

**Comparação de Métodos
para a Avaliação “in Vitro”
de Atividade Antimicrobiana
de Extratos Vegetais**

ISSN 1983-0467
Novembro, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sul
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 40

Comparação de Métodos para a Avaliação “in Vitro” de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais

Emanuelle Baldo Gaspar
Alessandro Pelegrine Minho
Robert Domingues
Ketrin Cristina da Silva

Embrapa Pecuária Sul
Bagé, RS
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

Rodovia BR-153, Km 632,9 Vila Industrial, Zona Rural, Caixa Postal 242

CEP 96401-970, Bagé, RS

Fone: + 55 (53) 3240-4650

Fax: + 55 (53) 3240-4651

www.embrapa.br/pecuaria-sul

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Fernando Flores Cardoso*

Secretária-Executiva: *Márcia Cristina Teixeira da Silveira*

Membros: *Bruna Pena Sollero, Elisa Köhler Osmari, Estefania Damboriarena, Fabiane Pinto Lamego, Graciela Olivella Oliveira, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Robert Domingues, Sérgio de Oliveira Jüchem.*

Suplentes: *Henry Gomes de Carvalho, Marcos Jun Iti Yokoo*

Supervisor editorial: *Lisiane Brisolara*

Revisor de texto: *Manuela Beragmim*

Normalização bibliográfica: *Graciela Olivella Oliveira*

Editoração eletrônica: *Murilo Lopes Gonçalves*

1ª edição

Publicação digitalizada (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sul

Comparação de métodos para a avaliação "in vitro" de atividade antimicrobiana de extratos vegetais / Emanuelle Baldo Gaspar... [et al.].— Bagé : Embrapa Pecuária Sul, 2017. PDF (23 p.).— (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1983-0467 ; 40)

1. Extrato vegetal. 2. Planta medicinal. 3. Bactericida. I. Gaspar, Emanuelle Baldo. II. Embrapa Pecuária Sul. III. Série.

CDD 615.42

© Embrapa 2017

Sumário

| | |
|-------------------------------------|----|
| Resumo | 4 |
| Abstract | 6 |
| Introdução | 7 |
| Material e Métodos | 9 |
| Resultados e Discussão | 13 |
| Conclusões | 15 |
| Referências | 19 |

Comparação de Métodos para a Avaliação “in Vitro” de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais

Emanuelle Baldo Gaspar¹
Alessandro Pelegrine Minho²
Robert Domingues³
Ketrin Cristina da Silva⁴

Resumo

O uso extensivo e inadequado de antibióticos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, impõe uma grande pressão de seleção aos microrganismos, o que leva ao aumento da prevalência de cepas resistentes aos antibióticos, e à redução, se não ausência, de alternativas terapêuticas. Os métodos tradicionais de pesquisa não têm tido sucesso no desenvolvimento de novas drogas, sendo necessária a adoção de novas estratégias. Dentre estas estratégias, podemos destacar a busca por novos compostos ativos provenientes de fontes naturais, sendo que, a descoberta de drogas a partir de vegetais tem ganhado grande interesse, devido ao baixo custo de produção, diversidade estrutural e múltiplos usos dos compostos ativos. A triagem de compostos vegetais com efeito antimicrobiano, entretanto, esbarra na falta de pontos de corte para prever a eficácia de um antimicrobiano vegetal e na falta de padronização de técnicas. Desta forma, buscamos com este trabalho comparar três diferentes técnicas de avaliação de efeito antimicrobiano de extratos de diferentes polaridades de plantas das famílias:

Mirtaceae (planta A); Asteraceae (planta B) e Fabaceae (planta C): (i) difusão em ágar variante disco-difusão, (ii) difusão em ágar variante perfuração de poço e (iii) microdiluição em meio líquido (caldo). Estes testes foram realizados com *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A partir dos resultados, recomendamos a utilização da microdiluição em caldo para avaliação da suscetibilidade bacteriana a extratos vegetais. Por outro lado, as técnicas de difusão apresentaram pouca utilidade para essa finalidade.

Palavra Chave: Extratos de plantas - Antimicrobianos - Antibióticos

¹ Médico Veterinário, Pós-Doutor em Sanidade Animal, Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, C. Postal 242, CEP 96401-970, Bagé - RS - alessandro.minho@embrapa.br

² Médica Veterinária, Pós-Doutora em Microbiologia Médica, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, C. Postal 242, CEP 96401-970, Bagé - RS - emanuelle.gaspar@embrapa.br

³ Biólogo, Mestre em Melhoramento Genético, Analista da Embrapa Pecuária Sul, C. Postal 242, CEP 96401-970, Bagé - RS - robert.domingues@embrapa.br

⁴ Bióloga, Pós-Doutoranda Universidade de São Paulo

Comparação de Métodos para a Avaliação “in Vitro” de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais

Abstract

The extensive and inappropriate use of antibiotics in both, human and veterinary medicine, imposes a great pressure of selection to the microorganisms, which leads to increased prevalence of antibiotic-resistant strains, and the reduction, if not the absence, of therapeutic alternatives. The traditional research methods have not been successful in developing new drugs, being necessary new strategies. Among these strategies we can highlight the research for new active compounds from natural sources. The discovery of drugs from plants has gained great interest due to the low cost of production, structural diversity and multiple uses of the active compounds. Screening of plant compounds with antimicrobial effect, however, have the obstacle of the lack of breakpoints to predict the effectiveness of a plant antimicrobial and lack of standardization techniques. In this way, we aimed with this work to compare three different techniques for evaluating antimicrobial effect of extracts of different polarities of plants from families: Mirtaceae (plant A); Asteraceae (plant B) e Fabaceae (plant C): (i) agar diffusion variant disk-diffusion, (ii) agar diffusion variant well-diffusion (iii) microdilution broth. These tests were performed with *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. From the results, we recommend using the broth microdilution for evaluation of bacterial susceptibility to plant extracts. On the other hand, diffusion techniques showed little use for this purpose.

Index Terms: Plant Extracts - Antimicrobials - Antibiotic

Introdução

Embora a descoberta dos antibióticos seja uma das maiores conquistas da área médica e veterinária, o uso extensivo e inadequado destas drogas impõe uma grande pressão de seleção aos microrganismos, o que leva ao aumento da prevalência de cepas resistentes aos antibióticos (NAGEL et al., 2016; RUSSELL, 2003; STEWART, 2002). Ademais, o uso indiscriminado destes fármacos em animais de produção também pode levar à persistência e disseminação de cepas resistentes, inclusive de microrganismos zoonóticos (KOLOTILIN et al., 2014). Devemos considerar ainda, a potencial geração de resíduos fármacos em produtos de origem animal (carne, leite, ovos e mel) um perigo real para a saúde do consumidor (BEYENE, 2016). Infelizmente, os métodos tradicionais de pesquisa não têm tido sucesso no desenvolvimento de novas drogas. Além disso, há um alto custo para a indústria farmacêutica obter aprovação para comercializar uma nova droga com atividade superior às drogas existentes e com baixas taxas de resistência (ABREU et al., 2012). De fato, nas últimas três décadas o número de novas drogas aprovadas vem caindo drasticamente. De 1980 a 1984 surgiram 19 novos compostos para o tratamento de infecções bacterianas. Já no período de 2010-2014, o Food Drug Administration (FDA), órgão americano responsável pela avaliação de novos medicamentos, aprovou apenas seis drogas antimicrobianas (SPELLBERG, 2014; VENTOLA, 2015). A dificuldade no desenvolvimento de novos compostos antibacterianos com toxicidade seletiva, aliada ao aumento de resistência aos antibióticos disponíveis, torna as alternativas terapêuticas cada vez mais escassas. Dentre as ações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para controlar a ocorrência e a disseminação de cepas resistentes está o encorajamento para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Neste sentido, novas estratégias de pesquisa são desejáveis, ou, até mesmo, impreteríveis. Desde a antiguidade até a era moderna, não faltam exemplos de plantas que têm mostrado potencial terapêutico no tratamento de infecções (ABREU et al., 2012; RADULOVIC et al., 2013).

Das mais de 350 mil espécies conhecidas de plantas, estima-se que apenas de 5 a 10% tenham sido estudadas. Considerando que cada planta contém de 500 a 800 metabólitos secundários diferentes (fitoquímicos), o potencial de descoberta de novos produtos é imenso (ABREU et al., 2012; SIBANDA; OKOH, 2007). O reino Plantae representa um enorme reservatório de compostos de origens distintas, muitos dos quais com potencial microbicida (RADULOVIC et al., 2013). Alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos dentre outros compostos são metabólitos secundários de plantas particularmente interessantes, neste sentido (CROTEAU et al., 2000; DAS et al., 2010). Resistência antimicrobiana a produtos naturais, originários de plantas, tem sido raramente detectada (CUZZOLIN et al., 2006; ZENG; JIANG, 2010). Compostos do metabolismo secundário formam um grupo heterogêneo de moléculas, tanto do ponto de vista biossintético quanto do estrutural e parecem não participar diretamente do crescimento e desenvolvimento das plantas. Por outro lado, estes compostos têm grande importância na proteção das plantas contra o ataque de herbívoros e microrganismos ou como atrativos para polinizadores e animais dispersores de sementes ou ainda como agentes alelopáticos (CROTEAU et al., 2000; GERTSCH, 2011). Como estes compostos têm, entre outras funções, a de proteção das plantas contra invasão por microrganismos, diversos deles têm potencial para serem usados como antimicrobianos. A busca por novos compostos ativos provenientes de fontes naturais é altamente desejável (ALVIN et al., 2014), sendo que, a descoberta de drogas a partir de vegetais tem ganhado grande interesse, devido ao baixo custo de produção, diversidade estrutural e múltiplos usos dos compostos ativos (ALVIN et al., 2014). Existem alguns métodos para testar a atividade antimicrobiana de novas substâncias, dentre elas, os extratos de plantas. Estes métodos estão muito bem padronizados para testes com antibióticos conhecidos. O instituto norte-americano CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) periodicamente publica manuais para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos, nos quais estão indicadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e diâmetros dos halos de inibição para os antibióticos, permitindo a classificação dos isolados

bacterianos em sensíveis, intermediários ou resistentes (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2014). Porém, a padronização dos pontos de corte para prever a eficácia de um antimicrobiano extraído de plantas ainda não foi estabelecida. Além disso, extratos de plantas são compostos por diferentes substâncias presentes em concentrações desconhecidas. Estas substâncias podem ter efeito isolado ou ainda agir em sinergia ou antagonismo com outras substâncias e, o que se observa, é o somatório destes efeitos. Desta forma, buscamos com este trabalho comparar três diferentes técnicas de avaliação de efeito antimicrobiano de extratos de diferentes polaridades de plantas das famílias: Mirtaceae (planta A); Asteraceae (planta B) e Fabaceae (planta C): (i) difusão em ágar variante disco-difusão, (ii) difusão em ágar variante perfuração de poço e (iii) microdiluição em meio líquido (caldo). Estes testes foram realizados com *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Material e Métodos

1. Preparo e solubilização dos extratos das plantas

Para obtenção do extrato bruto (pó seco), as plantas A e B foram mantidas em estufa a 40 °C pelo tempo necessário para total secagem. As mesmas foram posteriormente moídas e armazenadas a 4 °C, protegidas da luz. O extrato bruto em pó da planta C foi obtido diretamente de uma indústria produtora de extratos vegetais ricos em taninos.

A obtenção dos extratos metanólicos e hexânicos das plantas A e B se deu pelo método de extração por refluxo em duas etapas à temperatura de ebulição do solvente, por quatro horas, a partir do extrato bruto (pó seco). Após a primeira etapa, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado mais solvente, para a realização da segunda etapa da extração por refluxo, por mais quatro horas na mesma temperatura.

Os sobrenadantes obtidos nas duas etapas foram misturados e filtrados com algodão hidrófilo. As soluções filtradas foram submetidas à rotaevaporação a 50 °C até que todo o solvente fosse evaporado. Os extratos vegetais, depois da rotaevaporação, foram armazenados protegidos da luz, a 4 °C. Extratos metanólico e hexânico da planta C não foram utilizados, pois apresentavam baixo rendimento. As solubilizações dos extratos foram realizadas no dia das avaliações de efeito bactericida. Para os extratos aquosos, o pó seco da planta foi misturado à água deionizada a 40 °C, permanecendo em infusão por 30 minutos, sob agitação constante. A solução foi centrifugada e o pellet foi desprezado. O sobrenadante foi filtrado com algodão hidrófilo e, em seguida, com membrana de polietersulfona de 0,22 μm , para garantir a esterilidade. Para os extratos metanólicos e hexânicos, os produtos da rotaevaporação foram solubilizados em polissorbato 20 (Tween® 20) 5% estéril como diluente. Para a diluição manteve-se em agitação a 40 °C durante 30 minutos. Após, filtrou-se em algodão e posteriormente em membrana de polietersulfona de 0,22 μm . Para a realização dos testes foram preparadas soluções-mãe na concentração de 100 mg.mL⁻¹.

2. Preparo dos inóculos bacterianos

Os testes foram realizados com as cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Três colônias de cada bactéria foram semeadas em 3 mL de caldo tripton de soja (TSB) (*E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) ou caldo "brain heart infusion" (BHI) (*E. faecalis*). Os inóculos foram mantidos a 37 °C sob agitação de 200 rpm pelo tempo necessário para que houvesse a turvação dos meios. As culturas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos, foi retirado o sobrenadante e adicionado caldo Müller-Hinton (MH) até obtenção de turvação correspondente a 0,5 da escala McFarland (DO600 0,132 corresponde a 1,5x10⁸ UFC.mL⁻¹). Caso necessário, após análise por espectrofotometria (DO600) foram feitas diluições para ajustar a concentração para a escala 0,5.

Após o ajuste, foi realizada a diluição do inóculo bacteriano em meio Müeller-Hinton (1/100) a fim de se obter a concentração bacteriana de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

O extrato aquoso da planta A precipitou em caldo MH e todo teste teve que ser feito em tampão isotônico glicose fosfato (IGP) (tampão fosfato 1 mM; 287 mM glicose, pH 7).

3. Teste de microdiluição em caldo (concentração inibitória mínima e/ou concentração bactericida mínima)

Este teste foi realizado em placas de 96 poços. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A partir da solução-mãe¹ dos extratos foram feitas, na própria placa, diluições seriadas na base dois (2), num intervalo de 100 até 0,196 mg.mL⁻¹, totalizando 10 concentrações. Além dos extratos foram incubados controles positivos (somente o extrato) e controles negativos (somente a bactéria) para cada cepa testada. Foram colocados 100 μ L das diluições do extrato e 100 μ L da suspensão de bactérias, sendo que, desta forma, as diluições finais dos extratos variaram entre 50 e 0,098 mg.mL⁻¹ e a concentração final de bactéria ficou em $7,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas, sob agitação.

Após 24 horas de incubação, foi avaliada a turbidez dos poços. A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração na qual não foi observada turbidez. Foram selecionadas três concentrações antes e três após a CIM e foram plaqueados 10 μ L em ágar BHI sangue (5%), para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), que é a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano, após 24 horas de incubação, a 37 °C.

Em alguns casos não foi possível observar a CIM, pois a turbidez do extrato impediu a identificação da turbidez causada pelo crescimento bacteriano. Neste caso, o resultado foi anotado como não identificável (N.I.).

¹Solução-mãe ou stock solution (na expressão em inglês) é uma expressão comumente utilizada em química analítica e refere-se à solução de maior concentração, a qual será utilizada nas diluições seriadas. Geralmente, é padronizada nas análises de eficácia in vitro (50 ou 100 mg.mL⁻¹), mas pode ser a maior concentração possível de diluição do extrato vegetal.

4. Difusão em ágar, variante disco-difusão

O teste de disco-difusão foi realizado em triplicata apenas com a maior concentração do extrato vegetal (50 mg.mL⁻¹). Foram feitos pré-inóculos de cada uma das cepas de bactérias, até que as mesmas atingissem a escala 0,5 de McFarland. As culturas foram inoculadas na superfície do meio de cultura ágar MH com auxílio de suabe estéril, para uma cobertura uniforme do inóculo. Imediatamente após a sementeira, foram dispensados sobre a superfície do meio três discos estéreis de papel filtro, com um espaçamento de, pelo menos, 3 cm entre cada disco e 1,5 cm entre o disco e a borda da placa. Em seguida foram adicionados 5 µL do extrato sobre os discos. Após incubação a 37 °C, durante 18 horas, foi observada a possível formação de halo de inibição, que, caso presente, teve seu diâmetro medido por meio de uma régua. Os resultados foram expressos como a média de diâmetro do halo em milímetros (mm).

5. Difusão em ágar, variante perfuração de poço

Foram utilizadas todas as dez concentrações dos extratos vegetais (50 a 0,098 mg.mL⁻¹) preparadas em microtubos. A preparação dos inóculos microbianos e o plaqueamento foram feitos da mesma forma descrita na técnica de disco-difusão.

Após distribuição uniforme do inóculo bacteriano sobre a superfície do ágar, foram feitos poços com 6 mm de diâmetro. No total são feitos 10 poços por placa, com 30 mm de distância entre eles e 15 mm de distância da borda da placa. Em cada poço foram dispensados 50 µL de extrato, totalizando as dez diferentes concentrações testadas. Após a absorção do líquido pelo meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C, por 18 horas. Passado este tempo, foi verificada a possível formação de halo de inibição de crescimento. Os resultados foram expressos como a menor concentração necessária para a formação de halo de inibição.

Resultados e Discussão

A atividade antimicrobiana de plantas pode ser detectada pela observação da resposta de inibição de crescimento de microrganismos colocados em contato com extratos de tecidos vegetais. Muitos métodos são viáveis para esta observação, mas como estes não são igualmente sensíveis e, nem sempre são baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos podem ser profundamente afetados tanto pelo método quanto pelos microrganismos selecionados (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

Os resultados comparativos dos testes para as plantas A, B e C podem ser visualizados respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3.

Em todos os extratos da planta A, o efeito contra *E. fecalis* só pode ser observado na técnica de microdiluição (Tabela 1). Esta técnica também foi a única capaz de demonstrar a atividade contra *E. coli* e *P.*

aeruginosa do extrato da planta C (Tabela 3). Apenas em um caso foi observado efeito na técnica de difusão, variante perfuração de poço, mas não na técnica de microdiluição em meio líquido, trata-se do extrato aquoso da planta A contra *P. aeruginosa* (Tabela 1).

No presente trabalho, somente para o extrato metanólico foi observada atividade antibacteriana da planta B (Tabela 2), sendo este apenas para *S. aureus*.

Já o extrato hexânico da planta A apresentou atividade contra todas as cepas testadas (Tabela 1). No geral, na maioria dos casos no qual o efeito inibitório foi observado, a técnica de microdiluição mostrou-se mais sensível, exigindo doses menores do extrato de planta para que o efeito inibitório fosse observado (Tabela 1; Tabela 3).

Plantas da família Mirtaceae têm demonstrado atividade antimicrobiana em outros trabalhos (BARBOSA et al., 2015; SANTOS et al., 2015), enquanto que este mesmo tipo de atividade ainda não foi demonstrada em plantas da espécie B. Porém, outras espécies do mesmo gênero da planta B têm demonstrado atividade antimicrobiana, tanto contra bactérias (DEUSCHLE et al., 2007; HASSAN et al., 2012), quanto contra fungos (HASSAN et al., 2012; HOL; VAN VEEN, 2002).

A técnica de difusão, variante disco-difusão, apesar de ser de enorme valia nos testes de “screening” de sensibilidade de antibióticos, mostrou sensibilidade muito baixa para o teste com extratos de plantas, mesmo utilizando-se apenas a concentração mais alta de extrato, provavelmente por dificuldade de difusão do extrato.

Além disso, por não termos um padrão de diâmetro mínimo para que um extrato seja considerado eficiente ou não, a limitação da técnica é maior ainda. Na maioria dos estudos a zona de inibição é comparada com halos obtidos para antibióticos (IEVEN et al., 1979), o que pode ser útil para estabelecer a sensibilidade do microrganismo testado.

A grande vantagem dos testes de difusão em ágar é que estes permitem o uso de extratos sem filtração. Porém, essa não é a melhor escolha para avaliação de compostos apolares devido à dificuldade de difundirem-se no meio de cultura. O mesmo é válido para dispersões aquosas contendo substâncias de alto peso molecular (peso molecular acima de 100 kDa) (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). Talvez esse seja o motivo da atividade antimicrobiana do extrato aquoso da planta A ter sido observada apenas em *S. aureus*, por esta metodologia. Extratos não polares, óleos essenciais, suspensões de sólidos ou emulsões de substâncias antimicrobianas, que não difundem bem no ágar, podem ser testadas por incorporação destas na manufatura do próprio ágar (meio), ou em soluções aquosas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991), como por microdiluição em caldo.

Avaliações gerais são muito mais eficientes para substâncias solúveis em água e translúcidas, em comparação aos extratos de plantas. Vários autores citam o problema do “screening” com extratos de plantas (FARNSWORTH et al., 1966; IEVEN et al., 1979; RIOS et al., 1988). No presente trabalho tivemos alguns problemas. Na maioria dos casos a CIM não pôde ser definida, pois a turbidez do extrato dificulta a visualização de turbidez pelo crescimento microbiano.

Diluição em ágar pode ser o método mais conveniente para testar amostras complexas, tais como extratos de plantas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). Diluição em meio líquido é o mais laborioso, porém o mais acurado procedimento e que apresentou resultados melhores neste ensaio e em outros experimentos (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). De fato, os valores de CIM obtidos por microdiluição podem ser considerados promissores, sendo necessário o fracionamento do extrato vegetal para melhor predição dos compostos com atividade bactericida.

Conclusões

Recomenda-se a utilização da microdiluição em caldo para avaliação da suscetibilidade bacteriana a extratos vegetais. Por outro lado, as técnicas de difusão apresentaram pouca utilidade para essa finalidade.

Tabela 1. Efeito de avaliação de atividade antimicrobiana de extratos da planta A por meio de diferentes testes: microdiluição em caldo, difusão em ágar com perfuração e disco-difusão.

| Espécie bacteriana | Aquoso | | | | | | Tipo de extrato | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------|-------|------|------|------|------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | CIM | CBM | DP | DD | CIM | CBM | DP | DD | CIM | CBM | DP | DD | CIM | CBM | DP | DD |
| <i>Escherichia coli</i> | N.I. | S.E. | S.E. | S.E. | 12,5 | S.E. | S.E. | S.E. | 25 | S.E. | S.E. | S.E. | 25 | 25 | S.E. | S.E. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | N.I. | S.E. | 12,5 | S.E. | 6,25 | S.E. | S.E. | S.E. | 12,5 | S.E. | S.E. | S.E. | 12,5 | 12,5 | S.E. | S.E. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | N.I. | 3,125 | 50 | 7,33 | 0,78 | 1,56 | 12,5 | S.E. | 3,13 | 6,25 | S.E. | S.E. | 3,13 | 6,25 | S.E. | S.E. |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | N.I. | 0,39 | S.E. | S.E. | N.I. | 12,5 | S.E. | S.E. | N.I. | 25 | S.E. | S.E. | N.I. | 25 | S.E. | S.E. |

* CIM: concentração inibitória mínima (mg.mL⁻¹) obtida por microdiluição em caldo; CBM: concentração bactericida mínima (mg.mL⁻¹) obtida por microdiluição em caldo. DP: difusão em ágar com perfuração (mm); DD: disco-difusão (mm). N.I.: não identificável; S.E.: sem efeito

Tabela 2. Efeito de avaliação de atividade antimicrobiana de extratos da planta B por meio de diferentes testes: microdiluição em caldo, difusão em ágar com perfuração e disco-difusão.

| Espécie bacteriana | Tipo de extrato | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|------|------|------|------------|------|------|------|----------|------|------|------|
| | Aquoso | | | | Metanólico | | | | Hexânico | | | |
| | CIM | CBM | DP | DD | CIM | CBM | DP | DD | CIM | CBM | DP | DD |
| <i>Escherichia coli</i> | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. |
| <i>Staphilococcus aureus</i> | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | 50 | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | N.I. | S.E. | S.E. | S.E. | N.I. | S.E. | S.E. | S.E. | S.E. | N.I. | S.E. | S.E. |

*CIM: concentração inibitória mínima (mg.mL⁻¹) obtida por microdiluição em caldo; CBM: concentração bactericida mínima (mg.mL⁻¹) obtida por microdiluição em caldo. DP: difusão em ágar com perfuração (mg.mL⁻¹); DD: disco-difusão (mm). N.I.: não identificável; S.E.: sem efeito.

Tabela 3. Efeito de avaliação de atividade antimicrobiana de extrato aquoso comercial da planta C, por meio de diferentes testes: microdiluição em caldo, difusão em ágar com perfuração e disco-difusão.

| Espécie bacteriana | CIM | CBM | DP | DD |
|-------------------------------|-------|------|------|------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,78 | 3,13 | S.E. | S.E. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0,78. | 1,56 | S.E. | S.E. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,19 | 0,78 | 1,56 | 10 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | N.I. | 3,13 | 50 | 8 |

*CIM: concentração inibitória mínima (mg.mL^{-1}) obtida por microdiluição em caldo; CBM: concentração bactericida mínima (mg.mL^{-1}) obtida por microdiluição em caldo. DP: difusão em ágar com perfuração (mg.mL^{-1}); DD: disco-difusão (mm). N.I.: não identificável; N.I.: não identificável; S.E.: sem efeito.

Referências

ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, July 2012.

ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 7, p. 483-495, July/Ago. 2014.

BARBOSA, L. N.; PROBST, I. da S.; ANDRADE, B. F.; ALVES, F. C.; ALBANO, M.; CUNHA, M. de. L. da; DOYAMA, J. T.; RALL, V. L.; FERNANDES JÚNIOR, A. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of Oleo Science**, Tokio, v. 64, n. 3, p. 289-298, Mar. 2015.

BEYENE, T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. **Journal of Veterinary Science and Technology**, Los Angeles, v. 7, n. 1, p. 285, Jan. 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: twenty-fourth informational supplement: M100-S24. Wayne, 2014. 226 p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockeville: American Society of Plant Physiologists. 2000. p. 1250-1318.

CUZZOLIN, L.; ZAFFANI, S.; BENONI, G. Safety implications regarding use of phytomedicines. **European Journal of Clinical Pharmacology**, New York, v. 62, n. 1, 37-42, Jan. 2006.

- DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 4, n. 2, p. 104-111, Jan. 2010.
- DEUSCHLE, R. A.; CAMARGO, T. de; ALVES, S. H.; MALLMANNIV, C. A.; HEIZMANN, B. M. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 220-223, abr./jun. 2007.
- FARNSWORTH, N. R.; HENRY, L. K.; SVOBODA, G. H.; BLOMSTER, R. N.; YATES, M. J.; EULER, K. L. Biological and phytochemical evaluation of plants. I. biological test procedures and results from two hundred accessions, **Lloydia**, Cincinnati, v. 29, n. 2, p. 101-122, 1966.
- GERTSCH, J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 77, n. 11, p. 1086-1098, July 2011.
- HASSAN, W.; AL-GENDY, A.; AL-YOUSSEF, H.; EL-SHAZELY, A. Chemical constituents and biological activities of *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 67, n. 3-4, p. 144-150, März/Apr. 2012.
- HOL, W. H. G.; VAN VEEN, J. A. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* affect fungal growth. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 28, n. 9, p. 1763-1772, Sept. 2002.
- IEVEN, M.; BERGHE, D. A. V.; MERTENS, F.; VLIETINCK, A.; LAMMENS, E. Screening of higher plants for biological activities. I. Antimicrobial activity. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 36, n. 4, p. 311-321, 1979.
- KOLOTILIN, I.; TOPP, E. D.; COX, E.; DEVRIENDT, B.; CONRAD, U.; JOENSUU, J.; STÖGER, E.; WARZECHA, H.; MCALLISTER, T.; POTTER, A.; MCLEAN, M. D.; HALL, J. C.; MENASSA R. Plant-based solutions for veterinary immunotherapeutics and prophylactics. **Veterinary Research**, London, v. 45, n. 117, p. 1-12, Dec. 2014.
- NAGEL, J. L.; KAYE, K. S.; LAPLANTE, K. L.; POGUE, J. M. Antimicrobial stewardship for the infection control practitioner. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 771-784, Sept. 2016.
- RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D.; STOJANOVIC-RADIC, Z. Z.; STOJANOVIC, N. M. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 20, n. 7, p. 932-952, Mar. 2013.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, July/Aug. 1988.
- RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 3, n. 12, p. 794-803, Dec. 2003.

SANTOS, D. N.; SOUZA, L. L. de; OLIVEIRA, C. A. F. de; SILVA, E. R.; OLIVEIRA, A. L. de. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed (*Eugenia uniflora* L.) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 12, p. 93-99, Dec. 2015.

SIBANDA, T.; OKOH, A. I. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, ed. 25, v. 6, p. 2886-2896, Dec. 2007.

SPELLBERG, B. The future of antibiotics. **Critical Care**, London, v. 18, p. 228, June 2014.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 292, n. 2, p. 107-113, July 2002.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P. M. **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, 1991. v. 6, p. 47-69.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, Morrisville, v. 40, n. 4, p. 277-283, Apr. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office for Europe. **European strategic action plan on antibiotic resistance**. Copenhagen, 2011. 10 p. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/147734/wd14E_AntibioticResistance_111380.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2017.

ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Analysis of the adverse reactions induced by natural product-derived drugs. **British Journal of Pharmacology**, Malden, v. 159, n. 7, p. 1374-1391, Apr. 2010.

Embrapa

Pecuária Sul

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE 13605