

Influência do processo extrativo na atividade antimicrobiana de *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae)

Influence of the extraction process on the antimicrobial activity of *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae)

<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2024.1168>

Sales, Amanda Malini Rocha¹

 <https://orcid.org/0000-0003-1376-5339>

Freire, Daniel Oliveira⁴

 <https://orcid.org/0000-0002-1577-7862>

Felipe, Matheus Eça de Oliveira²

 <https://orcid.org/0000-0002-5067-6389>

Silva, Izabel Cristina Rodrigues da³

 <https://orcid.org/0000-0002-6836-3583>

Gris, Eliana Fortes³

 <https://orcid.org/0000-0003-0083-4075>

Martins, Paula Melo^{3*}

 <https://orcid.org/0000-0001-5824-9018>

Fagg, Christopher William¹

 <https://orcid.org/0000-0001-6072-7832>

¹Universidade de Brasília (UNB), Instituto de Biologia, *Campus* Universitário Darcy Ribeiro, Bloco E s/n 1º andar, Asa Norte, CEP 70910-900, DF, Brasil.

²Hospital Regional Leste. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Setor de Rádio e TV Norte (SRTVN), 701 Norte, Via W5 Norte, lote D, CEP 70719-040, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

³Universidade de Brasília (UNB), *Campus* Ceilândia. Ceilândia Sul, Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, CEP 72220-275, Brasília, DF, Brasil.

⁴Centro Universitário Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC). SIGA Área Especial para Indústria Lote 2/3, Scc St. Leste Industrial, Gama, CEP 72445-020, Brasília, DF, Brasil.

*Correspondência: paulamart@gmail.com.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias) no processo extrativo da maceração de *Croton antisiphiliticus* Mart. sobre a atividade antimicrobiana e teor de compostos polifenólicos. Os extratos foram obtidos por maceração das partes aéreas, utilizando delineamento fatorial 3², considerando 3 proporções droga/solvente 1:10, 1:20 e 1:30; e os tempos de 7, 10 e 13 dias. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de sólidos totais, teor de polifenóis totais e ácido gálico. A atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi avaliada utilizando a técnica de microdiluição. Apenas a concentração inibitória mínima (MIC) mostrou ser influenciada pelos fatores escolhidos, de forma que, quanto maior a proporção droga/solvente e maior o tempo de extração, melhores são os valores de MIC. O experimento F3 (1:30 p/v e 13 dias) obteve os

melhores resultados em relação ao teor de polifenóis totais, ácido gálico e CIM, com valores iguais a 411,37 mg GAE/g, 75,97 mg GAE/g e 0,001 mg/mL, respectivamente.

Palavras-chave: Maceração. Extrato hidroalcolólico. Citotoxicidade. Delineamento fatorial.

Abstract

The present study aimed to evaluate the influence of the factors drug / solvent ratio (p/v) and time (days) in the maceration extraction process of *Croton antisiphiliticus* Mart. on antimicrobial activity and polyphenolic compound content. The extracts were obtained by maceration of the aerial parts, using a factorial design 32, considering 3 proportions 1:10, 1:20 and 1:30; and 7, 10 and 13 days. Extracts were characterized in total solids content, total polyphenols content and gallic acid. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was evaluated using the microdilution technique. Only the minimum inhibitory concentration (MIC) was shown to be influenced by the factors chosen, so that the higher the drug / solvent ratio and the longer the extraction time, the better the MIC values. The F3 experiment (1:30 p/v and 13 days) obtained the best results in relation to the content of total polyphenols, gallic acid and MIC, with values equal to 411.37 mg GAE / g, 75.97 mg GAE / g and 0.001 mg / mL, respectively.

Keywords: Maceration. Hydroalcoholic extract. Cytotoxicity. Factorial design.

Introdução

Croton antisiphiliticus Mart., da família Euphorbiaceae, é um subarbusto neotropical, medindo em torno de 30 a 40 centímetros. Essa espécie está distribuída em todas as regiões do Brasil, tendo como domínio fitogeográfico: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica^[1].

A folha de *C. antisiphiliticus* é comprida, coberta por pelos finos amarelados e suas bordas são serreadas com glândulas evidentes e pateliformes. A face adaxial da folha é áspera e a face abaxial apresenta nervuras salientes. A espécie apresenta xilopódio bem desenvolvido, fino e quebradiço, difícil de ser retirado da terra por possuir um sistema subterrâneo xilopodífero que adentra o solo^[1,2].

As principais substâncias encontradas na espécie são flavonoides O-glicosilados: rutina, isoquercitina, quercetina, C-glicosilado: vitexina, ácido quínico e o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico, que são considerados polifenóis^[3-5].

Na medicina popular, *C. antisiphiliticus* Mart. é utilizada como anti-inflamatório, depurativo do sangue, no tratamento de infecções, reumatismo e doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis^[6,7]. Em estudos sobre a atividade biológica de *C. antisiphiliticus* Mart., extratos clorofórmicos e hexânicos de partes subterrâneas apresentaram atividade bactericida *in vitro* para *Staphylococcus aureus*^[8].

Estudos sobre a espécie *Croton antisiphiliticus* Martius demonstraram seu potencial anti-inflamatório^[4], anticancerígeno^[9] e antimicrobiano^[3], além dos compostos fitoquímicos possui^[4,5]. Entretanto, não se encontra na literatura estudos detalhados sobre a atividade das partes aéreas, assim como a influência do

processo extrativo. Com isso, o presente estudo pretende caracterizar os extratos hidroalcolóico das partes aéreas de *Croton antisiphiliticus* Mart. e sua atividade antimicrobiana.

Fundamentação Teórica

Cerrado

O Cerrado é a maior região de savana tropical da América do Sul e o segundo maior bioma brasileiro, distribuindo-se pelos estados de Minas Gerais, Tocantins, Bahia, Maranhão, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e o Distrito Federal^[3].

O Cerrado contém nascentes que formam grandes rios brasileiros: o Rio Amazonas, o Rio São Francisco e o Rio Paraná. A esse fato, atribui-se a esse bioma elevado potencial aquífero, o que favorece a sua biodiversidade^[10].

Nos últimos anos, o Cerrado vem perdendo considerável espaço para a agropecuária e agricultura e que, junto às queimadas, potencializam a perda do bioma que serve de abrigo para inúmeros animais e plantas, sendo estas de grande potencial terapêutico, auxiliando o homem na cura de doenças.

Plantas medicinais do Cerrado

As plantas medicinais podem ser encontradas em todos os biomas brasileiro. No Cerrado, várias espécies são utilizadas por conta de suas propriedades terapêuticas, como, por exemplo: Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville); Chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.)); Ipê-Roxo (*Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.)) e Pé-de-perdiz (*Croton antisiphiliticus* Mart.).

Esses são alguns dos exemplos da flora do Cerrado que apresentam propriedades medicinais e são muito utilizados nas comunidades que habitam esse bioma^[11,12].

Croton antisiphiliticus Mart.

Croton antisiphiliticus Mart., da família Euphorbiaceae, popularmente conhecida como pé de perdiz ou curraleira, é um subarbusto neotropical, medindo em torno de 30 a 40 centímetros. Essa espécie está distribuída em todas as regiões do Brasil^[1].

A espécie é utilizada como anti-inflamatório, depurativo do sangue, tratamento de infecções, reumatismo e doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis. A decocção é diurética^[6,7].

Em estudos sobre a atividade da biológica de *Croton antisiphiliticus*, os extratos clorofórmicos e hexânicos apresentaram atividade bactericida *in vitro* para *Staphylococcus aureus*^[9] e a experimento clorofórmio da partes subterrâneas da planta apresentou ação antimicrobiana para cepa da *American Type Cell Culture* (ATCC) 6583, *S. aureus*^[5].

Os extratos de *C. antisiphiliticus* também foram avaliados quanto à ação sobre as células MCF-7 (linhagem de células de câncer de mama humano) e TK-10 (linhagem de células de câncer renal), mostrando efeito citostático e citotóxico, respectivamente^[3].

As principais substâncias encontradas na espécie são flavonoides O-glicosilados rutina, isoquercitina, quercetina, C-glicosilado vitexina, ácido quínico e o diterpeno ácido ent-kaur-16-en-18-oico^[3-5].

Resistência bacteriana e a busca por novas alternativas

A resistência bacteriana é um processo natural que ocorre quando um microrganismo que causa infecção sobrevive a um medicamento que o mataria ou cessaria seu crescimento^[13]. Esse fato é datado desde o início da era dos antibióticos, mas somente nos últimos vinte anos o surgimento de cepas resistentes como ocorreu com uma maior frequência^[14].

A cada ano, nos Estados Unidos, ao menos 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias que se tornam resistentes aos antibióticos e cerca de 20 mil morrem a cada ano como resultado dessas infecções^[15]. As bactérias resistentes mais comumente relatadas são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, seguidas por *Salmonella* spp.^[16].

O uso exacerbado de antimicrobianos leva ao aumento de bactérias resistentes e, infelizmente, não há novos medicamentos para tratá-las. Dessa forma, buscam-se alternativas ao tratamento medicamentoso, como o uso de plantas, que, por meio da produção de metabólitos secundários conseguem resistir ao ataque de microrganismos, incluindo bactérias, parasitas, fungos e vírus.

Estudos relataram o potencial antimicrobiana de algumas plantas, como *Psidium guajava* (atividade antimicrobiana contra *MRSA*)^[17] e *Allium sativum* (atividade antimicrobiana contra tuberculose multidroga resistente (*XDR-TB*))^[18].

Delineamento fatorial: ferramenta de avaliação multifatorial

O uso de ferramentas de avaliação multifatorial é aplicado à otimização de métodos analíticos por suas vantagens em reduzir o número de experimentos que precisam ser executados, resultando no menor consumo de reagente e menor trabalho laboratorial, além de otimizar o processo e minimizar erros experimentais. Esses métodos, como experimento composto central e Box-Behnken, possibilitam, também, o desenvolvimento de modelos matemáticos, a fim de avaliar os fatores em estudo e os efeitos de interação entre os fatores^[19,20].

Metodologia

Droga vegetal

A espécie de *Croton antisiphiliticus* Mart. foi coletada nas coordenadas 15°45'52.6"S e 47°51'22.7"W, pela manhã. A espécie teve exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília sob o *voucher* UB 24044. O projeto tem cadastro SisGen nº A7B10E5.

As partes aéreas após seleção foram secas em estufa de secagem Q316M (Quimis Ltda.) à temperatura de 40 ± 2 °C até massa constante. A droga vegetal foi moída em moinho de facas SL32 (Prismalab Ltda), perfazendo um total de 578,68g. Foram determinados o teor de água e cinzas totais^[21].

Preparo dos extratos

Os extratos foram produzidos por maceração utilizando etanol 70%, de acordo com planejamento 3^2 , sendo 2 fatores em 3 níveis, considerando 3 proporções droga/solvente (p/v) 1:10, 1:20 e 1:30; e os tempos de 7, 10 e 13 dias, num total de 9 experimentos. As variáveis dependentes analisadas foram teor de sólidos totais, teor de polifenóis totais, teor de ácido gálico e concentração inibitória mínima.

Teor de sólidos totais

O teor de sólidos totais dos extratos foi realizado seguindo a metodologia de determinação de resíduo seco em extratos fluidos e moles da Farmacopeia Brasileira 5ª. Edição^[21].

Teor de polifenóis total

Para a determinação de polifenóis totais foi utilizado reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)^[22]. A leitura das amostras foi feita em 750 nm em espectrofotômetro Modelo U-3900 Hitachi Ltda. A curva padrão foi realizada com solução de ácido gálico nas concentrações de 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400; e 500 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g da amostra seca (mg GAE/g).

Determinação de ácido gálico

Foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando equipamento LaChrom Elite L-2130 (Hitachi Ltda). Como fase móvel, utilizou-se solução aquosa de ácido acético 0,1% (Fase A) e acetonitrila (fase B). Foi realizado um gradiente linear de 20 minutos, partindo da proporção de 5:95 (A:B) até 80:20 (A:B). Utilizou-se para a análise uma coluna ACE 5 C-18, de 150 x 4,6 mm, com tamanho de partícula igual 5 μ m, temperatura da coluna de 40 °C e detecção à 352 nm. O fluxo e o volume de injeção foram iguais a 0,5 mL/min e 3 μ L, respectivamente^[23]. A curva de calibração foi realizada com solução de ácido gálico padrão em água ultrapura nas concentrações de 10; 50; 100; 250; 500; 750 e; 1000 μ g/mL. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g da amostra (mg GAE/g).

Validação do método

A validação do método analítico seguiu as instruções da bibliografia^[24,25]. A linearidade foi avaliada pela injeção de seis concentrações diferentes do padrão ácido gálico. A partir da equação da reta foi dado o coeficiente angular, significativamente diferente de zero ($b=115,721$) e o coeficiente de correção linear, maior que 0,99 ($R^2=0,991$). A aplicação do teste de Cochran revelou que o sistema é heterocedástico. Dez repetições da análise da solução padrão de ácido gálico a 65 μ g/mL, sob as mesmas condições e realizadas pelo mesmo operador, foram feitas para verificar a precisão, sendo o desvio padrão relativo (DPR) igual a 0,286%. O limite de quantificação (LOQ) e o limite de detecção (LOD) tiveram valores iguais a 0,0084 μ g/mL e 0,00254 μ g/mL, respectivamente. Todos os parâmetros avaliados estão de acordo com o estabelecido.

Preparo do inóculo

As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), escolhidas para a realização do ensaio, foram fornecidas pela Faculdade LS, Taguatinga, Brasil. As bactérias foram cultivadas em ágar sangue (Kasvi Co., São José dos Pinhais, Brasil) e mantidas em estufa bacteriológica a 36,5 °C

por 18 horas. As colônias isoladas foram suspendidas em solução salina 0,85% e ajustadas a turbidez de uma solução padrão de McFarland de 0,5. Em seguida foi realizada a diluição^[26].

Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica de diluição seriada em utilizando microplaca de 96 poços. Os extratos foram diluídos com DMSO 2,5% e caldo Müeller-Hinton (Kasvi Co., São José dos Pinhais, Brasil), sendo a concentração inicial de extrato igual a 64 µg/ml. Diluições seriadas foram realizadas utilizando o caldo Müeller-Hinton e o extrato diluído e, posteriormente, incorporou-se as bactérias, totalizando o volume final de 200 µl. Para controle negativo foi utilizado caldo puro; para controle positivo, as bactérias adicionadas ao caldo puro e; para controle do crescimento foi utilizado o extrato diluído adicionado ao caldo. As placas foram incubadas a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por 24h em estufa bacteriológica. As microplacas foram lidas, no comprimento de onda de 630 nm, em leitora de placa de Elisa (modelo Polaris, Celer Ltda., São Paulo, Brasil).

Análise estatística

A avaliação do processo extrativo foi realizada com auxílio do programa Minitab14[®]. Utilizando Statistica[®] 10 foram analisados a influência dos fatores escolhidos sobre as variáveis por ANOVA e os resultados de otimização, considerando o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). A metodologia do ajuste à curva de dose-resposta sigmoideal foi aplicada para cálculo do IC_{50} e foi realizada a análise da repetibilidade dos dados por meio do intervalo de correlação intraclasses a 95%, utilizando GraphPad Prism 7.0 As variáveis do estudo foram expressas em média \pm desvio padrão.

Resultados e Discussão

A análise da droga vegetal de partes aéreas de *C. antisiphiliticus* resultou em teor de cinzas de $12,10 \pm 0,63\%$ e teor de água de $7,76 \pm 0,12\%$. Em relação ao teor de sólidos totais, o experimento F2 (1:30 p/v e 10 dias) apresentou o maior valor de teor de sólidos com valor igual a $4,60 \pm 0,08\%$ (**TABELA 1**).

A quantificação de polifenóis totais nos extratos foi feita pela equação da reta $y = 0,9891x + 35,074$ ($R^2 = 0,9978$). O experimento F3 (experimento F3) obteve maior quantidade de polifenóis, com valor igual a 411,37 mg GAE/g (**TABELA 1**). Em estudos com as partes aéreas de *C. antisiphiliticus*, a quantidade de polifenóis totais encontrada foi de $91,03 \pm 0,82$ mg GAE/g^[3]. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelo uso de delineamento fatorial para a produção dos extratos, além da época e local de coleta de *C. antisiphiliticus* diferentes. O resultado também se mostrou superior comparados a outras espécies de *Croton*, como *C. floribundus* ($91,41 \pm 1,13$ mg GAE/g) e *C. urucurana* ($79,97 \pm 0,67$ mg GAE/g)^[27].

Na quantificação do ácido gálico dos extratos, feita pela equação da reta $y = 127,443x - 10,160$ ($R^2 = 0,990$), o experimento F5 obteve melhor resultado, com valor igual a 79,07 mg GAE/g.

TABELA 1: Quantificação de polifenóis e ácido gálico dos extratos de *C. antisiphiliticus* Mart.

Fração	Fatores		Variáveis dependentes		
	P (p/v)	T (dias)	ST (%)	PT (mg GAE/g)	GT (mg GAE/g)
F1	(-1) 1:30	(-1) 7	3,39 ± 0,15	162,30 ± 6,65	48,73 ± 6,12
F2	(-1) 1:30	(0) 10	4,60 ± 0,08	195,68 ± 9,26	57,71 ± 0,56
F3	(-1) 1:30	(+1) 13	1,73 ± 0,06	411,37 ± 8,23	75,97 ± 0,37
F4	(0) 1:20	(-1) 7	0,63 ± 0,02	88,49 ± 1,20	66,81 ± 0,89
F5	(0) 1:20	(0) 10	0,89 ± 0,03	161,29 ± 34,65	79,07 ± 0,30
F6	(0) 1:20	(+1) 13	0,86 ± 0,02	206,50 ± 39,95	68,25 ± 0,76
F7	(+1) 1:10	(-1) 7	0,57 ± 0,07	63,31 ± 11,31	32,69 ± 0,39
F8	(+1) 1:10	(0) 10	0,87 ± 0,01	85,95 ± 26,11	25,60 ± 0,23
F9	(+1) 1:10	(+1) 13	1,53 ± 0,06	155,24 ± 0,85	17,22 ± 0,32

Resultados expressos em média ± desvio padrão de três repetições. P= proporção droga/solvente; T= tempo; ST= sólidos totais; PT= polifenóis totais; GT= ácido gálico total.

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada em IC₅₀ e IC₉₉ (**TABELA 1**). Os valores de MIC foram classificados em excelente para valores abaixo de 10 µg/mL; bom de 10 a 100 µg/mL; moderado de 100 a 500 µg/mL; fraco de 500 a 1000 µg/mL e; acima de 1000 µg/mL os extratos são considerados inativos^[28].

Os extratos testados em *E. coli* apresentaram, no geral, valores considerados moderados e fracos. Os testes em *S. aureus* demonstraram resultados de MIC moderados, mas os experimentos F3 (1:30 p/v e 13 dias) e F5 (1:20 p/v e 10 dias), apresentaram MIC excelentes, com valores iguais a 1 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. Estes mesmos experimentos também obtiveram os maiores valores de polifenóis totais e ácido gálico^[29,30], o que sinaliza a relação direta entre eles e a atividade antimicrobiana dos extratos, notadamente com efeito sinérgico dos polifenóis (**TABELA 2**).

TABELA 2: Atividade antimicrobiana dos extratos de *C. antisiphiliticus* Mart.

Fração	Fatores		IC ₅₀		IC ₉₉	
	P (p/v)	T (dias)	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
F1	(-1) 1:30	(-1) 7	0,19 (0,09–0,40)	0,23 (0,10–0,53)	19,18	22,77
F2	(-1) 1:30	(0) 10	2,45 (2,6.10 ⁻⁹ –2,45)	ND	251,76	ND
F3	(-1) 1:30	(+1) 13	0,12 (0,03–0,35)	1.10 ⁻³ (1.10 ⁻³ –6,95)	11,58	0,13
F4	(0) 1:20	(-1) 7	0,29 (0,17–0,48)	0,33 (4.10 ⁻³ –6,21)	28,75	32,88
F5	(0) 1:20	(0) 10	0,71 (0,14–3,60)	4.10 ⁻³ (1.10 ⁻⁴ –0,13)	70,56	0,45
F6	(0) 1:20	(+1) 13	2,79 (1,68–6,36)	0,17 (0,06–0,47)	275,72	16,98
F7	(+1) 1:10	(-1) 7	0,83 (0,19–3,48)	0,50 (0,30–0,81)	81,86	49,58
F8	(+1) 1:10	(0) 10	4,25 (3,56–5,06)	0,29 (0,17–0,48)	420,75	28,78
F9	(+1) 1:10	(+1) 13	0,55 (0,27–1,21)	ND	54,91	ND

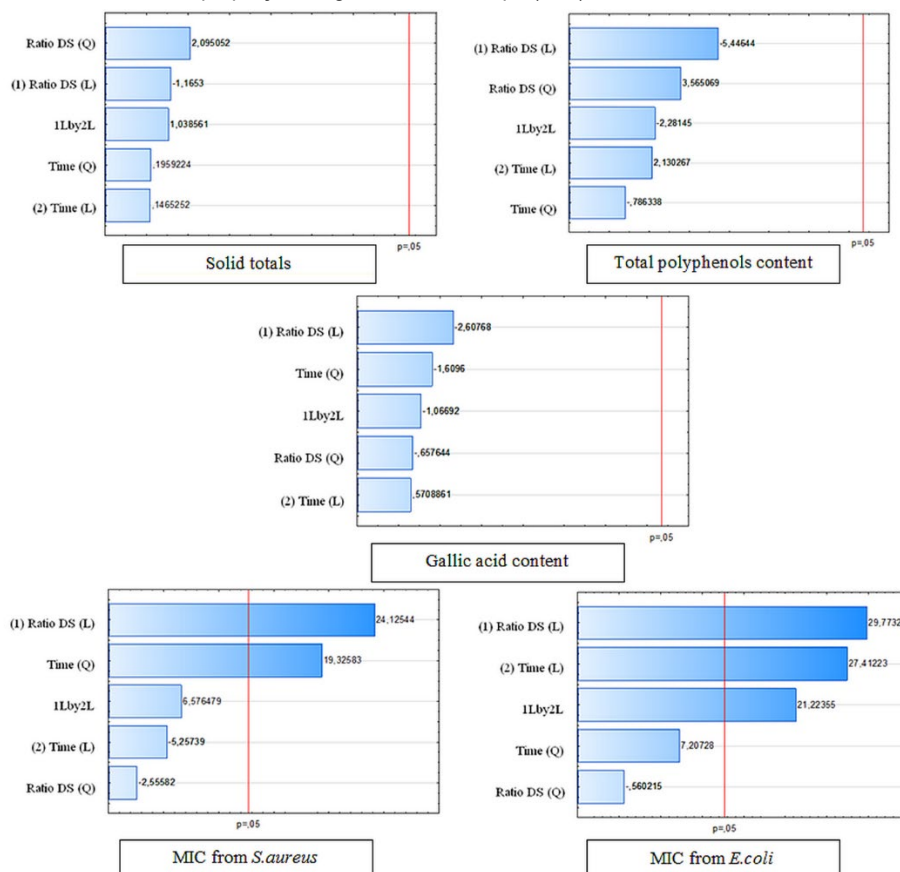
Resultados expressos em média ± desvio padrão de três repetições. P= proporção droga/solvente; T= tempo; ST= sólidos totais; IC₅₀= 50% concentração inibitória (MIC); IC₉₉= 99% concentração inibitória (MBC); ND= não determinado.

As variações nos valores de MIC dos extratos podem ser devido à técnica aplicada, linhagem dos microrganismos, a origem da planta e época da colheita, tipo de material vegetal utilizado e a quantidade de extrato testada, além do método extrativo e o solvente de extração^[31].

O fato dos extratos de partes aéreas, testados com *E. coli* não apresentarem valores de MIC tão bons comparados com os testados com *S. aureus*, pode ser explicado pela diferença estrutural das bactérias Gram-negativas, que apresentam uma parede celular composta de peptidoglicano, uma membrana externa contendo lipopolissacarídeo e um espaço periplasmático contendo enzimas capazes de destruir moléculas estranhas^[32,33].

Das variáveis estudadas, apenas a concentração inibitória mínima (MIC) mostrou ter sido influenciada pelos fatores proporção droga/solvente (p/v) e tempo (dias). Para os valores de MIC dos extratos de partes aéreas testados com *E. coli* e *S. aureus*, os fatores mostraram ter um efeito positivo separadamente, com um efeito ligeiramente maior para o fator de proporção droga/solvente, de modo que quanto menor a proporção (1:30 e 1:20 p/v) e maior tempo de extração (10 e 13 dias), melhores são os valores de MIC (**FIGURA 1**). Esses dados trazem uma reflexão importante a cerca da concentração das tinturas usualmente descritas^[34] para plantas medicinais, 3 vezes mais concentradas do que aquelas que apresentaram os melhores resultados de eficácia no experimento. Com relação ao tempo de extração, não existe na literatura e nem nos compêndios oficiais^[21] um consenso geral, seja em função do órgão vegetal seja em função das substâncias ativas de interesse para extração de modo que alguns autores desacreditam o procedimento de maceração por ser lento e não trazer o esgotamento da droga^[35]. Nesse caso, tempos com cerca de 10 dias, consideram-se razoáveis para produção de extratos de plantas com atividade pronunciada.

FIGURA 1: Efeito da proporção droga/solvente e tempo (dias) sobre as variáveis estudadas.



Quanto à função desejabilidade do estudo, foi observado que, para cada um das variáveis, a melhor condição dos extratos para obtenção de melhores resultados seria: PT= 1:12 g/g e 10 dias; GC= 1:30 g/g e 12 dias; MIC *E.coli* = 1:15 g/g e 10 dias.

Conclusão

Os extratos de partes aéreas de *C. antisyphiliticus* demonstraram atividade antibacteriana sobre as cepas testadas, tendo melhor resultado sobre *S. aureus*, bactéria comumente associada a infecções nosocomiais e comunitárias. Apesar dos fatores estudados não demonstrarem influência sobre todas as variáveis, efeitos positivos foram observados sobre a atividade antibacteriana, de forma que maior tempo de extração e menor proporção droga/solvente proporcionam melhores resultados. Dado o excelente perfil antimicrobiano demonstrado pelo extrato de *C. antisyphiliticus*, seu extrato hidroalcoólico indica ser um proeminente candidato a antimicrobiano, necessitando estudos mais aprofundados sobre segurança e eficácia.

Fontes de Financiamento

Não houve financiamento.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir nenhum conflito de interesse.

Colaboradores

Concepção do estudo: PMM; CWF; EFG.

Curadoria dos dados: AMMS; PMM.

Coleta de dados: AMMRS; MEOF.

Análise dos dados: PMM; DOF; ICRS; AMMRS; MEOF; EFG.

Redação do manuscrito original: AMMRS.; PMM; CWF; DOF; ICRS.

Redação da revisão e edição: AMMRS; PMM; CWF; EFG; DOF; ICRS.

Referências

1. Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR, Caruzo MBR, Berry P *et al*. **Croton in Lista de Espécies da Flora do Brasil** [online]. Flora do Brasil. 2015 [acesso em: 17 Feb. 2021]. Disponível em: [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17501>].
2. Dias JE, Laureano LC. **Farmacopeia Popular do Cerrado**. 1st ed. Goiás: Articulação Pacari; 2009. 352 p. ISBN: 978-85-62918-00-1
3. Carvalho FK. **Análise Fitoquímica e Atividade Biológica de *Croton antisyphiliticus* Mart. e *Croton heterodoxus* Baill.** Florianópolis; 2013. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Química] - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC. Florianópolis; 2013.

4. Reis GO, Vicente G, Carvalho FK, Heller M, Micke GA, Pizzolatti MG et al. *Croton antisiphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology** [online]. 2014 Apr 29; 22(2): 115–26. Disponível em: [<http://doi.org/10.1007/s10787-013-0184-6>].
5. Pereira S, Taleb-Contini S, Coppede J, Pereira P, Bertoni B, França S et al. An ent-kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* mart. **Molecules**. 2012; 17(8): 8851–8. Disponível em: [<https://doi.org/10.3390/molecules17088851>].
6. Americano T. **Fitoterapia Brasileira: uma abordagem energética**. 1st ed. Brasília: Cidade Gráfica Editora; 2015. 420 p. ISBN: 978-85-62258-08-4
7. Brandão MGL, Pignal M, Romaniuc S, Grael CFF, Fagg CW. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **J Ethnopharmacol** [online]. 2012 Sep; 143(2): 488–500. Disponível em: [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.052>].
8. Fernandes VC, Pereira SIV, Coppede J, Martins JS, Rizo WF, Belebani RO et al. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genet Mol Res** [online]. 2013; 12(2): 1005–11. Disponível em: [<https://doi.org/10.4238/2013.April.2.16>].
9. Nader TT, Coppede JS, Amaral LA, Facchin AL, Pereira AMS, Ferreira LM. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arq Inst Biol (Sao Paulo)** [online]. 2010 Sep; 77(3): 429–33. Disponível em: [<https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p4292010>].
10. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado** [online]. 2012 [acesso em: 2 fev. 2021]. Disponível em: [<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>].
11. Januário SR, Silvério-Lopes S. O poder terapêutico do Ipê Roxo e seu uso na terapia complementar ao tratamento de neoplasias. **Rev Bras Ter Saúde** [online]. 2014 Dec 30; 5(1): 9–14. Disponível em: [<https://doi.org/10.7436/rbts-2014.05.01.02>].
12. Castro Oliveira HW, Viveiro AA. Cerrado e plantas medicinais: algumas reflexões sobre o uso e a conservação. **Ens Saúde Amb** [online]. 2013 Oct 30; 5(3). Disponível em: [<https://doi.org/10.22409/resa2012.v5i3.a21016>].
13. AMR R on. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. [Online]. 2014. p. 84. Available from: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final_paper_with_cover.pdf].
14. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspect Medicin Chem** [online]. 2014 Jan 28;6: PMC. S14459. Disponível em: [<http://doi.org/10.4137/PMC.S14459>].
15. Prevention CFDA. **About Antimicrobial Resistance** [online]. 2017. Disponível em: [<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.ht%0Am%0A>].
16. Organization WHO. **High levels of antibiotic resistance found worldwide new data shows** [Online]. 2018. Disponível em: [<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>].
17. Anas K, Jayasree PR, Vijayakumar T, Manish Kumar PR. *In vitro* antibacterial activity of Psidium guajava Linn. leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian J Exp Biol** [online]. 2008 Jan; 46(1): 41–6. [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18697570/>].
18. Hannan A, Ikram Ullah M, Usman M, Hussain S, Absar M, Javed K. Anti-mycobacterial activity of garlic (*Allium sativum*) against multi-drug resistant and non-multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Pak J Pharm Sci** [online]. 2011 Jan;24(1):81–5. [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21190924/>].

19. Martins RM, Pereira SV, Siqueira S, Salomão WF, Freitas LAP. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Res Int** [online]. 2013 Mar; 50(2): 657–63. Disponível em: [<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.030>].
20. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC *et al*. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Anal Chim Acta** [Internet]. 2007 Aug; 597(2): 179–86. Disponível em: [<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>].
21. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Farmacopeia Brasileira** [online]. 6th ed. 2019 [acesso em: 17 fev. 2021] Disponível em: [<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985json-file-1>].
22. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am J Enol Vitic** [Online]. 1965 Jan 1; 16(3): 144 LP – 158. [<http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.abstract>].
23. Savietto JP, Furlan CM, Motta LB, Salatino MLF, Carvalho JE, Ruiz ALTG *et al*. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. **Rev Bras Farmacogn** [online]. 2013 Jul; 23(4): 662–7.
24. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). London: Tripartite Guideline; 2005. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf].
25. INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-8 [Online]. 2016 [acesso em: 17 fev. 2021] Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/C_GCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf].
26. CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute [online]. 2020 [acesso em: 17 fev. 2021] Available from: [https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf].
27. Silva A, Feitosa B, Lima V, Silva V. Antioxidant activity and total phenol, flavonoid and tannin contents of *Croton floribundus* and *Croton urucurana*. **Enciclopédia Biosf** [Internet]. 2019 Dec 15; 16(30): 11–22. Disponível em: [http://doi.org/10.18677/EnciBio_2019B2].
28. Machado KE, Cechinel Filho V, Tessarolo ML, Mallmann R, Meyre-Silva C, Bella Cruz A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharm Biol**. 2005; 43(7): 636–9. Disponível em: [<https://doi.org/10.1080/13880200500303817>].
29. Rasooly R, Choi HY, Do P, Morroni G, Brescini L, Cirioni O, *et al*. whISOBAX™ inhibits bacterial pathogenesis and enhances the effect of antibiotics. **Antibiotics**. 2020; 9(5). Disponível em: [<https://doi.org/10.3390/antibiotics9050264>].
30. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microb Drug Resist** [online]. 2013 Aug; 19(4): 256–65. Disponível em: [<https://doi.org/10.3390/10.1089/mdr.2012.0244>].
31. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**. 2008; 18(2): 301–7. Disponível em: [https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200_026].
32. Askari GA, Kahouadji A, Khedid K, Mousaddak M, Ouaffak L, Charof R *et al*. Evaluation of antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of leaves of *Vitis vinifera* Collected from different regions in Morocco. **Am Eurasian J Agric Environ Sci**. 2012; 12(1): 85-90. [[https://www.idosi.org/aejaes/jaes12\(1\)12/12.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes12(1)12/12.pdf)].

33. Duffy CF, Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **Int J Antimicrob Agents** [online]. 2001 Jun.; 17(6): 527–9. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00326-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00326-0).
34. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. ANVISA, 2011. 126p.
35. Sharapin, Nikolai. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santa Fé de Bogota. 2000. 248p. il.

Histórico do artigo | Submissão: 20/03/2021 | **Aceite:** 03/07/2024 | **Publicação:** 30/08/2024

Como citar este artigo: Sales AMR, Felipe MEO, Gris EF, Fagg CW *et al*. Influência do processo extrativo na atividade antimicrobiana de *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae). **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2024; 18(1): e1188. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2024.1188>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo com ercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

