

# Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos

## *Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts*

Eliana Almeida Mira De Bona<sup>1</sup>, Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>1\*</sup>, Thomas Kehrwald Fruet<sup>1</sup>, Tereza Cristina Marinho Jorge<sup>2</sup>, Alexandre Carvalho de Moura<sup>3</sup>

**RESUMO:** Vários estudos estão sendo conduzidos para a descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas, para que possam ser utilizados em produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria alimentícia. A ausência de padronização de métodos utilizados para a avaliação de extratos vegetais com potencial antimicrobiano dificulta a comparação de resultados. Considerando a necessidade de estabelecer um método com resultados consistentes para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais, este trabalho propôs-se a avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração mínima inibitória de extratos de plantas da família Myrtaceae sobre diferentes micro-organismos, utilizando três métodos para avaliação de antimicrobianos. Os métodos empregados foram microdiluição em caldo e difusão em ágar por disco e poço. Foram avaliados os extratos de *Psidium guajava*, *Myrciaria cauliflora* e *Syzygium cumini* sobre bactérias Gram-positivas, negativas e levedura. Em geral, a inibição promovida pelos extratos no teste de difusão em ágar por poço foi maior do que os valores obtidos por disco, independentemente do extrato vegetal testado. Contudo, a atividade inibitória de todos os micro-organismos só pôde ser determinada com o método de microdiluição em caldo, que também apresentou os resultados mais reprodutíveis, e mostrou-se o mais econômico e confiável para se avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais quando comparado aos outros métodos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Myrtaceae; difusão em ágar; disco-difusão; microdiluição.

**ABSTRACT:** Several studies have been conducted to discover new antimicrobial agents from plants to be used in pharmaceuticals, cosmetics and in the food industry. The lack of standardized methods for the evaluation of plant extracts with antimicrobial potential complicates the comparison of results. Taking into consideration the need to establish a method with consistent results to evaluate the antimicrobial activity of plant extracts, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of extracts of some plants from the Myrtaceae family on different micro-organisms based on a comparative assay with three methods that are commonly used for the assess antimicrobials. The methods used were broth microdilution, and agar diffusion by disc and well. The evaluated extracts were those of *Psidium guajava*, *Myrciaria cauliflora*, and *Syzygium cumini* for Gram-positive and negative bacteria and yeast. In general, inhibition extracts promoted by the agar diffusion test by well was higher than the values obtained by disc, regardless of the plant extracts tested. However, the inhibitory activity of all micro-organisms was only possible to be determined with the microdilution broth method, which also presented the more reproducible results, and proved to be the most economic and reliable way to evaluate the antimicrobial activity of plant extracts in contrast with other methods.

**KEYWORDS:** Myrtaceae; agar diffusion; disc diffusion; microdilution.

<sup>1</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biotecnologia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Cascavel (PR), Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Farmacognosia; UNIOESTE – Cascavel (PR), Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia; Universidade Federal da Fronteira Sul – Realeza (PR), Brasil.

\*Autor correspondente: fabiana.pinto@unioeste.br

Recebido em: 13/11/2012. Aceito em: 06/02/2014

## INTRODUÇÃO

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o objetivo de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental.

Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos diferentes métodos podem ser utilizados, sendo os seguintes os mais conhecidos: método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de microdiluição e microdiluição, os quais são realizados em caldo. 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 (CLSI, 2008). 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).

O método de disco-difusão foi proposto por vários autores para verificar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, como NASCIMENTO *et al.* (2000) e KARAMAN *et al.* (2003). Já OSTROSKY *et al.* (2008) mencionaram o método de microdiluição em caldo como sendo o mais confiável para avaliar agentes antimicrobianos, por fornecer resultados quantitativos e não ser influenciado pela velocidade de crescimento do micro-organismo. Por outro lado, OTHMAN *et al.* (2011) propuseram que, tanto o uso em base caldo como em base ágar são necessários para obtenção de resultados confiáveis da atividade antimicrobiana de extratos de plantas.

Embora geralmente sejam utilizadas as normatizações internacionalmente conhecidas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) como base para testes de suscetibilidade antimicrobiana, as diretrizes são direcionadas para antimicrobianos com parâmetros já conhecidos. Há poucos estudos comparativos relatando qual é o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, mesmo no que se refere às metodologias usualmente utilizadas. Além disso, há a necessidade da uniformização dos métodos de extração e testes *in vitro*, para que a pesquisa possa ser mais eficiente, e a interpretação dos resultados, mais facilitada e confiável (COWAN, 1999).

A ausência de padronização das metodologias limita as pesquisas sobre atividade antimicrobiana de extratos vegetais no que tange à comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores, que avaliam a mesma amostra com diferentes metodologias. Isso está relacionado a um caráter multifatorial que pode modificar a inibição *in vitro* de crescimento de micro-organismos, como o método de obtenção dos extratos, a espécie de micro-organismo utilizada, a

concentração da amostra e do inóculo e o método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana (RIOS *et al.*, 1988; KING *et al.*, 2008).

Em relação à atividade antibacteriana de extratos de plantas, estudos prévios comprovaram a eficácia de extratos de espécies da família Myrtaceae, como o de *Psidium guajava* L., com o uso de diferentes solventes (etanol-água, metanol, acetona e N,N-dimetilformamida) sobre o crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium, *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. pelo método de difusão em ágar (CARVALHO *et al.*, 2002; CHAH *et al.*, 2006; NAIR; CHANDA, 2007).

Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi comparar os métodos microdiluição em caldo e de difusão em ágar por poço e por disco para a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de três espécies de Myrtaceae (*Psidium guajava*, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg e *Syzygium cumini* L.) sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Plantas e extratos

As folhas das plantas *P. guajava* (goiabeira branca – voucher 6900), *M. cauliflora* (jabuticabeira – 6882) e *S. cumini* (jambolão – voucher 6898) foram coletadas nas primeiras horas da manhã, nos meses de janeiro e fevereiro, em propriedades rurais no município de Medianeira (PR). Foram identificadas no herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel (PR), sendo que uma exsiccata de cada planta foi depositada no herbário com o registro do exemplar *voucher* apresentado adjacente ao nome popular.

As folhas das plantas coletadas foram secas a 40°C e trituradas em moinho de facas do Tipo *Willye*, até a obtenção de pó de granulometria inferior a 0,42 mm. Foram preparados os extratos com base na metodologia de SANTURIO *et al.* (2007), com modificações. Para obtenção do extrato etanólico adicionou-se pó ao álcool etílico PA na proporção de 2:10 (p/v) para maceração por 24 horas, em shaker rotativo, a 180 rpm, a 23°C. Realizou-se a concentração do extrato em rota- evaporador a 40°C. O extrato obtido foi diluído com água destilada estéril contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) para a proporção final de 200 mg.mL<sup>-1</sup> e esterilizado por filtração em membrana filtrante com porosidade de 0,45 µm. Para a obtenção do extrato aquoso, a maceração foi realizada utilizando-se como solvente extrator a água destilada estéril, contendo 10% de DMSO, seguindo os mesmos padrões de proporção, armazenamento e filtragem do extrato etanólico. Outra filtração a vácuo foi realizada, tal como citado.

Ambos os extratos foram armazenadas em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

## Padronização dos inóculos bacterianos

As culturas de micro-organismos foram mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  em ágar nutriente (AN). As amostras foram recuperadas em caldo Mueller-Hinton (MH) para bactérias e caldo Caseína Soja (TSA) para levedura, e incubadas sem agitação durante 24 horas a  $36^{\circ}\text{C}$ , com exceção de *B. Subtilis*, que foi incubado a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, os inóculos foram repicados em placas de ágar Mueller Hinton (AMH) e (TSB) 24 horas antes do teste. Foram preparadas suspensões de cultura, diluídas em solução salina 0,85% utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>) para bactérias e  $2,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para levedura.

## Determinação da atividade antimicrobiana

Os testes foram realizados com cepas padrão de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCD B005, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium ATCC 14028; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os extratos foram diluídos e avaliados nas concentrações que variaram de 100 a 0,04 mg.mL<sup>-1</sup>.

Foram utilizados os métodos microdiluição em caldo, com base na metodologia de SANTURIO *et al.* (2007), com modificações, e as metodologias de difusão em ágar por poço e por disco, realizadas conforme recomendações do CLSI (2009a). Utilizaram-se como controle positivo os antimicrobianos clo-ranfenicol, gentamicina e nistatina (CLSI, 2009b).

## Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço

Previamente à realização dos experimentos, as amostras bacterianas foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a  $36^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Avaliou-se a suscetibilidade antimicrobiana de acordo com o método de disco-difusão, de acordo com recomendações do CLSI (2009a), com adaptações. Para tal, discos estéreis de papel filtro (6 mm Ø) receberam uma alíquota de 20 µL de cada extrato a ser testado e, em seguida, o disco foi aplicado com pinça estéril sobre uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH), previamente inoculada com o micro-organismo a ser testado. Para o teste de difusão em disco foram considerados com atividade inibitória os halos com diâmetro  $\geq 6$  mm.

O teste de difusão por poço foi realizado conforme atualizações do CLSI (2009a), com adaptações, que diferencia-se do teste de disco pela realização de três orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar MH em placas de Petri, com o auxílio de um molde formando os poços. As placas foram inoculadas na superfície pelos micro-organismos com o uso de um suabe e, então, os poços foram preenchidos com 20 µL do extrato na concentração a ser testada.

Em ambos os testes, as placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada.

Os dados obtidos nas avaliações de difusão em ágar foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos comparadas pelo teste Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR® (FERREIRA, 2007).

## Metodologia de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima, da Concentração Fungicida Mínima e da Concentração Bactericida Mínima

As amostras foram recuperadas em caldo BHI a  $36^{\circ}\text{C}$  por 18 horas antes do teste. Foram distribuídas em placa de microtitulação de 96 poços, 150 µL de MH (concentração dupla), para bactérias, e caldo RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato de sódio e com 2% de glicose (concentração dupla) para *Candida albicans*, em todos os poços. Foram adicionados à primeira coluna 150 µL de extrato; depois, foram homogeneizados e retirados 150 µL de cada poço da coluna 1 para a coluna 2, e assim sucessivamente até a coluna 12, obtendo-se, então, as concentrações do extrato (100 a 0,04 mg.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 15 µL do inóculo em cada poço da microplaca e incubou-se a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Decorrido o tempo, foram acrescidos a cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa de cloreto de trifenetetrazólio (CTT) a 0,5%, e as microplacas foram novamente incubadas a  $36^{\circ}\text{C}$  por mais 3 horas.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato em mg.mL<sup>-1</sup>, capaz de impedir o crescimento microbiano. Já a Concentração Fungicida Mínima (CFM)/Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada com base na metodologia de SANTURIO *et al.* (2007). A partir dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível, no teste da CIM anterior à adição de CTT, retirou-se uma alíquota de 10 µL, a qual foi inoculada na superfície do ágar MH. As placas foram incubadas a  $36^{\circ}\text{C}$  e, após 24 horas, foi definida a CFM/CBM como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios de CIM e CFM/CBM foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar pelas técnicas de disco e de poço

Nos bioensaios de difusão em ágar pelo método do poço, verificou-se que todos os extratos inibiram a maioria das bactérias, com formação de halos de inibição ao redor dos poços onde foram depositadas as soluções testadas. Na técnica do disco, foi possível observar que o número de bactérias inibidas pelos extratos foi menor quando comparado ao poço ( $p < 0,05$ ). No entanto, não foi verificada a inibição da levedura *C. albicans* por nenhuma técnica de difusão em ágar (Tabela 1).

Verificou-se a presença do halo de inibição nas concentrações dos extratos entre 50 e 100 mg.mL<sup>-1</sup>, e, para a comparação das medidas dos halos entre as técnicas de difusão por poço e por disco, utilizou-se a média do diâmetro dos halos na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup>, em teste de Tukey (significância de 5%) (Tabela 1).

Observou-se que em 13,5% das medidas dos halos de inibição, utilizando a metodologia de disco, e 52% da metodologia do poço, o coeficiente de variação ficou abaixo de 5%. Houve diferença significativa em 74% das medidas dos halos de inibição entre as metodologias testadas, observando melhor performance dos extratos com a utilização da técnica de poço (Tabela 1). A diferença entre os métodos ficou mais evidente quando analisados os extratos frente à *S. Typhimurium* e *K. pneumoniae* (Gram-negativas).

Verificou-se ainda diferença significativa entre os halos de inibição observados na metodologia do poço e do disco para a maioria das bactérias testadas em relação aos extratos aquosos e etanólicos de jambolão. LOGUERCIO *et al.* (2005), ao avaliarem a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *S. cumini* sobre cepas bacterianas de referência (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *K. pneumoniae*), pelo método de disco-difusão em concentrações entre 50 e 300 mg.mL<sup>-1</sup>, também observaram halo de inibição.

Através dos resultados do teste de difusão em ágar pela metodologia de poço, foi possível verificar a presença de halos de inibição para todos os extratos frente à *S. Typhimurium*. CHATTOPADHYAY *et al.* (1998) obtiveram resultado semelhante ao atual trabalho utilizando a técnica de disco-difusão para testar a atividade de extratos de jambolão. Os autores atribuem esta atividade inibitória à presença de polifenóis derivados do ácido gálico e elágico. Ambos os trabalhos demonstraram atividade inibitória dos extratos, principalmente os etanólicos, em concentrações variáveis, frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B.subtilis*) e para a maioria das Gram-negativas (como *E.coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*).

Em relação aos extratos de jabuticabeira, a técnica de poço avaliada com o extrato aquoso apresentou diferença estatística frente à técnica de disco para *S. enterica* e *S. aureus*. O mesmo se observou entre as técnicas quando avaliou-se o extrato

etanólico de jabuticabeira, sendo que somente a *K. pneumoniae* não apresentou halo de inibição para a técnica de disco. Já a técnica de poço para o extrato etanólico apresentou medidas de inibição para todas as bactérias avaliadas, sendo que 50% das cepas apresentaram diferença significativa entre as técnicas.

Não foram encontradas publicações referentes à atividade antimicrobiana das folhas da jabuticabeira com a utilização dos métodos de difusão em ágar frente a micro-organismos referência. A atividade bacteriostática e bactericida da jabuticabeira pode estar relacionada à presença de compostos da classe do seu principal constituinte, os taninos (REYNERTSON *et al.*, 2006), substâncias que apresentam atividade antimicrobiana relevante atribuída à propriedade destes em se complexar com proteínas, podendo atuar na inativação de enzimas (MARTINS *et al.*, 2000; MELLO; SANTOS, 2002).

Em relação às diferentes atividades apresentadas pelos extratos, o etanólico de goiabeira, assim como os demais extratos etanólicos, apresentaram, em geral, maiores halos de inibição do crescimento microbiano no teste de poço quando comparados aos extratos aquosos (Tabela 1). A atividade inibitória de goiabeira pode ser atribuída aos fitoconstituintes da espécie, que possuem ação antimicrobiana como cumarinas, aos flavonoides, como a guajaverina e quercetina, ao ácido psidiólico, triterpenos taninos e elagitannos, que promovem precipitação de proteínas (MARTINS *et al.*, 2000).

O controle realizado com antimicrobianos comerciais comprovou que, na metodologia de poço, houve melhor difusão dos antimicrobianos, o que possibilitou a medição de halos maiores do que no teste de disco. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato de a metodologia do poço propiciar mais facilidade de contato entre os antimicrobianos e os micro-organismos testados (ALVES *et al.*, 2008).

### Metodologia de microdiluição em caldo e determinação das Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima/ Concentração Bactericida Mínima

Em geral, a CIM variou entre 0,39 e 100 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo que para as bactérias Gram-positivas a variação das CIMs foi entre 6,25 e 100 mg.mL<sup>-1</sup> e de 0,39 a 25 mg.mL<sup>-1</sup> para as Gram-negativas, indicando estas como sendo as bactérias mais suscetíveis. Já a CIM para a levedura *C. albicans* variou de 6,25 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 2).

Com exceção do extrato etanólico de *S. cumini*, todos os demais apresentaram atividade bactericida somente para as Gram-negativas, com CBM entre 0,39 e 50 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 2). Esses resultados discordam de SANCHES *et al.* (2005), que verificaram os maiores efeitos bactericidas dos extratos hidroalcoólicos de *P. guajava* sobre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis*. Esses resultados discrepantes podem estar relacionados ao uso de diferentes

frações etanol-água do extrato, resultando na extração de moléculas capazes de penetrar a membrana de bactérias Gram-negativas, mas não de Gram-positivas (DUFFY; POWER, 2005).

Nenhum extrato apresentou atividade fungicida nos métodos de difusão em ágar ou de microdiluição testados

(Tabelas 1 e 2). Entretanto, COSTA *et al.* (2009) utilizaram o método de microdiluição e observaram atividade antifúngica do extrato de *S. cumini* L. sobre cepas clínicas de *C. albicans*. As divergências encontradas no presente estudo, em relação às pesquisas acerca da atividade antifúngica já publicadas com *S. cumini*, podem ser ocasionadas pelas diversas

**Tabela 1.** Comparação entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) obtidas pelas metodologias de disco e poço utilizando extratos de plantas aquosos e etanólicos (*Syzygium cumini*, *Myrciaria cauliflora* e *Psidium guajava*) e antimicrobianos comerciais (nistatina, cloranfenicol e gentamicina) frente a micro-organismos padrão.

Micro-organismos	Jambolão				Jaboticaba			
	Aquoso		Etanólico		Aquoso		Etanólico	
	D	P	D	P	D	P	D	P
Ca	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
Ec	8,6 ± 1,1 b cv = 9,16 %	0,0 ± 0,0 a	9,6 ± 0,5 a cv = 8,03 %	11,0 ± 1,7 a cv = 5,66 %	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	12,0 ± 1,7 a cv = 9,59 %	13,6 ± 1,1 a cv = 4,49 %
Kp	0,0 ± 0,0 a	11,0 ± 1,7 b cv = 5,14 %	0,0 ± 0,0 a	16,0 ± 1,7 b cv = 4,71 %	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	19,3 ± 1,5 b cv = 4,08 %
Pa	12,3 ± 2,3 a cv = 7,32 %	14,0 ± 3,4 a cv = 8,3 %	11,0 ± 1,0 a cv = 36 %	25,3 ± 2,5 b cv = 5,00 %	6,6 ± 1,1 a cv = 4,53 %	7,3 ± 2,3 a cv = 6,24 %	13,0 ± 1,7 a cv = 5,53 %	15,6 ± 0,5 a cv = 1,35 %
ST	8,0 ± 1,0 a cv = 10,81 %	18,6 ± 1,5 b cv = 5,47 %	8,3 ± 0,5 a cv = 9,56 %	17,3 ± 0,5 b cv = 4,43 %	8,6 ± 0,5 a cv = 10,17 %	21,0 ± 1,7 b cv = 5,59 %	9,3 ± 1,1 a cv = 9,25 %	18,3 ± 2,3 b cv = 6,88 %
Sa	13,0 ± 2,6 a cv = 12,91 %	23,3 ± 2,0 b cv = 5,30 %	15,0 ± 2,6 a cv = 9,31 %	18,0 ± 0,0 a cv = 1,56 %	11,3 ± 2,3 a cv = 12,63 %	25,0 ± 1,0 b cv = 2,75 %	11,6 ± 2,8 a cv = 9,96 %	23,6 ± 0,5 b cv = 1,99 %
Bs	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	20,0 ± 3,0 b cv = 9,11 %	13,6 ± 1,1 a cv = 5,95 %	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	11,6 ± 1,5 a cv = 9,86 %	16,3 ± 1,5 a cv = 8,46 %

  

Micro-organismos	Goiabeira				Nistatina		Cloranfenicol		Gentamicina	
	Aquoso		Etanólico							
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
Ca	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	41,6 ± 1,5 a (cv = 3,67)	43,3 ± 0,5 a (cv = 1,33)	-	-	-	-
Ec	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	9,3 ± 0,5 a cv = 8,10 %	15,0 ± 1,0 b cv = 4,19 %	-	-	27,0 ± 2,0 a cv = 7,41 %	46,6 ± 1,5 b cv = 3,27 %	-	-
Kp	0,0 ± 0,0 a	12,0 ± 0,0 b cv = 2,53 %	0,0 ± 0,0 a	14,0 ± 0,0 b cv = 2,44 %	-	-	36,0 ± 1,0 a cv = 2,78 %	44,0 ± 1,0 b cv = 2,27 %	-	-
Pa	0,0 ± 0,0 a	12,6 ± 1,1 b cv = 2,83 %	10,3 ± 1,5 a cv = 2,62 %	16,3 ± 0,5 b cv = 3,52 %	-	-	-	-	33,6 ± 0,0 a cv = 1,71 %	45,0 ± 0,0 b cv = 1,0 %
ST	7,6 ± 0,5 a cv = 9,23 %	13,3 ± 1,5 b cv = 6,01 %	8,3 ± 1,1 a cv = 9,29 %	16,6 ± 0,5 b cv = 4,48 %	-	-	29,0 ± 2,6 a cv = 9,12 %	41,0 ± 1,7 b cv = 4,22 %	-	-
Sa	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	-	-	-	-	28,0 ± 2,6 a cv = 9,45 %	34,3 ± 0,5 b cv = 1,68 %
Bs	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	13,6 ± 2,0 a cv = 8,27 %	13,6 ± 0,5 a cv = 5,49 %	-	-	-	-	36,6 ± 2,0 a cv = 5,68 %	47,6 ± 2,3 b cv = 4,84 %

D: disco; P: poço; cv: coeficiente de variação; Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha$ : 0,05); (O) não apresentou inibição; (-): teste não aplicável; Ca: *Candida albicans* ATCC 10231; Ec: *Escherichia coli* ATCC 2592; Kp: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; Pa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; ST: *Salmonella enterica* subsp *enterica* Typhimurium 14028; Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; Bs: *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* CCCD B005.

formas de preparo e pelas diferenças na composição química da planta, a qual pode ser influenciada por diferentes fatores do ambiente, como: local, condições de cultivo e época de colheita (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Não foi possível comparar os resultados obtidos pelo método de microdiluição em caldo dos extratos de *M. cauliflora*, já que ainda não existem estudos publicados demonstrando as CIMs deste extrato pelo mesmo método.

Em relação aos antimicrobianos comerciais utilizados como controles positivos, todos foram capazes de inibir o crescimento microbiano em baixas concentrações (Tabelas 1 e 2).

## Comparação dos métodos

Os valores referentes às atividades inibitórias dos extratos aquosos, seja por difusão em disco, em poço ou microdiluição, foram menores do que os obtidos para os extratos etanólicos. Esse fato provavelmente está relacionado aos distintos metabólitos que podem ser obtidos nas diferentes extrações aquosa e etanólica, podendo conferir maior atividade aos extratos etanólicos quando comparados aos aquosos (COWAN, 1999; SANCHES *et al.*, 2005).

O método de microdiluição em caldo possibilitou a visualização da atividade inibitória dos extratos em menores concentrações, porém, o mesmo não ocorreu nos métodos de difusão em ágar. Pode ser observado também que, ao contrário do método de microdiluição em caldo, alguns extratos nem mesmo apresentaram atividade inibitória quando foram

utilizados nos testes de difusão. A ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que o extrato seja inativo frente ao micro-organismo testado, mas sim que a difusão não foi completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura (MORENO *et al.*, 2006).

Resultados semelhantes foram descritos por ALVES *et al.* (2008), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de extratos etanólico e diclorometânico de *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae), utilizando os métodos de difusão em ágar e em caldo frente às bactérias Gram-positivas e negativas. Os autores observaram que, no teste de microdiluição em caldo, os extratos apresentaram atividade antibacteriana em que as CIMs variaram entre 250 e > 400 µg.mL<sup>-1</sup>, superior ao teste de difusão em ágar ou disco, sendo verificadas as medidas dos halos somente entre 100 e 300 mg.mL<sup>-1</sup>. Segundo os autores, isso pode estar relacionado com a dificuldade de difusão do extrato no meio de cultura sólido, ou ainda, devido às características lipofílicas de algumas amostras e/ou a natureza química das substâncias isoladas (RIOS *et al.*, 1988).

OTHMAN *et al.* (2011) avaliaram a atividade dos extratos de folhas de *Duabanga grandiflora* e *Acalypha wilkesiana*, utilizando a mesma técnica aqui utilizada com ágar, acrescentando para disco-difusão o espalhamento em profundidade, e ainda, ensaio turbidimétrico em caldo. Segundo os autores, os melhores resultados foram obtidos nos métodos turbidimétrico, que mede a contagem total de células bacterianas, incluindo células vivas e as células mortas, e com o teste de difusão em ágar por *pour plate*, o qual reflete a contagem

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima, Concentração Funcida/Bactericida Mínima (mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos de *Myrciaria cauliflora*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* e antimicrobianos comerciais frente a micro-organismos padrão

Extratos		<i>Candida albicans</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
		CIM	CFM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Etanólico	6,25	ND	0,39	0,39	0,78	3,13	0,39	0,39	0,39	0,78	12,5	ND	6,25	ND
	Aquoso	12,5	ND	3,13	3,13	6,25	25	3,13	3,13	3,13	6,25	25	ND	75	ND
<i>Psidium guajava</i>	Etanólico	12,5	ND	1,56	1,56	1,56	6,25	1,56	1,56	1,56	1,56	12,5	ND	6,25	ND
	Aquoso	12,5	ND	3,13	6,25	25	50	6,25	6,25	6,25	12,5	50	ND	100	ND
<i>Syzygium cumini</i>	Etanólico	6,25	ND	0,78	0,78	3,13	6,25	0,78	3,13	0,78	6,25	12,5	100	6,25	ND
	Aquoso	6,25	ND	3,13	3,13	3,13	6,25	1,56	1,56	1,56	3,13	25	ND	100	ND
Cloranfenicol		-	-	0,04	0,04	0,04	0,04	-	-	0,04	0,04	-	-	-	-
Gentamicina		-	-	-	-	-	-	0,04	0,09	-	-	0,04	0,09	0,04	0,04
Nistatina		0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ND: não determinado na faixa de concentração testada; (-): teste não aplicável.

de bactérias viáveis, sendo mais pontual e preciso. Assim, os autores propuseram o uso de ambos os ensaios, em ágar e caldo, para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas para obter resultados confiáveis.

Verificaram-se que os resultados da CIM e CFM/CBM obtidos nesse estudo refletem o efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento celular dos micro-organismos em caldo. A confirmação da presença de células vivas com o uso do CTT ou a presença de células viáveis em ágar exclui a necessidade da utilização de outros testes em base ágar. ZGODA; PORTER (2001) avaliaram extratos orgânicos das plantas *Lemma minor* L. e *Ilex cornuta* Lindl. pela metodologia de microdiluição em caldo e afirmaram que esse método se mostrou confiável para a triagem de produtos naturais contra bactérias e fungos, permitindo realizar triagem antimicrobiana e determinando a CIM em testes com um grande número de extratos, pela utilização de uma escala de nanogramas a microgramas dos compostos a serem testados.

Apesar dos testes em ágar serem os mais utilizados e apresentarem como vantagem a simples avaliação dos resultados pela visualização do halo, possuem como desvantagem serem métodos muito trabalhosos, no que se refere à preparação das placas e do inóculo bacteriano. Além disso, o uso do disco imerso no extrato deixa resíduo adjacente ao disco, influenciando na medição dos halos e na concentração do próprio disco. Já o teste de microdiluição gera uma economia de espaço, meios de cultura e reagentes, possibilitando a determinação quantitativa da CIM, sendo possível realizar várias repetições e diversas diluições uniformes dos extratos

em apenas uma placa por micro-organismo, aumentando a confiabilidade dos testes.

## CONCLUSÕES

Ao comparar os resultados da atividade antibacteriana dos extratos aquosos e etanólicos utilizando-se o método de difusão em ágar, observou-se que houve diferença significativa entre as metodologias de difusão em ágar analisadas, sendo que o ensaio de difusão em ágar pela técnica do poço demonstrou melhor desempenho, já que houve inibição da maioria das bactérias testadas. Embora esta tenha sido a melhor técnica de difusão observada neste estudo, pode-se considerar que o método de microdiluição em caldo foi a melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana, por fornecer dados quantitativos, além de ser mais confiável e econômico para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa.

---

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, Franca, v.31, p.1224-1229, 2008.
- CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. *Acta Farmaceutica Bonaerens*, Recife, v.21 n.4, p.255-258, 2002.
- CHAH, K.F.; EZE, C.A.; EMUELOSI, C.E.; ESIMONE, C.O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.104, p.164-167, 2006.
- CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B.K.; VAIAD, L.K. Antibacterial activity of *Syzygium* species. *Fitoterapia*, v.69, n.4, p.356-367, 1998.
- COSTA, A.C.B.P.; PEREIRA, C.A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida Glabrata* e *Candida tropicalis*. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.38, n.2. p.111-116, 2009.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Oxford, v.12, p.564-582, 1999.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3ª ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3, 2008.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standand-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009b.
- DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Dunboyne, v.17, p.527-529, 2005.
- FERREIRA, D.F. 2007. *Sistema Sisvar para análises estatísticas*. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/danielff/softwares.htm>. Acesso em 18 nov. 2011.
- KARAMAN, I.; ŞAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M. ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v.85, p.231-235, 2003.
- KING, T.; DYKES, G.; KRISTIANTI, R. Comparative evaluation methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, Australia, v.91, n.6, p.1423-1429, 2008.
- LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de Jambolão (*Syzygium cumini* (L. skulls). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376, 2005.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas medicinais*. 3ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2000. 220p.
- MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMOES, C.M.O. (Ed). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ª ed. Florianópolis/Porto Alegre: Ed.Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. 2002. p.527-540.
- MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, Buenos Aires, v.40, p.223-231, 2006.
- NAIR, R.; CHANDA, S. In vitro antimicrobial activity of *Psidium Guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.38, p.452-458, 2007.
- 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.
- OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.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, 2008.
- OTHMAN, M.; LOH, H.S.; WIART, C.; KHOO, T.J.; LIM, K.H.; TING, K.N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, v.84, p.161-166, 2011.
- REYNERTSON, K.A. *Phytochemical analysis of bioactive components from edible Myrtaceae fruits*. 2007. (Dissertação de Mestrado) - The City University of New York, 2007. Disponível em: [http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/archive/Reynertson\\_dissertation\\_final\\_11\\_15\\_2006.pdf](http://www.home.earthlink.net/~phytochemistry/archive/Reynertson_dissertation_final_11_15_2006.pdf). Acessado em 5 jun. 2010.
- RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, Burjassot, v.2, p.127-149, 1988.
- SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; SCHIAVINI, M.S.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Maringá, v.48, n.3, p.429-36, 2005.
- SANTURIO, M.J.; SANTURIO, D.F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.
- ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, Philadelphia, v.39, n.3, p.221-225, 2001.