

Estudo da metodologia de difusão em disco como ferramenta de *screening* preliminar de atividade antibacteriana em extratos vegetais

GORSKI¹, A. S., SILVA², P. C. G., VIEIRA², L. T. A. & SONEHARA¹, I. Y.

Resumo

A utilização de plantas no tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade. O interesse em pesquisas nesta área tem aumentado nos últimos anos, e um dos principais fatores é a busca por novos princípios ativos antimicrobianos, devido ao aumento da resistência microbiana aos fármacos existentes. A realização de testes preliminares fáceis e rápidos em extratos de plantas permite a seleção de amostras para análises detalhadas posteriores, abreviando um processo que pode levar à descoberta de novas fontes de compostos com atividade antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo a investigação da metodologia de difusão em disco como ferramenta para um *screening* preliminar da possível atividade antibacteriana de extratos vegetais contra cepas selvagens de *Staphylococcus aureus*. O método foi testado em extratos vegetais provenientes de folhas de espécies pertencentes à família Myrtaceae, que se destaca por ser constituída de 150 gêneros e 3.600 espécies distribuídas em todos os biomas, além de ter alto potencial econômico e de aplicações. A coleta do material vegetal foi realizada no município de Campos do Jordão, na colônia de férias Umuarama da Universidade Presbiteriana Mackenzie, durante o segundo semestre de 2017, consistindo de oito espécies: *Neomitranthes* sp. Kausel ex D. Legrand, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Siphoneugena* cf. *reitzii* D. Legrand, *Myrcia splendens* (Sw.) DC, *Myrcia hartwegiana* (O. Berg) Kiaersk, *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos, *Siphoneugena* cf. *reitzii* D. Legrand e *Myrcia* sp. DC. Após secagem e trituração das folhas, foram preparados extratos hidroalcoólicos que foram testados contra *Staphylococcus aureus* selvagem pelo método de difusão em disco. Observou-se que praticamente todos os extratos apresentaram alguma atividade inibitória, sendo que as amostras de *Myrcia splendens* (Sw.) DC e *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos mostraram maior potencial de atividade. Estudos posteriores de determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) por membros do grupo de pesquisa confirmaram estas atividades, mostrando a eficiência da metodologia de difusão em disco na detecção de atividade. O estudo concluiu que o método de difusão em disco mostrou-se efetivo, sendo um método simples, confiável e econômico para determinação preliminar de sensibilidades antimicrobianas dos extratos vegetais.

Palavras-chave: Difusão em disco; Atividade antimicrobiana; Myrtaceae.

Introdução

As plantas são importantes fontes de matéria-prima, e partes como raiz, caule e folhas podem fornecer substâncias ativas que são utilizadas terapeuticamente (Rosa et al., 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos 2013 e 2015 a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou, com um crescimento de 161% (Brasil, 2016). Dentro deste panorama, a família Myrtaceae destaca-se entre os representantes da flora brasileira por apresentar grande número de espécies de interesse medicinal, reconhecidas por suas atividades antibacterianas, antifúngicas, cicatrizantes, anti-sépticas, anti-inflamatórias e anti-diarreicas (Lorenzi & Matos, 2002). É também reconhecida pelo seu potencial na produção de óleos voláteis (Lima et al., 2006).

O problema de saúde pública mais relevante atualmente é o da resistência bacteriana aos antibióticos, que apresenta consequências clínicas e econômicas preocupantes. As bactérias Gram-positivas mais resistentes são da espécie *Staphylococcus aureus* e do gênero *Enterococcus* spp. Já as Gram-negativas são das espécies *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e da família Enterobacteriaceae (Hawkey, 2008). Observou-se que nos últimos 6 anos foram publicados 15.940 artigos com o foco na in-

vestigação de propriedades antibacterianas em plantas, conforme pesquisa realizada nas bases de dados Google Acadêmico, Scielo e PubMed (figura 1). Percebe-se um grande interesse na atividade antibacteriana de espécies vegetais, mostrando sua relevância na busca por novos compostos que possam apresentar maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e primordialmente que apresentem um índice baixo de resistência bacteriana (Mendonça et al., 2018).

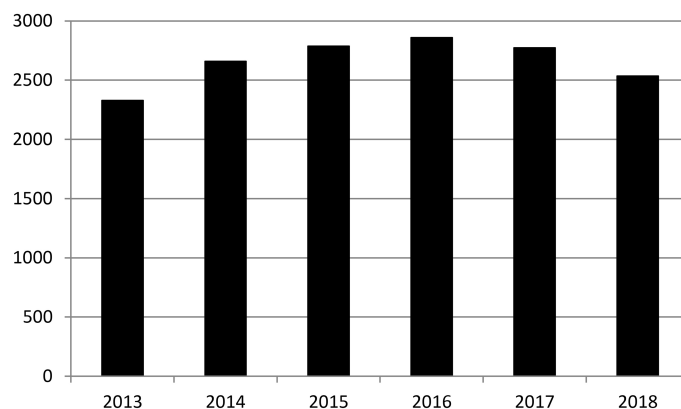


Figura 1 Estudos científicos de atividade antibacteriana em plantas.

¹ Universidade Presbiteriana Mackenzie, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Farmácia

² Universidade Presbiteriana Mackenzie, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Ciências Biológicas

Dentre estes artigos citados, 7.454 investigam a atividade contra *Staphylococcus aureus* (figura 2). Esta bactéria é facilmente encontrada nas fossas nasais em cerca de 30% dos adultos saudáveis, e também na pele (20%); assim, são carregados transitoriamente e, por se tratar de uma bactéria de rápida multiplicação e disseminação pelos tecidos, é capaz de provocar doenças e infecções graves aos seres humanos. Nota-se que a maior incidência está em pacientes e funcionários de hospitais (Soares & Pereira, 2016).

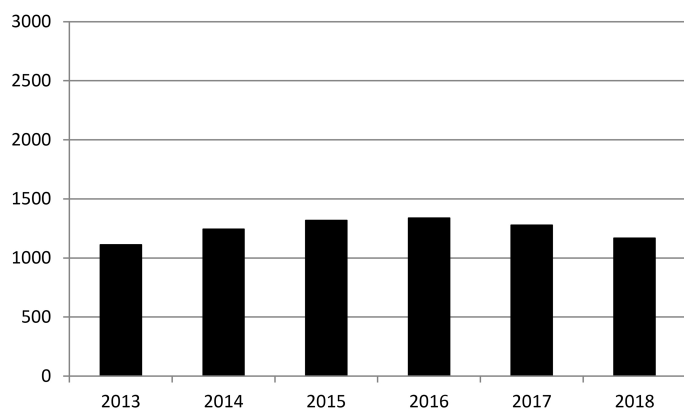


Figura 2 Estudos científicos de atividade antibacteriana em plantas contra *Staphylococcus aureus*.

A ausência de padronização de métodos utilizados para a avaliação de extratos vegetais com potencial antimicrobiano dificulta a comparação de resultados; há uma variedade de técnicas usadas, e dentre elas as mais conhecidas incluem macrodiluição, microdiluição, difusão em disco e difusão em poço (Ostrosky et al., 2008). Segundo Machado & Gales (2017), a macrodiluição foi uma das primeiras técnicas a serem utilizadas, e envolve a preparação de diluições seriadas e logarítmicas em um meio de cultura líquido (caldo). A microdiluição utiliza a mesma estratégia, em placas de Elisa estéreis, com 96 poços de fundo em formato de U. Já o método de difusão em disco é o processo no qual há a semeadura do microorganismo em superfície de meio de cultura sólido, com o antimicrobiano impregnado em discos dispostos sobre este meio sólido. A difusão em poço é realizada pela incorporação de concentrações de um antimicrobiano em poços perfurados em meio de cultura sólido, com o microorganismo inoculado sobre a superfície do ágar, assim avaliando sua sensibilidade ao antimicrobiano.

O método de difusão em disco foi idealizado por Alexander Fleming em 1950, porém foi apenas em 1996 que este método de difusão em disco foi padronizado por Bauer et al. (1960). Desde então, é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios no Brasil, por ser prático, qualitativo, de fácil execução e ideal para bactérias de crescimento rápido. O Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do CLSI (antigo NCCLS) descreve todo processo de padronização do método conforme Bauer et al., porém de forma mais completa, com o desenvolvimento de padrões de interpretação associados a dados laboratoriais e clínicos. Atualmente, o Brasil segue a versão brasileira das diretrizes EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), conforme determinado pela Portaria Nº 64 do Ministério da Saúde, de 11 de dezembro de 2018 (Brasil, 2018; BrCast, 2017).

Os reagentes utilizados no método de difusão em disco são relativamente econômicos, sem necessidade de equipamentos especiais, e o método apresenta flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados. Entretanto, apresenta algumas dificuldades como na avaliação da suscetibilidade quando

ocorre baixa difusão no ágar, ou em testes com bactérias nutricionalmente mais exigentes que requerem suplementação dos meios de cultura. Além disso, podem haver variações nos resultados, sendo necessário um controle de qualidade periódico para garantir a confiabilidade do teste.

O tipo de extrato utilizado no método de difusão em disco é variável, podendo influenciar no resultado dos testes. Como exemplo, uma avaliação da atividade antimicrobiana em extrato aquoso, hidroalcoólico e alcoólico de folhas de espécies da família Myrtaceae realizada no Centro Universitário UNINTA, em Salvador, em 2017, apresentou resultados de atividade antimicrobiana no extrato aquoso de *Eugenia uniflora*, *Syzygium cumini* e *Psidium guajava* contra *Staphylococcus aureus* na concentração de 100 mg/mL. Na análise do extrato hidroalcoólico, *Syzygium cumini* demonstrou atividade na concentração de 100mg/dL contra *Pseudomonas aeruginosa*, e diante de *S. aureus*, *Eugenia uniflora*, *Syzygium mallowense*, *Syzygium cumini* e *Psidium guajava* apresentaram atividade na concentração de 100 mg/dL. No extrato alcoólico, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* apresentaram atividade antimicrobiana diante das quatro cepas estudadas (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*), concluindo que os extratos alcoólicos das espécies apresentaram melhor atividade e maior espectro de ação quando comparadas aos outros extratos (Albuquerque et al., 2017).

Com relação aos meios de cultura utilizados nos testes de suscetibilidade, o Ágar Mueller-Hinton é o mais recomendado para a realização segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais dos Estados Unidos (CLSI, 2012), pois possui proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e nível adequados de cálcio e magnésio evitam resultados falsos de sensibilidade e resistência (MBiolog, 2014).

Material e métodos

Coleta e Preparação do Extrato

A coleta do material foi realizada no município de Campos do Jordão, na colônia de férias Umuarama da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em 26 de setembro e 31 de novembro de 2017. As espécies, identificadas e depositadas no Herbário Mackenzie, encontram-se listadas na tabela 1.

Tabela 1 Lista das espécies botânicas coletadas e utilizadas nos ensaios de difusão em disco.

AMOSTRA	ESPÉCIE	DATA DE COLETA PARA O EXTRATO	COLETOR, NÚMERO	Nº DE TOMBO (MACK)
A	<i>cf. Neomitranthes</i> sp. Kausel ex D.Legrand	26/09/17	Vieira, LTA 457	2748
B	<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	26/09/17	Vieira, LTA 459	2750
C	<i>Siphoneugena</i> cf. <i>reitzii</i> D.Legrand.	26/09/17	Vieira, LTA 456	2747
D	<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	26/09/17	Vieira, LTA 458	2749
E	<i>Myrcia hartwegiana</i> (O.Berg) Kiaersk.	30/11/17	Vieira, LTA 460	2751
F	<i>Neomitranthes capivariensis</i> (Mattos) Mattos.	30/11/17	Vieira, LTA 461	2752
G	<i>Siphoneugena</i> cf. <i>reitzii</i> D.Legrand	30/11/17	Vieira, LTA 462	2753
H	<i>Myrcia</i> sp. DC.	30/11/17	Vieira, LTA 463	2754

Após a coleta, os ramos coletados foram secos em estufa a 45°C durante um período de 7 dias, após o qual as folhas foram trituradas em moinho de facas. O material pulverizado foi acondicionado

em frascos de vidro estéreis, vedados, e mantido à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento do uso. Cada amostra foi macerada durante uma semana à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com agitação diária, em solução hidroetanólica 50% (p/p), em proporção de 1g de pó da planta para 10g de solução extratora. Após a maceração, o material foi submetido a filtragem através de algodão e, posteriormente, papel de filtro. O extrato bruto assim obtido foi acondicionado em frascos de vidro estéreis e mantido em temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento do uso.

Todos os procedimentos para testes de sensibilidade foram baseados na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988) e no método padrão CLSI/M02-A11 (2012), adaptados onde necessário. Foi utilizada cepa de bactéria *Staphylococcus aureus selvagem*, com confirmação de identidade realizada através dos testes de catalase, DNase, coagulase e sensibilidade à novobiocina.

Preparação e inoculação das placas

O meio de cultura Mueller-Hinton foi preparado conforme as instruções do fabricante, esterilizado em autoclave, resfriado em banho-maria entre 45 e 50°C e, em fluxo laminar, vertido em placas de Petri estéreis e descartáveis de 90 mm de diâmetro de forma a garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm. Após resfriamento à temperatura ambiente (25°C), as placas foram armazenadas em geladeira até o momento do uso.

O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão direta em solução salina (cloreto de sódio 0,85%) de colônias de 24 h da bactéria *Staphylococcus aureus* selecionadas numa placa de ágar Mueller-Hinton. A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça estéril, e os microorganismos assim coletados foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril. Esta suspensão foi ajustada para turbidez equivalente à solução-padrão de McFarland 0,5.

Para inoculação das placas, em até 15 minutos após o ajuste de turbidez foi mergulhado um swab estéril de algodão na solução de inóculo, e girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar qualquer excesso de inóculo. Realizou-se a inoculação da superfície seca da placa de Petri com o meio Mueller-Hinton esfregando o swab de forma horizontal em todas as regiões, repetindo-se este procedimento por mais duas vezes e girando a placa aproximadamente 60° a cada vez, para assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Deixou-se a tampa entreaberta de três a cinco minutos.

Preparação das diluições-teste

A partir do extrato bruto, foram preparadas diluições-teste em caldo Mueller-Hinton ajustado para cátions, preparado de acordo com instruções do fabricante e esterilizado em autoclave, com armazenagem a 4°C até a utilização. Foi necessário o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como co-solvente durante a preparação das diluições com o intuito de evitar a precipitação das amostras.

Para a preparação das amostras, foi preparada uma primeira diluição (diluição 1) do extrato bruto em proporção 1:1 com caldo Mueller-Hinton e adicionado DMSO suficiente para se obter uma concentração de 10% do co-solvente. Assim, 2,5 mL de extrato hidroalcolólico bruto foram diluídos com 2,0 mL de caldo Mueller-Hinton e adicionados 0,5 mL de DMSO, totalizando um volume de 5 mL, a solução resultante sendo homogeneizada com auxílio do vórtex durante 10 segundos. A partir desta primeira diluição, foi realizada diluição seriada 1:1 com caldo Mueller-Hinton; assim sendo, 2,5 mL da diluição 1 foram diluídos com 2,5 mL de meio de

cultura e homogeneizados, para obtenção da diluição 2. O mesmo procedimento foi realizado até a obtenção de 5 diluições. As concentrações assim obtidas, considerando-se a concentração inicial em mg/mL no extrato bruto, encontram-se na tabela 2.

Discos

Para a preparação dos discos impregnados, foi utilizada a metodologia publicada em literatura (Farmacopéia Brasileira, 1988; Silveira et al., 2009), com modificações. Desta forma, discos de aproximadamente 5mm de diâmetros foram cortados em papel de filtro qualitativo com uso de perfurador de papel comum, e impregnados com as diluições-teste dos extratos vegetais, nas concentrações a serem testadas. Os ensaios foram realizados com três tempos de impregnação diferentes: 30 minutos (Ensaio 1); 1h30min (Ensaio 2); e 22 horas (Ensaio 3). Os discos assim impregnados foram colocados separados sobre placas de Petri e deixados à temperatura ambiente dentro do fluxo laminar para secagem.

Em cada placa de Petri inoculada, distribuíram-se igualmente, com auxílio de uma pinça estéril, cinco discos em sua superfície, de maneira que os diâmetros de centro para centro não excedessem 30mm. Cada disco foi depositado na superfície do meio fazendo uma leve pressão sobre eles para melhor aderência e fixação. As placas foram incubadas a 35°C por 24h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Leitura dos halos de inibição

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e os halos medidos em milímetros usando um paquímetro encostado na parte de trás da placa de Petri invertida, inspecionado cuidadosamente usando luz transmitida para identificar a presença de pequenas colônias ou de algum crescimento dentro do halo de inibição, sendo este medido incluindo o disco de papel de filtro.

Resultados e discussão

As diluições-teste utilizadas nos ensaios estão apresentadas na tabela 2. Os valores de concentração referem-se à concentração do extrato bruto considerando o peso inicial das folhas secas pulverizadas que sofreram a extração; portanto, um valor de 86,40 mg/mL significa que 86,40 mg de folhas secas pulverizadas extraídas, conforme metodologia descrita anteriormente, em volume de solvente hidroetanólico equivalente a 1mL, forneceram o resultado apresentados. Note-se que, devido à quantidade irregular de material vegetal disponível para os ensaios, as diluições de cada amostra não apresentam correspondência de uma para outra; por exemplo, a amostra D encontra-se muito mais concentrada do que a amostra H, mesmo em diluições metodologicamente equivalentes.

Tabela 2 Concentrações do extrato bruto inicial e das diluições-teste utilizadas nos ensaios.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO EXTRATO BRUTO (mg/mL)	DILUIÇÃO 1 (mg/mL)	DILUIÇÃO 2 (mg/mL)	DILUIÇÃO 3 (mg/mL)	DILUIÇÃO 4 (mg/mL)	DILUIÇÃO 5 (mg/mL)
A	172,79	86,40	43,20	21,60	10,80	5,40
B	143,03	71,52	35,76	17,88	8,94	4,47
C	163,83	81,92	40,96	20,48	10,24	5,12
D	200,00	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25
E	103,66	51,83	25,92	12,96	6,48	3,24
F	362,23	181,11	90,56	45,28	22,64	11,32
G	225,09	112,54	56,27	28,14	14,07	7,03
H	98,52	49,26	24,63	12,32	6,16	3,08

(A) cf. *Neomitrantes* sp. Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capiviensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (H) *Myrcia* sp. DC.

O uso de DMSO como co-solvente foi necessário devido à precipitação das amostras, quando muito concentradas, após diluição em caldo Mueller-Hinton puro. Na proporção de co-solvente utilizada para o preparo das diluições (10% v/v), os resultados obtidos com a Diluição 1 devem ser observados com cuidado, pois a concentração de DMSO encontra-se muito próxima ao limite de tolerância de *S. aureus*, de 11% (Jorge et al., 2009); da mesma forma, a concentração de etanol (solvente de extração) ainda é alta nesta primeira diluição (25%). A presença em conjunto destes dois solventes possivelmente influencia a atividade inibitória, podendo levar a resultados falso-positivo, e portanto optou-se por descartar resultados de inibição para esta primeira diluição-teste na análise de resultados. A tabela 3 apresenta as concentrações, em porcentagem, de DMSO e etanol presentes em cada diluição realizada.

Tabela 3 Concentração (em porcentagem) de solvente de extração (etanol) e co-solvente (DMSO) nas diluições testadas.

SOLVENTE	CONCENTRAÇÃO (%) NAS DILUIÇÕES				
	1	2	3	4	5
ETANOL	25,0	12,5	6,25	3,13	1,56
DMSO	10,0	5,0	2,5	1,25	0,63

Comparando-se os tempos de impregnação, é possível perceber que a sensibilidade é maior no tempo de 22h, sendo possível a detecção de inibição em amostra em concentrações a partir de 12,5 g/mL (amostra D), contrastando com a menor concentração de 50 mg/mL para a mesma amostra quando o disco é impregnado por 1h30min. Este é um fator importante neste estudo preliminar, pois a concentração das possíveis substâncias com atividade antibacteriana é muito pequena no extrato bruto, o que leva à necessidade de métodos que apresentem sensibilidade para detecção de atividade.

Tabela 4 Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição com impregnação de 1h30m (Ensaio 2).

AMOSTRAS	DILUIÇÃO				
	1	2	3	4	5
A	11,72	10,94	--	--	--
B	10,70	--	--	--	--
C	11,30	9,94	--	--	--
D	11,76	10,10	--	--	--
E	--	--	--	--	--
F	10,60	10,54	10,26	--	--
G	9,80	9,00	8,80	--	--
H	11,0	10,70	--	--	--

(A) cf. *Neomitrantes* sp. Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capiviensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (H) *Myrcia* sp. DC.

As amostras C e G referem-se ao mesmo indivíduo, *Siphoneugena* cf. *reizii* D. Legrand, amostrado em épocas diferentes, sendo a amostra C proveniente de uma coleta de seca e G, coleta de período chuvoso. A diferença nos resultados poderia ser creditada, neste caso, à diferença em composição química decorrente das variações sazonais, pois sabe-se que as condições climáticas podem influenciar a formação de metabólitos secundários nas plantas (Reis & Mariot, 2002).

Analisando os resultados, observa-se que praticamente todos os extratos apresentam alguma atividade inibitória, em diferentes concentrações, comprovando que a ferramenta utilizada de difusão em disco mostrou-se eficaz para a determinação de sensibilidades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*.

Tabela 5 Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição com impregnação de 22h (Ensaio 3).

AMOSTRAS	DILUIÇÃO				
	1	2	3	4	5
A	12,46	10,78	--	--	--
B	12,26	10,16	--	--	--
C	10,64	10,70	--	--	--
D	14,52	13,26	11,8	12,22	--
E	10,54	--	--	--	--
F	12,28	11,24	10,88	10,36	--
G	12,18	10,72	11,14	--	--
H	11,76	10,90	--	--	--

(A) cf. *Neomitrantes* sp. Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capiviensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (H) *Myrcia* sp. DC.

Tabela 6 Concentração em mg/mL das amostras apresentando halos de inibição no Ensaio 2 (impregnação de 1h30 min).

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL) NAS DILUIÇÕES				
	1	2	3	4	5
A	86,40	43,20	--	--	--
B	71,52	--	--	--	--
C	81,91	40,96	--	--	--
D	100,00	50,00	--	--	--
E	--	--	--	--	--
F	181,11	90,56	45,28	--	--
G	112,54	56,27	28,14	--	--
H	49,26	24,63	--	--	--

(A) cf. *Neomitrantes* sp. Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capiviensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (H) *Myrcia* sp. DC.

Percebe-se que praticamente todos os extratos apresentam alguma atividade inibitória, em diferentes concentrações. O melhor potencial antibacteriano é apresentado pela amostra D (*Myrcia splendens* (Sw.) DC.), com formação de halo de inibição a uma concentração de 12,50 mg/mL de folhas pulverizadas. Esta espécie é a mesma da amostra B, que apresentou halo em uma concentração de 40,96 mg/mL mas com concentrações maiores de co-solvente e solvente de extração (5% e 12,5%, respectivamente). A diferença nos resultados pode ser devida tanto à diferença na amostragem (o indivíduo B teve coleta menor devido às condições da planta), como ao fato de, por serem indivíduos diferentes, poderem apresentar constituição química individual com diferenças suficientes para apresentar resultados diversos neste tipo de ensaio preliminar. Não se podem descartar também interferências decorrentes do processo de secagem e extração das amostras.

Tabela 7 Concentração em mg/mL das amostras apresentando halos de inibição no Ensaio 3 (impregnação de 22h).

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL) NAS DILUIÇÕES				
	1	2	3	4	5
A	86,40	43,20	--	--	--
B	71,52	35,76	--	--	--
C	81,91	40,96	--	--	--
D	100,00	50,00	25,00	12,50	--
E	51,83	--	--	--	--
F	181,11	90,56	45,28	22,64	--
G	112,54	56,27	28,14	--	--
H	49,26	24,63	--	--	--

(A) cf. *Neomitrantes* sp. Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capiviensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena* cf. *reizii* D.Legrand; (H) *Myrcia* sp. DC.

Para efeito comparativo, a tabela 8 traz resultados de ensaios de determinação de Concentração Inibitória Mínima realizados pelo método da microdiluição em caldo nos mesmos extrato, em um estudo paralelo por outros membros do grupo de pesquisa. É possível perceber que as atividades detectadas pelo método de difusão em disco foram confirmadas, embora pelas diferenças metodológicas não seja possível uma comparação direta dos resultados

Tabela 8 Concentração em mg/mL das amostras apresentando halos de inibição no Ensaio 3 (impregnação de 22h).

AMOSTRA	ESPÉCIE	CIM [†] (mg/mL)*
A	<i>cf. Neomitranthes</i> sp. Kausel ex D. Legrand	1,080 - 0,540
B	<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	0,894 - 0,447
C	<i>Siphoneugena</i> cf. <i>reitzii</i> D. Legrand.	1,024 - 0,512
D	<i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.	5,0 - 2,5
E	<i>Myrcia hartwegiana</i> (O.Berg) Kiaersk.	1,296 - 0,648
F	<i>Neomitranthes capivariensis</i> (Mattos) Mattos.	4,528 - 2,264
G	<i>Siphoneugena</i> cf. <i>reitzii</i> D. Legrand.	2,814 - 1,407
H	<i>Myrcia</i> sp. DC.	0,616 - 0,308
ampicilina ¹		0,2 - 0,1 µg/mL
DMSO		12,5 - 11% ¹

* Concentração relativa ao peso das folhas pulverizadas extraídas

[†] Dados sem precisão devido à formação de precipitado

¹ Jorge et al., (2009)

Conclusão

Os resultados mostraram que existe atividade antimicrobiana detectável em todas as amostras vegetais contra cepas selvagens de *Staphylococcus aureus*. A espécie *Myrcia splendens* (Sw.) DC. apresenta os resultados mais promissores nestes testes preliminares, seguida por *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos, sugerindo a viabilidade de estudos mais aprofundados de atividade antimicrobiana. Já a espécie *Siphoneugena* cf. *reitzii* D. Legrand apresenta resultados de inibição diferentes conforme a época de coleta, sugerindo a influência das condições climáticas sobre sua composição química. O tempo de impregnação dos discos pode influenciar nos resultados, sendo que o maior tempo testado (22h) levou aos resultados de maior sensibilidade.

O estudo concluiu que o método de difusão em disco mostrou-se efetivo, sendo um métodos simples, confiável e econômico para determinação preliminar de sensibilidades antimicrobianas dos extratos vegetais.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do PIBIC Mackenzie. Parte do estudo foi realizado de forma paralela ao projeto MackPesquisa n° 171035.

Conformidade com padrões éticos e legais: Submetemos ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado e fomos registrados no SisGen, em conformidade com o disposto na Lei 13.123/ 2015 sob o número de certificado A6E66F0.

Referências

- Albuquerque, F. H. C., Soares, K., & Oliveira, M. A. S. 2017. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos das folhas de espécies da família Myrtaceae frente à cepas de bactérias de interesse. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 16(2), 139-145. DOI: 10.9771/cmbio.v16i2.17989.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4):493–496. DOI: 10.1093/ajcp/45.4ts.493
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. 2016. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 190 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2018. Portaria N° 64, de 11 de dezembro de 2018. Determina aos laboratórios da rede pública e rede privada, de todas as Unidades Federadas, a utilização das normas de interpretação para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), tendo como base os documentos da versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Diário Oficial da União, 240(Seção 1), p. 59.
- BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Teste sensibilidade aos antimicrobianos. Método de Disco-Difusão EUCAST. Versão 6.0.
- Farmacopéia Brasileira*. 1988. 4ª ed. Parte 1. São Paulo:Ateneu.
- Hawkey, P.M. 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(suppl_1):1–9. DOI: 10.1093/jac/dkn241.
- CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão. Recuperado em 18 de novembro de 2018, de http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf.
- Jorge, S.D., Masunari, A., Rangel-Yagui, C.O., Pasqualoto, K.F.M., & Tavares, L.C. 2009. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(8), 3028-3036. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.03.011
- Lima, M.E.L., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobra, M. E., & Moreno, P.R.H. 2006. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State-Brazil. *Pharmacologyonline*, 3, 589-593.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Machado, A. & Gales, A. Interpretação de dados microbiológicos. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Uso Racional de Antimicrobianos para Prescritores. Módulo 2. Recuperado em 30 de agosto de 2018, de http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/htm.
- MBIOLOG Diagnósticos. Mueller Hinton. Recuperado em 23 de novembro de 2018, de <http://www.mbiolog.com.br/site/wp-content/uploads/2012/07/Bula-Agar-Mueller-Hinton-vs02.pdf>.

- Mendonça, K.F., Carneiro, J.K.R., & Oliveira, M.A.S. 2018. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso, hidroalcoólico e alcoólico de folhas de espécies da família Lamiaceae. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, 4:7072. DOI 10.26694/repis.v4i0.7072.
- NCCLS. 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Wayne, PA: NCCLS.
- Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O. & Freitas, B.R. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301–307. DOI 10.1590/S0102-695X2008000200026.
- Reis, M. & Mariot, A. 2002. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: Simões, C.M.O et al. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. (4ª ed., pp. 41–62). Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC.
- Rosa, R.L., Barcelos, A.L.V., & Bampi, G. 2012. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D'Oeste-SC. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(2), 306–310. DOI10.1590/S1516-05722012000200009.
- Silveira, L.M.S, Olea, R.S.G., Mesquita, J.S., da Cruz, A.D.L.N. & Mendes, J.C. 2009. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Revista Brasileira de Farmácia*, 90(2), 124–128.
- Soares, L.A.V. & Pereira, S.B. 2016. Inibição bacteriana do extrato fluido de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville (barbatimão) sobre cepas selecionadas de *Staphylococcus aureus*. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, 5(1), 39–44.