



Eficiência do extrato hidroalcoólico de *Croton floribundus* Spreng. no controle de bactérias que causam mastite bovina

Croton floribundus Spreng. hydroalcoholic extract efficiency in controlling from bacteria that cause bovine mastitis

L. D. R. Cabral¹; L. B. D. Vecchi^{1*}; A. F. Almeida¹; L. S. Matsumoto¹; M. A. Silva¹; R. M. G. Silva²; E. C. T. Mello-Peixoto¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Norte do Paraná, 86360-000, Bandeirantes-PR, Brasil

²Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná, 86360-000, Bandeirantes-PR, Brasil

*laurabvecchi@gmail.com

(Recebido em 21 de julho de 2021; aceito em 08 de abril de 2022)

Resistência medicamentosa continua representando importante problema mundial. A busca por terapias naturais é frequentemente observada em decorrência da possibilidade de minimizar o uso de medicamentos sintéticos, além da menor ocorrência de efeitos adversos. Capixingui (*Croton floribundus*) é uma espécie arbórea, tropical, considerada como planta medicinal. Em sua composição destaca-se o ácido caurenóico, com ação antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Croton floribundus* a 10% (EHAC10%) sobre inócuos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. A atividade antimicrobiana foi avaliada por difusão em disco e concentração inibitória mínima. Complementarmente, foi determinada atividade antioxidante, além dos teores de fenóis e flavonoides totais. EHAC10% inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, e *Pseudomona aeruginosa*. Quanto à atividade antioxidante, teores de fenóis e flavonoides totais, foi possível verificar o padrão dose dependente com valores máximos apresentados na maior dosagem avaliada pelo presente estudo (1.000 µg mL⁻¹). A atividade antioxidante, foi registrada a partir de 250 µg mL⁻¹, apresentando valor máximo correspondente a 70,56%. Os maiores teores de fenóis e flavonoides totais corresponderam a 280 mg e 44,41 mg, respectivamente. Dessa forma, as atividades antibacteriana e antioxidante do EHAC 10% podem representar importante potencial terapêutico para o controle da mastite bovina, especialmente para sistemas orgânicos de produção.

Palavras-chave: Capixingui, plantas medicinais, produção animal orgânica.

The medication resistance remains an important world problem. The search for natural therapy is frequently noticed due to the possibility to minimize the use of synthetic chemical medication, as well as the lower occurrence of adverse effects. Capixingui (*Croton floribundus*) is a tropical tree species considered as a medicinal plant. In its composition, kaurenolic acid stands out, due to its antimicrobial, cytotoxic and anti-inflammatory action. Thus, the objective was to evaluate the antimicrobial activity of *Croton floribundus* hydroalcoholic extract at 10% (EHAC10%) on innocuous *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853. The antimicrobial activity was evaluated using disc diffusion and minimum inhibitory concentration. Complementarily, antioxidant activity was determined, as well as flavonoids and phenols total levels. The EHAC10% inhibited *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, and *Pseudomona aeruginosa* growth. Regarding antioxidant activity, phenols and flavonoid total contents, it was possible to verify the dose-dependent pattern, presenting maximum values at 1.000 µg mL⁻¹. The antioxidant activity was recorded from 250 µg mL⁻¹, with a maximum value corresponding to 70.56%. The highest levels of total phenols and flavonoids corresponded to 280 mg and 44.41 mg, respectively. Thus, the antibacterial and antioxidant activities of EHAC 10% may represent an important therapeutic potential for the control of bovine mastitis, especially for organic production systems.

Keywords: Capixingui, medicinal plants, organic animal production.

1. INTRODUÇÃO

Resistencia medicamentosa continua representando um importante problema mundial [1], tanto para medicina humana [1], como para medicina veterinária [2, 3]. Diversas categorias medicamentosas vêm apresentando esse problema, dentre essas destaca-se os anti-helmínticos [4, 5], acaricidas [6, 7] e antimicrobianos [8, 9]. A crescente resistência farmacológica aos diferentes antimicrobianos sintéticos, vem determinando importante impacto sobre a saúde pública principalmente pela dificuldade terapêutica em substituir com eficiência esses medicamentos.

A resistência bacteriana aos fármacos atuais é responsável por grande parte das infecções hospitalares [10]. Dessa forma, a busca por terapias naturais é frequentemente observada em decorrência da possibilidade de minimizar o uso de medicamentos químicos sintéticos, além da menor capacidade de resultar efeitos adversos indesejáveis. A Organização Mundial da Saúde tem valorizado a utilização de plantas medicinais, e o Brasil, da mesma forma, acompanha este incentivo, principalmente pelo estabelecimento das diretrizes para o uso de plantas medicinais, com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde desde 2006 [11].

As plantas medicinais têm despertado crescente interesse não só para a comunidade acadêmica [12], como também para a população em geral [13]. O uso de extratos vegetais isolados ou associados pode retardar o desenvolvimento de resistência medicamentosa frente a bactérias e fungos [14]. Conseqüentemente, incentivos governamentais foram implantados nos últimos anos a fim de contribuir para o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.

No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PLANAPLO, 2016-2019), é norteada pelos princípios de melhoria da atenção à saúde, sustentabilidade e desenvolvimento socioeconômico, além de contemplar o fortalecimento da agricultura familiar pela produção e comercialização de plantas medicinais de qualidade. Além disso, a adicional vantagem relativa às plantas medicinais refere-se ao fato de que por ser um produto natural, apresenta menor impacto sobre o meio ambiente e sua biodiversidade [15].

A *Croton floribundus* Spreng. pertence à família Euphorbiaceae, popularmente conhecido como capixingui ou tapichingui, é uma espécie arbórea pioneira, adaptada às margens de rios, característica de área de borda de floresta [16]. Considerada uma planta medicinal, sua importância se deve principalmente por suas propriedades citotóxicas, antimicrobianas, antioxidantes, anticolinesterásica [17], antisifilítica e antiulcerativa [18]. Em relação aos compostos bioativos da planta, destaca-se o ácido caurenóico (2% em cascas secas) pela sua ação antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória [19], o que justifica sua utilização no combate a diversas doenças, principalmente as infectocontagiosas [20].

Dentre as doenças infectocontagiosas de grande impacto na medicina veterinária, a mastite bovina se destaca pelo seu grande prejuízo econômico à atividade leiteira [21]. Doença multifatorial de difícil controle sanitário, pode se manifestar nas formas clínica e subclínica, levando a prejuízos como: queda na produção, descarte e óbito prematuro de animais, além da redução na quantidade e qualidade do leite [22]. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) corresponde ao principal agente etiológico, o qual produz enterotoxinas termoestáveis, que mesmo após a pasteurização do leite podem permanecer presentes, ocasionando distúrbios alimentares ao consumidor [23]. Adicionalmente, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [24] e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) [25] também são agentes relativamente frequentes de contaminação microbiana associada à mastite bovina. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolólico de *Croton floribundus* a 10% (EHAC10%) na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como sua atividade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *Croton floribundus* foram coletadas no município de Boituva, São Paulo e uma exsicata foi herborizada, identificada no Instituto Florestal de Assis/SP e registrada. A fim de

produzir extrato hidroalcolico de casca de *Croton floribundus* a 10% (EHAC10%), as cascas secas do caule foram trituradas, e adicionadas à solução constituída de 30% de água destilada e 70% de álcool etílico (etanol) absoluto 99,8% para análise (PA).

A extração dos princípios bioativos ocorreu por meio de agitação mecânica durante 30 segundos e subsequente acondicionamento em frasco estéril de vidro âmbar, protegido da luz, durante 24 horas. Após esse período procedeu-se a filtração a vácuo, sendo o produto da primeira filtração armazenado em frasco estéril de vidro âmbar, protegido da luz. O material vegetal foi novamente acrescido de solução hidroalcolica, nas mesmas proporções supracitadas, e esse procedimento ocorreu por três vezes acrescentando solução hidroalcolica a cada nova filtração, buscando aproveitar ao máximo a extração dos compostos bioativos da amostra vegetal utilizada.

Após extração, procedeu-se concentração utilizando evaporizador rotativo a 60°C e pressão 500 mmHg. Posteriormente foi realizada a liofilização a 50°C negativos, e pressão negativa de 150 mmHg.

Avaliação antimicrobiana do EHAC10%

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado a técnica de difusão em disco de acordo com Kirby & Bauer [26]. O EHAC10% liofilizado foi ressuscitado em água destilada estéril na concentração inicial de 50 mg mL⁻¹, e a partir desta diluição foram realizadas as seguintes diluições de 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, e 0,78 mg mL⁻¹.

Em câmara de fluxo laminar unidirecional, 40 µL de cada concentração do EHAC10% foi impregnada em discos de papel filtro (7mm), em quintuplicada. Subsequentemente, após a secagem, os discos foram fixados sobre placas de Ágar Mueller–Hinton, previamente semeadas com swab estéril pelos inócuos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, todas na concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹. Posteriormente, procedeu-se a incubação em estufa microbiológica a 37°C por 24 a 48h.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) o EHAC10% foi ressuscitado em meio caldo nutriente, nas mesmas concentrações descritas anteriormente. Da mesma forma, procedeu-se a inoculação utilizando as mesmas cepas bacterianas descritas, contendo aproximadamente 5 x 10⁵ UFC mL⁻¹. A concentração inibitória mínima é a mais baixa concentração de um produto responsável por limitar o crescimento de uma bactéria. Conforme indicado pela normativa do CLSI (2011) [27], a incubação ocorreu por 16-20h, em estufa microbiológica a 35°C; sendo possível o desenvolvimento microbiológico caracterizado pela turvação dos caldos.

Avaliação da atividade antioxidante do EHAC 10%

Para determinação da atividade antioxidante (AA%), teores de fenóis totais e flavonoides, o EHAC10% foi avaliado nas dosagens de 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 µg mL⁻¹, em triplicada.

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade doadora de H⁺ para o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acordo com Blois (1958) [28]. Este método baseia-se na redução do radical livre estável DPPH de coloração violeta à coloração amarelada. O teste é sensível para detectar baixas concentrações dos princípios ativos [29], e o resultado pode ser visualizado pelo grau de descoloração do reagente após os 30 minutos necessários para a reação atingir o estado de platô. Para tanto, foi utilizado 1mL de solução tampão acetato (pH 5,5 e 100 mM), 1,25 mL de etanol P.A., 250 µL de solução de DPPH (250 µM) e 50 µL das diferentes dosagens do EHAC10% a serem avaliadas. O DPPH apresenta máxima absorvância à 517 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H⁺, sendo que o extrato reage com o radical DPPH em ambiente de pouca luminosidade, em seguida é submetido ao espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis) a um comprimento de onda de 517 nm [30].

O cálculo da atividade antioxidante foi realizado de acordo com a fórmula:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = [(A \text{ controle} - A \text{ amostra}) / A \text{ controle}] \times 100$$

Em que:

A amostra: absorvância das amostras após 30 minutos

A controle: absorvância do DPPH

Avaliação dos compostos fitoquímicos do EHAC10%

Fenóis totais

Para determinação de fenóis totais, foi utilizada a técnica do reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de comparação.

A cada 0,5 mL de extrato, foi adicionado 5 mL de água destilada e 0,25 mL de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 minutos, foi adicionado 1 mL de solução de Na₂CO₃ saturada a 10%, e a mistura armazenada por 1 hora. A absorvância foi medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de extrato. O ácido gálico é precursor de diversos tipos de compostos fenólicos, possui estrutura simples, e por esse motivo é considerado substância de escolha como padrão.

Flavonoides totais

A dosagem dos flavonoides totais do extrato foi determinada por espectrofotômetro UV-Vis, segundo a metodologia de Zhishen et al. (1999) [31]. Esse teste é baseado na complexação dos flavonoides com AlCl₃, ocorrendo deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda.

Uma alíquota de 250 µL dos extratos para cada uma das dosagens supracitadas foi adicionada a 1,25 mL de água destilada, e 75 µL de solução de NaNO₂ a 5%. Após 6 minutos, 150 µL de solução de AlCl₃/H₂O a 10% foi adicionada, e após mais 5 minutos foi acrescentado 0,5 mL de solução de NaOH 1M. Para finalizar o volume total acrescentou-se 2,5 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vórtex, e a absorvância mensurada a 510 nm. Os resultados foram expressos em mg de rutina por g de extrato, considerando que a rutina, assim como a quercetina, apresenta estrutura básica de flavonoides, podendo ser empregada como indicador indireto de flavonoides.

Métodos estatísticos

Todos os dados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel®(2021). Posteriormente, calculou-se a média dos valores da atividade antioxidante do extrato hidroalcolico. A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico da casca do caule de *Croton floribundus* a 10% (EHAC10%) sobre *S. aureus* ATCC 25923, *S. saprophyticus* foi verificada pela inibição (-) ou crescimento (+).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da atividade antimicrobiana do EHAC10%

O teste de difusão em disco evidenciou inibição do crescimento bacteriano nas dosagens de 25 e 50 mg mL⁻¹ sobre as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, e *S. saprophyticus* ATCC 15305. Porém, não foi possível observar inibição sobre as cepas de *E. coli* ATCC 11229, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico da casca do caule de *Croton floribundus* a 10% (EHAC10%) sobre *Streptococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Bactérias	Dosagens do EHAC 10% (mg mL ⁻¹)						
	0,7813	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 11229	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (-) Inibição, (+) Crescimento

Avaliando o látex puro (100%) de *Croton urucurana* (*C. urucurana*), Soldera et al. (2010) [32] verificaram que esse também apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923 e nenhuma atividade diante da *E. coli* e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Da mesma forma, Silva Júnior et al. (2009) [33], ao estudarem *C. urucurana* (100 µg mL⁻¹), observaram inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, o que não ocorreu para *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

A ação antimicrobiana do EHAC10%, sobre *S. aureus* ATCC 25923 e *S. saprophyticus* ATCC 15305, pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos, pois esses apresentam atividade inibitória sobre bactérias Gram positivas [34]. Complementarmente, os flavonoides [35] formam complexos com a parede bacteriana e proteínas solúveis extracelular, rompendo as mesmas [36].

O teste de CIM do EHAC 10% identificou a eficácia frente a *S. aureus* ATCC 25923, *S. saprophyticus* ATCC 15305 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, uma vez que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Porém, observou-se que o EHAC10% inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 em dosagens diferentes das observadas no teste de difusão em disco, acontecendo o mesmo com *S. saprophyticus* ATCC 15305.

Com relação a *P. aeruginosa* ATCC 27853 no teste de difusão em disco, não foi observado halo de inibição em qualquer diluição avaliada pelo presente estudo. Entretanto, no teste de CIM a bactéria foi inibida (Tabela 2). Provavelmente o teste de difusão em disco pode ter influenciado esses resultados, por favorecer a volatilização dos princípios ativos do extrato e assim, dificultar sua difusão no ágar.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcolico da casca do caule de *Croton floribundus* a 10% (EHAC 10%), sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Bactérias	Extrato de <i>Croton floribundus</i> (mg mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,5625
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	12,5
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25

Legenda: (-) Não apresentou inibição de crescimento

Barth et al. (2018) [18], também verificaram eficácia do extrato bruto do caule de *Croton floribundus* contra *S. aureus*, registrando valor de CIM correspondente à 39,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essa dosagem é consideravelmente maior quando comparada ao presente estudo. Esse efeito pode ter sido decorrente da utilização de extração etanólica. Mentonça et al. (2016) [35], sugeriram que o álcool absoluto apresenta volatilização durante o processo de extração.

Avaliação antioxidante dos compostos fitoquímicos do EHAC10%

O EHAC 10% apresentou atividade antioxidante registrada a partir de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valores máximos de 70,56% (Tabela 3).

Tabela 3: Valores em porcentagem da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Croton floribundus* a 10% (EHAC10%).

Dosagens ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atividade Antioxidante (%)
25	0
50	0
75	0
100	0
250	4,43
500	29,03
1000	70,56

As propriedades antioxidantes do EHAC10% registradas pelo presente estudo, podem ser atribuídas à presença de fenóis totais, conforme observado por Takao et al. (2015) [36].

Avaliando o extrato alcoólico da casca do caule de *Croton floribundus*, Barth et al. (2018) [18] verificaram o valor de 62,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IC_{50} , ou seja, a concentração necessária para inibir pela metade os radicais livres presentes na solução, e ao avaliarem o extrato na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, verificaram até 90% de atividade antioxidante.

Adicionalmente, foi observada presença de fenóis e flavonoides no extrato avaliado. Em relação aos teores de fenóis totais, verificou-se que cada grama do extrato apresentou 280 mg de ácido gálico. Silva et al. (2019) [37] ao avaliarem o extrato etanólico das folhas de *Croton floribundus* observaram o valor de $91,41 \pm 1,13$ mg de ácido gálico por grama do extrato na dosagem de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em relação aos teores de flavonoides totais, verificou-se que cada grama do extrato avaliado apresentou 44,41 mg de rutina. Silva et al. (2019) [37] utilizaram quercetina como padrão e verificaram $54,32 \pm 2,99$ mg para cada grama de extrato (ainda na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Esses resultados diferentes para a mesma espécie podem ser justificados por inúmeros fatores ambientais, como sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, nutrientes do solo, disponibilidade de água, temperatura, entre outros [36].

4. CONCLUSÃO

Dessa forma, e a partir dos resultados encontrados, pôde-se concluir que o EHAC10% apresentou atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Pseudomona aeruginosa* e atividade antioxidante. Assim, potencial terapêutico particularmente importante para sanidade animal em sistemas agroecológicos e orgânicos de produção, cujo uso de antibióticos químicos sintéticos é fator limitante para a manutenção das certificações dos produtos de origem animal.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aos Ministérios MCTI, MDA, MAPA, MPA e MEC pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva N. AUTOMEDICAÇÃO: o descuidado de si entre dos profissionais do serviço móvel de urgência e emergência. Rev Eletr Fainor. 2015 Dez;8(2):125-40.
2. DeAmorim AR, Buchini JLC, Pissinati IM, Martins GCG, Gobetti STC, Marçal WS. O uso irracional de medicamentos veterinários: uma análise prospectiva. Rev Bras Hig Sanidade Anim. 2020 Jun;14(2):196-205. doi: 10.5935/1981-2965.20200017
3. Heinzen EL, Peixoto ECTM, Jardim JG, Garcia RC, Oliveira NTE, Orsi RO. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. Acta Vet Bras. 2012;6(1):40-4. doi: 10.21708/avb.2012.6.1.2300
4. Nascimento BLH, Temporim NM, Santos MMS, Conti AAH, Oliveira LT, Vilhena IFM. Alterações clínicas e laboratoriais como indicadores para o tratamento anti-helmíntico em ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus*. Ciênc Anim Bras. 2018;19:1-10. doi: 10.1590/1809-6891v19e-40928
5. Neuhaus LD, Peixoto ECTM, Marengoni NG, Herpich R, Araújo JS, Levistki IC, et al. Ocorrência de endoparasitas em bezerras leiteiras na região de Marechal Candido Rondon. Sci Agrar Parana. 2006;5(2):5-11.
6. Araque A, Ujueta S, Bonilla R, Gómez D, Rivera J. Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de Colombia. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2014;17(1):161-70. doi: 10.31910/rudca.v17.n1.2014.951
7. Mendes TM, Balbino JNF, Silva NCT, De Farias LA. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*: uma revisão sobre as perspectivas, distribuição e resistência. Pubvet. 2019 Jun;13(6):1-9. doi: 10.31533/pubvet.v13n6a347.1-9
8. Da Costa ALP, Silva Junior ACS. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. Estação Científica (UNIFAP). 2017 Mai;7(2):45-57. doi: 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57
9. Silva JFC, Ferreira OC, De Almeida LEM, Dos Santos MHB, Gomes AL, De Vasconcelos AB, et al. Resistência a doramectina e alternativas diagnósticas para o controle seletivo de helmintos gastrintestinais em ovinos. Pubvet. 2020 Set;14(9):1-8. doi: 10.31533/pubvet.v14n9a657.1-8
10. Santos NQ. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto Context - Enferm. 2004;13(n.esp):64-70. doi: 10.1590/s0104-07072004000500007
11. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União. 04 mai 2006;84(Seção1). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html
12. Vinagre NPL, Farias CG, De Araújo RJG, Vieira JMS, Silva Júnior JOC, Corrêa AM. Efetividade clínica de um enxaguatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. Rev Odontol da UNESP. 2011 Jan;40(1):30-5.
13. Ceolin S, Ceolin T, Casarin ST, Severo VO, Ribeiro MV, Lopes ACP. Plantas medicinais e sua aplicabilidade na atenção primária à saúde. Rev APS. 2017 Mar;20(1):81-8. doi: 10.34019/1809-8363.2017.v20.15812
14. Neto LAG, Gomes FT. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população do município de Oliveira Fortes - MG. Rev Perspect Online. 2018 Ago;8(27):1-17. doi: 10.2524/886882720181319
15. Lima LR, Cavalcante RRL, Martins MCC, Parente DM, Cavalcante AAMC. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A.C. Smith) (Imburana-de-cheiro). Rev Bras Plantas Med. 2013;15(3):415-22.
16. Rodrigues TA, Neto JL, Carvalho TAR, Barbosa ME, Guedes JC, Carvalho AV. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. Rev Ibero-Americana Ciências Ambient. 2020 Jan;11(1):412-28. doi: 10.6008/CBPC2179-6858.2020.001.0037
17. Válio IFM, Scarpa FM. Germination of seeds of tropical pioneer species under controlled and natural conditions. Rev Bras Botânica. 2001 Mar;24(1):79-84. doi: 10.1590/s0100-84042001000100009

18. Barth EF, Pintainho LS, Dileli P, Biavatti DC, Silva YL, Bortolucci W, et al. Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). *Brazilian J Biol.* 2018;78(4):601-8. doi: 10.1590/1519-6984.166522
19. Bratti C, Vieira MC, Zárata NAH, Oliveira APA, Marafiga BG, Fernandes SSL. Levantamento de plantas medicinais nativas da Fazenda Azulão em Dourados-MS. *Rev Bras Plantas Med.* 2014;15(SUPPL. 1):675-83. doi: 10.1590/S1516-05722013000500008
20. Da Rocha CAM, Rabelo NLF, Rodrigues AM, Da Rocha SM, Dos Reis HS. Prospecção científica e tecnológica do ácido caurenóico, um diterpeno bioativo. *Cad Prospecção.* 2020 Mar;13(1):256-67. doi: 10.9771/cp.v13i1.32202
21. Borges EC, Silva LC, Alencar SM, Aguiar CL. Caracterização química de extratos etanólicos de propolis com atividade inibitória do crescimento de estafilococos isolados de mastite bovina. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial.* 2014;08(01):1040-153. doi:10.3895/S1981-36862014000100001
22. De Jesus RA, Coutinho CA. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. *Pubvet.* 2018 Mar;12(3):1-10. doi: 10.22256/pubvet.v12n3a58.1-10
23. Lopes BC, Manzi MP, Langoni H. Etiologia das mastites: Pesquisa de micro-organismos da classe mollicutes. *Veterinária e Zootec.* 2018 Jun;25(1):173-9. doi: 10.35172/rvz.2018.v25.41
24. Selowa SC, Shai LJ, Masoko P, Mokgotho MP, Magano SR. Antibacterial activity of extracts of three *Croton* species collected in Mpumalanga region in South Africa. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2010;7(2):98-103. doi: 10.4314/ajtcam.v7i2.50861
25. Toro LME, Correa JCC. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. *Iatreia.* 2010 Sep;23(3):240-9.
26. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6. doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S21: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement. United States: CLSI; 2011.
28. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199-200. doi: 10.1038/1811199a0
29. Manian R, Nagarajan A, Perumal S, Manian S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chem.* 2008;107(3):1000-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.008
30. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
31. Zhishen J, Mengcheng T, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999;64:555-9.
32. Soldera CC, Zanella GN, Paula A, Frasson Z. Avaliação da atividade antibacteriana de *Croton urucurana*. *Context Saúde.* 2010 Dez;10(19):25-31. doi: 10.21527/2176-7114.2010.19.25-31
33. Silva Júnior IE, Cechinel Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev Bras Farmacogn.* 2009 Mar;19(1B):242-8. doi: 10.1590/S0102-695X2009000200011
34. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(2):174-81. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007
35. Mendonça AT, Carvalho AR, Ferreira MC, Resende Júnior MC. A utilização dos extratos hidroalcoólico e alcoólico de *Eugenia uniflora* L. como agente antibacteriano. *Unincor.* 2016 Jul;14(1):826-33. doi: 10.5892/ruvrd.v14i1.3019
36. Takao LK, Imatomi M, Gualtieri SCJ. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Brazilian J Biol.* 2015 Nov;75(4):948-52. doi: 10.1590/1519-6984.03314
37. Silva AFG, Feitosa BH, Lima VT, Silva VFB. Antioxidant activity and total phenol, flavonoid and tannin contents of *Croton floribundus* and *Croton urucurana*. *Enciclopédia Biosf.* 2019 Dez;16(30):11-22. doi: 10.18677/EnciBio_2019B2