

METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA APLICADAS A EXTRATO VEGETAL BRUTO (HIDROALCOÓLICO): COMPARAÇÃO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Bárbara Malachias da Silva (IC) e Ieda Yuriko Sonehara (Orientadora)

Apoio: PIVIC Mackenzie

RESUMO

Entre os métodos mais simples para a determinação de suscetibilidade microbiana encontram-se os de difusão em ágar. O objetivo do presente estudo foi comparar a eficiência entre duas destas técnicas quando utilizados em amostras de extrato vegetal hidroalcoólico bruto, como teste preliminar de suscetibilidade antibacteriana. O extrato vegetal utilizado no estudo foi obtido a partir de ramos com folhas de quatro indivíduos diferentes pertencentes a quatro espécies da família Myrtaceae, que possui vários estudos publicados comprovando a existência de atividade antibacteriana: *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk, *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos, *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand, e *Myrcia* sp. DC. Estas espécies foram coletadas na Trilha do Pomar da colônia de férias Umuarama da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em Campos do Jordão/SP. A partir destes extratos compararam-se as técnicas de difusão em discos e difusão em poços, as quais foram testados frente a cepa selvagem de *S. aureus*, seguindo metodologia descrita em literatura. Todas as amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana em menor ou maior grau frente a esta cepa. Concluiu-se que os dois métodos de difusão em ágar são eficientes, porém a técnica de difusão em poços demonstrou halos de inibição melhor definidos e maior sensibilidade quando comparado à técnica de difusão em discos.

Palavras-chave: Disco-difusão. Poço-difusão. Teste de suscetibilidade.

ABSTRACT

Agar diffusion methods are among the simplest methods for the determination of bacterial susceptibility. The objective of the present study was to compare the efficiency between two agar diffusion techniques when used on raw hydroalcoholic plant extracts as a preliminary method to determine antimicrobial susceptibility. Plant extracts were obtained from four different individuals belonging to four species from the Myrtaceae family, which has several published studies demonstrating their antibacterial activity: *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk, *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos, *Siphoneugena cf. reitzii* D. Legrand, and *Myrcia* sp. D.C. These specimens were collected at the Pomar trail located in Mackenzie Presbyterian University Umuarama vacation colony in Campos do Jordão/SP. Using these extracts, disc and well agar diffusion techniques were compared by testing susceptibility against a wild strain of *S. aureus*, according to methodology described in literature. All tested

samples showed antimicrobial activity to a lesser or greater degree against this strain. It was concluded that the two agar diffusion methods are efficient, although the well diffusion technique showed better-defined inhibition halos, and greater sensibility when compared to disc diffusion assays.

Keywords: Disk-diffusion. Well-diffusion. Susceptibility test.

1. INTRODUÇÃO

Na pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana, testes preliminares qualitativos e com facilidade de execução podem ser de grande utilidade para uma triagem inicial de compostos a serem posteriormente investigados em mais detalhes. Quando se trata de extratos vegetais, estas técnicas podem eventualmente auxiliar na determinação de qual fração de um extrato possui maior potencial antimicrobiano, e também servir como um parâmetro para auxiliar na definição da concentração de partida nos testes de potência antimicrobiana (determinação de Concentração Inibitória Mínima, CIM).

As técnicas mais utilizadas em testes de sensibilidade são os testes de difusão em ágar, sendo que um teste rotineiro mesmo em laboratórios de microbiologia clínica utiliza o método de disco-difusão em ágar (ou difusão em disco) (NCCLS, 2003). Este mesmo método foi proposto por vários autores para verificar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, como Nascimento *et al.* (2000) e Karaman *et al.* (2003). Uma alternativa a este método é o teste de sensibilidade por difusão em poço, também chamado difusão em ágar perfurado (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Considerando que a busca por novos compostos com atividades biológicas de interesse tem muitas vezes se voltado para o estudo de substâncias presentes em plantas (BARREIRO, BOLZANI, 2009; VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2006), compreende-se a necessidade por metodologias que possam ser utilizadas diretamente em extratos vegetais. A simples comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores, muitas vezes em diferentes institutos de pesquisa, que avaliam o mesmo tipo de atividade com uso de diferentes amostras e metodologias pode levar a um desvio na análise final de resultados; variáveis como método de obtenção dos extratos, espécie de microorganismo utilizada, concentração da amostra e do inóculo e método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana podem interferir com os resultados, e idealmente devem ser mantidas constantes em um dado estudo (KING *et al.*, 2008; RÍOS *et al.*, 1988).

Pode-se dizer, portanto, que existe uma necessidade de se determinar a validade da comparação de resultados com o uso de diferentes metodologias, mantendo-se o restante das condições de ensaio inalteradas. Considerando que o método de difusão em ágar padronizado tanto pelo CLSI (2009) como pelo EUCAST (2017) é o de difusão em disco, porém a técnica de difusão em poços também é utilizada em extratos vegetais, houve o interesse na comparação entre estes dois métodos para verificar aspectos como facilidade de execução, sensibilidade e adequação para uso na detecção de atividade antimicrobiana em extrato vegetal hidroalcoólico. Para tanto, foram utilizados extratos de quatro espécies de plantas da família *Myrtaceae* encontradas na colônia de férias da Universidade

Presbiteriana Mackenzie, em Campos do Jordão/SP: *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk, *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos, *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand, e *Myrcia sp.* DC., sendo que estas espécies já se encontram identificadas e depositadas no Herbário da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

A escolha de Myrtaceae deveu-se ao fato de que esta família apresenta grande número de espécies de interesse por suas propriedades terapêuticas e farmacológicas (LIMA *et al.*, 2006), apresentando atividades antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, cicatrizante, anti-séptica e antidiarréicas (LORENZI, MATOS, 2002).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Existem, atualmente, vários métodos para avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição. Os métodos de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (NCCLS, 2003). Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos vegetais, tem-se utilizado mais frequentemente o método de microdiluição em caldo (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A importância de uniformização dos métodos de extração e testes *in vitro* é essencial para que a pesquisa possa ser mais eficiente, e a interpretação dos resultados, mais facilitada e confiável (COWAN, 1999). As normatizações conhecidas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (EUCAST) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são as mais comumente utilizadas como base para testes de suscetibilidade antimicrobiana. Estas diretrizes são direcionadas de modo específico para antimicrobianos com parâmetros já conhecidos, sendo atualmente adaptadas para uso no estudo de atividade de extratos vegetais (BONA *et al.*, 2014).

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966 por Bauer, Kirby e Truck, e fornece resultados qualitativos da atividade antimicrobiana. A metodologia tem o princípio no uso de discos de papel impregnado com o agente antimicrobiano, os quais são colocados na superfície do ágar uniformemente semeado com o microrganismo; após essa etapa verifica-se a presença ou ausência de um halo de inibição. As medições do diâmetro dos halos de inibição formados são normalmente correlacionadas às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) obtidas com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (XIMENES, 2009). Os diâmetros medidos são interpretados em tabelas de

referência, como por exemplo as tabelas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, Estados Unidos da América).

A metodologia de difusão em poços é uma técnica de perfuração em ágar; a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY *et al.*, 2008). Fundamenta-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido inoculado com o microorganismo, com posterior medida dos halos de inibição como realizado no método de difusão em disco.

Os meios de cultura utilizados nessas técnicas devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos a serem estimulados e não obter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana em estudo. No método de difusão a concentração do ágar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios (PINTO *et al.*, 2003). Entre os meios de cultura utilizados para teste de suscetibilidade de bactérias, o Müller-Hinton é o mais citado, porém outros meios utilizados são caseína-soja (TSA e TSB) e Luria-Bertani (OSTROSKY *et al.*, 2008).

3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada seguiu as determinações CLSI (2009), EUCAST (2017), e procedimentos descritos em artigos com foco em extratos vegetais (BONA *et al.*, 2014; OSTROSKY *et al.*, 2008), com as adaptações necessárias.

3.1 Preparação dos extratos vegetais e diluições-teste

As espécies avaliadas foram coletadas na Colônia de Férias Umuarama da Universidade Presbiteriana Mackenzie, localizada no município de Campos do Jordão (SP), como parte do Projeto MackPesquisa nº 171035 (SONEHARA *et al.*, 2018). O material foi desidratado em estufa a 45°C por um período de 5 dias, e em seguida submetido à trituração por meio de moinho de facas. O pó assim obtido foi armazenado em frascos estéreis bem vedados, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e umidade, até o momento do uso.

O extrato vegetal bruto foi preparado seguindo métodos farmacopéicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), com o material triturado sendo macerado em proporção 1:10 (p/p) utilizando-se como solvente uma solução hidroetanólica 50%. A maceração ocorreu por um período de 7 dias, com agitação diária, ao final do qual foi realizada filtração através de algodão, repetida caso necessário para a retirada completa de resíduos. O extrato bruto assim obtido foi armazenado em frascos estéreis, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para cada extrato a ser testado, prepararam-se soluções-mãe através de diluição 1:1 do extrato bruto com caldo Mueller-Hinton contendo DMSO (co-solvente) suficiente para totalizar 10% do volume final da solução-mãe; assim, para a obtenção de 5 mL de solução-mãe, 2,5 mL de extrato bruto foram diluídos com 2,0 mL de caldo Mueller-Hinton e acrescentados 0,5 mL de DMSO.

As diluições a serem testadas foram preparadas através de diluição seriada 1:1 a partir da solução-mãe. Para tanto, tomou-se uma alíquota de 2mL da solução-mãe, transferindo-a para um frasco estéril e acrescentando-se 2 mL de caldo Mueller-Hinton; após homogeneização, 2 mL desta solução foram transferidos para novo frasco, completando-se este com 2 mL de caldo Mueller-Hinton; e assim sucessivamente, para a obtenção de quatro diluições de trabalho. Estas diluições de trabalho e mais a solução-mãe foram denominadas “diluições-teste” (D1 a D4).

3.2 Atividade Antimicrobiana

3.2.1 Confirmação de identidade e viabilidade da cepa

Foram realizados 3 testes para confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* utilizada, que se encontrava armazenadas no banco de cepas da Universidade Presbiteriana Mackenzie desde o segundo semestre de 2015.

Teste da Catalase (H₂O₂)

Plaqueou-se uma pequena quantidade da bactéria em lâmina de vidro, acrescentando-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

POSITIVO: Se houver alguma reação (borbulhar) significa que a bactéria é Gram-positiva, comprovando ser *Staphylococcus*.

NEGATIVO: Caso contrário é classificada como Gram-negativa, portando poderia ser *Streptococcus* ou *Enterococcus*.

Coagulase (Staphy Test)

Em uma lâmina foi colocada uma gota do Staphy test REAGENTE, e misturado com uma alça de bactéria (de maneira circular). Em outra lâmina foi colocada uma gota do Staphy test CONTROLE, e misturado com uma alça de bactéria (de maneira circular).

Staphy-test R= reativo propriamente dito (fibrinogênio e hemolisina)

Staphy-test C= é o controle (não sensibilizada com fibrinogênio e hemolisina).

Princípio: capacidade do *Staphylococcus* aglutinar hemácias de carneiro previamente sensibilizados com fibrinogênio e hemolisina.

POSITIVO: quando em 5 segundos no Staphy- test R é positivo e no Staphy-test C é negativo.

NEGATIVO: quando em 5 segundos o resultado é negativo em ambos Staphy-test.

DNAse (ágar base)

Em uma placa de ágar base, foi semeado um pouco da bactéria e incubado em estufa a 37°C durante 3 dias. Após este período, adicionou-se quantidade suficiente de HCl para verificar o resultado.

POSITIVO: Não haverá turvação no líquido nas laterais da colônia bacteriana

NEGATIVO: Haverá turvação na placa nas laterais da colônia bacteriana

3.2.2 Preparação dos meios de cultura

O meio de cultura foi preparado a partir de base desidratada de ágar Mueller-Hinton disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante. Imediatamente após esterilização em autoclave, foi resfriado até 45° a 50°C antes da distribuição em placas de Petri descartáveis e estéreis de 90 mm de diâmetro. O meio foi devidamente distribuído em uma superfície horizontal, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm (aproximadamente 25 mL em uma placa circular de 90 mm de diâmetro).

As placas assim preparadas foram armazenadas em geladeira (2 a 8°C), exceto quando utilizada no mesmo dia. As placas foram usadas até sete dias após a preparação, tomadas as precauções adequadas, como embrulhá-las em plástico, para minimizar o ressecamento do ágar. Examinou-se uma amostra representativa de cada lote de placas para confirmar sua esterilidade, mediante a sua incubação a 35°C durante 24 horas.

3.2.3 Preparação do inóculo e inoculação das placas de ágar

A preparação do inóculo seguiu os procedimentos descritos nas metodologias NCCLS M2-A8 e CLSI M02-A11, com pequenas modificações; assim, foram escolhidas cinco colônias de *S. aureus*, com diâmetro aproximado de 1 mm, de cultura de 24 horas em ágar Mueller-Hinton, que foram colhidas com uso de *swab* estéril e suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,85%. A suspensão foi colocada em agitador de vórtex por 15 segundos e sua densidade celular ajustada com solução salina estéril a 0,85% suficiente para obter-se turbidez equivalente a uma solução-padrão McFarland 0,5.

Em até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo, mergulhou-se um *swab* de algodão estéril na suspensão. O *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do frasco, acima do nível do líquido. Isso foi com intuito de ajudar a

retirar qualquer excesso de inóculo no swab. A superfície seca da placa com o meio ágar Mueller-Hinton foi inoculada esfregando-se o swab em toda a superfície do ágar. Repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° a cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se um swab na margem da placa de ágar.

3.2.4 Teste de suscetibilidade por difusão em disco

Para a preparação dos discos impregnados foi utilizada metodologia publicada em literatura (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; SILVEIRA *et al*, 2009), com modificações. Assim, discos foram obtidos a partir de papel de filtro qualitativo, perfurado com furador de papel comum e resultando em discos uniformes de diâmetro aproximado de 5mm. Os discos foram impregnados com as diluições-teste dos extratos vegetais por trinta minutos. Os discos assim impregnados foram colocados em uma placa de Petri, separadamente de modo a facilitar a circulação de ar entre eles, e secos ao ar em fluxo laminar. Após a secagem, foram guardados em frascos estéreis vedados até o uso.

Foram aplicados 5 discos em cada placa de meio de cultura inoculado, distribuídos por igual; estes discos corresponderam às cinco diluições-teste de uma determinada espécie. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. As placas foram incubadas invertidas, em estufa a 35°C, em até 15 minutos após a aplicação dos discos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após 24 horas de incubação, os halos formados foram medidos usando um paquímetro, que foi encostado na parte de trás da placa de Petri invertida.

3.2.5 Teste de suscetibilidade por difusão em poço

Na técnica de perfuração em ágar, placas previamente inoculadas tiveram removidas pequenas porções do meio de cultura sólido para a formação de poços. Esta remoção foi realizada com o fundo de ponteiras esterilizadas de 5mL, cujo diâmetro foi adequado para a formação de poços regulares de aproximadamente 5 mm, nos quais foi possível aplicação dos extratos a serem analisados. Os poços foram preenchidos com 100 µL das diluições-teste, e levadas para a estufa a 35°C por 24 horas. Após esse tempo, o diâmetro dos halos de inibição foi medido, em milímetros, com um paquímetro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 traz os dados das espécies coletadas e identificadas que foram utilizados no presente estudo.

Tabela 1 – Dados dos espécimes utilizados no estudo

AMOSTRA	ESPÉCIE	DATA DE COLETA	COLETOR, NÚMERO	Nº DE TOMBO (MACK)
E	<i>Myrcia hartwegiana</i> (O.Berg) Kiaersk.	30/11/2017	Vieira, LTA 460	2751
F	<i>Neomitranthes capivariensis</i> (Mattos) Mattos.	30/11/2017	Vieira, LTA 461	2752
G	<i>Siphoneugena</i> cf. <i>reitzii</i> D.Legrand.	30/11/2017	Vieira, LTA 462	2753
H	<i>Myrcia</i> sp. D.C.	30/11/2017	Vieira, LTA 463	2754

FONTE: SONEHARA *et al.*, 2018.

4.1 Confirmação de identidade e viabilidade da cepa

Foram realizados três diferentes testes de identificação para espécies Gram-Positivo, com cepas identificadas como sendo *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*.

Teste da Catalase (H₂O₂)

No teste da Catalase todos os resultados deram positivo, pois houve alguma reação (borbulhas) significativa, comprovando serem os microorganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, conforme a Figura 1. Observou-se que a lâmina que apresentava *Staphylococcus aureus* demonstrou reação mais proeminente (Figura 2).

Figura 1 – Teste da Catalase. Da esquerda para a direita: *S. aureus*; *S. saprophyticus*; *S. epidermidis*. Ensaio em duplicata.



Figura 2 – Teste da Catalase: *Staphylococcus aureus* positivo.



Coagulase (Staphy Test)

O Staphy Test foi realizado em cepas identificadas como *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus* e *epidermidis*, com os resultados sendo apresentados na Figura 3. A espécie *S. aureus* adquiriu um resultado ideal comparado as outras espécies (Figura 4), pois teve o resultado positivo (quando em 5 segundos o Staphy-test R é positivo e o Staphy-test C é negativo), enquanto que as demais apresentaram resultados negativos (quando em 5 segundos ambos Staphy-test são negativos).

Figura 3 – Testes de Coagulase (Staphy test): *Staphylococcus sp* positivo. Da esquerda para a direita: *S. aureus*; *S. saprophyticus*; *S. epidermidis*. Ensaios em duplicata.

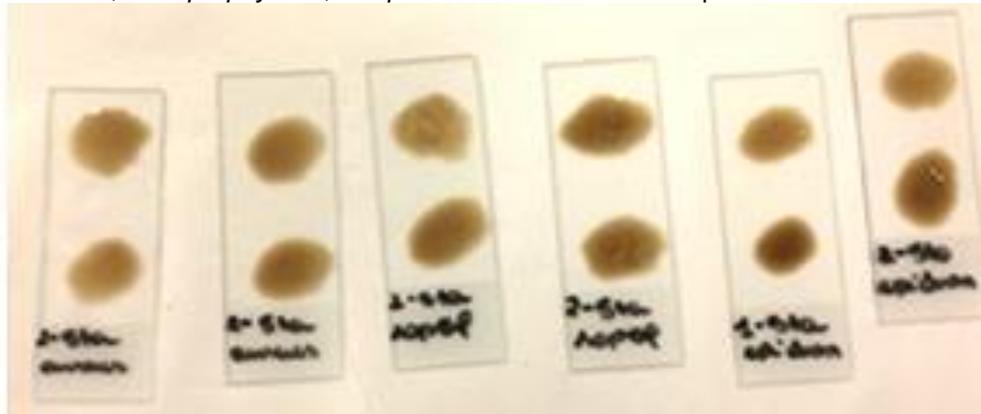
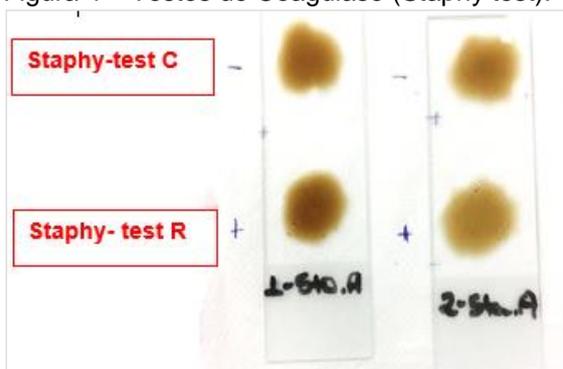


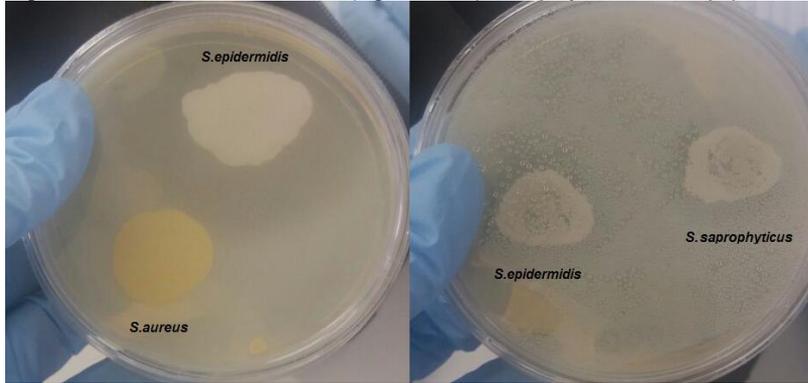
Figura 4 – Testes de Coagulase (Staphy test): *Staphylococcus aureus* positivo



DNase (ágar base)

Após o crescimento das bactérias em placas de Petri, adicionou-se quantidade suficiente de HCl e verificou-se que todos os resultados são positivos (ausência de turvação no líquido), como mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Testes de DNase (ágar base): *Staphylococcus sp* positivo



Conforme os resultados apresentados pelos testes de identificação das espécies de bactérias, foi determinado que a cepa de bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* existente no banco de cepas seria adequada para os ensaios.

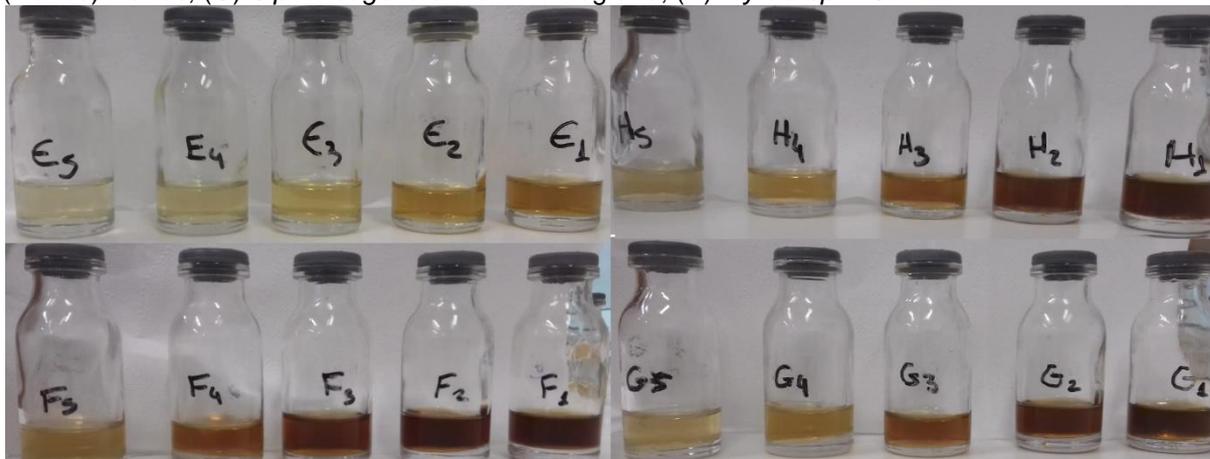
4.2 Resultados da aferição e interpretação dos diâmetros dos halos de inibição das técnicas de difusão

As diluições-teste utilizadas nos ensaios de difusão, tanto em disco como em poço, estão apresentadas na Tabela 2, enquanto a Figura 6 ilustra as diluições feitas por estes extratos para realização do procedimento. 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 51,83 mg/mL significa que 51,83 mg de folhas secas pulverizadas extraídas, conforme metodologia descrita anteriormente, em volume de solvente hidroetanólico equivalente a 1mL, forneceram o resultado dos ensaios descritos.

Tabela 2 – Concentrações do extrato bruto inicial e das diluições-teste utilizadas nos ensaios. (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

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)
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

Figura 6 – Diluições-teste. (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC



O uso de DMSO como co-solvente foi necessário devido à precipitação das amostras quando diluídos em caldo Mueller-Hinton puro. Na proporção de co-solvente utilizada para o preparo da amostra (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 provavelmente influencia a atividades inibitória, diminuindo a confiabilidade dos resultados nesta diluição.

Na Figura 7 podem-se observar as placas com o método de difusão em disco. A Tabela 3 resume os resultados dos ensaios de difusão em disco, com as respectivas triplicatas. Os resultados para a amostra E foram considerados negativos, levando-se em conta a concentração do co-solvente (DMSO) e do solvente de extração (etanol); o resultado E2 nas diluições-teste 4 e 5 foi descartado devido à incoerência, não sendo possível a inibição apenas em concentrações mais diluídas, sem inibição nas mais concentradas. Os demais resultados foram considerados válidos. A Tabela 4 e o Gráfico 1 trazem os resultados consolidados das triplicatas.

Figura 7 – Placas com o método de difusão em disco.

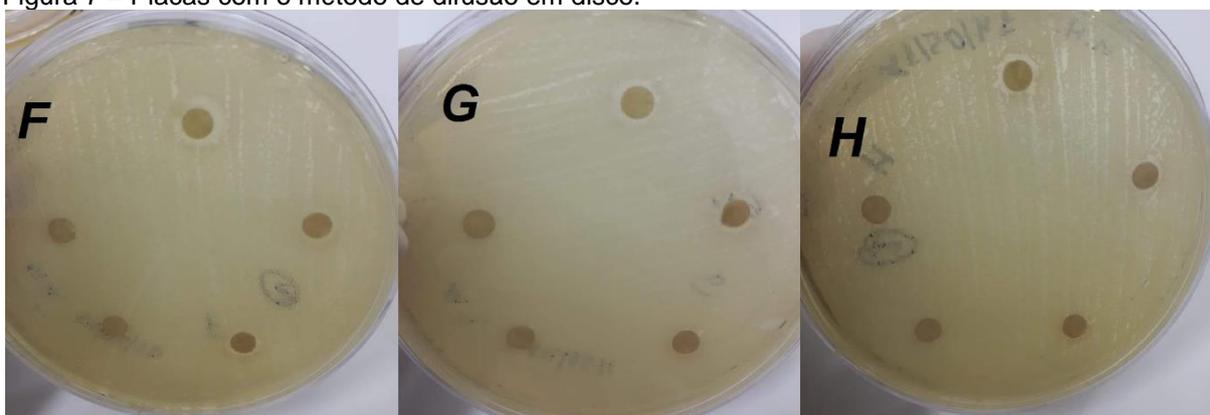


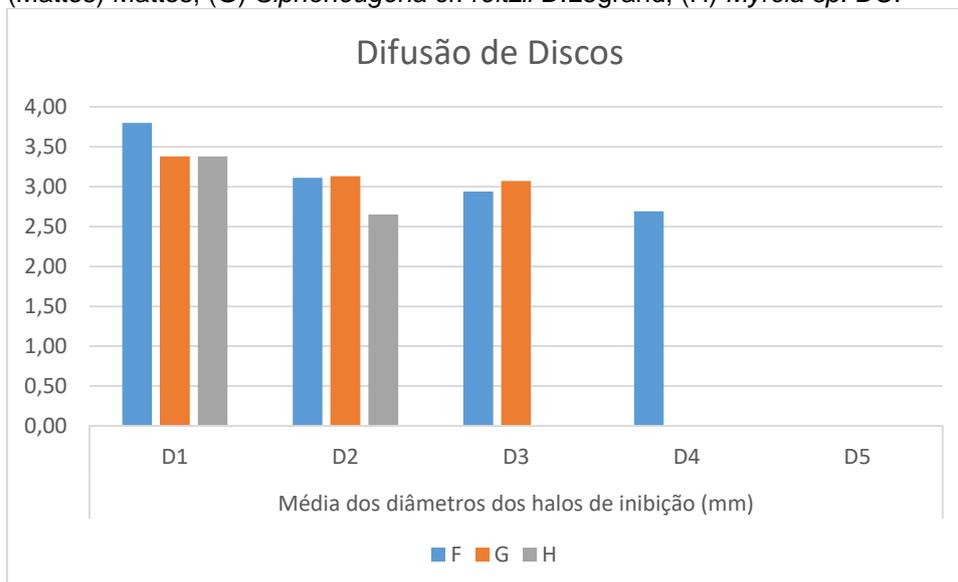
Tabela 3 – Resultados dos ensaios de difusão em disco - triplicatas. (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

AMOSTRA	TRIPLICATA	DILUIÇÃO 1 (mm)	DILUIÇÃO 2 (mm)	DILUIÇÃO 3 (mm)	DILUIÇÃO 4 (mm)	DILUIÇÃO 5 (mm)
E	E1	2,77	-	--	--	--
	E2	2,77	--	--	8,00	3,53
	E3	--	--	--	--	--
F	F1	3,76	3,02	2,66	2,56	2,56
	F2	3,52	3,09	3,09	2,70	--
	F3	4,11	3,22	3,08	2,80	--
G	G1	3,67	3,67	3,00	--	--
	G2	3,52	2,78	--	--	--
	G3	2,95	2,94	3,14	--	--
H	H1	3,52	2,88	--	--	--
	H2	3,36	3,00	--	--	--
	H3	3,26	2,07	--	--	--

Tabela 4 – Média dos valores dos resultados de difusão em disco. (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

AMOSTRAS	MÉDIA DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm)				
	D1	D2	D3	D4	D5
F	3,80	3,11	2,94	2,69	--
G	3,38	3,13	3,07	--	--
H	3,38	2,65	--	--	--

Gráfico 1 – Média dos valores dos resultados de difusão em disco. (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.



A Tabela 5 resume os resultados dos ensaios de difusão em poço, com as respectivas triplicatas.

Tabela 5 – Resultados dos ensaios de difusão em poço - triplicatas. (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

AMOSTRAS	TRIPLICATA	DILUIÇÃO 1 (mm)	DILUIÇÃO 2 (mm)	DILUIÇÃO 3 (mm)	DILUIÇÃO 4 (mm)	DILUIÇÃO 5 (mm)
E	E1	--	--	--	--	--
	E2	--	--	--	--	--
	E3	--	--	--	--	--
F	F1	8,31	5,24	3,98	--	--
	F2	8,74	6,87	5,46	--	--
	F3	7,87	5,98	3,60	--	--
G	G1	7,67	5,80	5,50	--	--
	G2	7,88	6,06	4,55	--	--
	G3	7,78	6,26	4,73	--	--
H	H1	8,09	5,76	4,47	--	--
	H2	7,60	--	--	--	--
	H3	--	--	--	--	--

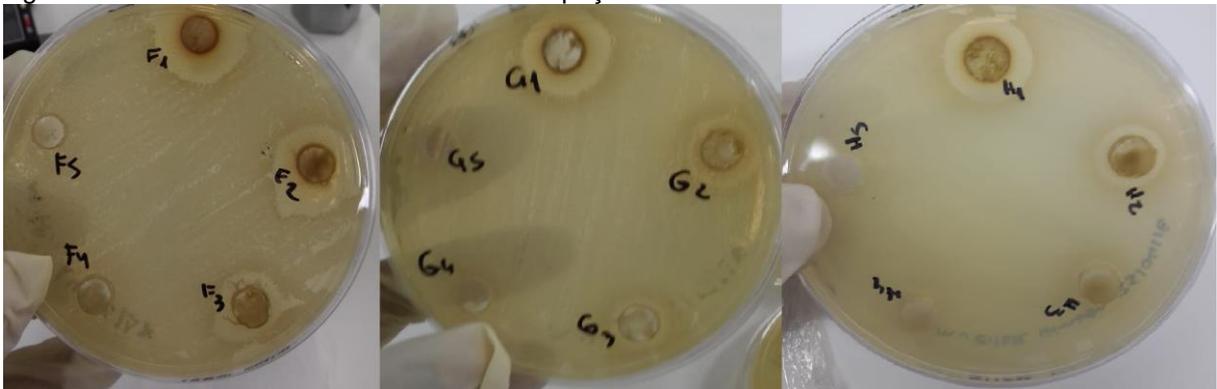
Observou-se durante o estudo que existe uma dificuldade na perfuração dos poços de forma homogênea, formando paredes retas e sem causar a perfuração total (até o fundo) da placa inoculada. É necessário um grande cuidado neste procedimento, o que pode ser considerado uma desvantagem em relação ao ensaio com uso de discos, onde não foram detectados problemas na técnica utilizada para obtenção de discos uniformes. Concluiu-se que a reprodutibilidade é mais problemática quando se usa esta técnica, uma vez que existe uma dependência direta da capacidade de perfurar os poços de forma uniforme em todos os ensaios.

Percebeu-se que a formação de halos é muito mais nítida com o uso de poços, formando halos de inibição de maior diâmetro (Figura 8). Pode-se relacionar este resultado ao fato de haver uma difusão muito mais eficiente quando existe o contato do extrato testado com o ágar em praticamente toda sua profundidade, ampliando o alcance do efeito inibitório de crescimento e resultando em maior área livre de microorganismos. De acordo com Vanden Berghe & Vlietibck (1991) o método de poços é o mais adequado para testar a difusão de substâncias em extratos hidroalcoólicos de plantas. Isso porque está relacionada com o transporte da propriedade do extrato vegetal pelo solvente hidroalcoólico no meio ágar, facilitando um resultado mais evidente. Enquanto no método de discos o solvente

hidroalcoólico pode ser evaporado no ato da aplicação na superfície do ágar diminuindo a condução da propriedade da planta no meio.

Houve a precipitação dos extratos da amostra E durante o período de incubação, apesar da presença do co-solvente; embora esta precipitação não invalide completamente o resultado quando existe o halo de inibição, há sem dúvida um desvio que pode ser significativo na comparação da eficiência de inibição entres as diferentes amostras. Este é um caso típico em que o uso da técnica de difusão em disco é mais adequada, uma vez que a precipitação desta amostra não ocorreu durante os trinta minutos necessários para a impregnação dos discos.

Figura 8 – Placas com o método de difusão de poços.

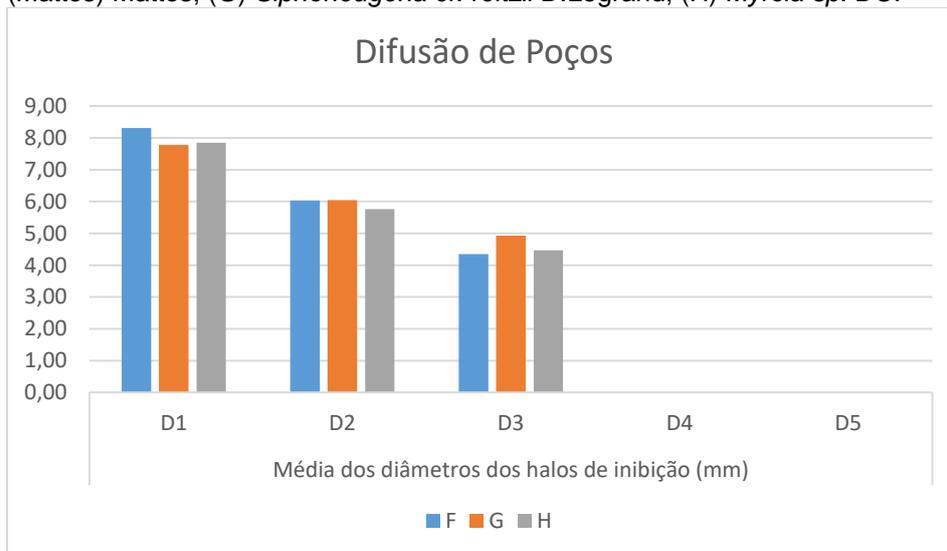


A Tabela 6 e o Gráfico 2 mostram os valores médios consolidados dos resultados dos ensaios.

Tabela 6 – Média dos valores dos resultados de difusão em poço. (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

AMOSTRAS	MÉDIA DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm)				
	D1	D2	D3	D4	D5
F	8,31	6,03	4,35	--	--
G	7,78	6,04	4,93	--	--
H	7,85	5,76	4,47	--	--

Gráfico 2 – Média dos valores dos resultados de difusão em Poços. (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.



Consolidando os dados dos ensaios e considerando a concentração dos extratos nas diluições testadas (Tabela 2, pág. 11), observa-se que nos ensaios de difusão em disco, a atividade inibitória é detectada para as três amostras a partir de concentrações na faixa de 22 - 28 mg/mL, sendo a melhor inibição detectada no extrato F, *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos (halo visível na diluição 4; 22,64 mg/mL). Enquanto que nos ensaios de difusão em poço, é detectada inibição na concentração de 12,32 mg/mL no extrato H, *Myrcia sp.* DC (diluição 3). Desta forma, pode-se concluir que há uma sensibilidade maior no teste de difusão em poço. Na metodologia de poço, houve melhor difusão das ações antimicrobianas, o que possibilitou a medição de halos maiores do que no teste de disco. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato da metodologia do poço propiciar mais facilidade de contato entre ações antimicrobianas e os micro-organismos testados (BONA, 2014).

O resultado destes testes, que foram concebidos como sendo preliminares à determinação de potência antimicrobiana pelo método de microdiluição (determinação de Concentração Inibitória Mínima, CIM), é coerente com os achados das análises realizadas dentro do escopo do Projeto MackPesquisa nº 171035 (SONEHARA *et al.*, 2018), que indicou a maior atividade inibitória contra *S. aureus* da amostra H, *Myrcia sp.* DC. A Tabela 7 traz os resultados de CIM do referido projeto para as amostras deste estudo; note-se que, por se tratarem de métodos de sensibilidades diferentes, não se pode fazer uma comparação direta (quantitativa) dos resultados em relação à concentração de inibição. No entanto, percebe-se que, qualitativamente, os resultados são coerentes, com a amostra H apresentando a melhor atividade inibitória, seguida pelas amostras G e F.

Tabela 7 – Resultados de CIM para as amostras estudadas. (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

AMOSTRA	ESPÉCIE	CIM [†] (mg/mL [*])
F	<i>Neomitranthes capivariensis</i> (Mattos) Mattos.	4,528 - 2,264
G	<i>Siphoneugena cf. reitzii</i> D.Legrand.	2,814 - 1,407
H	<i>Myrcia sp.</i> DC.	0,616 - 0,308
† dados sem precisão devido à formação de precipitado		
* concentração relativa ao peso das folhas pulverizadas extraídas		

FONTE: SONEHARA *et al.*, 2018.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em comparação com a técnica de difusão em disco, bastante simples, a de difusão em poço apresenta como desvantagens a dificuldade na perfuração dos poços de forma homogênea e adequada, e problemas causados pela baixa solubilidade de extratos vegetais que podem apresentar precipitação durante o período de incubação das placas;
- Percebe-se que os halos de inibição no ensaio de difusão em poços são mais nítidos e de maior diâmetro do que nos ensaios em disco, possivelmente devido à difusão em toda a profundidade da placa resultando em inibição mais homogênea do crescimento microbiano;
- Houve maior sensibilidade nos ensaios de difusão em poço, detectando-se inibição de crescimento em concentrações menores dos extratos vegetais;
- Comparando-se os resultados com ensaios de determinação de CIM, confirma-se que os ensaio de difusão em discos e poços podem ser utilizados como testes preliminares para detectar a possível atividade inibitória de extratos vegetais.

6. REFERÊNCIAS

- BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. *Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos*. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; TRUCK, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method*. **American Journal Clinical Pathology**, Hagerstown, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BONA, Eliana Almeida Mira; PINTO, Fabiana Gisele da Silva; FRUET, Thomas Kehrwald.; JORGE, Tereza Cristina Marino MOURA, Alexandre Carvalho. *Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p.218-225, set. 2014.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard - Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11 (ISBN 1-56238-781-2 [Print]; ISBN 1-56238-782-0 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2012.

COWAN, Marjorie Murphy. *Plant products as antimicrobial agents*. **Clinical Microbiology Reviews**, Oxford, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Definitive document version 6.0. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2017.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. Parte 1. São Paulo:Atheneu, 1988. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260232/4_edicao_part1.pdf/26bb8af0-4c69-4a4f-ae2b-2a40fdc6ffe7>. Acesso em: 27 mar. 2017

JORGE, S.D.; MASUNARI, A.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PASQUALOTO, K.F.M.; TAVARES, L.C. *Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against Staphylococcus aureus*. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 8., p. 3028-3036, 2009. doi: 10.1016/j.bmc.2009.03.011.

KARAMAN, I.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M. ADIGÜZEL, A. *Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L.* **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.85, n.2, p.231-235, 2003.

KING, Thea; DYKES, Gary; KRISTIANTI, Ruth. *Comparative evaluation methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds*. **Journal of AOAC International**, Sydney, v.91, n.6, p.1423-1429, 2008.

LIMA, Marcos Enoque Leit; CORDEIRO, Inês; YOUNG, Maria Cláudia Marx; SOBRA, Marcos E.G.; MORENO, Paulo Roberto H. *Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State - Brazil*. **Pharmacologyonline**, Salerno, v.3, p.589-593, 2006. Disponível em: <<http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2006/vol3/063.Lima.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

LORENZI Harri; MATOS, F.J. Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa:Instituto Plantarum, 2002.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. *Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.4, p.247-56, 2000.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OSTROSKY, Elissa A.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, Marcos E.L.; KANECO, Telma M.; NISHIKAWA, Suzana.O.; FREITAS, Beatriz R. *Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANECO, Mary Telma; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p.325

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAW, A. *Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.2, n.3, p.127-149, 1988.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. *Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Paulínia, v.14, n.2, p. 306-310, 2012

SILVEIRA, Luiz Mario da Silva; OLEA, Roberto Sigfrido Gallegos; MESQUITA, Josinete Santos; CRUZ, América de Lourdes Nogueira; MENDES, Janice Corrêa. *Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 90, n.2, p. 124-128, 2009.

SONEHARA, Ieda; VIEIRA, Leandro; PINCINATO, Éder; ROSÁRIO, Ricardo; BITUN, Marina; SATO, Juliana; FERNANDES, Gustavo; PAULICHEN, Aline; COSTA, Pedro Henrique; GALVÃO Isabela. **Identificação e estudo de potencial farmacológico de Myrtaceae existentes na Trilha do Pomar da colônia de férias da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Campos do Jordão/SP)**. 2018. Relatório de conclusão de projeto de pesquisa. MackPesquisa, São Paulo, 2018.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. *Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. In: DEY, P.M., HARBONE, J.D. (eds). **Methods in Plant Biochemistry**, Academic Press, London, p. 47–69, 1991.

VIEGAS JUNIOR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. *Os produtos naturais e a química medicinal moderna*. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p.326-337, abr. 2006.

XIMENES, Luiz Antônio. *Avaliação da qualidade dos discos de antimicrobiano para teste de disco – difusão produzidos no Brasil*. **AC&T Científica**, São José do Rio Preto, v. 4, n. 1, 9 jan. 2009. Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/trab_micro.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2017

Contatos: barbaramalachias@gmail.com & ieda.sonehara@mackenzie.br