

SCREENING DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ESPÉCIES VEGETAIS DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Amanda Sousa Gorski (IC) e Ieda Yuriko Sonehara (Orientadora)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

Constituída por cerca de 3.600 espécies, a família Myrtaceae representa uma das famílias mais importantes de Angiospermas no Brasil; existem vários estudos relatando as ações benéficas de espécies pertencentes a esta família, dentre elas ação antifúngica, antiinflamatória, cicatrizante, anti-séptica, antidiarréica e possível atividade antibacteriana. Ressalta-se que, com o crescimento da resistência bacteriana frente aos medicamentos, há a necessidade de busca por novos princípios ativos, e o conhecimento tradicional sobre o uso de plantas é sem dúvida uma fonte de possíveis novos compostos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo a identificação preliminar de possível potencial antibacteriano de sete espécies diferentes pertencentes à família *Myrtaceae* que foram coletadas em dois períodos diferentes na Trilha do Pomar da colônia de férias da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em Campos do Jordão/SP. Após identificação e secagem, foram preparados extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies coletadas, e os extratos testados contra cepas selvagens de *Staphylococcus aureus* através do método de difusão em disco. Foram também testados diferentes tempos de impregnação dos discos nos extratos, o que influenciou a sensibilidade do ensaio. Os resultados mostraram que praticamente todas as espécies testadas apresentaram halos de inibição detectáveis com tempo de impregnação do disco de 22h, sendo que as amostras de *Myrcia splendens* (Sw.) DC e *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos apresentaram maior indicação de atividade. O estudo concluiu que as espécies citadas merecem estudos mais aprofundados para identificação dos compostos químicos responsáveis pela atividade e que poderiam levar à identificação de novos compostos-líder para o desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: Myrtaceae. Antibacteriano. Difusão em disco..

ABSTRACT

Represented by around 3,600 species, Myrtaceae is one of the most important Angiosperm families in Brazil. There are several studies reporting their beneficial activities, among which can be cited their antifungal, anti-inflammatory, wound-healing, antiseptic, antidiarrheal, and possible antibacterial activities. It's important to note that, with the current increase in bacterial resistance, there is a pressing need for the introduction of new antibacterial compounds. The knowledge coming from the traditional use of plants is, without any doubt, a likely source for the development of new drugs. This study aimed at a preliminary study of

the possible antibacterial activity of seven species of Myrtaceae, collected at the Pomar trail at Mackenzie Presbyterian University vacation colony in Campos do Jordão/SP. After identification and drying, leaf hydroalcoholic extracts were prepared and tested against wild strains of *Staphylococcus aureus* using the agar disk diffusion method. Different disk impregnation times were also tested for the extracts, resulting in different sensitivities in the essays. Almost all specimens showed the formation of inhibition halos in disks impregnated for 22h, being that *Myrcia splendens* (Sw.) DC and *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos showed the best antibacterial potential. The study concludes that these species show marked possibility of antibacterial activity, and deserve to be the targets of more detailed studies aiming to the identification of the compounds responsible for the activity and that could lead to the identification of new *hits* for the development of new drugs.

Keywords: Myrtaceae. Antibacterial. Disk-diffusion.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são importantes fontes de matéria-prima, e partes como raiz, caule e folhas podem fornecer substâncias ativas que são utilizadas para a produção de medicamentos (ROSA *et al.*, 2012). A família Myrtaceae destaca-se entre os representantes da flora brasileira por apresentar grande número de espécies de interesse medicinal, sendo também reconhecida pelo seu potencial na produção de óleos voláteis (LIMA, 2006), além de apresentar atividades antibacterianas, antifúngicas, cicatrizantes, anti-sépticas, antiinflamatórias e antidiarréicas (LORENZI; MATOS, 2002). Por outro lado, é conhecida a existência de espécies pertencentes a esta família na colônia de férias da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), em Campos do Jordão/SP, sendo que entre as espécies já identificadas e depositadas no Herbário da UPM encontram-se *Calypttranthes concina*, *Eugenia cf. dodonaefolia*, *Eugenia involucrata*, *Myrceugeniarufescens*, *Myrcia retorta*, *Myrcia splendens*, *Neomitranthes cf. capivariensis* e *Pimenta pseudocariophyllus*.

Este projeto realizou um *screening* da possível atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos das folhas de espécies pertencentes à família Myrtaceae existentes na Trilha do Pomar da colônia de férias da UPM, e que foram coletadas durante o segundo semestre de 2017 no escopo do projeto MackPesquisa nº 171035 (SONEHARA *et al.*, 2018). A sensibilidade de cepa selvagem de *Staphylococcus aureus* a estes extratos brutos foi determinada de forma preliminar através do método de difusão em disco.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Por muito tempo no Brasil, principalmente na Floresta Amazônica, tribos indígenas fizeram uso de plantas e suas preparações com finalidades medicinais. Mas foi somente com a chegada dos portugueses que esses conhecimentos foram ampliados (OLIVEIRA *et al.*, 2006). As plantas medicinais brasileiras e as que vieram da Europa contribuíram de forma valiosa para ampliar a tradição de uso de diversas espécies, apesar de muito deste conhecimento ter sido perdido devido à resistência dos portugueses às manifestações culturais dos negros e índios (SOUZA, 1995). A Amazônia abriga 50% da biodiversidade do Planeta e, de acordo com dados de instituições de pesquisas da região, cerca de cinco mil, dentre as 25 mil espécies amazônicas, já foram catalogadas e suas propriedades terapêuticas estudadas (GASPAR, 2009).

Percebe-se, portanto, a importância que a flora brasileira possui como fonte de pesquisa para a investigação de novos compostos que possam eventualmente vir a se transformar em novos medicamentos. Junte-se a isto o fato de que, atualmente, cerca de 80% da população utiliza plantas para cura ou tratamento de alguma doença (BRASIL,

2006), e compreende-se o interesse nos estudos envolvendo a atividade farmacológica das diversas espécies pertencentes à flora brasileira.

A família Myrtaceae compõe uma das famílias mais importantes de Angiospermas no Brasil, e está inserida na ordem Myrtiliflorae (Myrtales), constituída de cerca de 150 gêneros com aproximadamente 3600 espécies distribuídas em todos os biomas (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III, 2009). Tendo alto potencial econômico, muitas de suas espécies são utilizadas na alimentação, como *Psidium guajava* L. (goiaba) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga), consumidas em forma de suco, doces, geleias e sorvetes (LORENZI, MATOS, 2002). Já pelo lado medicinal destacam-se *Myrciaria dubia*, que apresenta alto teor de vitamina C, e *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto), que auxilia no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite (LORENZI, MATOS, 2002). Existem em torno de 700 espécies diferentes de *Eucalyptus* catalogadas e destas, aproximadamente, 500 produzem óleos essenciais, usados de diversas formas para tratamento de doenças como, doenças respiratórias, bronquite e asma; em condições febris, nos casos de malária, tifo e cólera e; problemas de pele, queimaduras e úlceras (SEFIDKON *et al.*, 2008). Um estudo químico feito no Instituto de Química na Universidade Estadual Paulista, em 2014, revelou que as folhas de *Eugenia brasiliensis* apresentam atividade antiinflamatória em seus extratos, explicando seu uso na forma de chá para o tratamento de artrite e reumatismo (DAMETTO, 2014). As folhas e raiz da pedra-ume-caã (*Myrcia sphaerocarpa*) auxiliam no tratamento do Diabetes Mellitus e da hipertensão arterial (CORRÊA, GOTTLIEB, 1970).

A busca por novos princípios ativos baseado no conhecimento tradicional da atividade de plantas tem despertado muito interesse, até porque o aumento da resistência microbiana aos antimicrobianos atualmente em uso vem se tornando uma preocupação mundial, e espécies da família Myrtaceae apresentam expressiva atividade antimicrobiana frente a diferentes microrganismos (VUOTTO *et al.*, 2000). Recentemente, houve uma crescente preocupação em relação à resistência bacteriana aos fármacos já existentes, não só no Brasil, mas no mundo inteiro, devido ao uso indiscriminado ou incorreto de antibióticos, acarretando em mortalidade de pacientes ou falta do efeito terapêutico desejado (FIO *et al.*, 2000). Além disso, outros fatores colaboram para a urgência no desenvolvimento de novos compostos antibacterianos, tais como a necessidade de opções terapêuticas para o tratamento de infecções, uma vez que existem pessoas que são alérgicas e podem ser infectadas por bactérias suscetíveis a apenas um ou dois antibióticos, deixando os médicos sem opções de tratamento; e o aumento da resistência bacteriana nos hospitais forçando a liberação de pacientes para evitar infecções até mais graves, havendo assim, a necessidade de novos antibióticos com perfil farmacocinético que favoreçam uma dose única que possa ser administrada em casa (RICE, 2003).

Em relação à atividade antimicrobiana de espécies de Myrtaceae, constatou-se em estudos de sensibilidade através do método de difusão em ágar, realizados na Universidade Estadual Paulista em Rio Claro/SP em 2005 a partir de extratos hidroalcoólicos, que a *Eugenia uniflora* apresenta alta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus spp*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, porém foi detectada resistência em *Pseudomonas aeruginosa* (ALVES *et al.*, 2000). Já em pesquisas de Gnanakalai e Gopal (2014) foram testados diferentes extratos de espécie *Eucalyptus smithii* contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, com o extrato clorofórmico apresentando atividade maior em relação a todos esses patógenos; nestes estudos, o extrato etanólico e acetônico demonstrou atividade mínima, e o extrato aquoso não apresentou ação antimicrobiana. Autores diversos demonstram a atividade do extrato aquoso da folha de *Psidium guajava* L. contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus albus* e *Staphylococcus aureus* (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Entre as Myrtaceae encontradas na Colônia Umuarama (Campos do Jordão/SP) que já foram identificadas e depositadas no Herbário da Universidade Presbiteriana Mackenzie, podem ser mencionados espécies pertencentes aos gêneros *Calypttranthes*, *Myrceugenia*, *Myrcia*, *Myrciaria*, *Siphoneugena*. Oito espécies de Myrtaceae já foram identificadas anteriormente de forma específica na Trilha do Pomar: *Calypttranthes concina*, *Eugenia cf. dodonaefolia*, *Eugenia involucrata*, *Myrceugenia rufescens*, *Myrcia retorta*, *Myrcia splendens*, *Neomitranthes cf. capivariensis* e *Pimenta pseudocariophyllus*. Destas espécies, vale notar que gêneros *Myrcia* e *Myrciaria* possuem diversos estudos publicados identificando atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-proliferativa (APEL *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2013; CALLONI *et al.*, 2015; CASCAES *et al.*, 2015; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014), hipoglicemiante e gastroprotetora (BORGES *et al.*, 2013), anti-hemorrágica (CASCAES *et al.*, 2015), e vasodilatadora (ANDRADE *et al.*, 2015), entre outras.

Desta forma, o interesse no estudo dos diversos gêneros pertencentes às Myrtaceae é crescente, justificando a proposta deste trabalho no sentido de testar um método que possa ser utilizado no *screening* de atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

3. METODOLOGIA

Coleta e Preparação do Extrato

A coleta do material foi realizada pelos componentes do grupo de pesquisa responsável pelo projeto MackPesquisa nº 171035 (SONEHARA *et al.*, 2018) no município de Campos do Jordão, na colônia de férias Umuarama da Universidade Presbiteriana

Mackenzie, durante o segundo semestre de 2017. As espécies coletadas e posteriormente identificadas, e que tiveram os extratos testados, encontram-se listados na Tabela 1 abaixo.

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 sp.</i> 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 cf. 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 cf. reitzii</i> D.Legrand	30/11/17	Vieira, LTA 462	2753
H	<i>Myrcia sp.</i> DC.	30/11/17	Vieira, LTA 463	2754

Após a coleta, o material foi seco em estufa a 45°C durante um período de 7 dias, após o qual as folhas foram trituradas em moinho de facas no laboratório de Química da Universidade Presbiteriana Mackenzie. 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 assim obtida foi macerada durante uma semana em solução hidroetanólica 50% (p/p), em proporção de 1g de pó da planta para 10g de solução extratora. Houve agitação diária dos frascos, que foram mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a maceração, o material foi submetido a filtração através de algodão e, posteriormente, papel de filtro. O extrato bruto assim obtido foi acondicionado em frascos de vidro estéreis com tampa de plástico rosqueável, devidamente identificado e mantido em temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento do uso.

Screening de Atividade Antimicrobiana

O método utilizado foi o da difusão em disco, onde realizou-se a difusão do extrato em superfície de meio de cultura (Ágar Mueller-Hinton) a partir de um disco impregnado com extrato vegetal hidroalcoólico. Todos os procedimentos para testes de sensibilidade foram

baseados na Farmacopéia Brasileira 4^o edição (1988) e no método padrão CLSI/M02-A11 (2012), adaptados onde necessário.

Preparação e inoculação das placas

O meio de cultura utilizado para os testes foi o Mueller-Hinton, preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante. Este meio foi esterilizado em autoclave, resfriado em banho-maria entre 45 e 50°C e vertido em placas de Petri estéreis e descartáveis de 90 mm de diâmetro, numa superfície horizontal de forma a garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm medido com o auxílio de uma régua, dentro de fluxo laminar a fim de evitar possíveis contaminações. Após resfriamento à temperatura ambiente (25°C), as placas foram embrulhadas em papel-filme para minimizar o ressecamento do ágar e armazenadas em geladeira (de 2 a 8°C) até o momento do uso. Havendo excesso de umidade na superfície antes de ser utilizada, as placas foram colocadas no fluxo laminar à temperatura ambiente entre 10 a 30 minutos, com as tampas entreabertas, até que o excesso de umidade superficial evaporasse.

Realizou-se a preparação do inóculo a partir de uma suspensão direta em solução salina (cloreto de sódio 0,85%) de colônias de 24h 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 5mL de solução salina estéril. Esta suspensão foi ajustada para que sua turbidez coincidissem com a solução-padrão de McFarland 0,5, disponível comercialmente.

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 no swab. 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 hidroalcoólico bruto foram diluídos com 2,0 mL de caldo Mueller-Hinton e adicionados 0,5 mL de DMSO, totalizando um volume de 5mL, 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. Observa-se o processo através da Tabela 2 abaixo. As concentrações assim obtidas, considerando-se a concentração inicial em mg/mL no extrato bruto, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2 – Procedimento de diluição realizado nas oito amostras da família Myrtaceae estudadas.

DILUIÇÕES	AMOSTRAS	CALDO MUELLER-HINTON	DMSO	VOLUME FINAL
1	2,5ml de extrato bruto	2,0ml	0,5ml	5,0ml
2	2,5ml do total da diluição 1	2,5ml	--	5,0ml
3	2,5ml do total da diluição 2	2,5ml	--	5,0ml
4	2,5ml do total da diluição 3	2,5ml	--	5,0ml
5	2,5ml do total da diluição 4	2,5ml	--	5,0ml

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 na 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.

Foram utilizadas três placas (ensaios em triplicata), depositando, alternadamente, os discos referentes à diluição sendo testada, correspondendo a cada extrato obtido das espécies e devidamente identificadas. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35°C por 24h, sendo realizada uma leitura de controle após 18h de incubação, com a finalidade de analisar se a placa foi satisfatoriamente semeada, se o inóculo era correto e os halos de inibição resultantes foram uniformemente circulares.

Leitura dos halos de inibição

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e os halos medidos em milímetros usando um paquímetro que foi 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diluições-teste utilizadas nos ensaios estão apresentadas na Tabela 3. 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.

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. Desta forma, optou-se por descartar resultados de inibição para esta primeira diluição-teste na análise de

resultados. A Tabela 4 apresenta as concentrações, em porcentagem, de DMSO e etanol presentes em cada diluição realizada.

Tabela 3 – Concentrações do extrato bruto inicial e das diluições-teste utilizadas nos ensaios. (A) *cf. Neomitranthes sp.* Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capiviariensis* (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)
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

Tabela 4 – 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

As leituras dos halos de inibição foram padronizadas para após 24 horas de incubação, por questão de logística de uso do laboratório.

Foram realizados três tipos de ensaios, cada um em triplicata, com o objetivo de se determinar o grau de influência do tempo de impregnação dos discos nos extratos, nas diluições testadas, sobre os resultados. Os tempos de impregnação testados foram de 30min (Ensaio 1); 1h30min (Ensaio 2); e 22h (Ensaio 3). A impregnação dos discos por apenas 30 minutos mostrou ser insuficiente, com ausência de formação de halo mesmo quando se espera uma inibição, mínima que seja, devido à presença de DMSO e etanol. Os resultados consolidados dos demais ensaios são apresentados na Tabela 5 e Tabela 6 a seguir.

No ensaio com tempo de impregnação de 1h30min (Tabela 5) houve a presença de halos de inibição em praticamente todas as amostras testadas, porém concentradas nas

duas primeiras diluições, ou seja, na presença de concentração maior do extrato. O ensaio com tempo de impregnação de 22h (Tabela 6) mostra uma sensibilidade maior, refletido tanto no maior diâmetro dos halos de inibição, como na detecção de inibição em concentrações mais diluídas das amostras. As Tabela 7 e Tabela 8 trazem detalhadas as diluições onde foram detectadas a inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 5 – Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição com impregnação de 1h30m (Ensaio 2). (A) *cf. Neomitrantes sp.* Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

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	--	--	--

Tabela 6 – Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição com impregnação de 22h (Ensaio 3). (A) *cf. Neomitrantes sp.* Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitrantes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

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	--	--	--

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 7 – Concentração em mg/mL das amostras apresentando halos de inibição no Ensaio 2 (impregnação de 1h30min). (A) *cf. Neomitranthes sp.* Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

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	--	--	--

Tabela 8 – Concentração em mg/mL das amostras apresentando halos de inibição no Ensaio 3 (impregnação de 22h). (A) *cf. Neomitranthes sp.* Kausel ex D.Legrand; (B) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (C) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (D) *Myrcia splendens* (Sw.) DC.; (E) *Myrcia hartwegiana* (O.Berg) Kiaersk; (F) *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos; (G) *Siphoneugena cf. reitzii* D.Legrand; (H) *Myrcia sp.* DC.

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	--	--	--

Analisando os resultados, 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.

As amostras C e G referem-se ao mesmo indivíduo, *Siphoneugena* cf. *reitzii* 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).

Observou-se em ensaios realizados por outros membros do grupo de pesquisa, em seus respectivos projetos que utilizaram as técnicas de difusão em poço e de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição, que existe um problema de solubilidade das amostras em caldo Mueller-Hinton mesmo na presença de co-solvente. Embora o mesmo problema não tenha sido observado no método de difusão em discos durante o período de impregnação dos discos, é um ponto a ser considerado em futuras investigações.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O tempo de impregnação dos discos influencia os resultados, sendo que o maior tempo testado (22h) levou aos resultados de maior sensibilidade;
- Os resultados mostraram que existe atividade antimicrobiana detectável de todas as amostras contra cepas selvagens de *S.aureus*; ensaios de determinação de Concentração Inibitória Mínima realizados no escopo do projeto MackPesquisa nº 171035 (SONEHARA *et al.*, 2018) confirmaram esta atividade, concluindo-se que os ensaios de difusão em disco podem ser utilizados em uma triagem preliminar de extratos vegetais;
- A espécie *Myrcia splendens* (Sw.) DC. apresenta os resultados mais promissores nestes testes preliminares, seguida por *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos;

- 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;
- Sugerem-se estudos mais aprofundados de atividade antimicrobiana das espécies *Myrcia splendens* (Sw.) DC. e *Neomitranthes capivariensis* (Mattos) Mattos.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, Tânia Maria de Almeida; SILVA, Andréia Fonseca; BRANDÃO, Mitzi; GRANDI, Telma Sueli Mesquita; SMÂNIA, Elza de Fátima A; SMÂNIA JÚNIOR, Artur; ZANI, Carlos Leomar. *Biological screening of Brazilian medicinal plants*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367- 373, 2000.

ANDRADE, D.M.L.; REIS C.F.; CASTRO, P.F.S.; BORGES, L.L; AMARAL, N.O.; TORRES, I.M.S.; REZENDE, S.G.; GIL, E.S.; CONCEIÇÃO, E.C.; PEDRINO, G.R.; ROCHA, L. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, New York, vol. 2015, Article ID 696135, 8 pages, 2015. doi:10.1155/2015/696135.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. *An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.161, n. 2, p. 105-21, out. 2009.

APEL, M.A.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M.C.; CORDEIRO, I.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 48, n. 4, p. 433–438, 2010. <https://doi.org/10.3109/13880200903164386>

BORGES, L.L; CONCEIÇÃO, E.D.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, Barking, v. 153, p. 224-233, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.064>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_>; Acesso em: 03 de março de 2017.

CALLONI, C.; AGNOL, R.F.; MARTÍNEZ, L.S.; MARCON, F.S.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, Ottawa, v. 70, p. 15–22, April 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.032>

CASCAES, M.M.; GUILHON, G.M.S.P.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; SANTOS, L.S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n.10, p. 23881-23904, 2015. doi: 10.3390/ijms161023881.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, 2012.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, 2012.

CORRÊA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R. A *Química de Mirtáceas Brasileiras: O óleo essencial de Pseudocaryophyllus pabstianus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p.127-128, 1970.

DAMETTO, Alessandra Cristina. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110857>> . Acesso em: 01 de março de 2017.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. Parte 1. São Paulo: Atheneu, 1988. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 27 mar. 2017

FIO, Fernando de Sá del; MATTOS FILHO, Thales Rocha de; GROppo, Francisco Carlos. *Resistência Bacteriana*. **Revista Brasileira de Medicina**. Rio de Janeiro, v.57, n.10, p. 1129-1140, 2000.

GASPAR, L. **Plantas medicinais**. Pesquisa Escolar Online, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. 30 de junho de 2008. (Atualizado em 8 de setembro de 2009). Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/index.>>. Acesso em: 01 de mar. 2017.

GNANAKALAI, Kannusamy.; GOPAL, Rangaswamy. *Evaluation of antibacterial potential of Eucalyptus smithii bark extracts against some bacterial strains*. **International Journal of Biosciences and Nanosciences**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 42-45, 2014.

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.

LEITE-LEGATTI, A.V.; BATISTA, A.G.; ROMANELLI, N.; DRAGANO, V.; MARQUES, A.C.; MALTA, L.G.; RICCIO, M.F.; EBERLIN, M.N.; MACHADO, A.R.T.; CARVALHO-SILVA, L.B.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M.; MARÓSTICA JÚNIOR, R. *Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities*. **Food Research International**, Ottawa, v. 49, n.1, p. 596–603, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.044>

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, Gislene G.F.; LOCATELLI, Juliana; FREITAS, Paulo C.; Silva, Giuliana L. *Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, n.4, p. 247- 56, 2000.

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. *Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ª ed. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2002. p. 41-62.

RICE, Louis B. *Do we really need new anti-infective drugs?* **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 459-463, 2003.

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 Medicinais**, Paulínia, v.14, n.2, p. 306-310, 2012.

SILVEIRA, L.; OLEA, R.; MESQUITA, J.; CRUZ, A.; MENDES, J.; 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.

SEFIDKON, F.; BAHMANZADEGAN, A.; ASSAREH, M. H. *Effect of distillation methods and harvesting times on the essential oil and cineole content of Eucalyptus dealbata*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 44, n. 2 p. 250-253, 2008.

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.

SOUZA, Raimunda Bandeira. **Conhecimento e percepção dos docentes e discentes sobre a utilização de fitoterapia por pacientes hospitalizados**. 1995. 185f. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Belém, 1995.

VUOTTO, Maria Luisa; BASILE, Adriana; MOSCATIELLO, Vincenza; DE SOLE, Pasquale; CASTALDO-COBIANCHI, Rosa; LAGHI, Emanuela; IELPO, Maria Teresa Lucia. *Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 13, p. 197-201, 2000.

WANG, W.H.; TYAN, Y.C.; CHEN, Z.S; LIN, C.G.; YANG, M.H.; YUAN, S.S.; TSAI, W.C. Evaluation of the Antioxidant Activity and Antiproliferative Effect of the Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seed Extracts in Oral Carcinoma Cells. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, Article ID 185946, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/185946.

Contatos: amandagorski10@hotmail.com & ieda.sonehara@mackenzie.br