

Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Croton draco* em bactérias de importância sanitária

Antibacterial activity of the hidroalcoholic extract *Croton draco* on bacteria of sanitary importance

Morales-Ubaldo Ana¹ , Hernández-Alvarado Jerelly² , Valladares-Carranza Benjamín³ , Velázquez-Ordoñez Valente³ , Delgadillo-Ruiz Lucía⁴ , Rosenfeld-Miranda Carla⁵ , Rivero-Pérez Nallely^{1*} , Zaragoza-Bastida Adrian^{1*} 

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. México. ²Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. México. ³Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El Cerrillo Piedras Blancas. Toluca, Estado de México. C.P 50090. ⁴Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, México. ⁵Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Isla Teja s/n, Casilla 567, Valdivia, Chile
*Autor responsable y de correspondencia: Nallely Rivero-Perez, Zaragoza-Bastida Adrian. Rancho Universitario Av. Universidad km 1, A.P. 32 CP.43600. 01771717 2000 ext. 2440. Ex-Hda. de Aquetzalpa, Hidalgo, México. ubaldolizet8@gmail.com, j_lizbeth_1895@hotmail.com, benvac2004@yahoo.com.mx, vvo@uaemex.mx, delgadillolucia@gmail.com, crosenfe@uach.cl, nallely_rivero@uaeh.edu.mx, adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx.

RESUMEN

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) menciona que o uso inadequado de antibióticos levou ao surgimento de cepas bacterianas resistentes aos mecanismos de ação desses medicamentos, devido à falta de terapias eficazes, é necessário o desenvolvimento de novas opções de tratamento para doenças que afetam a saúde, a esse respeito, os extratos de plantas ou seus compostos puros oferecem uma alternativa. O objetivo da presente investigação foi caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana in vitro do extrato hidroalcoólico de *Croton draco* em bactérias de importância sanitária. O extrato foi obtido por maceração hidroalcoólica, caracterização química e qualitativa do extrato, a atividade antibacteriana foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os testes de caracterização qualitativa realizados no extrato hidroalcoólico de *Croton draco* indicam a presença de compostos fenólicos, terpenos, saponinas e alcalóides, pela primeira vez a presença de timol e carvacrol foi determinada por cromatografia gasosa nas concentrações de 0,5340 mg/ml e 0,4206 mg/mL, respectivamente. As bactérias apresentaram diferentes graus de sensibilidade, no entanto, foi determinada uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas, como *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. subtilis*.

Palavras-chave: *Croton draco*, Extrato hidroalcoólico, Antibacteriano, Concentração inibitória mínima, Concentração bactericida mínima.

ABSTRACT

The World Organization for Animal Health (OIE) mentions that the inappropriate use of antibiotics has led to the emergence of strains of bacteria resistant to the mechanisms of action of these drugs, due to the scarcity of effective therapies, the development of new treatment options is required for diseases that affect health, in this respect plant extracts or their pure compounds offer an alternative. The aim of the present investigation was to characterize and evaluate the in vitro antibacterial activity of the hidroalcoholic extract of *Croton draco* on bacteria of sanitary importance. The extract was obtained by hidroalcoholic maceration, a qualitative and chemical characterization of the extract was carried out, and the antibacterial activity was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration

(MBC). The qualitative characterization tests performed on the hydroalcoholic extract of *Croton draco* indicate the presence of phenolic compounds, terpenes, saponins and alkaloids, by gas chromatography the presence of thymol and carvacrol was determined in concentrations of 0.5340 mg/ml and 0.4206 mg/mL respectively. The bacteria showed different degrees of sensitivity to the hydroalcoholic extract, however, greater activity was determined against Gram positive bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Croton draco*, Hydroalcoholic extract, Antibacterial, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) menciona que o uso inadequado de antibióticos levou ao surgimento de cepas de bactérias resistentes aos mecanismos de ação desses medicamentos, situação alarmante para a saúde humana e a saúde animal (OIE, 2016), devido à falta de terapias eficazes. Requer o desenvolvimento de novas opções de tratamento para doenças que afetam a saúde, extratos vegetais ou seus compostos puros, oferecendo uma alternativa potencial para o desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos que podem ser utilizados no controle de microrganismos patogênicos, devido à presença de metabólitos ou compostos que inibem o crescimento ou causam a morte (Lavor *et al.*, 2014; Upadhyay *et al.*, 2016).

Nesse sentido, Maxia *et al.*, (2005) mencionam que existem práticas etnoveterinárias de agricultores e pastores, baseadas no conhecimento transmitido de geração em geração. Por outro lado, Martínez e Jiménez-Escobar (2017) documentaram um total de 62 práticas etnoveterinárias; destacando o uso de plantas no tratamento de feridas, condições oculares e digestivas, práticas associadas a 44 espécies de plantas pertencentes a 30 famílias botânicas; dentre as quais se destaca o gênero *Croton* (*Croton lanatus*).

O sangue de dragón, sangregado o sangue de drago (*Croton draco*), é um dos arbustos usados na medicina tradicional por diferentes culturas do mundo. Alguns de seus usos etnomedicinais são: hemostático, antidiarreico, antiulceroso, antiviral, cicatrizante, antitumoral, antiinflamatório, antioxidante e antimicrobiano, entre outros (Gupta *et al.*, 2008).

No México, esta planta recebe muitas propriedades curativas, como as mencionadas acima, devido à grande variedade de metabólitos secundários que tem, como: alcalóides, taninos, diterpenos e óleos voláteis (Salatino *et al.*, 2007); no entanto, são necessários estudos para determinar as concentrações nas quais ele apresenta seu efeito farmacológico e os compostos aos quais as propriedades farmacológicas podem ser atribuídas.

Estudos realizados por Peres *et al.*, (1997) mostram que extratos de algumas espécies de *Croton* apresentam atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

De acordo com o exposto, o objetivo da presente investigação foi realizar uma caracterização qualitativa e química do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, além de determinar sua atividade antibacteriana (*in vitro*) em bactérias de importância sanitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtendo o extrato

Amostras de material vegetal da parte aérea de *Crotón draco* foram coletadas durante o verão (junho-agosto) no município de Huatusco (19° 08'56" N 96° 57'58 " W), pertencente ao estado de Veracruz. Para a identificação da planta, foi consultado o herbário da Universidade Nacional Autônoma do México e o espécime da planta foi identificado como *Crotón draco* subsp. *draco* (IBUNAM: MEXU: 501697).

O material vegetal foi seco à temperatura ambiente na ausência de luz, 250 g do material seco (triturado) foi macerado em um litro de solução hidroalcoólica (70:30, água: metanol), por 48 horas em temperatura ambiente na ausência de luz. O extrato líquido da maceração foi filtrado através de papel de filtro e algodão; posteriormente, o líquido obtido foi concentrado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo (BÜCHI™ R-210, Flawil, Alemanha), de acordo com a metodologia descrita por (Rivero-Pérez *et al.*, 2016). O extrato resultante foi mantido refrigerado até nova avaliação.

Caracterização química do extrato

Para o extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, o perfil químico qualitativo foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Bañuelos-Valenzuela *et al.*, (2018), em tubos de ensaio de 10 ml de Pyrex. Os testes foram os seguintes: teste KMnO₄ para insaturações, teste FeCl₃ para oxidrilos fenólicos (taninos vegetais), teste Liebermann-Burchard para esteróis e triterpenos, teste Salkowski para esteróis e triterpenos, teste de cumarinas, teste Baljet para sesquiterpenlactonas, teste de H₂SO₄ para flavonóides, teste de Shinoda para flavonóides, teste de Dragendorff para alcaloides, teste de taninos, teste de floratanino, teste de esteróides, teste de agitação, teste de bicarbonato de sódio e teste de Salkowski para saponinas.

A composição química do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco* foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bañuelos-Valenzuela *et al.*, (2018), utilizando um cromatógrafo a gás (CG; Agilent Technologies série 6890N fabricado nos EUA), com coluna polar DB_WAXetr, a 250 °C e 12,13 psi, com um fluxo de He 36,5 ml min⁻¹ após a injeção. As condições para a coluna foram: temperatura inicial de 50 °C de zero a dois minutos, aumentando de 10 em 10 °C até atingir 250 °C, mantendo a temperatura constante por 5 minutos e depois descendo para 50 °C por dois minutos com um fluxo de He de 1,6 ml min⁻¹ a uma pressão de 12,13 psi e uma velocidade média de 25 cm s⁻¹, usando um detector de chama ionizante (FID), a uma temperatura de 210 °C, com um fluxo de H₂ de 40 ml min⁻¹ e um fluxo de ar de 450 ml min⁻¹. Os padrões (Sigma-Aldrich) foram utilizados em diferentes concentrações (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de padrões utilizados na cromatografia em fase gasosa para a caracterização química do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*

Padrão	Timol (mg ml ⁻¹)	Carvacrol (mg ml ⁻¹)	Linalool (mg ml ⁻¹)	Terpineno (mg ml ⁻¹)	Limoneno (mg ml ⁻¹)
1	10.373	8.284	7.744	7.154	8.496
2	5.186	4.142	3.872	3.577	4.248
3	2.593	2.071	1.936	1.789	2.124
4	1.297	1.035	0.968	0.894	1.062
5	0.648	0.518	0.484	0.447	0.531
6	0.324	0.259	0.242	0.224	0.265

Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para o extrato, seguindo as especificações do CLSI., (2012). Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com as cepas ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Salmonella cholerasuis* ATCC 10708, *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 e subcategoria ATCC 19113 e ATCC 19113 que foram reativados em Muller Hinton Agar (BD Bioxon), a pureza das cepas foi corroborada pela coloração de Gram.

Confirmada a morfologia das bactérias, inoculou-se uma colônia em caldo nutritivo (BD Bioxon), que foi incubado sob agitação constante (70 rpm) por 24 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, o inóculo foi ajustado com caldo de nutrientes para 0,5 do padrão de turbidez de McFarland (Remel, R20421), o que corresponde a 150×10^6 células/ml. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método de microdiluição em placas; As concentrações avaliadas foram: 400, 200, 100, 50, 25, 12,50, 6,25, 3,12 mg/ml, para as cepas a serem avaliadas. Cada concentração foi preparada com caldo nutritivo (BD Bioxon). O tratamento foi realizado em triplicado em uma placa de 96 poços, foram colocados 100 µl de cada uma das diluições mais 10 µl da suspensão bacteriana previamente ajustada para 0,5 McFarland. Após a inoculação, a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas a 70 rpm sob agitação constante. O controle positivo foi Kanamicina (AppliChem 4K10421) nas concentrações de 64, 32, 16, 8,0, 4,0, 2,0, 1,0 e 0,5 µg /ml. O caldo de nutrientes foi utilizado como controle negativo.

Para determinar o ponto final da CIM, foi utilizado um método colorimétrico com base no uso de sais de tetrazólio, conforme descrito por Balouiri et al., (2016). Após o tempo de incubação, 20 µl de uma solução a 0,04% (p / v) de p-iodonitrotetrazólio (Sigma-Aldrich I8377) foram adicionados a cada poço; foi incubado por 30 minutos a 37 °C e a leitura foi realizada, determinando como a concentração inibitória mínima; aquele para o qual a solução fica rosa (Kaewpiboon et al., 2012; Mothana et al., 2009).

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), após adição de p-iodonitrotetrazólio, 5 µl de cada poço foram inoculados no ágar Mueller Hinton, depois incubados a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, verificou-se o crescimento da bactéria para determinar a concentração bactericida mínima do extrato, fração ou

metabolito; considerando como CBM, a concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano na placa.

Análise estatística

Os dados obtidos foram normalizados e analisados por meio de análise de variância e comparação de médias por Tukey, com nível de confiança de 95%; com o pacote estatístico Minitab 18.

RESULTADOS

Caracterização química do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*

Os testes de caracterização qualitativa realizados no extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, indicam a presença de compostos fenólicos (cumarinas, flavonóides e flavonas), terpenos (sesquiterpenos), saponinas e alcalóides.

O análise por cromatografia em fase gasosa do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco* determinou a presença de timol e carvacrol em concentrações de 0,5340 mg/ml e 0,4206 mg/ml, respectivamente; sem determinar a presença de Linalool, terpineno e limoneno.

Atividade antibacteriana

Na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, foram determinadas diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre as bactérias avaliadas, a CIM para *E. coli*, *S. typhi*, *S. cholerasuis*, *P. aeruginosa* 100 mg/ml; sem encontrar diferenças estatísticas, para *L. monocytogenes* de 50 mg/ml, com diferenças significativas em relação ao restante das bactérias avaliadas e de 25 mg/ml para *S. aureus*, *B. subtilis*; mostrando diferenças estatísticas com as bactérias acima mencionadas. Por outro lado, a CIM da bactéria avaliada apresentou diferenças estatísticas significativas em relação à CIM do controle com canamicina, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, em bactérias de importância sanitária

Bactérias avaliadas	Concentração inibitória mínima		Concentração bactericida mínima	
	EHCD (mg/mL)	Kanamicina (µg/mL)	EHCD (mg/mL)	Kanamicina (µg/mL)
<i>E. coli</i>	100 ^c	4	200 ^c	8
<i>S. typhi</i>	100 ^c	4	200 ^c	8
<i>S. cholerasuis</i>	100 ^c	2	200 ^c	4
<i>P. aeruginosa</i>	100 ^c	16	200 ^c	32
<i>L. monocytogenes</i>	50 ^b	2	100 ^b	4
<i>B. subtilis</i>	25 ^a	0.5	50 ^a	1
<i>S. aureus</i>	25 ^a	2	50 ^a	4
P value	0.0001		0.0001	

EHCD; Extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, diferentes literais ^{a,b,c} nas colunas indicam diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$)

Na Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico de *Crotón draco*, foram determinadas diferenças estatísticas significativas ($p \geq 0,05$) entre as bactérias avaliadas, a CBM para *E. coli*, *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa* 200 mg/ml; sem encontrar diferenças estatísticas entre eles, para *L. monocytogenes* de 100 mg/ml, com diferenças significativas em relação ao restante das bactérias avaliadas, e de 50 mg/ml para *S. aureus*, *B. subtilis*; mostrando diferenças estatísticas com as bactérias acima mencionadas. Por outro lado, o CBM da bactéria avaliada apresentou diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$) em relação ao CBM do controle positivo (Kanamicina), como mostra a Tabela 2.

DISCUSSÃO

Atualmente, o surgimento de bactérias resistentes ou multidrogas a drogas antibacterianas representa um sério problema de saúde pública em todo o mundo; Esse problema requer vigilância constante, situação que desafia a comunidade científica na busca de alternativas (Lai *et al.*, 2017). A eficácia reduzida e o aumento da toxicidade dos antimicrobianos sintéticos agravam o problema. Então, os cientistas estão procurando por compostos naturais para obter soluções. Nesse sentido, a medicina tradicional baseada no uso de plantas medicinais representa uma alternativa para o tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes ou multiresistentes, tanto em humanos quanto em animais (Valle *et al.*, 2015).

Os resultados da caracterização qualitativa do extrato hidroalcoólico de *Croton draco*, indicam a presença de compostos fenólicos (cumarinas, flavonóides e flavonas), terpenos (sesquiterpenos), saponinas e alcalóides; metabólitos que foram relatados em outras plantas com atividade antibacteriana, de acordo com a literatura: cumarinas (Souza *et al.*, 2005), flavonóides (Cushnie *et al.*, 2005), sesquiterpenos (Barrero *et al.*, 2005), saponinas (Mandal *et al.*, 2005) e alcalóides (Cushnie *et al.*, 2014).

Por outro lado, a caracterização química por cromatografia gasosa permitiu determinar a presença de timol (0,5340 mg/ml) e carvacrol (0,4206 mg/ml); compostos com atividade antibacteriana de acordo com Du *et al.*, (2005).

Salatino *et al.*, (2007) relataram uma caracterização qualitativa e química de diferentes espécies do gênero *Croton*, que coincide com a caracterização do extrato avaliado no presente experimento.

Peres *et al.*, (1997) relataram a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Croton urucurana*; determinou uma melhor atividade do extrato contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). Resultados consistentes com os obtidos na presente investigação, uma vez que as menores concentrações de CIM e CBM foram comparadas às cepas Gram positivas de *L. monocytogenes* (50 mg/ml de CIM, 100 mg/ml de CBM), *B. subtilis* e *S. aureus* (25 mg/ml MIC, 50 mg/ml CBM). Isso pode ser explicado porque

a membrana externa das bactérias Gram-negativas atua como uma barreira seletiva que limita a entrada de antibacterianos (Cabrerá *et al.*, 2007).

Estudos semelhantes realizados por Selowa *et al.*, (2009) relatam a atividade antibacteriana de extratos de metanol de *Croton salvatycus*, *C. megalobotrys*, *C. steenkapianus*, contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo *C. steenkapianus*; o único inativo contra *E. coli* e *S. aureus*. Caso contrário ao *Croton draco*, que mantém atividade contra essas espécies bacterianas. Essa diferença pode dever-se ao fato de os compostos e suas concentrações mudarem dependendo do gênero, espécie, estado fenológico, situações de estresse e localização geográfica da planta. Além da técnica utilizada para a extração e concentração de metabólitos secundários (Hernández-Alvarado *et al.*, 2018).

Ainda que no presente experimento o mecanismo de ação não tenha sido determinado, o mecanismo de ação ao qual a atividade antibacteriana de cumarinas, flavonóides, sesquiterpenos, saponinas e alcalóides está associada, é devido à sua capacidade de afetar a permeabilidade da membrana celular dos Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; Diminua o pH citoplasmático e cause hiperpolarização da membrana celular, de acordo com o publicado por Gonelimali *et al.*, 2018.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que no extrato hidroalcoólico de *Croton draco*, ele contém metabólitos com potencial atividade antibacteriana; abrindo assim a possibilidade de ser utilizado como um fitofarmacêutico capaz de atuar contra bactérias de importância sanitária; no entanto, é recomendado em estudos futuros isolar e avaliar o (s) composto (s) que conferem a referida atividade com cepas de coleta e cepas de campo isoladas com resistência a diferentes antibióticos.

LITERATURA CITADA

BALOUIRI M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

BAÑUELOS-VALENZUELA R, Delgadillo L, Chairez F, Delgadillo O, Meza-López C. 2018. Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*. 52(3): 309-321. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6423180>.

BARRERO AF, Quílez del Moral JF, Lara A, Herrador MM. 2005. Antimicrobial Activity of Sesquiterpenes from the Essential Oil of *Juniperus thurifera* Wood. *Planta Med.* 71(01): 67-71. <https://doi:10.1055/s-2005-837753>

CABRERA CE, Gómez RF, Zúñiga AE. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica.* 38 (2): 149-158.
<http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v38n2/v38n2a07.pdf>

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. USA. Pp. 88.

CUSHNIE TPT, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 26(5): 343-356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>

CUSHNIE TPT, Cushnie B, Lamb AJ. 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 44(5):377-386. <https://doi:https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>

DU E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. 2015. *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of animal science and biotechnology.* 6:58-58. <https://doi:10.1186/s40104-015-0055-7>.

GONELIMALI FD, Lin J, Miao W, Xuan J, Charles F, Chen M, Hatab SR. 2018. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in microbiology.* 9: 1639-1639. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.01639>

GUPTA D, Bleakley B, Gupta, RK. 2008. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology.* 115(3):361-380.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.018>

HERNÁNDEZ-ALVARADO JL, Zaragoza-Bastida A, López-Rodríguez GM, Peláez-Acero A, Olmedo-Juárez A, Rivero-Perez N. 2018. Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario.* 8(1): 14-27. <https://dx.doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>

KAEWPIBOON C, Lirdprapamongkol K, Srisomsap C, Winayanuwattikun P, Yongvanich, T, Puwaprisirisan, Puwaprisirisan P, Svasti J, Assavalapsakul W. 2012. Studies of the *in vitro* cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai

medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(1): 217. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-217>.

LAI CC, Lee K, Xiao Y, Ahmad N, Veeraraghavan B, Thamlikitkul V, Hsueh PR. 2014. High burden of antimicrobial drug resistance in Asia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2(3): 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.02.007>.

LAVOR AK LS, Matias EFF, Alves EF, Santos BS, Figueredo FG, Lima LF, Coutinho HDM. 2014. Association between drugs and herbal products: *In vitro* enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). *European Journal of Integrative Medicine*. 6(3):301-306. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.002>.

MANDAL P, Sinha BSP, Mandal NC. 2005. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia*. 76(5): 462-465. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.004>.

MARTÍNEZ GJ, Jiménez - Escobar ND. 2017. Plantas de interés veterinario en la cultura campesina de la Sierra de Ancasti (Catamarca, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 16(4):329-346. https://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_1_-_1292_-_329_-_346_0.pdf

MAXIA A, Lancioni C, Mura L, Mongiano PD. 2005. Plantas usadas en la practica etnoveterinaria en el Nuorese (Cerdena, Italia). *Revista de Fitoterapia*. 5(2). 155-161. <https://docplayer.es/6533436-Plantas-usadas-en-la-practica-etnoveterinaria-en-el-nuorese-cerdena-italia.html>

MOTHANA RA, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski PJ. 2009. Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC complementary and alternative medicine*. 9(1):7. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-7>.

OIE (Organización Internacional de Salud Animal). 2016. Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente. www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/PortalAMR/ES_OIE-AMRstrategy.pdf

PERES, MTLP, Monache FD, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 56(3):223-226. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00039-1)

RIVERO-PEREZ N, Ayala-Martínez M, Zepeda-Bastida A, Meneses-Mayo M, Ojeda-Ramírez D. 2016. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of spent *Pleurotus*

ostreatus substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Indian Journal of Pharmacology*. 48(2):141-144. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.178826>.

SALATINO A, Salatino MLF, Negri G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 18:11-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>

SELOWA SC, Shai LJ, Masoko P, Mokgotho MP, Magano SR. 2009. Antibacterial activity of extracts of three *Croton* species collected in Mpumalanga region in South Africa. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*. 7(2):98-103. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3021162/pdf/AJTAM0702-0098.pdf>

SOUZAA SMD, Monacheb FD, Smania A. 2005. Antibacterial Activity of Coumarins. *Naturforsch*. 60: 693-700. <https://pdfs.semanticscholar.org/d5a6/502543e2174bd3da1f1d6bb6d73b98784b4e.pdf>

UPADHYAY A, Karumathil DP, Upadhyaya I, Bhattaram V, Venkitanarayanan K. 2016. Controlling Bacterial Antibiotic Resistance Using Plant-Derived Antimicrobials. En: Kateryna K, Mahendra R. Antibiotic Resistance. Academic Press. Pp. 205-226. ISBN 9780128036426. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00010-1>.

VALLE DL, Andrade JI, Puzon JJM, Cabrera EC, Rivera WL. 2015. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(7): 532-540. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.04.005>