



**FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE FERNANDÓPOLIS
FACULDADES INTEGRADAS DE FERNANDÓPOLIS**

**ANA RITA DA SILVA ISELLI
ARTHUR HENRIQUE LONGO
FERNANDA TALPO SANCHES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
LÁTEX DE *Croton urucurana* Baill EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO
ANO**

**FERNANDÓPOLIS
2016**

**ANA RITA DA SILVA ISELLI
ARTHUR HENRIQUE LONGO
FERNANDA TALPO SANCHES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO LÁTEX DE
Croton urucurana Baill EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Banca Examinadora do Curso de Graduação em Farmácia da Fundação Educacional de Fernandópolis como exigência parcial para obtenção do título de bacharel em farmácia.

Orientador: Prof. Me. Giovanni Carlos de Oliveira
Co-orientador: Prof. Me. Jeferson Leandro de Paiva

**ANA RITA DA SILVA ISELLI
ARTHUR HENRIQUE LONGO
FERNANDA TALPO SANCHES**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO LÁTEX DE
Croton urucurana Baill EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO**

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em farmácia.

Aprovado em: ___ de dezembro de 2016.

Banca examinadora	Assinatura	Conceito
Prof. Me. Giovanni Carlos de Oliveira		
Prof. Me. Jeferson Leandro de Paiva		
Profa. Ma. Alessandra Moreira de Lima		

Prof. Me. Giovanni Carlos de Oliveira
Presidente da Banca Examinadora

Dedicamos este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele, nada seria possível, e nossos sonhos não seriam concretizados.

Aos nossos familiares, que sempre nos deram apoio, e estiveram presentes acreditando em nosso potencial, nos incentivando na busca de novas realizações e descobertas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Senhor Ademar Martins Sanches pelos seus esforços e contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao nosso orientador, Giovanni Carlos de Oliveira pela organização e acompanhamento de toda a parte teórica e estrutural do estudo.

Ao nosso co-orientador, Jeferson Leandro de Paiva pelo auxílio em toda a parte prática, bem como na elaboração dos resultados.

A professora Alessandra Moreira de Lima por nos orientar na identificação da planta e também nas dúvidas que surgiram ao decorrer do nosso trabalho.

Não podemos deixar de agradecer às Faculdades Integradas de Fernandópolis pela oportunidade concedida de utilizar toda sua infraestrutura na realização deste trabalho.

A personalidade criadora deve pensar e julgar por si mesma, porque o progresso moral da sociedade depende exclusivamente da sua independência.

Albert Einstein

RESUMO

Pertencente à família Euphorbiaceae, a espécie *Croton urucurana* Baill é conhecida popularmente como Sangra d'água, denominação atribuída devido ao látex, o "sangue de dragão", de cor vermelha liberado quando ocasionados cortes no caule da árvore. A pesquisa teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana do látex de *Croton urucurana* Baill nas cepas bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e nas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira na estação do outono e a segunda no inverno, utilizando para o estudo os métodos de ensaios de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento de superfície e plaqueamento em profundidade. Os ensaios foram executados em triplicata. No ensaio de superfície, o látex do outono apresentou maior efetividade contra *Staphylococcus aureus*, enquanto o do inverno, demonstrou contra *Enterococcus faecalis*. No ensaio de profundidade, o látex do outono apresentou melhor efetividade por inibir todas as bactérias testadas, no entanto o látex do inverno obteve maior eficácia contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Serão necessárias novas pesquisas para a confirmação da diferença encontrada entre os métodos utilizados.

Palavras-chave: *Croton*. Látex. Cepas bacterianas. Atividade antimicrobiana. Sangue de dragão.

ABSTRACT

Belonging to the Euphorbiaceae family, the *Croton urucurana* Baill is popularly known as Bleeds water, a name attributed due to the red latex, the "dragon's blood", released when cutting the stem of the tree. The aim of this research was to analyze the antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baill latex in Gram positive strains: *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, and Gram negative: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. Two collections were made, the first one being in the fall season and the second one in the winter, using for the study the disc diffusion assay methods by plating in surface scattering and plating in depth. The assays were performed in triplicate. In the surface assay, latex of autumn showed greater effectiveness against *Staphylococcus aureus*, while that of winter demonstrated against *Enterococcus faecalis*. In the depth trial, latex of the autumn showed better effectiveness by inhibiting all the bacteria tested, however the winter latex obtained greater efficacy against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Further research will be required to confirm the difference found between the methods used.

Keywords: Croton. Latex. Bacterial strains. Antimicrobial activity. Dragon blood.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento de superfície (amostra do outono).	29
Tabela 2 -	Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade (amostra do outono).	31
Tabela 3 -	Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento de superfície (amostra do inverno).	33
Tabela 4 -	Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade (amostra do inverno).	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Croton urucurana</i> Baill	17
Figura 2 -	Flores da <i>Croton urucurana</i> Baill	18
Figura 3 -	Corte em diagonal para extração da seiva	25
Figura 4 -	Coleta do látex da <i>Croton urucurana</i> Baill	25
Figura 5 -	<i>Escherichia coli</i> – plaqueamento em espalhamento de superfície	36
Figura 6 -	<i>Escherichia coli</i> – plaqueamento em profundidade	36
Figura 7 -	Teste de droga padrão - plaqueamento em espalhamento de superfície <i>Escherichia coli</i>	37
Figura 8 -	Teste de droga padrão - plaqueamento em profundidade <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASP** - Aspásia
- ATCC** - *American type culture collection.*
- CLSI** - *Clinical and laboratory standards institute.*
- NCCLS** - *National committee for clinical laboratory standards.*
- UFC** - Unidade formadora de colônia.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 DESENVOLVIMENTO TEÓRICO	14
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	24
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	26
3.3 MICRO-ORGANISMOS PARA O BIOENSAIO	26
3.4 METODOLOGIA DOS ENSAIOS ANTIBACTERIANOS	26
3.4.1 Ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento em superfície	26
3.4.2 Ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade ...	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas para o tratamento de doenças (DUBREUIL, 2013). Com o tempo, passou-se a usá-las na busca de novos compostos para a produção de medicamentos, até o momento em que surgiram as drogas sintéticas, fato que diminuiu drasticamente a busca por compostos bioativos na flora (SILVA JUNIOR et al., 2009). Porém, ainda assim, as plantas acumulam grande diversidade de compostos ainda não explorados que podem contribuir à terapêutica (DUBREUIL, 2013).

A *Croton urucurana* Baill é uma espécie de planta pertencente à família Euphorbiaceae, sendo conhecida popularmente pelo nome de “Sangra d’água”. Tem sido utilizada tradicionalmente para o tratamento de infecções, inflamações, câncer, diarreia e feridas (OLIVEIRA et al., 2008).

Segundo Sorreano et al. (2008), a Sangra d’água é uma árvore pioneira de porte pequeno a médio, apresentando crescimento rápido e ciclo de vida curto, encontrada em abundância em várias formações florestais brasileiras. Através do corte de sua casca pode-se obter o látex ou sangue de dragão.

O sangue de dragão é uma resina de coloração vermelho escura famosa pelos seus efeitos medicinais, que foi muito utilizada na antiguidade por diversas culturas. Esse termo é empregado devido à coloração do látex (GUPTA; BLEAKLEY e GUPTA, 2008).

O presente projeto tem como estudo pesquisar sobre a utilização e as propriedades antimicrobianas do látex, ou sangue de dragão, oriundo do gênero *Croton*, mais especificamente da espécie *Croton urucurana* Baill.

Várias pesquisas foram realizadas com o intuito de averiguar o potencial antimicrobiano dessa resina. Em seu trabalho, Silva Junior et al. (2009) testaram várias plantas medicinais e seus compostos no combate a micro-organismos e confirmaram que a seiva da Sangra d’água *in natura* foi a mais ativa, com espectro de ação abrangendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de

apresentar atividade antifúngica. Além disso, comparando o uso do látex ao dos extratos das entrecascas e folhas, encontrou-se maior atividade antimicrobiana nos látex seco e *in natura*, sendo possivelmente relacionada à presença de compostos polares nestes (OLIVEIRA et al., 2008). Segundo Silva e Fernandes Junior (2010), o látex de *Croton urucurana* inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas, excetuando-se *Escherichia coli*, tendo potente atividade no combate a *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

Em decorrência da crescente resistência microbiana aos antibióticos disponíveis no mercado, é imprescindível a pesquisa de novos compostos e, sendo o Brasil portador de ampla flora, deve-se incentivar esse tipo de busca, fundada nos estudos etnofarmacológicos (OLIVEIRA et al., 2008).

1 DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

O sangue de dragão é uma resina de coloração vermelho escura, que foi muito utilizada na antiguidade por diversas culturas, devido aos seus efeitos medicinais e ornamentais (GUPTA; BLEAKLEY e GUPTA, 2008). O termo, “sangue de dragão”, é utilizado para as resinas que são retiradas, através de cortes na casca do caule de quatro gêneros diferentes de plantas: Croton (Euphorbiaceae), Dracaena (Dracaenaceae), Daemonorops (Palmaceae) e Pterocarpus (Fabaceae) (YI et al., 2014).

Utilizado em diferentes culturas do mundo, o sangue de dragão é uma droga tradicionalmente renomada que possui diversos usos terapêuticos: antidiarreico, antiulcerativo, antimicrobiano, cicatrizante de feridas e antitumoral (GURGEL et al., 2001). Existem relatos históricos do uso dessa resina: na redução da febre, na cicatrização de úlceras internas de boca, garganta, estômago, intestino, no tratamento de infecções virais que afetam o estômago e trato respiratório e para o relaxamento muscular (GUPTA; BLEAKLEY e GUPTA, 2008). Além dessas aplicações medicinais, foi muito usado como: corante em lãs, pintura e decoração de porcelanas e casas, além de pigmento para batons (PEARSON, 2002). Foi aplicado em magia popular e na prática de vudu com o intuito de trazer dinheiro ou amor, na forma de incenso para afastar entidades e energias negativas de ambientes, além de, na bruxaria, aumentar a potência dos feitiços. Apesar de sua ampla utilização, poucas pesquisas têm sido feitas para conhecer a fundo sua fonte verdadeira, controle de qualidade e aplicações clínicas (GUPTA; BLEAKLEY e GUPTA, 2008).

A família Euphorbiaceae é composta por aproximadamente 334 gêneros, que contém 8.000 espécies. Nas Américas ocorrem cerca de 2.500 espécies distribuídas em 92 gêneros. As espécies de Euphorbiaceae têm ampla notoriedade no movimento econômico, através da alimentação humana e na medicina perante conhecimento popular (TRINDADE e LAMEIRA, 2014).

As plantas da família Euphorbiaceae podem ser exibidas como espécies arbóreas, arbustivas, subarbustos e ervas com folhas alternas simples ou compostas

estipuladas. Destacam-se ainda por serem capazes de fornecer uma seiva, o látex, sendo visível ao causar injúrias mecânicas à planta (MONTEIRO, 2015).

No Brasil, a família Euphorbiaceae está representada em 63 gêneros e 918 espécies partilhadas nos diferentes tipos de vegetações. *Croton* é o gênero mais estudado de Euphorbiaceae. Atualmente pesquisas sobre o gênero são de suma importância para o entendimento das taxonomias do mesmo. No entanto, esses estudos não são suficientes frente à diversidade do gênero no país, em particular para a região centro-oeste, onde ainda não existem estudos em *Croton* (SODRE; SILVA; SALES, 2014).

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero e mais multímido da família Euphorbiaceae e complementa a subfamília Crotonoideae, que representa cerca de 2.400 espécies associadas em 67 gêneros e 12 tribos (LIMA e PIRANI, 2008). Possui grande variedade de plantas com flores, tendo em média 1.300 espécies de ervas, arbustos e árvores, efetuando importante relevância ecológica em vegetação secundária em áreas tropicais e subtropicais por todo o planeta (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; LIMA; PIRANI, 2008). Encontra-se preponderantemente nas Américas, ainda que algumas espécies demandem a África, Ásia e Oceania. Embora o gênero *Croton* tenha ampla distribuição geográfica, sua vasta diversidade localiza-se em maior concentração na América do Sul, Antilhas e México (MONTEIRO, 2015).

No Brasil, existem aproximadamente 350 espécies divididas em 29 seções, com diversas classes vegetacionais, estando em maior presença na região leste do país, particularmente em áreas de vegetação aberta, extensivamente ordenado nos mais variados ambientes, sobressaindo-se no cerrado, na caatinga e nos campos rupestres (CESÁRIO et al., 2015). Vale salientar que as diversas espécies de *Croton* desenvolvem-se, prevalentemente, em áreas perturbadas como: beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas (LOPES et al., 2012).

Por obter ações químicas demasiadamente prósperas, torna-os propícios para amplos estudos em relação às suas substâncias naturais com atividades farmacologicamente ativas, despertando interesse em perquirir estudos fitoquímicos e suas atividades biológicas (ARRAIS et al., 2014).

Das diversas espécies do gênero *Croton* tem se a possibilidade de utilizar distintas partes da planta para o processo na melhora terapêutica em amplas situações, que vão desde o tratamento de feridas à aceleração de cicatrização (SIMIONATTO et al., 2007). Vale também destacar suas outras ações medicinais como: combate aos processos de inflamações, neoplasias, constipação intestinal, diarreia dentre outros distúrbios digestivos, hipertensão, diabetes, malária, úlceras e adiposidade (BARRETO et al., 2013).

Embora se tenha o conhecimento de um amplo número de elementos isolados e dos funcionamentos das ações biológicas pesquisadas, o número de espécies de *Croton* estudadas até este momento é escasso, tanto em relação à parte química quanto ecológica, assim para um melhor aproveitamento desta espécie, é essencial uma aprimorada erudição da capacidade operacional e usual dessas plantas (LOPES et al., 2012).

A espécie *Croton urucurana* Baill ilustrada pela figura 1 pertence à família Euphorbiaceae, conhecida popularmente como: sangue de dragão, urucurana, sangra d'água, urucuana, lucurana, licurana, sangue-da-água, capixingui, tapexingui e tapixingui. Estas denominações são atribuídas devido ao fato de que, quando ocasionado cortes no caule da árvore é liberado um látex de cor vermelha, abundantemente peculiar em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. No Brasil, são encontradas nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, indo além de nossas fronteiras, também podem ser localizadas no Uruguai e na Argentina. Desenvolvem-se em solos calcários, úmidos e encharcados em uma vasta diversidade de temperaturas, por esta razão ocorrem em diversificadas vegetações (DI SAPIO e GATTUSO, 2013; PEIXOTO et al., 2006).

Figura 1: *Croton urucurana* Baill.



Fonte: Elaboração própria.

Possui porte pequeno, em geral, em torno de 5 metros de altura, podendo alcançar, em alguns casos, 10 metros. *Croton urucurana* exhibe as mesmas características encontradas para a maioria das Euphorbiaceae, de folhas simples e alterna. Porém, apresenta pecíolo muito longo, margens inteiras e folhas no formato cordado ou triangular-ovalado, com ápice acuminado e base cordada. As folhas são também palminérveas, estipuladas, discolores, com a face abaxial esbranquiçada. Possui tricomas estrelados na face adaxial da folha, formando pontuações esbranquiçadas, além de tricomas esbranquiçados também nas nervuras, nos pecíolos e ramos. Devido aos tricomas, suas folhas possuem a superfície da face adaxial áspera, assemelhando-se a uma lixa quando tocada. As folhas velhas se apresentam na coloração alaranjada. Possui duas glândulas na junção do pecíolo com a base da face adaxial do limbo (SILVA et al., 2012).

Na figura 2 retrata as flores da *Croton urucurana* Baill estando em disposição de botões e inflorescências denso-pubescentes, são pequenas branco-esverdeadas dispostas em cachos terminais, florescem nos meses de dezembro a junho e perduram por aproximadamente três dias, sendo conceituadas como melíferas e sua frutificação simultânea (FERREIRA; AZEVEDO e PASIN, 2009).

Figura 2: Flores da *Croton urucurana* Baill.



Fonte: Elaboração própria.

As flores femininas são compostas por três pistilos, a masculina está localizada na parte da inflorescência distal, dispondo de uma corola de cinco pétalas e numerosos estames (DI SAPIO e GATTUSO, 2013).

Sua madeira é relativamente pesada ($0,83 \text{ g/cm}^3$), rígida, compacta, de média resistência ao ser desprotegida. A mesma pode ser usada na produção de canoas, obras hidráulicas e externas, tal como dormentes e esteios, para carroceria, carpintaria e marcenaria (LORENZI, 2002).

Segundo Timich e Santos (2015), porções semipurificadas do extrato da casca de *Croton urucurana* avolumou consideravelmente a letalidade da *Anagasta kuehniella* Zeller, propondo o uso deste em potencial, voltado à atividade de inseticida natural. Além disso, o látex presente no tronco vem sendo utilizado em diversificadas debilidades em relação à saúde, na medicina popular.

De acordo com estudos na literatura em biologia, outra função da casca da *Croton urucurana* é sua capacidade em fornecer o extrato metanólico propiciando uma ação antimicrobiana; em relação ao extrato aquoso é presumivelmente um

antídoto promitente em relação aos efeitos gerados pelo veneno da *Bothrops jararaca*; no que se refere ao látex puderam ser constatados: ações antifúngicas, efeito antidiarreico e em algesia visceral (PIZZOLATTI et al., 2013).

Ainda que, da família Euphorbiaceae o gênero *Croton* vem sendo o mais pesquisado no Brasil e contribuindo para o enriquecimento na classificação dos estudos levantados sobre a espécie, não são suficientes perante a diversidade do gênero no país, pois ainda existem regiões como o Centro-Oeste que não foram realizados estudos em *Croton* (SODRE; SILVA e SALES, 2014).

Com o aparecimento dos antibióticos, o uso das plantas medicinais e/ ou derivados de plantas para este fim decresceu grandemente até que, na década de 90 voltou-se a utilizar os extratos de plantas, como também outros tratamentos alternativos. Os motivos pelos quais esse “renascimento” ocorreu foram: a diminuição da descoberta de novas drogas antimicrobianas, o aumento da resistência das bactérias a esses fármacos e a necessidade de tratamentos para novos agentes etiológicos emergentes. Devido a isso, cientistas tentam descobrir, nas plantas, novos compostos, metabólitos secundários, com ação antimicrobiana para aperfeiçoar a ação dos antibióticos (SILVA JUNIOR et al., 2009).

Vários estudos foram realizados com o intuito de averiguar o potencial antimicrobiano da *Croton urucurana*. Silva e Fernandes Junior (2010) utilizaram as folhas, o látex e o floema da Sangra d'água e obtiveram achados importantes com relação à sua propriedade antimicrobiana. As bactérias utilizadas para o ensaio foram *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*. O látex inibiu o crescimento de quase todas essas bactérias, apenas contra a *Escherichia coli* não teve eficiência, entretanto foi considerado potente no combate à *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

Oliveira et al. (2008), em suas pesquisas, notaram que no látex seco de *Croton urucurana* havia a presença de alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos, taninos condensados e esteroides, que são metabólitos secundários com efeitos antimicrobianos.

Outro estudo que merece destaque é a de Silva Junior et al. (2009), na qual testaram diversas plantas medicinais com relação às suas atividades antibacterianas e antifúngicas. As plantas utilizadas no artigo foram: *Bowdichia virgilioides*, *Calophyllum brasiliense*, *Lafoensia pacari*, *Simaba ferruginea*, *Cariniana rubra*, *Stryphnodendron obovatum* e *Croton urucurana*. Desta última foi usado o látex in natura para as pesquisas, sendo considerado o produto com maior atividade antimicrobiana dentre os avaliados, tendo efetividade tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas. Foram testadas as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri* e *Serratia marcescens*. Desses micro-organismos, apenas os cinco últimos não apresentaram sensibilidade ao sangue de dragão. A seiva vermelha teve o melhor espectro de ação também contra fungos, confirmando que o sangue de dragão tem atividade contra dermatófitos.

Oliveira et al. (2008) realizaram uma triagem *in vitro* utilizando o látex e extratos de diferentes polaridades. Os achados foram que os compostos polares presentes no látex, provavelmente, são os responsáveis pela atividade antimicrobiana do sangue de dragão. O látex seco e o látex *in natura* não tiveram diferentes espectros de ação, no entanto apresentaram maior atividade do que os outros farmacógenos testados (extratos de folhas e entrecasca).

Considerando o inconveniente da persistência das bactérias frente aos diversificados antimicrobianos existentes, manifestou-se a relevância do entendimento em variedades de plantas que apresentem características antimicrobianas e, com isto, pesquisas que apresentam elementos provenientes de origem vegetal vêm crescendo. Essa busca ocorre em virtude da ampla diversidade de substâncias químicas presentes nas plantas, os metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides, terpenoides e compostos fenólicos. Diversos destes dispõem de eficiente ação antimicrobiana, anteriormente certificada em estudos (ARRAIS et al., 2014).

Na família Euphorbiaceae especificamente no gênero *Croton*, evidenciou-se diversificadas finalidades significativas na medicina habitual, sendo caracterizada

por notória existência de diterpenos como: labdano, ciclitoles, triterpenos, esteroides, substâncias fenólicas e flavonoides. Estes metabólitos são evidenciados por obterem uma grande cadeia em procedimentos biológicos, no qual, seguramente proporcionam a perquisição em inovações de substâncias bioativas, sendo capazes de mostrar alguma particularidade medicinal procurando prováveis finalidades farmacológicas subsequentes. (BARRERA; GOMEZ e CASTIBLANCO, 2016).

Os flavonoides são produzidos por plantas como resposta a uma infecção microbiana. Torna-se previsível que esses elementos evidenciem ação antimicrobiana *in vitro* para a proteção contra uma ameaça relacionada aos microrganismos. Tal ação ocorre eventualmente devido à capacidade dos flavonoides produzirem complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede bacteriana. Flavonoides com maior ação lipofílica conseguem similarmente lisar as membranas microbianas (LÓPEZ, 2010).

De acordo com Loguercio et al. (2005), existem algumas suposições a respeito das ações antimicrobianas exercidas pelos taninos. A primeira conjectura-se na inibição das enzimas bacterianas e/ou pela complexação com as distintas moléculas presentes nessas enzimas; já a segunda, parte do pressuposto de que os taninos ajam na membrana celular dos micro-organismos, e com isso alteram seu metabolismo; por fim, a última hipótese refere-se à complexação dos taninos com os íons metálicos, reduzindo a disponibilidade destes elementos que são indispensáveis para o processo de metabolização dos micro-organismos.

Segundo Di Sapio e Gattuso (2013) a maior parte das pesquisas fitoquímicas efetuadas na *Croton Urucurana* Baill, foram ocorridas a partir de seu látex, vale salientar que também foram feitos estudos em outras partes da espécie como seu caule e casca. A prevalência dos elementos separados do “sangue de dragão” são: catequina, galocatequina, epigalocatequina (monómeros de flavan-3-ol) e proantocianidinas divergentes fases de polimerização; em porção inferior estão inseridos os elementos como o alcalóide taspina, um lignano chamado dimetilcedrusina, também disponibiliza diversos diterpenos como ácido hardwickiico, bicantriol, crolequinol, ácido crolequínico, korberina A e korberina B.

O gênero *Croton* evidencia vasta propensão financeira, sobretudo no setor farmacêutico, visto que, dispõem-se singularmente abundante em metabólitos secundário tais como: alcaloides, terpenoides e cocarcinógenos. Pesquisa realizada atualmente sobre este gênero reuniu dados a respeito de seu emprego terapêutico, químico e farmacológico, resultando de modo irrefutável sua ampla capacidade medicinal, todavia se faz relevante ampliar essas descobertas, em virtude da grandiosidade das espécies que se fazem presentes (LIMA e PIRANI, 2008; MONTEIRO, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A pesquisa teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana do látex de *Croton urucurana* Baill nas cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter aerogenes*. Efetuar critérios para testes de controle de qualidade e interpretação dos halos de inibição para estudo comprobatório de possível ou não resistência bacteriana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Averiguar a atividade antimicrobiana do látex nas cepas previamente selecionadas.

b) Realizar uma avaliação frente às diluições que resultarão na inibição do crescimento ou não dos micro-organismos.

c) Analisar comparativamente as metodologias utilizadas: ensaio de difusão em disco por plaqueamento em superfície e em profundidade.

d) Analisar comparativamente o potencial antimicrobiano do látex frente às estações do ano (outono e inverno).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

No decorrer do trabalho foram realizadas duas coletas do látex da espécie *Croton urucurana* Baill, que ocorreram no município de Aspásia no estado de São Paulo, Brasil - ASP, 180 - Estrada Geniópolis. A árvore encontra-se em mata ciliada à margem do Córrego do Cascavel, tendo como ponto de origem o Córrego da Estiva, localizado no município de Santa Albertina no estado de São Paulo.

A primeira coleta foi executada no dia 01 de junho de 2016 (outono - ausência de floração), estando o tempo parcialmente nublado com temperatura de 23°C e com umidade a 87%; sendo a segunda colheita realizada no dia 26 de agosto de 2016 (inverno – período de floração), estando o tempo limpo com temperatura de 21°C com umidade a 59%.

Para a obtenção do látex foram efetuados diversos cortes em diagonal de modo superficial no tronco da árvore como ilustrado pela figura 3, a sangria processou-se com materiais próprios (faca e lanças) devidamente esterilizados. Demonstrado pela figura 4, o látex foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, recipiente apropriado para garantir que não ocorressem interferências do meio durante o armazenamento e transporte do produto ao Laboratório Escola de Análises Clínicas das Faculdades Integradas de Fernandópolis mantida pela Fundação Educacional de Fernandópolis.

Figura 3: Corte em diagonal para extração da seiva



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4: Coleta do látex da *Croton urucurana* Baill



Fonte: Elaboração própria.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

O material botânico látex "*in natura*" foi armazenado em geladeira, entre 2 e 8°C, com controle de temperatura e umidade.

3.3 MICRO-ORGANISMOS PARA O BIOENSAIO

As cepas bacterianas empregadas no bioensaio foram: Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* NEWP0022, *Enterobacter aerogenes* NEWP0048 e as Gram positivas: *Staphylococcus aureus* CCD5007 e *Enterococcus faecalis* NEWP0012, provenientes da Coleção de Micro-organismos Norte Americana (*American Type Culture Collection* - ATCC) da marca Laborclin, Newprov e Cefar.

3.4 METODOLOGIA DOS ENSAIOS ANTIBACTERIANOS

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os métodos recomendados pela NCCLS (2003) para testes de sensibilidade por disco-difusão e critérios para testes de controle de qualidade e interpretação dos halos de inibição (CLSI, 2011).

3.4.1 Ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento em superfície

As placas de Petri foram preparadas com ágar Muller-Hinton (Oxoid®) e inoculadas pelo método de espalhamento em superfície com a respectiva suspensão bacteriana (bactéria ATCC), preparada em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com concentração ajustada em 0,5 da escala de MacFarland (1×10^6 UFC/mL). Após inocular o microrganismo aguardou-se cinco minutos para o ágar secar e deu-se continuidade à metodologia de Bauer e Kirby.

A partir do látex puro foi realizada a diluição seriada (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,0312 - 0,0156 - 0,0078 - 0,0039 - 0,0020) sendo utilizados (20µL) para

impregnar os discos de papel filtro estéreis com diâmetro de 6mm (Cecon[®]), depositados sobre a superfície das placas e estas acondicionadas em geladeira por 15 minutos e em seguida incubadas à 37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação procedeu-se a mensuração das zonas de inibição de crescimento bacteriano, considerando-se ativos os halos de inibição \geq a 10 mm, conforme estabelecido por Oliveira et al. (2008). Utilizamos como droga padrão: Norfloxacin (Cecon[®], 10 μ g/disco), Penicilina G (Cecon[®], 10 μ g/disco), Amoxicilina (Cecon[®], 10 μ g/disco), Vancomicina (Cecon[®], 30 μ g/disco). O experimento foi realizado em triplicata.

3.4.2 Ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade

Preparou-se uma suspensão com as respectivas bactérias (ATCC), em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com concentração ajustada em 0,5 da escala de MacFarland (1x10⁶ UFC/mL). Adicionou-se 1 mL da suspensão bacteriana no fundo da placa de Petri estéril e em seguida verteu-se 15 mL de ágar Muller-Hinton (Oxoid[®]) fundido e resfriado a 45°C de acordo com Silva; Junqueira; Silveira (2001). A placa inoculada ainda dentro da Câmara de Fluxo Lamina foi homogeneizada com movimentos suaves na forma de oito misturando o inóculo. Após inocular o microrganismo aguardou-se cinco minutos para o ágar secar e deu-se continuidade à metodologia de Bauer e Kirby.

A partir do látex puro foi feita a diluição seriada (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,0312 - 0,0156 - 0,0078 - 0,0039 - 0,0020) sendo utilizados (20 μ L) para impregnar os discos de papel filtro estéreis com diâmetro de 6mm (Cecon[®]), depositados sobre a superfície das placas e estas acondicionadas em geladeira por 15 minutos e em seguida incubadas à 37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a mensuração das zonas de inibição de crescimento bacteriano, considerando-se ativos os halos de inibição \geq a 10 mm, conforme estabelecido por Oliveira et al. (2008). Utilizamos como droga padrão: Norfloxacin (Cecon[®], 10 μ g/disco), Penicilina G (Cecon[®], 10 μ g/disco), Amoxicilina (Cecon[®], 10 μ g/disco), Vancomicina (Cecon[®], 30 μ g/disco). O experimento foi realizado em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Iniciou-se o experimento no dia 01 de junho que compreende a estação de outono, sendo coletado o material botânico (látex) de *Croton urucurana*. Soldara, Zanella e Frasson (2010) descrevem que durante pesquisa semelhante houve formação de halo de inibição apenas para bactérias Gram positivas, sendo as preparações e o látex puro, inativos contra as bactérias Gram negativas testadas.

Nos resultados do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento de superfície da tabela 1, o espectro de ação antimicrobiano demonstrado pelo látex frente às bactérias Gram positivas tem maior atividade contra os *Staphylococcus aureus*, apresentando faixa de concentração de 1,0 a 0,0156 mg/disco com mensuração dos halos variando de 20 a 10 mm de diâmetro; o *Enterococcus faecalis* expressou sensibilidade nas mesmas concentrações 1,0 a 0,0156 mg/discos e mensuração dos halos de 12,5 a 7,0 mm, que ao compararmos com os parâmetros estabelecidos de ≥ 10 mm para efetividade, viabiliza a eficácia do látex até a concentração de 0,25 mg/disco.

Tabela 1- Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento em superfície (amostra do outono).

Diâmetro dos halos de inibição (mm)						
<i>Croton urucurana</i>	Dose (mg/disco)	Bactérias				
		S.a	E.c	E.f	E.a	P.a
T1	1,0	20	--	12,5	--	--
T2	0,5	15	--	11	--	--
T3	0,25	11,7	--	10	--	--
T4	0,125	11,5	--	8,5	--	--
T5	0,0625	10	--	8	--	--
T6	0,0312	10	--	7,7	--	--
T7	0,0156	10	--	7	--	--
T8	0,0078	--	--	--	--	--
T9	0,0039	--	--	--	--	--
T10	0,0020	--	--	--	--	--
	Amoxicilina*	35	19	27	8	7
	Norfloxacino*	28	28	16	30	27
	Penicilina G**	40	6	22	5	10
	Vancomicina**	18	0	20	9	9

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: S.a = *Staphylococcus aureus*; E.c = *Escherichia coli*; E.f = *Enterococcus faecalis*; E.a = *Enterobacter aerogenes*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; T = diluição; -- = ausência de halo de inibição; * = Droga padrão para bactérias Gram positivas; ** = Droga padrão para bactérias Gram negativas.

Os resultados apresentados condizem com as pesquisas de Oliveira et al. (2008) e Soldera, Zanella e Frasson (2010), comprovam que o solvente polar (água) é melhor devido à maioria dos fitoconstituintes que apresentam maior atividade antimicrobiana, presentes no látex, serem polares.

Na tabela 2, os resultados do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade mostram um maior espectro de atividade antibacteriana contra: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. O espectro de ação antimicrobiano do látex apresenta maior atividade também contra o *Staphylococcus aureus*, com faixa de concentração de 1,0 a 0,0625 mg/disco com mensuração dos halos de 20 a 9,3 mm, apresentando efetividade até a concentração de 0,125 mg/disco, portanto menos eficaz que o método em superfície que demonstrou eficácia até 0,0156 mg/disco. Com relação ao *Enterococcus faecalis*, a faixa de concentração foi ativa em 1,0 a 0,125 mg/disco com halo de inibição de 15,3 a 10 mm, neste caso o método por profundidade é melhor por apresentar eficácia em concentração até 0,125 mg/disco. Nos micro-organismos Gram negativos o espectro de maior atividade antimicrobiana é referente à *Enterobacter aerogenes* com faixa de concentração de 1,0 a 0,0312 mg/disco e halo de inibição de 16,7 a 6,7 mm; a *Escherichia coli*, por sua vez, teve faixa de concentração de 1,0 a 0,5 mg/disco e halo de inibição de 15 a 12,7 mm e a *Pseudomonas aeruginosa* de 1,0 a 0,5 mg/disco e mensuração de halo de 13,3 a 9,7 mm.

Tabela 2 - Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade (amostra do outono).

Diâmetro dos halos de inibição (mm)						
<i>Croton urucurana</i>	Dose (mg/disco)	Bactérias				
		S.a	E.c	E.f	E.a	P.a
T1	1,0	20	15	15,3	16,7	13,3
T2	0,5	13,3	12,7	11,7	15	9,7
T3	0,25	12,3	--	10	13,7	--
T4	0,125	11,7	--	10	9,3	--
T5	0,0625	9,3	--	--	9,1	--
T6	0,0312	--	--	--	6,7	--
T7	0,0156	--	--	--	--	--
T8	0,0078	--	--	--	--	--
T9	0,0039	--	--	--	--	--
T10	0,0020	--	--	--	--	--
	Amoxicilina*	27	20	23	19	8
	Norfloxacino*	18	35	19	17	27
	Penicilina G**	30	8	18	8	10
	Vancomicina**	16	0	18	5	9

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: S.a = *Staphylococcus aureus*; E.c = *Escherichia coli*; E.f = *Enterococcus faecalis*; E.a = *Enterobacter aerogenes*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; T = diluição; -- = ausência de halo de inibição; * = Droga padrão para bactérias Gram positivas; ** = Droga padrão para bactérias Gram negativas.

O segundo experimento, por plaqueamento em profundidade, expressa resultados diferentes dos encontrados por Oliveira et al., (2008), Soldera, Zanella e Frasson (2010), ao pontuar resultados de sensibilidade para a bactéria *Escherichia coli* e maior atividade contra as demais bactérias Gram negativas. Comparando os dois métodos utilizados (plaqueamento em espalhamento de superfície e plaqueamento em profundidade), consideramos o segundo experimento melhor, pelo fato de favorecer a homogeneização do micro-organismo junto ao meio, além de proporcionar um tempo maior para a difusão do princípio ativo analisado.

A segunda etapa do estudo iniciou-se com a coleta do material botânico (látex) de *Croton urucurana* no dia 26 de agosto do decorrente ano, compreendendo a estação do inverno. O ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento de superfície da tabela 3 expôs resultados em conformidade aos da tabela 1 contra os mesmos micro-organismos. O *Staphylococcus aureus*, apresentou faixa de concentração de 1,0 a 0,0156 mg/disco com mensuração dos halos variando de 20 a 7,3 mm de diâmetro e eficácia antimicrobiana até a concentração 0,0625 mg/disco, este resultado demonstra melhor efetividade do látex colhido no outono que denotou até a concentração 0,0156 mg/disco; o *Enterococcus faecalis* expressou sensibilidade nas concentrações 1,0 a 0,0312 mg/discos e mensuração dos halos de 16,7 a 8,7 mm, que ao compararmos com os parâmetros estabelecido de ≥ 10 mm para efetividade, viabiliza a eficácia do látex até a concentração de 0,0625 mg/disco, portanto melhor efetividade nesta estação do que a apresentada no outono que teve eficácia até a concentração de 0,25 mg/disco.

Tabela 3 - Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento em superfície (amostra do inverno).

Diâmetro dos halos de inibição (mm)						
<i>Croton urucurana</i>	Dose (mg/disco)	Bactérias				
		S.a	E.c	E.f	E.a	P.a
T1	1,0	20	--	16,7	--	--
T2	0,5	16	--	14,7	--	--
T3	0,25	15,7	--	10,7	--	--
T4	0,125	10	--	10	--	--
T5	0,0625	10	--	10	--	--
T6	0,0312	7,7	--	8,7	--	--
T7	0,0156	7,3	--	--	--	--
T8	0,0078	--	--	--	--	--
T9	0,0039	--	--	--	--	--
T10	0,0020	--	--	--	--	--
	Amoxicilina*	40	20	20	5	10
	Norfloxacino*	30	40	20	30	40
	Penicilina G**	40	10	20	10	5
	Vancomicina**	20	10	20	10	5

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: S.a = *Staphylococcus aureus*; E.c = *Escherichia coli*; E.f = *Enterococcus faecalis*; E.a = *Enterobacter aerogenes*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; T = diluição; -- = ausência de halo de inibição; * = Droga padrão para bactérias Gram positivas; ** = Droga padrão para bactérias Gram negativas.

Os resultados do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade exposto na tabela 4, demonstra espectro de atividade antibacteriana frente aos mesmos micro-organismos exibidos no outono, ou seja, contra: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. O espectro de ação antimicrobiano do látex apresenta maior atividade também contra o *Staphylococcus aureus*, com faixa de concentração de 1,0 a 0,0156 mg/disco com mensuração dos halos de 20 a 7,5 mm. Observa-se nesta estação que o látex apresenta efeito antimicrobiano até

0,0156 mg/disco nos dois ensaios realizados, apresentando eficácia até a concentração 0,0625 mg/disco. O resultado por profundidade contra *Staphylococcus aureus* no outono expôs eficácia em concentração 0,125 mg/disco, conferindo melhor resultado no inverno. Para *Enterococcus faecalis*, a faixa de concentração foi ativa em 1,0 a 0,0312 mg/disco com halo de inibição de 16,7 a 5 mm, apresentando menor efetividade frente ao parâmetro estabelecido de ≥ 10 mm em relação ao método em superfície que teve efetividade até a concentração de 0,0625 mg/disco, sendo o resultado do método de profundidade de 0,25 mg/disco. A concentração da eficácia expressa no outono de 0,125 mg/disco demonstra maior efetividade do látex.

Nos experimentos contra *Escherichia coli* realizados no outono e no inverno, nota-se que o primeiro teve atividade até a concentração de 0,5 mg/disco, enquanto a segunda amostra do látex apresentou atividade até 0,0625 mg/disco. *Pseudomonas aeruginosa* foi inibida da mesma forma que a *Escherichia coli*, nas concentrações de 0,5 mg/disco na amostra de outono e 0,0625 mg/disco na do inverno. Com relação à mensuração dos halos, foram consideradas efetivas as concentrações até 0,250 mg/disco para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na segunda amostra, enquanto na primeira amostra as concentrações foram de 0,5 mg/disco para *Escherichia coli* e látex puro, ou seja, 1,0 mg/disco para *Pseudomonas aeruginosa*.

Com relação a *Enterobacter aerogenes*, no outono, houve maior atividade, apresentando inibição nas concentrações até 0,0312 mg/disco com halos de inibição ≥ 10 mm nas concentrações acima de 0,250 mg/disco. Ao passo que no inverno houve inibição nas concentrações superiores a 0,5 mg/disco, porém com halo de inibição < 10 mm e, portanto, considerada ineficaz.

Tabela 4 - Diâmetro dos halos de inibição do ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade (amostra do inverno).

Diâmetro dos halos de inibição (mm)						
<i>Croton urucurana</i>	Dose (mg/disco)	Bactérias				
		S.a	E.c	E.f	E.a	P.a
T1	1,0	20	18,3	16,7	5,0	14,7
T2	0,5	15	10	10,1	4,3	10,3
T3	0,25	15	10	10	--	10,3
T4	0,125	11,7	6,7	6,7	--	8,5
T5	0,0625	10	5,0	5,0	--	8,3
T6	0,0312	8,3	--	5,0	--	--
T7	0,0156	7,5	--	--	--	--
T8	0,0078	--	--	--	--	--
T9	0,0039	--	--	--	--	--
T10	0,0020	--	--	--	--	--
	Amoxicilina*	40	20	25	5	10
	Norfloxacino*	9	25	15	20	30
	Penicilina G**	30	10	20	10	10
	Vancomicina**	20	5	20	10	10

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: S.a = *Staphylococcus aureus*; E.c = *Escherichia coli*; E.f = *Enterococcus faecalis*; E.a = *Enterobacter aerogenes*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; T = diluição; -- = ausência de halo de inibição; * = Droga padrão para bactérias Gram positivas; ** = Droga padrão para bactérias Gram negativas.

Nas estações de outono e inverno o látex de *Croton urucurana*, expressou eficácia antimicrobiana contra a *Escherichia coli*, diferentemente de Oliveira et al (2008) em seus ensaios de difusão em disco.

Essas variações nos resultados apresentados podem ter relação com vários fatores que influenciam tanto na produção de metabólitos pela planta, como o grau de acúmulo dos ativos nas diferentes estações do ano. Por exemplo, no decorrer do crescimento dos botões florais são absorvidos uma fração dos fitoconstituintes no desenvolver dos metabólitos vegetais. Portanto, neste período de desenvolvimento

da árvore é possível que ocorram alterações no acúmulo de ativos no látex (SOLDERA; ZANELLA e FRASSON, 2010). Os principais fatores que podem provocar alterações na produção dos compostos químicos são: o clima, tipo de solo, radiação solar, períodos de seca ou chuva, época da coleta e demais condições ambientais (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; OGASAWARA, 2013).

Figura 5: *Escherichia coli* – plaqueamento em espalhamento de superfície.



Fonte: Elaboração própria

Figura 6: *Escherichia coli* – plaqueamento em profundidade.



Fonte: Elaboração própria

Figura 7: Teste de droga padrão - plaqueamento em espalhamento de superfície *Escherichia coli*



Fonte: Elaboração própria

Figura 8: Teste de droga padrão - plaqueamento em profundidade *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Elaboração própria

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O látex da *Croton urucurana* Baill, apresenta atividade antimicrobiana contra as cepas bacterianas empregadas no bioensaio: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* NEWP0022, *Staphylococcus aureus* CCDD5007, *Enterococcus faecalis* NEWP0012 e *Enterobacter aerogenes* NEWP0048, provenientes da Coleção de Micro-organismos Norte Americana (*American Type Culture Collection* - ATCC) da marca Laborclin, Newprov e Cefar, conforme os resultados apresentados no ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade e de superfície.

No ensaio de difusão em disco por plaqueamento em espalhamento de superfície, o potencial antimicrobiano do látex foi bastante efetivo contra cepas Gram positivas, expondo maior eficácia contra *Staphylococcus aureus* na estação do outono por apresentar efetividade até a concentração 0,0156 mg/disco e mediante a *Enterococcus faecalis*, o inverso, melhor efetividade no inverno. O ensaio de difusão em disco por plaqueamento em profundidade, denotou efetividade antimicrobiana frente as bactérias Gram positivas e Gram negativas, conferindo melhor desempenho do látex de *Croton urucurana* na estação do outono por apresentar eficácia contra todos os micro-organismos testados, diferente do látex extraído no inverno que não apresentou eficácia contra a *Enterobacter aerogenes*. O método por profundidade expressa melhores resultados com atividade de amplo espectro, incluindo a *Escherichia coli*, diferente dos estudos pesquisados.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se, aparentemente, que o método por profundidade torna a fusão da bactéria ao meio mais homogênea e auxilia quanto ao tempo para melhor difusão da matéria prima ao meio, proferindo melhor ação do látex de *Croton urucurana*.

Contudo, sugere-se novos estudos para fundamentar esta teoria, uma vez que a maioria dos artigos pesquisados não apresentaram inativação de micro-organismos Gram negativos em especial a *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

- ARRAIS, L. G. et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 316-322, 2014.
- BARRERA, C. A. C.; GOMEZ, D. C.; CASTIBLANCO, F. A. Medicinal importance of *Croton* genus (euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Ciudad de la Habana, v. 21, n. 2, p. 234-247, jun. 2016.
- BARRETO, M. B. et al. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 675-679, mar. 2013.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, jan. 1998.
- CESÁRIO, F. R. A. S. et al. Efeitos do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* nas lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina em camundongos. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 2, p. 17-28, mar. 2015.
- CLSI publication M100-S21 **Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories**, 2011.
- DI SAPIO, O. A.; GATTUSO, M. A. Caracteres morfoanatômicos y micrográficos de la corteza de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Dominguezia**, v. 29, p. 1, abr. 2013.
- DUBREUIL, J. D. Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxinogenic *Escherichia coli*. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2009-2041, nov. 2013.
- FERREIRA, P. C.; AZEVEDO, C. P.M.F.; PASIN, L. A.A.P. Fenologia da *Croton urucurana* Baill em área de recuperação ambiental da UNIVAP- XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, São José dos Campos. 2009.
- GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 361-380, out. 2008.
- GURGEL, L. A. et al. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 4, p. 319-322, jun. 2001.
- LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 2, jun. 2008.

- LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar/abr. 2005.
- LOPES, E. L. et al. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2169-2172, out. 2012.
- LÓPEZ, P. V. A. Bioprospecção de extratos de *Croton Urucurana* Baill e seus fungos endofíticos. 2010. 141 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, jul. 2010.
- LORENZI, H. ÁRBORES BRASILEIRAS: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 4.ed. **Nova Odessa**: São Paulo, v. 01 p. 117, 2002.
- MONTEIRO, L. P. Determinação da atividade citotóxica do extrato vegetal de *Croton urucurana* Baill em linhagens de células tumorais. 2015. 86 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal de Viçosa**, Campus Viçosa, Viçosa, jul. 2015.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN -56238-485-6]**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- OGASAWARA, D. C. Constituintes químicos e atividades antioxidante e antiproliferativa de extratos de *Astraea Klotzsch* e *Croton* L. (Euphorbiaceae). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, jan. 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, p. 587-593, out./dez.2008.
- PEARSON, J. Dragons Blood. **The Horticulturist**, v.11, n.7, p. 10-12, 2002.
- PEIXOTO, A. M. et al. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. ed. 6. São Paulo: Fapesp, 2006.
- PIZZOLATTI, M. G. et al. *Clerodane diterpenes* from bark of *Croton urucurana* Baillon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**., São Paulo, v. 24, n. 4, p. 609-614, abr. 2013.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, jan. 2007.
- SILVA JUNIOR, I. E. et al. Triagem antimicrobiana de algumas plantas medicinais do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, p. 242-248, mar. 2009.
- SILVA, A. C. et al. FLORESTAS INUNDÁVEIS: ecologia, florística e adaptações das espécies. Lavras: UFLA, 2012.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of venomous Animals and Toxins including tropical diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, ago. 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, A. F. N. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

SIMIONATTO, E. et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 879-885, jul. 2007.

SODRE, R. C.; SILVA, M. J.; SALES, M. F. Croton L. (Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 1, p. 221-234, mar. 2014.

SOLDERA, C. C.; ZANELLA, G. N.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antibacteriana de *Croton Urucurana*. Ijuí, **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n.19, p. 25-31, jul./dez. 2010.

SORREANO, M.C.M. et.al. Deficiência de micronutrientes em mudas de sangra d agua (*Croton urucurana*, Baill). **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 126-132, abr./jun. 2008.

TIMICH, M.; SANTOS, D. Y. A. C. Effect Of *Croton Urucurana* Baill. extracts against *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Boletim de Botânica**, v. 33, p. 1-5, 2015.

TRINDADE, M. J. S.; LAMEIRA, O. A. Especies de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, p. 292-309, out./dez. 2014.

YI, T. et al. A systematic review of the botanical, phytochemical and pharmacological profile of *Dracaena cochinchinensis*, a plant source of the ethnomedicine “Dragon’s Blood”. **Molecules**, v. 19, n. 07, p. 10650-10669, jul. 2014.