disponível, salinidade, altitude, dentre outras variantes (Figura 1) (ISAH; 2019; LI et al., 2020).

Figura 1: Principais aspectos que podem interferir no conteúdo de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)

1.4 Cerrado

O Brasil possui uma gama de produtos naturais e, de acordo com o Ministério da Saúde (2016), a maior parte da biodiversidade do mundo se encontra no país, que dispõe de aproximadamente 15 a 20% da diversidade biológica de todo o planeta. Merece

destaque a vegetação de grande porte que representa aproximadamente 24% da biodiversidade do país sul americano.

O bioma Cerrado é o segundo maior domínio ecológico do Brasil, possuindo diferentes espécimes vegetais que abrangem distintas fitofisionomias. Sua vegetação está presente em aproximadamente 23,9% do território do país, em que, mais de 220 espécies são descritas como sendo utilizadas na medicina popular (BRASÍLIA AMBIENTAL, 2018; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2021; AMARAL, 2019). Apesar da grande potencialidade terapêutica de inúmeras espécies vegetais do Cerrado, ainda existe uma escassez de estudos para investigar as propriedades medicinais dessas plantas, sobretudo, quando se correlaciona a imensa biodiversidade do bioma pelo espaço ocupado (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* nativa do Cerrado, conhecida popularmente como barbatimão, é um exemplo de planta medicinal encontrada nesse bioma. Popularmente é utilizada como recurso terapêutico de várias enfermidades, como diarreia, úlceras, hemorragias vaginais e gonorreia. Possui também ação anti-inflamatória, cicatrizante, antisséptica, adstringente, anti-hipertensiva e anti-hemorragica. A casca do tronco do barbatimão é a principal parte empregue na confecção de produtos farmacêuticos (LIMA et al., 2017; CHAVES et al., 2016). Diante da enorme potencialidade da *Stryphnodendron adstringens*, vários fármacos foram ou estão sendo desenvolvidos, como o Fitoscar registrado pela ANVISA, na forma de pomada para uso tópico, indicada para cicatrização de diversos ferimentos (BRASIL, 2014).

1.5 *Croton antisyphiliticus* Mart.

Um dos gêneros que possui espécies presentes no Cerrado é o gênero *Croton*, da família Euphorbiaceae, com cerca de 1.300 espécies de plantas, muitas destas utilizadas como medicinais pela população (XU; LIU; LIANG 2018). Alguns estudos conduzidos com espécies desse gênero, como *Croton pulegioides* Baill, *Croton zehntneri* (variedade estragol) e *Croton urucurana*, utilizando diferentes tipos de extratos produzidos com diversos órgãos, demonstraram atividade contra cepas bacterianas e fúngicas (ARRAIS et al., 2014; COSTA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

A espécie *Croton antisyphiliticus* Mart., popularmente chamada de pé de perdiz ou minuano, é uma planta com propriedades medicinais natural do Cerrado. Possui

estatura de 30 a 40 cm e, normalmente forma moitas ou grupos. Na medicina tradicional, folhas e raízes são utilizadas na forma de decoctos ou garrafadas, sendo indicadas para tratamento de sífilis, reumatismo e inflamações. Em mulheres, a espécie é empregada no tratamento de doenças infecciosas no ovário e no útero, assim como, para controlar o ciclo menstrual, estimular a gravidez e reabilitar o útero pós-parto. Já no homem, é utilizada no tratamento de inflamações na próstata (OLIVEIRA et al., 2011; VERDE; PAULA; CANEIRO, 2003; DIAS; LAUREANO, 2009).

Sabendo da potencialidade de espécies de plantas medicinais do gênero *Croton*, cuja atividade antimicrobiana de *C. antisyphiliticus* Mart. foi demonstrada por alguns autores contra algumas espécies de microrganismos (SALES, 2018; NADER, 2014), entretanto, nunca da flor dessa planta. Considerando também que os metabólitos secundários de uma planta interferem diretamente em suas propriedades farmacológicas e que sua produção e armazenamento podem sofrer modificações devido a vários aspectos (ISAH; 2019; LI et al., 2020), o presente trabalho analisou a atividade antimicrobiana da planta pé de perdiz coletada no município de Patos de Minas -MG, contra espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo uma cepa de MRSA.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos produzidos a partir de diferentes órgãos da espécie *Croton antisyphiliticus* Mart. coletada em Patos de Minas -MG contra diferentes espécies bacterianas.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos metanólicos dos diferentes órgãos (raiz, caule, folha e flor) da espécie *Croton antisyphiliticus* Mart.;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos contra às espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

(MRSA, SCCmec III), *Enterococcus faecium* (JH255), *Enterococcus faecalis* (ATCC 551332), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As plantas da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. (Figura 2) foram coletadas na zona rural do município de Patos de Minas, na Fazenda Paulista (18°30'06.1"S, 46°31'36.3"O) no período de floração, no dia 15 de setembro de 2019, na primeira parte do dia (das 8 horas as 10 horas). O local apresenta vegetação típica de Cerrado, próximo a região onde a Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas está sendo construída. Os espécimes vegetais foram identificados pela Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira, engenheira agrônoma e docente do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UFU. Posteriormente foram encaminhados e depositados no herbário da UFU, sob o voucher: HUFU79.879.

Figura 2: Imagens da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. em seu ambiente natural.



Fonte: Autoria própria

3.2 Preparação dos extratos metanólicos (EMs)

Após a coleta, os extratos dos espécimes vegetais da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. foram preparados com base na metodologia descrita por Silva (2018), em que, as plantas foram lavadas para retirada de prováveis impurezas e seus órgãos foram separados entre raiz, caule, folha e flor, para verificar possíveis diferenças da ação antimicrobiana nestes órgãos (Figura 3).

Figura 3: Órgãos da planta devidamente limpos e separados. (a) raiz, (b) caule, (c) folha e (d) flor.



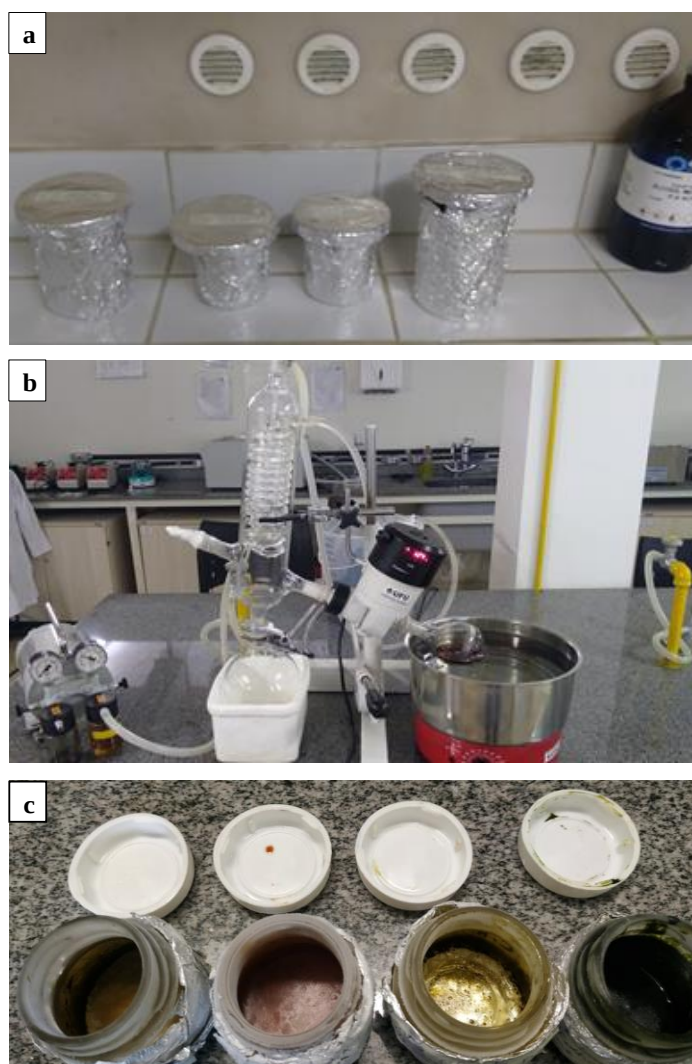
Fonte: Autoria própria

Posteriormente, os órgãos foram congelados a -80°C e, em seguida, liofilizados por 48h. Após essa etapa, estes foram colocados num moinho de facas para sua completa trituração. Ao final do processo, o pó resultante de cada órgão foi depositado separadamente em frascos ao abrigo da luz, ficando nestes até o processo de extração.

Para realizar a extração dos compostos químicos dos órgãos triturados (raiz, caule, folha e flor), foi utilizado como solvente o metanol (99% de pureza) num volume (mL) de 10X a massa (g) de cada órgão. As misturas formadas pelos órgãos triturados e pelo metanol foram depositadas em béqueres envoltos com papel alumínio por um período de três dias, e a cada 24h sofreram agitação (processo de extração exaustiva). Em seguida, o

conteúdo de cada béquer foi filtrado utilizando um papel filtro com a ajuda de uma bomba a vácuo. As porções líquidas foram submetidas a evaporação rotativa, numa temperatura de 55 °C e numa pressão constante e reduzida de 500 Pa (pascal), enquanto que as porções sólidas foram novamente colocadas no metanol, e submetidas novamente a todo o processo em um total de cinco vezes. Os extratos metanólicos (EMs) de cada parte da planta obtidos após a evaporação rotativa foram acondicionados em recipientes embrulhados com papel alumínio e estocados no ultrafreezer em uma temperatura de -80 °C (Figura 4).

Figura 4: Obtenção dos extratos metanólicos (EMs) dos diferentes órgãos da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. (a) Processo de extração exaustiva, (b) Evaporação rotativa e (c) Extratos metanólicos obtidos (flor, raiz, caule e folha, respectivamente).



Fonte: Autoria própria

3.3 Espécies bacterianas

Para testar a atividade antimicrobiana dos EMs obtidos, os seguintes microrganismos foram utilizados: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), uma cepa de origem hospitalar de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA SCCmec III), *Enterococcus faecium* (JH255), *Enterococcus faecalis* (ATCC 551332), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As espécies bacterianas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rosineide Ribas, coordenadora do Laboratório de Microbiologia Molecular (MicroMol), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU.

Os microrganismos estavam armazenados em caldo Triptona de Soja (TSB) com acréscimo de glicerol (20%), numa temperatura de -20°C. A recuperação dos microrganismos foi realizada de acordo com Brasil (2017), em que os mesmos, foram transferidos para tubos contendo 5 mL de TSB estéril, com o auxílio de uma alça de platina. Posteriormente, foram colocados em estufa por 24h a 37 °C e, transferidos para o agar Triptona de Soja (TSA), sob as mesmas condições anteriores. Para avaliar os aspectos morfológicos cada microrganismo foi submetido à coloração de Gram.

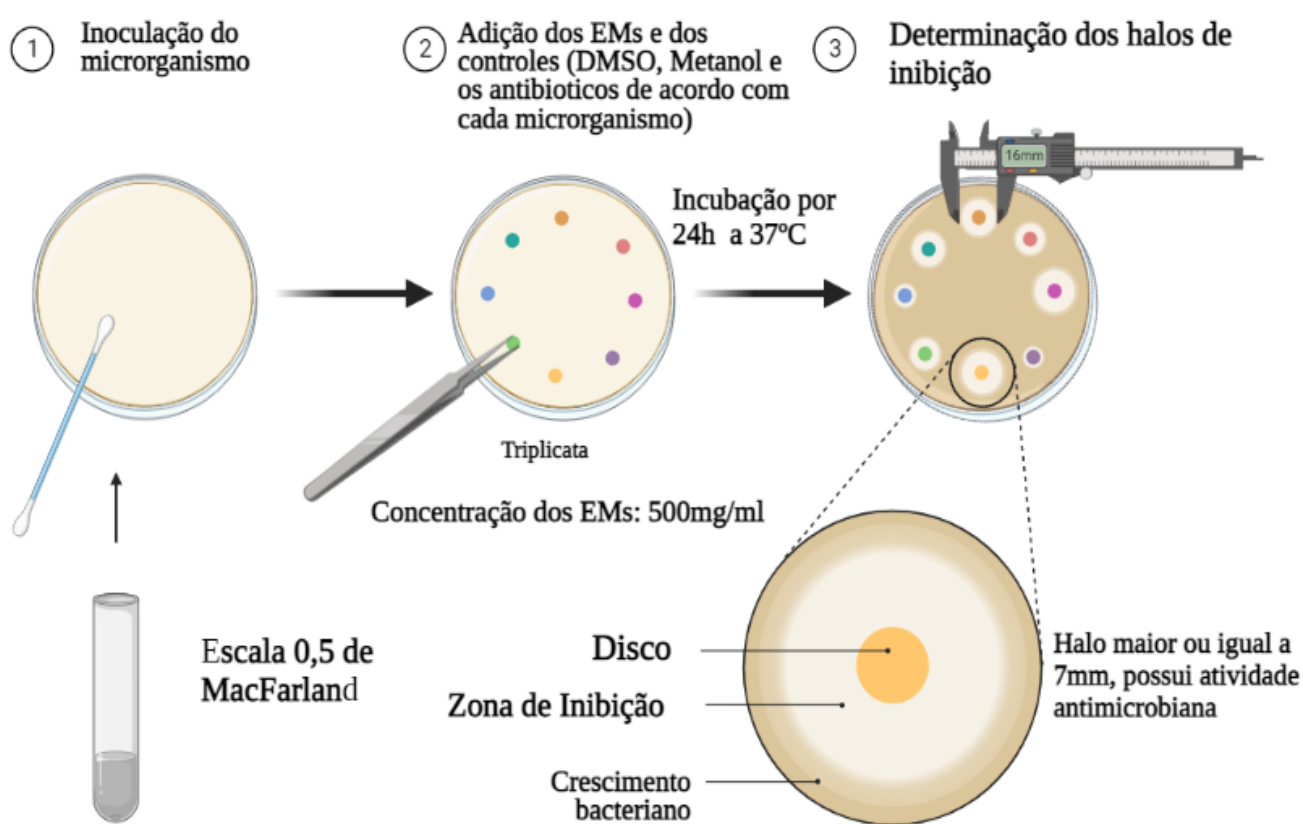
3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em agar

Para testar a atividade antimicrobiana dos EMs das raízes, caules, folhas e flores, da espécie *Croton antispyhiliticus* Mart., o método de difusão em agar foi utilizado baseado na metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2020), em que, os microrganismos utilizados foram cultivados por 24 horas, posteriormente, inoculados num tubo de salina (0,8%) e suas respectivas concentrações foram ajustadas conforme a escala de 0,5 de MacFarland, 10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

Utilizando um *swab*, as espécies bacterianas foram semeadas em placas contendo agar Mueller-Hinton (MH). Depois de 5 minutos, foram depositados nestas placas, discos de papel de 6 mm de diâmetro encharcados com os EMs das raízes, caules, folhas e flores, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), numa concentração de 500 mg/mL. Como controle negativo foram acrescentados discos impregnados com metanol (99% de pureza) e DMSO (100%). Já como controle positivo, foram adicionados os seguintes antibióticos:

azitromicina (AZI 15 µg) para *S. aureus* e MRSA; eritromicina (15 µg) também para MRSA; ampicilina (AMP 10 µg) para *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. coli*; penicilina G (10 U. I) também para *E. faecalis* e *E. faecium* e, gentamicina (GEN 10 µg) para *P. aeruginosa*. Após a incubação das placas por 18 a 24 horas a 37°C, os halos de inibição formados foram medidos em mm. Aqueles que apresentaram halos com tamanhos superiores ou equivalentes a 7 mm, tiveram a atividade antimicrobiana considerada positiva (Figura 5).

Figura 5: Avaliação da atividade antimicrobiana dos EMs utilizando o teste de difusão em agar.



Fonte: Autoria própria

3.5 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Para realizar a CIM de cada extrato que propiciou a inibição dos microrganismos testados, houve o cultivo destes até no máximo 48h antes dos testes em meio TSA, posteriormente, colônias características e isoladas de cada microrganismo foram

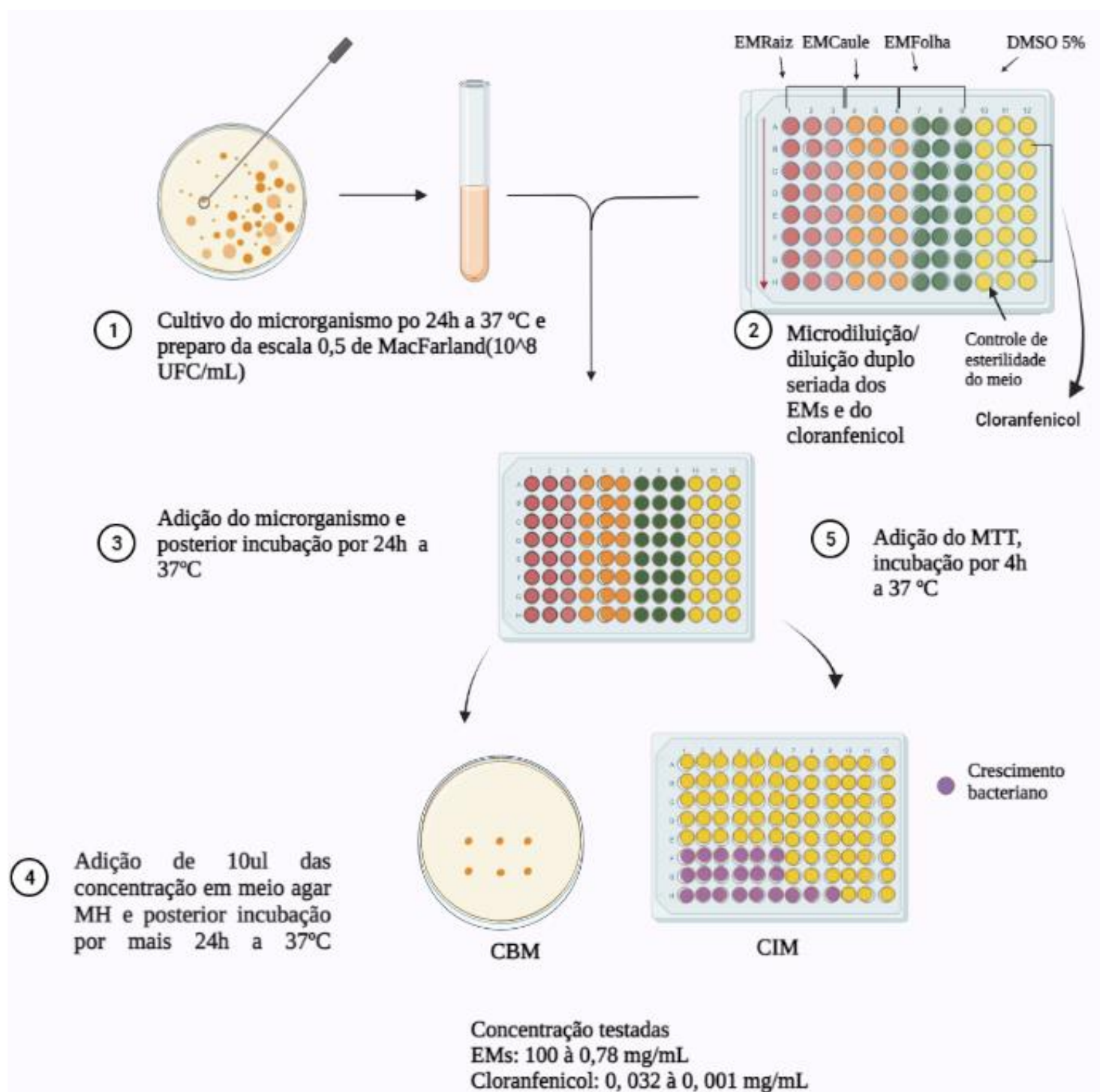
inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de salina a 0,8 % e a turbidez foi ajustada conforme a escala de 0,5 de MacFarland (10^8 UFC/mL).

Os EMs dos órgãos foram diluídos em DMSO a 5% e, foram testados em placas de 96 poços pelo método de microdiluição. Ao todo, 8 concentrações duplo-seriadas dos extratos foram testadas (de 100 mg/mL a 0,78 mg/mL), e como controles, foram realizados também testes com DMSO a 5% e cloranfenicol (de 0,032 mg/mL a 0,001 mg/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e as placas permaneceram incubadas a 37°C por 24h. Para constatar quais concentrações dos EM inibiram o crescimento bacteriano, bem como, para validar os controles, o teste de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] foi realizado. Foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço da placa que permaneceu em incubação durante 4 horas a 37°C. O MTT, um sal de aspecto amarelo e hidrossolúvel, que ao ser reduzido por desidrogenases de células viáveis dá origem à formazana, um sal arroxeadado e insolúvel em água. Dessa forma, o ensaio de MTT foi empregado para determinar a viabilidade celular, haja vista que nos poços que apresentaram coloração arroxeadada fica evidente a presença de microrganismos viáveis, e assim a concentração dos EMs foi ineficaz para inibir o crescimento bacteriano (EMBRAPA, 2018; JOUX; LEBARON, 2000). Portanto, as CIMs dos EMs foram consideradas aquelas que inibiram o crescimento bacteriano em todas as triplicatas.

Após a determinação da CIM, 10 µL do caldo MH foram retirados dos poços em que não foi evidenciado o crescimento microbiano e inoculados, em triplicata, em placas de Petri com meio agar Muller-Hinton para determinação das CBMs. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, e as CBMs dos EMs foram consideradas as menores concentrações (mg/mL) que inibiram o crescimento bacteriano das cepas analisadas (Figura 6).

A CIM é a menor concentração com potencial bacteriostático, inibe o crescimento bacteriano, já a CBM é a menor concentração com capacidade bactericida, aquela que causa a morte das bactérias (FLEURY, 2021; REIS et al., 2020). Assim, por meio da validação dessas concentrações foi possível verificar quais concentrações dos EMs possuem capacidade bacteriostática (CIM) e bactericida (CBM).

Figura 6: Avaliação do potencial bacteriostático e bactericida dos EMs pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).



Fonte: Autoria própria

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos EMs foi avaliada através do teste de difusão em agar e os resultados estão apresentados na **Tabela 1**. Foram considerados EMs com atividade antimicrobiana aqueles que obtiveram halos de inibição com média superior ou igual a 7 mm. Seguindo esse parâmetro, todos os EMs demonstraram atividade antimicrobiana contra as espécies de bactérias Gram-positivas testadas, porém foram ineficazes contra as espécies Gram-negativas.

O teste de difusão em agar foi criado em 1966 pelos pesquisadores Kirby e Bauer, e é utilizado na investigação da sensibilidade de um microrganismo a determinados compostos. Em sua metodologia, culturas puras de microrganismos, previamente identificados e crescidos em meio sólido são submetidas a discos de papel filtro embebidos com os compostos de interesse. Estes, se dispersam pelo meio de cultura através dos discos de papel de forma radial e podem ou não formar halos de inibição que são avaliados em milímetros. Amplamente aplicado nos laboratórios de microbiologia, esse método qualitativo é de fácil execução e apresenta resultados confiáveis (KASVI, 2016; ANVISA, 2020; TAVARES, 2014). No presente trabalho, teste de difusão em agar foi utilizado na análise da atividade antimicrobiana dos EMs, entretanto, por ser um método apenas qualitativo, as bactérias sensíveis aos extratos também foram submetidas ao método de microdiluição (método quantitativo) para determinação das CIMs, e posteriormente, das CBMs (**Tabela 2**).

Tabela 1.Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos (EMs) preparados a partir de diferentes órgãos de *Croton antisiphiliticus* Mart. Os halos estão representados em mm (milímetros). Os valores expressam as médias das triplicatas e o desvio padrão é apresentado entre parênteses.

Composto	Concentração/ Quantidade	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. aureus</i> (MRSA SCCmec III)	<i>E. faecium</i> (JH255)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 551332)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Raiz	500 mg/mL	15,5 (± 1)	15,5 (±1)	13 (±1)	12,66 (±1)	NAA	NAA
Caule	500 mg/mL	14,66 (± 1)	13,66 (±1)	11,5 (±1)	14 (±1)	NAA	NAA
Folha	500 mg/mL	15,33 (± 1)	14,16 (±1)	11,5 (±1)	14,66 (±1)	NAA	NAA
Flor	500 mg/mL	12,33 (±1)	12,33 (±1)	10,83 (±1)	11,16 (±1)	NAA	NAA
AZL	15 µg	22,16 (0)	21 (±1)	NT	NT	NAA	NT
AMP	10 µg	NT	NT	25,83 (±1)	24	22,66 (± 1)	NT
ERI	15 µg	NT	26,66 (±1)	NT	NT	NT	NT
PEN G	10 UI	NT	NT	19 (±1)	17,66 (±3)	NT	NT
GEN	10 µg	NT	NT	NT	NT	NT	19,5 (± 1)
Metanol	100 %	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA
DMSO	100 %	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA

AMP: ampicilina; AZL: azitromicina; GEN: gentamicina; ERI: eritromicina; PEN G: penicilina G; NAA: Não apresentou atividade antimicrobiana; NT: Não testado

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos EMs preparados a partir de diferentes órgãos de *Croton antispyhiliticus* Mart. contra as espécies de bactérias Gram positivas.

Composto	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>S. aureus</i> (MRSA SCCmec III)		<i>E. faecium</i> (JH255)		<i>E. faecalis</i> (ATCC 551332)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
Raiz	6,25	25	12,5	25	12,5	25	12,5	25
Caule	25	50	25	100	6,25	100	6,25	100
Folha	25	100	25	100	6,25	100	6,25	100
Flor	50	>100	50	>100	50	>100	25	>100
Cloranfenicol	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,008	0,002	>0,032
DMSO	NAA*	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA	NAA

NAA: Não apresentou atividade antimicrobiana. Concentrações testadas dos EMs :100 à 0,78 mg/mL Concentrações testadas do cloranfenicol: 0,032 à 0,001 mg/mL

Os EMs demonstraram capacidade de inibir o crescimento das bactérias Gram positivas testadas. Dentre estes, o EM preparado com a raiz apresentou os melhores resultados para *S. aureus* e MRSA, com CIM de 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL, respectivamente. Entretanto, EMs preparados a partir do caule e da folha mostraram-se mais eficazes para *E. faecium* e *E. faecalis*, com CIM de 6,25 mg/mL para ambos. O EM feito com a flor apresentou maiores CIMs para todos estes microrganismos e, conseqüentemente foi considerado o menos eficaz em relação à capacidade bacteriostática.

Os EMs também apresentaram capacidade bactericida nas concentrações testadas, com exceção do EM preparado com flor que não foi capaz de causar a morte das espécies bacterianas analisadas em nenhuma concentração e, novamente foi o menos eficaz. Dentre os três extratos que apresentaram atividade bactericida (raiz, caule e folha), o EM preparado com raiz apresentou os melhores resultados, com CBM de 25 mg/mL para todas as espécies avaliadas.

A atividade antimicrobiana da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. frente a *E. faecium* e *E. faecalis* ainda não havia sido verificada, bem como, o potencial antibacteriano da flor dessa planta. De acordo com a literatura consultada na realização do presente trabalho, este foi o primeiro a realizar essas duas análises. Mesmo que o EM preparado a partir da flor tenha apresentado menor eficácia, também demonstrou capacidade de inibir o crescimento das espécies de bactérias Gram positivas analisadas. Além disso, a espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. demonstrou resultados promissores contra *E. faecium* e *E. faecalis* demonstrando capacidade bactericida e bacteriostática.

Na literatura ainda não há um consenso entre pesquisadores em relação a uma padronização de valores das CIMs para a avaliação dos extratos vegetais (MENDES et al., 2020). Entretanto, alguns consideram promissoras CIMs inferiores a 100 mg/mL, como Puton et al. (2018) e Batista (2008).

Carvalho (2013) testou extratos e diversas frações de *Croton antisiphiliticus* Mart., preparados com diferentes solventes (água/álcool, hexano e acetato de etila) contra as bactérias *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978); *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Destacando as duas últimas espécies analisadas, que também foram utilizadas no presente estudo, *S. aureus* apresentou as seguintes CIMs: 250 µg/mL para o extrato bruto hidroalcólico da planta inteira (CAEBT); 500 µg/mL para o extrato bruto hidroalcólico da folha (CAEBF) e 125 µg/mL

para o extrato bruto hidroalcólico do caule (CAEBC), sendo este, o mais eficaz contra *S. aureus*. Já para *E. coli*, as CIMs foram de 250 µg/mL para o CAEBT; 500 µg/mL para o CAEBF; 500 µg/mL para o CAEBC, sendo o extrato bruto hidroalcólico da planta inteira o mais eficaz para *E. coli*. As frações preparadas com hexano e acetato de etila a partir da planta inteira e dos órgãos (folha e caule) isolados, também demonstraram capacidade bacteriostática para estes microrganismos. Diferentemente dos resultados encontrados por Carvalho (2013), o presente estudo não apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, entretanto, conforme demonstrado, o pesquisador utilizou os respectivos solventes para preparar os extratos e frações de *Croton antisiphiliticus* Mart.: água/álcool, hexano e acetato de etila. Contudo, os extratos do presente estudo foram preparados com metanol, além disso, o local de coleta da planta também difere, o que pode justificar essa discrepância nos resultados encontrados.

Sales (2018) verificou a interferência da proporção droga/solvente e o tempo empregue na etapa de maceração na preparação dos extratos, na atividade antimicrobiana de *Croton antisiphiliticus* Mart. Dezoito extratos etanólicos das partes aéreas e subterrâneas desta espécie foram avaliados contra cepas bacterianas *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213). Utilizando o método de microdiluição as CIMs foram analisadas e os extratos preparados com as partes aéreas da planta obtiveram resultados de 4250 a 120 µg/mL contra *E. coli* e de 500 a 1 µg/mL para *S. aureus*. Ainda, os extratos das partes subterrâneas apresentaram a CIM variando de 990 a 50 µg/mL contra *E. coli* e de 360 a 20 µg/mL contra *S. aureus*. No estudo, foi constatado que quanto maior a concentração do extrato testado, pior é a atividade antimicrobiana, e que os extratos das partes subterrâneas apresentaram melhor potencial antibacteriano. Sales (2018) sugere que diferença encontrada em extratos com maiores concentrações em relação a atividade antimicrobiana, pode ser justificada pela disponibilidade de moléculas livres, uma vez que em menores concentrações os compostos bioativos presentes nos extratos estarão mais dispersos e poderão interagir com outras moléculas para efetuar sua ação antimicrobiana, e de forma oposta, em concentrações maiores esses compostos bioativos podem interagir entre si e diminuir sua capacidade antimicrobiana. Essa hipótese, pode ser uma das explicações para os EMs testados no presente estudo terem apresentado maiores CIMs.

Nader e colaboradores (2010) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos preparados com partes aéreas e subterrâneas de *Croton antisiphiliticus* utilizando três

solventes, metanol, clorofórmio (10%) e hexano, frente a *S. aureus* (ATCC 25923) e cepas de *S. aureus* causadoras de mastite, obtidas de bovinos leiteiros, isoladas do leite e dos tetos desses animais, da ordenha, garganta e fossas nasais dos ordenadores. Para validar a atividade antimicrobiana, o método de microdiluição foi utilizado. Os extratos, clorofórmico e hexânico apresentaram CIMs de 125 µg/mL e 500 µg/mL para os isolados bovinos e 125 µg/mL para *S. aureus* (ATCC 25923), já o extrato metanólico demonstrou CIMs superiores a 1 mg/mL para essas cepas bacterianas. Nader e colaboradores (2010) foram os primeiros a testar a atividade antimicrobiana de *Croton antisiphiliticus* Mart.

Pereira e colaboradores (2012) analisaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de raízes de *Croton antisiphiliticus* Mart. preparado com clorofórmio (CHCl₃) contra *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 6538), bem como, contra cepas bacterianas dessas mesmas espécies isoladas de casos clínicos com infecções no sistema urinário e respiratório, respectivamente. Como resultado, o extrato bruto apresentou CIM de 2 mg/mL para as duas cepas de *E. coli*, de 2,5 mg/mL para *S. aureus* (ATCC 6538) e, 2 mg/mL para a cepa isolada do caso de infecção respiratória. As frações também demonstraram potencial bacteriostático para todas as cepas bacterianas analisadas. Pereira et al. (2012) também isolaram um diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-óico das frações obtidas por meio da raiz de *Croton antisiphiliticus*, sua atividade antimicrobiana também foi avaliada frente as cepas bactérias anteriormente relatadas. O diterpeno demonstrou CIMs de 2 mg/mL para as duas cepas de *E. coli*, de 0,250 mg/mL para *S. aureus* (ATCC 6538) e 2 mg/mL para a cepa isolada do caso de infecção respiratória.

Nader e colaboradores (2014) analisaram a atividade antimicrobiana do diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-óico, cedido por Pereira et al. (2012), obtido da espécie *Croton antisiphiliticus* contra o biofilme de cepas de *S. aureus* causadoras de mastite em bovinos. No estudo, o composto foi avaliado quanto ao seu potencial bactericida e bacteriostático e, a gentamicina (30 mg/ml) foi o antibiótico utilizado como tratamento comparativo. Em relação a capacidade bacteriostática, o composto e o antibiótico gentamicina não apresentaram diferença significativa, entretanto, o diterpeno na concentração de 250 µg/mL eliminou 56% da biomassa bacteriana, enquanto o antibiótico utilizado conseguiu eliminar apenas 13%, demonstrando uma importante atividade antibiofilme do diterpeno em relação á gentamicina, uma vez que mesmo numa concentração 120 vezes menor, sua atividade antimicrobiana foi significativa.

É importante salientar também a aplicabilidade dos extratos juntamente com antibióticos já estabelecidos, com intuito de ampliar a atividade antimicrobiana, mesmo que estes tenham obtido CIMs superiores as desejadas (MENDES et al.,2020). Esse sinergismo de plantas medicinais com antimicrobianos foi pesquisado por Silva (2010). Em seu estudo foi verificado que extratos de determinadas plantas potencializaram a atividade antimicrobiana dos antibióticos, em suma essa potencialização foi demonstrada majoritariamente contra *S. aureus*.

Diferentes fatores podem justificar diferenças na atividade antimicrobiana entre o presente trabalho e de outros autores, como à variação climática do local onde a planta da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. foi coletada, o solvente utilizado na preparação do extrato, diferenças sazonais, o ciclo da planta, estação em que a espécime foi coletada, dentre outros (WEBSTER, 2008). Estes, estão diretamente relacionados à produção e armazenamento dos metabolitos secundários, que podem sofrer mudanças de acordo com a temperatura, a quantidade de água disponível, altitude, dentre outros fatores (LI et al., 2020). Como todos estes aspectos podem interferir na atividade antimicrobiana de extratos preparados a partir de uma mesma espécie vegetal, é necessário que os autores passem a relatá-los em suas pesquisas, dando ênfase nos fatores ambientais (altitude em que a planta estava submetida, temperatura, fase de crescimento, dentre outros) para que possamos verificar quais aspectos podem propiciar diferenças em relação ao potencial antibacteriano de uma espécie vegetal.

Através da análise dos resultados encontrados, bem como, de dados encontrados por outros pesquisadores, é possível afirmar que a atividade antimicrobiana de *Croton antisiphiliticus* Mart. é mais evidente em bactérias Gram-positivas, devido a simplicidade da parede bacteriana desses microrganismos em relação às Gram-negativas. Bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa constituída de uma pequena porcentagem de peptidoglicano, diferentemente das bactérias Gram-positivas (TAVARES, 2014). Entretanto, além de uma membrana interna, Gram-negativas possuem também uma membrana externa formada por lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas. Os lipopolissacarídeos contribuem significativamente na impermeabilidade dos agentes bacterianos. A passagem de antimicrobianos polares é restringida pelas porinas devido ao tamanho dos canais, além disso, essas bactérias possuem também a capacidade de diminuir a presença desses compostos através de bombas de efluxo (DENYER; MAILLARD, 2002).

A atividade antimicrobiana da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. contra a cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA SCCmec III), no nosso conhecimento, ainda não havia sido verificada, foi a primeira vez que esse espécime vegetal foi avaliado em uma cepa resistente de *S. aureus*. Um achado importante, tendo em vista que apesar de todas as cepas bacterianas analisadas no presente estudo serem de grande importância clínica, MRSA é ainda mais preocupante. Embora a incidência dessa cepa ter sido reduzida em algumas áreas nos últimos tempos, infelizmente ainda é preocupante devido a sua capacidade de causar alta morbidade, bem como, uma elevada taxa de mortalidade (TURNER et al., 2019). No passado, cepas de MRSA estavam restritas ao ambiente hospitalar, entretanto, essa associação está mudando, cada vez mais os múltiplos tipos de MRSA têm causado infecções em pessoas fora do ambiente hospitalar, bem como, em animais utilizados no ramo alimentício e nos de estimação (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Assim, a atividade antimicrobiana da espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. contra MRSA apresenta resultados esperançosos, e futuramente essa planta poderá ser usada para detecção e isolamento de compostos com ação antibacteriana e possível, utilização contra infecções causadas por cepas de bactérias resistentes.

A espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. possui potencial antimicrobiano. Em estudos futuros pretendesse avaliar a atividade antimicrobiana de extratos preparados a partir da planta inteira desta espécie para verificar possíveis sinergismos entre seus diferentes órgãos. Além disso, também serão avaliadas prováveis diferenças em seu potencial antibacteriano em relação à coletas de seus espécimes vegetais realizadas em diferentes épocas do ano e em distintos horários do dia.

Por seu grande potencial antibacteriano, esperasse que futuramente a espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. possa ser utilizada em estudos que investigam atividade sinérgica com outros agentes antimicrobianos já descritos e utilizados clinicamente, ou ainda na produção de um novo agente bacteriano.

5 CONCLUSÃO

EMs preparados a partir de diferentes órgãos de *Croton antisiphiliticus* Mart. apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas testadas: *S.*

aureus (ATCC 25923), MRSA, *E. faecium* (JH255) e *E. faecalis* (ATCC 551332). Em relação ao potencial bacteriostático o EM preparado com a raiz dessa espécie foi o mais eficaz contra *S. aureus* e MRSA, com CIM de 6,25mg/ml e 12,5 mg/mL, respectivamente, já os EMs obtidos a partir do caule e da folha apresentaram melhores resultados para *E. faecium* e *E. faecalis*, com CIM de 6,25mg/ml para ambos. Em relação ao potencial bactericida, o EM preparado a partir da raiz obteve os melhores resultados, com CBM de 25 mg/mL para *S. aureus*, MRSA, *E. faecium* e *E. faecalis*. Em contrapartida o EM preparado com a flor apresentou maiores CIMs e não demonstrou capacidade bactericida nas concentrações testadas.

A espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. possui potencial antibacteriano, esperasse que futuramente ela possa contribuir no desenvolvimento de antimicrobianos inclusive contra cepas de microrganismos resistentes. Entretanto, mais estudos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-Resistant Enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. **Microbial Drug Resistance**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 590-606, jun. 2018.

AMARAL, A. **Qual a importância do Cerrado para a biodiversidade global?** 2019. Disponível em: <http://cepfcerrado.iieb.org.br/qual-importancia-do-cerrado-para-biodiversidade-global/>. Acesso em: 06 out. 2021.

ANVISA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Módulo 10 - Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica. Brasília: ANVISA, 2020.

ANVISA. **Módulo 4:** gram-positivos. 2008a. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/imp_ent.htm. Acesso em: 12 set. 2021.

ANVISA. O uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana. 2008b. Disponível em: <
https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/res_outros.htm>. Acesso em: 20 set. 2021.

ARRAIS, L. et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 21, p.316-322, 2014.

ASCOM/ANVISA. **Superbactérias: de onde vêm, como vivem e se reproduzem.** 2018. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5097813&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=superbacterias-de-onde-vem-como-vivem-e-se-reproduz-1&inheritRedirect=true >. Acesso em: 08 out. 2021.

BATISTA, H. L. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas do estado do Tocantins.** 2008. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BAYAT, B. et al. High frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with SCCmec type III and spa type t030 in Karaj's teaching hospitals, Iran. **Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 331-341, 23 ago. 2017.

BERUBE, B.; WARDENBURG, J. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: nearly a century of intrigue. **Toxins**, Chicago, v. 5, n. 6, p. 1140-1166, 13 jun. 2013.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54-67, fev. 2020.

BRASIL, M. C. O. A. Atividade antimicrobiana do extrato metanólico total e frações de *Calliandra dysantha* Benth. 2017. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografia da espécie *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO)**. Brasília: Ministério da Saúde. 2014; 61 p.

BRASÍLIA AMBIENTAL. **Bioma Cerrado**. 2018. Disponível em: <https://www.ibram.df.gov.br/bioma-cerrado/>. Acesso em: 06 out. 2021.

BRIGULLA, M.; WACKERNAGE, W. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 86, p. 1027-1041, fev. 2010.

CARVALHO, F. K. de. **Análise fitoquímica e atividade biológica de *Croton antisiphiliticus* Mart.ius e *Croton heterodoxus* Baillon**. 2013. 225 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CAVAILLON, J. M. Exotoxins and endotoxins: inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon**, [S.L.], v. 149, n. 1, p. 45-53, jul. 2018.

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **Laboratory Detection of: Oxacillin/Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. 2019.

Disponível em: https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/lab_mrsa.html. Acesso em: 07 out. 2021.

CHAVES, D.A et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 524-530, jun. 2016.

CHIANG, Y. N.; PENADÉS, J. R.; CHEN, J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical. **Plos Pathogens**, Cingapura, v. 15, n. 8, [s.l.], 8 ago. 2019.

CLSI. **M100**: Padrões de desempenho para teste de suscetibilidade antimicrobiana. 30 ed. Pensilvânia, 2020. 332 p.

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

DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal Of Applied Microbiology**, Brighton, v. 92, n. 1, p. 35-45, maio 2002.

DIAS, J. E.; LAUREANO, L. C. (org.). **Farmacopéia popular do Cerrado**. Goiás: Articulação Pacari (Associação Pacari), 2009. 352 p.

DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, [S.L.], v. 166, n. 1, p. 30-33, 1 jan. 2020.

DUPORT, C.; ALPHA-BAZIN, B.; ARMENGAUD, J. Advanced Proteomics as a Powerful Tool for Studying Toxins of Human Bacterial Pathogens. **Toxins**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 576-594, 4 out. 2019.

EMBRAPA. **COMUNICADO TÉCNICO 427**: Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, 2018. 12 p.

FIOCRUZ. **O que são mutações, linhagens, cepas e variantes?** 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/o-que-sao-mutacoes-linhagens-cepas-e-variantes-1>. Acesso em: 07 out. 2021.

FIORE, E.; VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of Enterococci. **Microbiology Spectrum**, Boston, v. 7, n. 4, [s.l.] 16 ago. 2019. American Society for Microbiology.

FLEURY. **Concentração Inibitória Mínima**. 2021. Disponível em: <https://www.fleury.com.br/medico/exames/concentracao-inibitoria-minima-varios-materiais>. Acesso em: 27 set. 2021.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 269-284, 8 abr. 2015.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Resistência a antibióticos. **Jornal de Infecção e Saúde Pública**. Nova Iorque, p. 369-378. set. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034116301277?via%3Dihub#bib0260>. Acesso em: 19 mar. 2021.

GENSINI, G. F.; CONTI, A. A.; LIPPI, D. The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. **Journal Of Infection**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 221-224, mar. 2007.

GHUNEIM, L.A.J. et al. Nano-Sized and Filterable Bacteria and Archaea: biodiversity and function. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-2, 21 ago. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01971>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01971/full>. Acesso em: 10 out. 2021.

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

GOESSWEINER-MOHR, N. et al. Conjugation in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 2, n. 4, [s.l.], 15 ago. 2014

GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 67, n. 2, p. 277-301, jun. 2003.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. de. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 561-584, dez. 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, [S.L.], v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

HUTCHINGS, M. I; TRUMAN, A.W; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 51, p. 72-80, nov. 2019.
Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190?via%3Dihub#sec0010>. Acesso em: 15 set. 2021.

ILANGO VAN, A.; CONNERY, S.; WAKSMAN, G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 301-310, maio 2015.

ISAH, T. Stress and defense responses in plat secundar metabolites production. **Biological Research**, Nova Delhi, v.52, n.1, [s.l.], 29 jul. 2019. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31358053/>. Acesso em: 18 set. 2021.

JANG, J. et al. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 570-581, 3 jul. 2017.

JOHNSTON, C. et al. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 181-196, 10 fev. 2014.

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 2, n. 12, p. 1523-1535, out. 2000.

KASVI. **Agar Mueller Hinton**: você conhece seu uso e aplicação?. Você conhece seu uso e aplicação?. 2016. Disponível em: <https://kasvi.com.br/uso-aplicacao-agar-mueller-hinton/>. Acesso em: 24 set. 2021.

KONG, C.; NEOH, Hui-Min; NATHAN, S. Targeting Staphylococcus aureus Toxins: a potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 72, 15 mar. 2016. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/3/72>. Acesso em: 10 set. 2021.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 1-2, out. 2018.

LEVISON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Amgh, 2010. 676 p.

LIMA, T. C. D. de. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de Stryphnodendron adstringens utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 329-338, 2017

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 148, p. 80-89, mar. 2020.

LI, W.; LYNCH, M. Universally high transcript error rates in bacteria. **Elife**, [S.L.], v. 9, [s.l.], 29 maio 2020.

LOBRITZ, Michael A. et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 27, p. 8173-8180, 22 jun. 2015.

LOPES, A. C. C. et al. Fatores de risco para infecção por pseudomonas aeruginosa em relação à infecções hospitalares. **Brazilian Journal Of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 2121-2130, 2020.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 77-84, jan. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S087090251500067X>. Acesso em: 20 set. 2021.

MACEDO, A. R. S. de. **Efeitos dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* (Jucá) na inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e em conjugação de plasmídeos de resistência em *Escherichia coli***. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

MACHADO, O.V. O. et al. **Antimicrobianos**: revisão geral para graduandos e generalistas. Fortaleza: Unichristus, 2019. 455 p. Disponível em: https://unichristus.edu.br/uni_editoras/antimicrobianos-revisao-geral-para-graduandos-e-generalistas/. Acesso em: 20 set. 2021.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 268-281, mar. 2012.

MCADAM, A. J. Enterobacteriaceae ? Enterobacterales ? What Should We Call Enteric Gram-Negative Bacilli? A Micro-Comic Strip. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 58, n. 2, [s.l.], 28 jan. 2020.

MENDES, F. L. R. et al. Buscando novos antimicrobianos: avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *eugenia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 3, p. 228-234, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p. Disponível em: < http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2018/01/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf >. Acesso em: 08 set. 2021.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Cerrado**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado>. Acesso em: 06 out. 2021.

NADER, T.T. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Croton* frente *Staphylococcus aureus* causador de mastite bovina**. 2014. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014.

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

NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de diterpeno isolado de *Croton antisiphiliticus* frente *Staphylococcus aureus*. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, n. 1, p. 032-037, fev. 2014

NYGAARD, T. K. et al. Alpha-Toxin Induces Programmed Cell Death of Human T cells, B cells, and Monocytes during USA300 Infection. **Plos One**, Bozeman, v. 7, n. 5, [s.l.], 4 maio 2012.

ODONKOR, S.T.; AMPOFO, J. K. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. **Microbiology Research**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 2, 11 jun. 2013.

OLIVEIRA, I. S. et al. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana Baillon*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p.587-593, dez. 2008.

OLIVEIRA, R. B. F. Prospecção de genes de resistência bacteriana a antibióticos em cavernas da Bahia. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2015. Disponível em: < <http://nbcgib.uesc.br/genetica/admin/images/files/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20COMPLETA%20RHYAN%20CORRIGIDA.pdf> >. Acesso em: 10 set. 2021.

OLIVEIRA, T. G. de et al. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1712-1718, out. 2011.

OMS. *E. coli*. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Acesso em: 07 out. 2021.

OMS. **Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>. Acesso em: 20 set. 2021.

OPAS/OMS. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. 2017. Disponível em: <

<https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>>. Acesso em: 10 set. 2021.

OTTO, M. Staphylococcus aureus toxins. **Current Opinion In Microbiology**, Rockville, v. 17, p. 32-37, fev. 2014.

PEREIRA, S. et al. An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 8, p. 8851-8858, 25 jul. 2012. MDPI AG.

PUTON, B. M. S. et al. Concentração inibitória mínima e atividade antioxidante do extrato de *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae) extraído por diferentes solventes. **Perspectiva**, Erechim, v. 49, n. 159, p. 109-118, set. 2018.

RAZA, T. et al. Vancomycin resistant Enterococci: a brief review. **J Pak Med Assoc**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 768-772, mar. 2018.

REIS, J. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal Of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 342-363, jan. 2020

REITER, K. C. **Distribuição dos SCCmec tipos I, II, III e IV em Staphylococcus aureus meticilina-resistente isolados de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos**. 2018. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/6660/1/PPG_%2032022.pdf. Acesso em: 14 set. 2021.

SABER, Huda et al. A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Types in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Species. **Malaysian Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 7-18, 2017.

SALES, A. M. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de Croton antisiphiliticus Mart**. 2018. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/23959>. Acesso em: 10 set. 2021.

SANTOS, A. L. dos et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 43, n.

6, p. 413-423, dez. 2007. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/jbpml/a/gHvPXyhgbzWt69YKxGqPFHk/?lang=pt>. Acesso em:
 20 set. 2021.

SANTOS, M. A. dos; PAIVA, I. C. de; ANDRADE, E. G. da S. ENTEROCOCCUS RESISTENTE A VANCOMICINA (VRE): perfil geral. **Revista Jrg de Estudos Acadêmicos**, [S.L.], v. 4, n. 8, p. 127-139, mar. 2021.

SARAIVA, R. M. C. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

SILVA, D. J. et al. Antibióticos: fatores relacionados à resistência bacteriana. **Revista Saberes**, São Paulo, v. 7, n. 1, [s.l.], jul. 2018.

SILVA, M.O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472-482, 8 out. 2018.

SILVA, N.C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA, V. N. M. Atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima de extratos metanólicos totais de *Calliandra dysantha Benth.* (Fabacea). 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

SOUCY, S. M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J.P. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 472-482, 17 jul. 2015.

STOCZYNSKA, K. et al. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal Of Applied Genetics**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 273-285, 11 mar. 2014.

TAM, K.; TORRES, V. J. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiology Spectrum**, Nova Iorque, v. 7, n. 2, [s.l.], 12 abr. 2019.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. 746 p.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto & Contexto - Enfermagem*, v. 15, n. 1, p.115-121, 2006.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 203-218, 8 fev. 2019.

VALENT, Peter et al. Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine. **Journal Of Innate Immunity**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 111-120, 2016.

VERDE, G. M. V.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 13, p. 64-66, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p.326-337, abr. 2006.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 115, n. 1, p. 140-146, jan. 2008.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 5-18, jan. 2007.

XU, W.; LIU, W.; LIANG, Q. Chemical Constituents from Croton Species and Their Biological Activities. *Molecules*, v. 23, n. 9, p.2333, 12 set. 2018.