

COMUNICADO
TÉCNICO

254

Teresina, PI
Outubro, 2019

Embrapa

Detecção da atividade antibacteriana in vitro de compostos naturais à base de plantas: metodologia científica

Luíz Gonzaga Alves dos Santos Filho
Karina Neob de Carvalho Castro
Alitieni Moura Lemos Pereira
Fábio Mendonça Diniz

Detecção da atividade antibacteriana in vitro de compostos naturais à base de plantas: metodologia científica

Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho, engenheiro de pesca, doutorando em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. Karina Neoob de Carvalho Castro, médica-veterinária, doutora em Sanidade Animal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Alitiene Moura Lemos Pereira, tecnóloga em Aquicultura, doutora em Aquicultura, pesquisadora da Embrapa Meio-Norte Parnaíba, PI. Fábio Mendonça Diniz, engenheiro de pesca, doutor em Genética Molecular, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

O interesse em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de agentes antimicrobianos naturais para combater a resistência microbiana tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Mayers, 2009). Conforme Soares e Tavares-Dias (2013), o uso de produtos naturais vem ganhando destaque, pois podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e microrganismos, além de não serem prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem no que se refere aos resíduos farmacológicos presentes nos alimentos de origem animal. A atividade de drogas e compostos naturais contra microrganismos é comumente detectada pela técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), na qual se determina a menor concentração da

substância que inibe o crescimento do microrganismo teste (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Existe uma gama de métodos utilizados para a detecção da atividade antibacteriana in vitro de drogas e de compostos naturais. Entre eles, destaca-se o método de diluição em ágar, que é padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e pelo Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST) (Balouiri et al., 2016).

O método de diluição trata-se de uma análise quantitativa utilizada para avaliação da Concentração Inibitória Mínima, na qual as substâncias em diferentes concentrações são adicionadas a um meio líquido

onde é inoculado o microrganismo e cujo resultado é determinado por meio de leitura visual ou por meio de um espectrofotômetro (Ostrosky et al., 2008; Balouiri et al., 2016). Tal análise pode ser dividida em macrodiluição e microdiluição. A macrodiluição utiliza tubos e volumes de 1 mL a 10 mL, enquanto a microdiluição é realizada em placas de 96 poços utilizando-se menores volumes (100 µL). Por ser uma tarefa tediosa e manual, que requer grande quantidade de reagentes e espaço, o método da macrodiluição mostra-se desvantajoso em relação à microdiluição (Jorgensen; Ferraro, 2009).

A microdiluição apresenta uma série de vantagens em comparação ao outro método, como sensibilidade, reprodutibilidade, economia de espaço, possibilidade de uso de placas comerciais e sistemas automatizados de leitura e baixo custo (Ostrosky et al., 2008; Veiga, 2016;). Dessa forma, o uso dessa técnica para a determinação da Concentração Inibitória Mínima de drogas e compostos é amplamente difundido (Chraibi et al., 2017; Amparo et al., 2018; Ceballos et al., 2018).

Posteriormente à verificação da CIM, pode-se prosseguir com o teste da Concentração Bactericida Mí-

nima (CBM), que se refere à concentração mínima do composto natural capaz de eliminar completamente as bactérias alvo do estudo. Nesse caso, as amostras obtidas do caldo nutritivo de cultura com o composto natural, na CIM observada, são subcultivadas em placas de Petri com meio de cultura à base de ágar e são expostas a condições ambientais favoráveis ao crescimento bacteriano, para verificar se a concentração testada teve ação bactericida, que é constatada quando não se verifica crescimento bacteriano na placa de Petri (Araújo et al., 2009).

Essa publicação descreve o procedimento otimizado de preparação das soluções que contêm óleo essencial (OE) e extrato etanólico (EE) de plantas, cultura das bactérias alvo do estudo, inoculação e diluição dos OE/EE e bactérias na placa de 96 poços, inoculação em placas de Petri com ágar Mueller Hinton e interpretação dos resultados.

Materiais necessários

Reagentes

- Solução de álcool etanólico 70%
- Etanol 99,8% PA
- Ágar Mueller Hinton
- Caldo Mueller Hinton
- Água destilada

- Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo – DMSO
- Tween 80 USP
- Cloreto de Sódio PA

Equipamentos e vidrarias

- Luvas de borracha nitrílica
- Máscara
- Papel toalha
- Placas de Petri
- Alça bacteriológica
- Estufa de cultura bacteriológica
- Cabine de segurança biológica
- Microtubos estéreis de 2 mL
- Pipetador 100-1000 µL
- Pipetador 10-100 µL
- Placa de cultura de células de 96 poços de fundo chato com tampa
- Proveta 10 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Agitador automático com aquecimento, ou resistência
- Vórtex/Agitador
- Tubos de ensaio ≥ 5 mL
- Becker 2.000 mL
- Seringa 1-10 mL
- Filtro de seringa de Nylon ou Teflon PTFE 0,45 µm ou 0,22 µm
- Cubeta de 0,7 mL para espectrofotômetro
- Espectrofotômetro UV/Vis
- Tubo de ensaio com tampa ≥ 30 mL
- Pincel marcador

Procedimentos

Esta metodologia tem duração de 4 dias, englobando desde a preparação da cultura da(s) bactéria(s) alvo do estudo até a observação do resultado da Concentração Bactericida Mínima. Dessa forma, em cada dia, são realizadas atividades específicas para a condução do ensaio, as quais são descritas a seguir.

Dia 1º

Renovação da cultura de bactérias alvo do estudo:

- Preparar meio de cultura ágar Mueller Hinton em 1 placa de Petri (para cada bactéria a ser testada), aproximadamente 25 mL de ágar para cada placa;
- Autoclavar placa de Petri e ágar Mueller Hinton em erlenmeyer (preparado conforme recomendações do fabricante);
- Com uma alça bacteriológica, selecionar um ponto ou colônia isolada da cultura de bactéria mantida previamente em estoque e, na placa preparada, fazer o esfregão em zigzag verticalmente e horizontalmente;
- Incubar por 18-24 horas a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ para utilização no dia seguinte.

Dia 2

Preparo da solução com OE/EE:

- Pesar 100 mg de OE/EE em microtubos estéreis;
- Diluir o EE da planta em uma solução com 90% de água destilada + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 100 mg/mL de EE;
- Diluir o OE em uma solução com 50% de etanol, 1% de tween e 49% de água destilada, na concentração de 100 mg/mL de OE;
- Preparar também um microtubo somente com a solução diluente para utilização no controle de toxicidade do diluente de OE/EE;
- Preparar o volume de 12 mL de caldo Mueller Hinton, conforme recomendações do fabricante, para cada placa de 96 poços (suplementar o meio com sal para bactérias de ambiente marinho, respeitando as particularidades de cada espécie);
- Preparar 2 tubos, com 5 mL de solução salina (0,85% de NaCl PA) cada, e esterilizar em autoclave. Um dos tubos será o branco; no outro, serão diluídas as bactérias para análise no espectrofotômetro UV/VIS;

- No microtubo que contém o EE/OE diluído (na concentração de 100 mg/mL), sugar com uma seringa estéril, retirar a agulha, inserir o filtro, expelir o filtrado em um microtubo estéril e identificá-lo com pincel marcador (Figura 1);

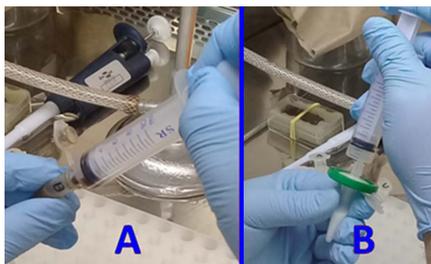


Figura 1. Procedimento de filtração da solução que contém óleo essencial ou extrato etanólico a 100 mg/mL. A: Retirada da solução do microtubo com seringa estéril; B: Seringa estéril acoplada ao filtro de nylon de porosidade 0,22 μ m para filtração/esterilização da solução em um microtubo estéril.

- Diluir em um dos tubos com solução salina (0,85% NaCl) as bactérias alvo do estudo, de forma que obtenha o padrão de turvação McFarland 0,5 (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com o auxílio de uma alça bacteriológica, selecionar de 2 a 3 colônias isoladas bem-definidas na cultura da placa de Petri preparada no dia anterior e dissolver no tubo de 5 mL com

solução salina. Utilizar um agitador automático para auxiliar na homogeneização (Figura 2).

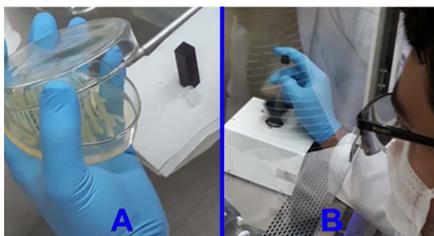


Figura 2. Preparo da solução no padrão de turvação McFarland 0,5. A: Seleção de colônias bacterianas (2 a 3 colônias) com a alça bacteriológica para dissolver no tubo com solução salina (0,85% NaCl); B: Homogeneização da solução salina com bactérias ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) no vórtex.

- Constatar em espectrofotômetro de UV/VIS a absorbância em 600 nm de 0,08 a 0,13 da solução salina que contém as bactérias diluídas (padrão McFarland 0,5). Caso a leitura de absorbância esteja abaixo de 0,08, inserir mais colônias de bactérias na solução salina e homogeneizar em agitador. Se a leitura ultrapassar 0,130, deve-se diluir a solução salina que contém bactérias, inserindo mais solução salina estéril;
- Dividir o caldo Mueller Hinton estéril da seguinte forma: separar 1 mL para o grupo controle de esterilidade e 11 mL para diluição das bactérias. Utilizar as bactérias no experimento com concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL, conforme orienta a CLSI (2015). Assim, por meio de diluições, calcula-se a quantidade necessária de solução salina bacteriana para o caldo: $C1 \times V1 = C2 \times V2 \therefore 1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL} \times V1 = 5 \times 10^5 \text{ UFC/mL} \times 11.000 \mu\text{L} \therefore V1 = 36,67 \mu\text{L}$. Ou seja, deve-se diluir 36,67 μL de solução salina com bactérias na concentração $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em caldo (11.000 μL - 36,67 μL = 10.963,33 μL) para resultar em um meio com bactérias diluídas na concentração final de 5×10^5 UFC/mL. Dessa forma, deve-se pipetar 10.963,33 μL de caldo Mueller Hinton estéril para um tubo de ensaio e 36,67 μL de solução salina com bactérias no padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland e, em seguida, homogeneizar em agitador. Assim, obtém-se caldo Mueller Hinton com as bactérias alvo do estudo na concentração desejada para utilizar na placa de 96 poços;
- Na placa de 96 poços (Figura 3), procede-se da seguinte forma:

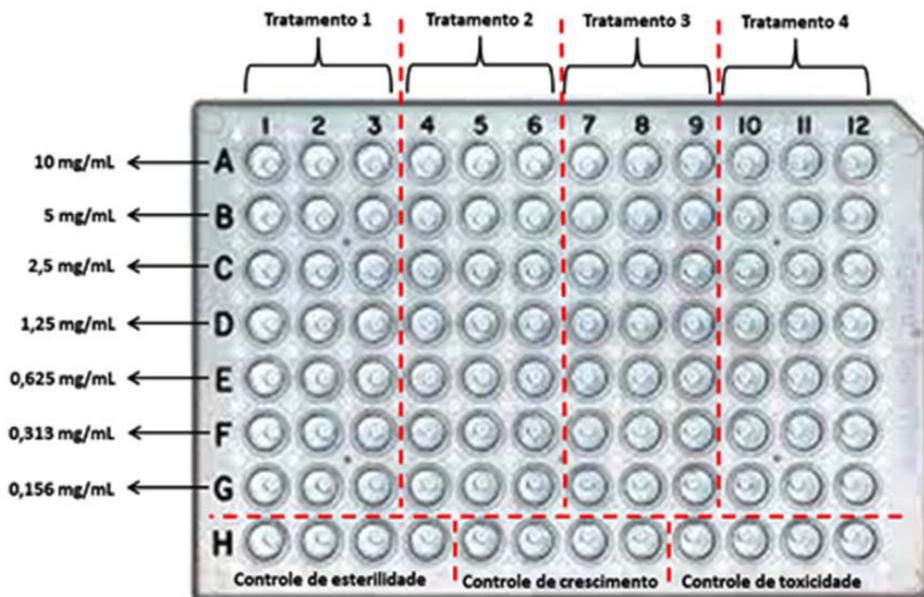


Figura 3. Exemplo de esquema de uso de placa de 96 poços com as respectivas concentrações de óleo essencial/extrato etanólico utilizadas. Coluna 1 a 3: teste do antimicrobiano 1; coluna 4 a 6: teste do antimicrobiano 2; coluna 7 a 9: teste do antimicrobiano 3; coluna 10 a 12: teste do antimicrobiano 4; linha H (H1 a H4): controle de esterilidade, no qual se utiliza apenas caldo nutritivo estéril, com intuito de constatar que o caldo nutritivo utilizado no experimento não teve contaminação; linha H (H5 a H8): controle de crescimento, no qual se utiliza apenas caldo nutritivo com bactérias, a fim de verificar a viabilidade das bactérias utilizadas; linha H (H9 a H12): controle de toxicidade, no qual se utiliza apenas o diluente do óleo essencial ou extrato etanólico na solução que contém caldo nutritivo e bactérias, para verificar se a solução diluente utilizada interfere ou não no resultado final de inibição do crescimento bacteriano. Cada tratamento utiliza três colunas de poços e cada coluna é referente a uma repetição do teste do produto antimicrobiano. Em cada tratamento, inicia-se com o produto antimicrobiano na linha A, na concentração de 10 mg/mL, e na linha seguinte com a metade da concentração, de forma sucessiva, até chegar na linha G com a concentração do antimicrobiano a 0,156 mg/mL.

- Injetar 180 μL do caldo com bactérias em todos os poços da linha A (da coluna 1 a 12) e no poço H9;
- Injetar 100 μL em todos os poços da linha B até a linha G e nos poços H10, H11 e H12;
- Em todos os poços da linha A (A1 a A12): injetar 20 μL de solução antimicrobiana (OE/EE diluído), considerando cada coluna 1 repetição. No poço H9, pipetar apenas a solução diluente de EE/OE, pois este será o grupo controle de toxicidade do diluente;
- A partir de então, em cada coluna (de 1 a 12), pipetar 100 μL do poço A para o B, 100 μL do B para o C, 100 μL do C para o D, 100 μL do D para E, 100 μL do E para o F, 100 μL do F para o G, 100 μL do G para o descarte (para que todos tenham volume final de 100 μL);
- Pipetar 100 μL do poço H9 para o H10, 100 μL do H10 para o H11, 100 μL do H11 para o H12 e 100 μL do H12 para o descarte;
- Poço H1 até H4: injetar 100 μL de caldo estéril sem bactérias e sem antimicrobiano – controle de esterilidade;
- Poço H5 até H8: injetar 100 μL de caldo com bactérias – controle de crescimento;
- Fechar a placa com tampa (ou em bolsa), e incubar por 18-24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Dia 3

- Deve-se constatar a integridade do experimento realizado no dia anterior (Figura 4) e observar inicialmente o grupo controle de esterilidade, que deve estar límpido e sem crescimento bacteriano (poços H1, H2, H3 e H4). Em seguida, deve-se verificar o controle de crescimento, no qual as bactérias devem crescer normalmente, deixando o meio turvo, demonstrando assim a integridade das bactérias (H5, H6, H7 e H8). Por fim, verificar o controle de toxicidade do diluente do óleo/extracto, o qual não deve ser tóxico às bactérias, observando-se crescimento bacteriano (H9, H10, H11 e H12). Posteriormente, nos poços onde foram testados os produtos antimicrobianos, deve-se verificar onde houve e não houve crescimento bacteriano e observar qual a menor concentração testada capaz de inibir o crescimento da bactéria utilizada;

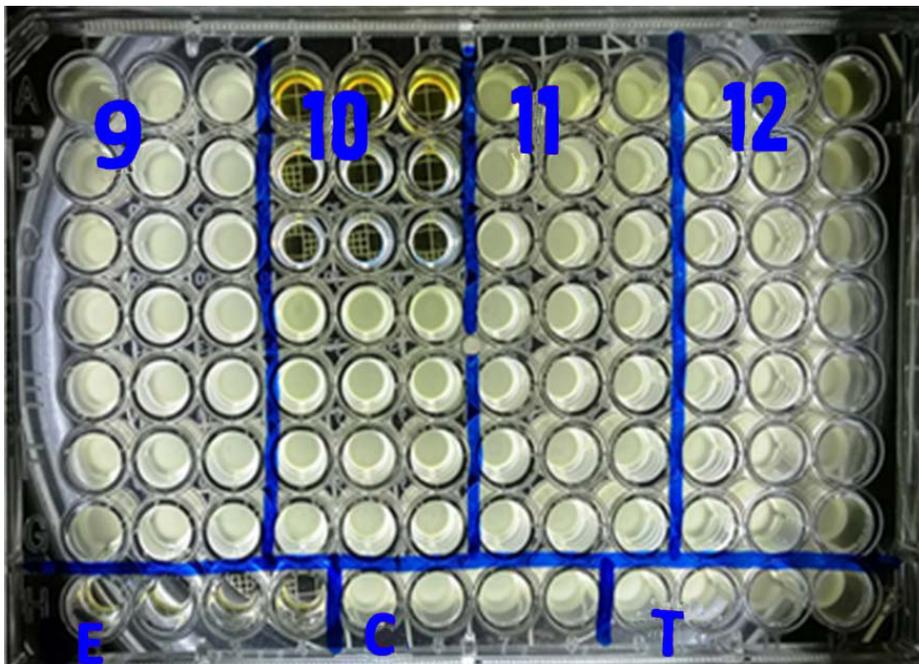


Figura 4. Placa de 96 poços ao término do teste de CIM. Grupo 9: teste com extrato etanólico (EE) de flores de *Egletes viscosa* nas colunas 1 a 3, e cada coluna é 1 repetição do teste; grupo 10: teste com EE de folhas de *E. viscosa* nas colunas 4 a 6, e cada coluna é 1 repetição do teste; grupo 11: teste com EE de folhas de *Solidago chilensis* nas colunas 7 a 9, e cada coluna é 1 repetição do teste; grupo 12: teste com EE de folhas de *Croton heliotropiifolius* nas colunas 10 a 12, e cada coluna é 1 repetição do teste. Em todos os testes, iniciou-se na linha A com a concentração de 10 mg/mL de EE e sucederam-se diluições $\frac{1}{2}$ (B=5, C=2,5, D=1,25, E=0,625, F=0,313 e G=0,156 mg/mL). Grupo E: controle de esterilidade nos poços H1, H2, H3 e H4; grupo C: controle de crescimento nos poços H5, H6, H7 e H8; grupo T: controle de toxicidade nos poços H9, H10, H11 e H12. Nessa placa, pode-se observar que: os EEs 9, 11 e 12 não inibiram o crescimento bacteriano em nenhuma concentração testada; o EE 10 inibiu o crescimento bacteriano até a concentração de 2,5 mg/mL em todas as repetições; o controle de esterilidade encontra-se límpido, demonstrando que não houve contaminação no caldo nutritivo utilizado, garantindo sua integridade; o controle de crescimento encontra-se turvo, demonstrando que as bactérias utilizadas no estudo estavam viáveis; e no controle de toxicidade do diluente do EE, verifica-se turvação, ou seja, a solução utilizada para diluir o EE não interferiu no crescimento bacteriano, não influenciando no resultado final do experimento.

- Pode-se utilizar o sal 2,3,5 trifênil tetrazólio (CTT) na verificação e confirmação do crescimento bacteriano nos poços. Para isso, previamente, deve-se preparar uma solução aquosa com 3% de sal 2,3,5 trifênil tetrazólio em frasco tipo âmbar estéril. Em cada poço

da placa de 96 poços, pipetar 20 μL da solução de CTT e incubar por 1 hora. Por fim, verificar os poços que apresentaram turvação na cor vermelha, indicativa da presença de células bacterianas viáveis, e que, portanto, o OE/EE não teve efeito inibidor (Figura 5);

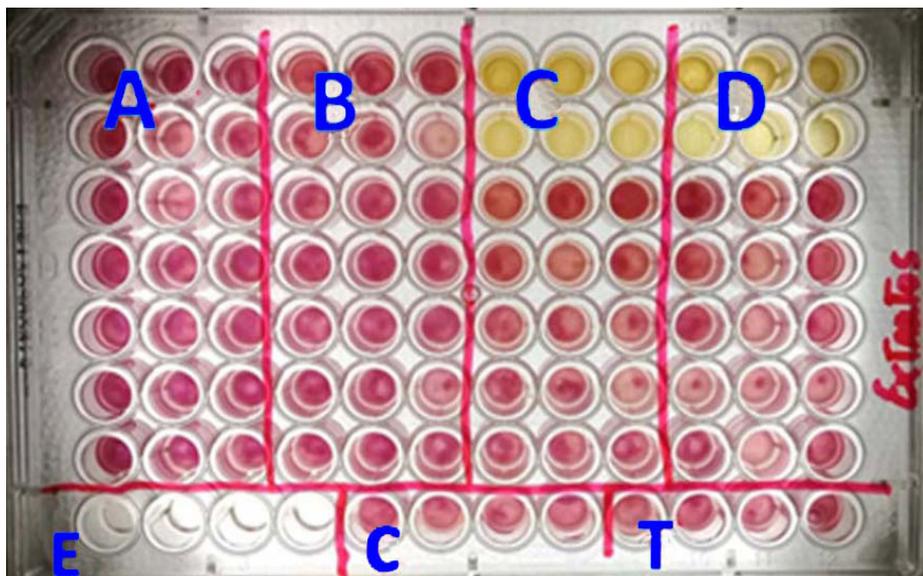


Figura 5. Placa de 96 poços ao término do teste de CIM com utilização do sal 2,3,5 trifênil tetrazólio (20 μL de solução 3%). Grupo A: teste com extrato etanólico (EE) de folhas de *Mikania glomerata* nas colunas 1 a 3, e cada coluna é 1 repetição do teste; grupo B: teste com EE de folhas de *Mesosphaerum suaveolens* nas colunas 4 a 6, e cada coluna é 1 repetição do teste; grupo C: teste com EE de folhas de *Lantana camara* nas colunas 7 a 9, e cada coluna é 1 repetição do teste; grupo D: teste com EE de folhas de *Ocimum gratissimum* nas colunas 10 a 12, e cada coluna é 1 repetição do teste. Em todos os testes, iniciou-se na linha A com a concentração de 10 mg/mL de EE e sucederam-se diluições $\frac{1}{2}$ (B=5, C=2,5, D=1,25, E=0,625, F=0,313 e G=0,156 mg/mL). Grupo E: grupo controle de esterilidade nos poços H1,

H2, H3 e H4; grupo C: controle de crescimento nos poços H5, H6, H7 e H8; grupo T: controle de toxicidade nos poços H9, H10, H11 e H12. Nessa placa, pode-se observar com mais facilidade, por meio do uso do sal 2,3,5 trifenil tetrazólio que: os EEs A e B não inibiram o crescimento bacteriano em nenhuma concentração testada, o que é possível verificar pela coloração vermelha em todos os poços; os EEs C e D inibiram o crescimento bacteriano até a concentração de 5 mg/mL em todas as repetições, pois até a referida concentração do EE não se verificou coloração vermelha; o controle de esterilidade encontra-se límpido, demonstrando que não houve contaminação no caldo nutritivo utilizado, garantindo sua integridade; o controle de crescimento encontra-se vermelho, demonstrando que as bactérias utilizadas no estudo estavam viáveis; e no controle de toxicidade do diluente do EE, verifica-se coloração vermelha, ou seja, a solução utilizada para diluir o EE não interferiu no crescimento bacteriano, não influenciando no resultado final do experimento.

- Após constatar os grupos controle e o resultado de inibição do crescimento, preparar meio de cultura ágar Mueller Hinton (seguindo as recomendações do fabricante), suficiente para três placas de Petri para cada tratamento (25 mL de ágar/placa). No caso de bactérias de ambiente marinho, suplementar o meio de cultura com sal, respeitando as particularidades de cada espécie;
- A partir da placa de 96 poços, pipetar uma alíquota de 10 µL de cada poço na placa com ágar

Mueller Hinton (não tocar no ágar com o pipetador) e, em seguida, dividir uma placa em três setores (Figura 6). Cada setor deve fazer referência a uma concentração inibitória e cada ponto dentro do setor deve ser uma amostra de 10 µL de cada repetição. Incubar as placas de Petri por 18-24 horas a 35 ± 2 °C. Deve-se fazer também o teste com o controle de crescimento, para verificar como é o crescimento daquela bactéria em condições favoráveis e assim comparar.

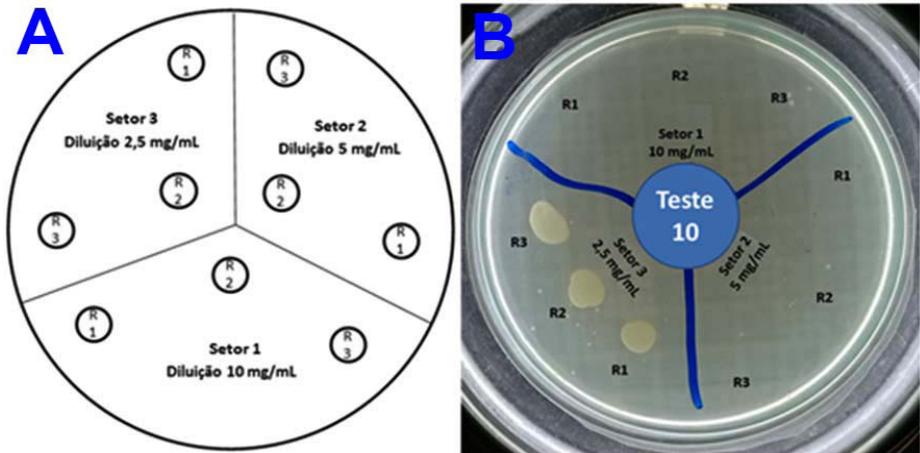


Figura 6. A - Sugestão de esquema para uso da placa de Petri nas subculturas retiradas da placa de 96 poços para realização do teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Placa de Petri dividida em três setores: setor 1, setor 2 e setor 3. Cada setor refere-se a 1 diluição que inibiu o crescimento bacteriano na placa de 96 poços, ou seja, nesse caso o setor 1 refere-se à concentração de 10 mg/mL do EE usado, o setor 2 refere-se a 5 mg/mL e o setor 3, a 2,5 mg/mL (exemplo retirado do grupo 10 da Figura 4). Em cada setor, são pipetados 10 μ L de cada repetição. Setor 1-R1 = amostra de 10 μ L obtida do poço A4 (linha A, coluna 4); setor 1-R2 = amostra obtida do poço A5; setor 1-R3 = amostra obtida do poço A6; setor 2-R1 = amostra obtida do poço B4; setor 2-R2 = amostra obtida do poço B5; setor 2-R3 = amostra obtida do poço B6; setor 3-R1 = amostra obtida do poço C4; setor 3-R2 = amostra obtida do poço C5; setor 3-R3 = amostra obtida do poço C6. B – Foto do resultado obtido no teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) do grupo 10 na Figura 4.

Dia 4

- Verificar crescimento nas placas de Petri para constatar Concentração Bactericida Mínima. A Concentração inibitória mínima (bacteriostática) do produto antibacteriano testado será a menor concentração verificada na placa de 96 poços (no dia anterior), capaz de inibir o crescimento bacteriano. A Concentração Bactericida Mínima do produto antibacteriano testado será a menor concentração verificada na placa de Petri onde não houve crescimento bacteriano;
- Na Figura 4, no grupo 10, pode-se verificar que a CIM foi de 2,5 mg/mL, pois foi a menor concentração do EE na qual se observou inibição do crescimento das bactérias;
- Na Figura 6B, que se refere à continuação do experimento re-

gistrado na Figura 4, verifica-se que nos setores 1 e 2 (referentes à concentração de 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente) não houve crescimento bacteriano, porém, no setor 3 (referente à concentração de 2,5 mg/mL), observa-se crescimento bacteriano, ou seja, a CBM foi 5 mg/MI;

- Neste trabalho, foram testados 45 extratos etanólicos e 28 óleos essenciais (em triplicata) de diferentes espécies de plantas, dos quais 30 EE e 28 OE demonstraram resultados positivos contra *Vibrio parahaemolyticus* (IOC 18950) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Os diluentes utilizados não apresentaram ação inibitória contra as bactérias testadas.

Agradecimentos

Agradecemos ao “Projeto BRS Aqua, parceria celebrada entre o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), Fundação Eliseu Alves (FEA) e Embrapa, com aporte de recursos do BNDES, SAP/MAPA, contrapartida da Embrapa e apoio do CNPq”

Referências

AMPARO, T. R.; BRAGA, V. C. C.; SEIBERT, J. B.; SOUZA, G. H. B. de; TEIXEIRA, L. F. M. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma: Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018. DOI: 10.14450/2318-9312.v30.e1.a2018.pp50-59.

ARAÚJO, C. R. F. de; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. do S. V.; ALVES, P. M.; HIGINO, J. S.; MARTINS, A. B. Concentração mínima bactericida do extrato do cajueiro sobre bactérias do biofilme dental. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 9, n. 2, p. 187-191, maio/ago. 2009. DOI: 10.4034/1519.0501.2009.0092.0009.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, Apr. 2016.

CEBALLOS, S.; KIM, C.; DING, D.; MOBASHERY, S.; CHANG, M.; TORRES, C. Activities of oxadiazole antibacterials against *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, e00453-18, Aug. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00453-18.

CHRAIBI, M.; FIKRI BENBRAHIM, K.; ELMSELLEM, H.; FARAH, A.; ABDEL-RAHMAN, I.; EL MAHI, B.; FILALI BABA, Y.; KANDRI RODI, Y.; HLIMI, F. Antibacterial activity and corrosion inhibition of mild steel in 1.0 M hydrochloric acid solution by *M. piperita* and *M. pulegium* essential oils. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 8, n. 3, p. 972 - 981, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 9th ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012. (CLSI document M07-A9, v. 32, n. 2).

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, Dec. 2009.

MAYERS, D. L. (ed.). **Antimicrobial drug resistance: clinical and epidemiological aspects**. Dordrecht: Springer, 2009. v. 2, 1347 p.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-12,3 2013.

VEIGA, A. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Presidente
Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo

Secretário-Executivo
Jeadys Araújo de Oliveira

Membros
Edvaldo Sagrilo, Orlane da Silva Maia, Luciana Pereira dos Santos Fernandes, Lígia Maria Rolim Bandeira, Humberto Umbelino de Sousa, Pedro Rodrigues de Araújo Neto, Antônio de Pádua Soeiro Machado, Alexandre Kemeenes, Ana Lúcia Horta Barreto, Braz Henrique Nunes Rodrigues, Francisco José de Seixas Santos, João Avelar Magalhães, Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara,

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650,
Bairro Buenos Aires,

Caixa Postal 01

CEP 64008-780, Teresina, PI

Fone: (86) 3198-0500

Fax: (86) 3198-0530

www.embrapa.br/meio-norte

Sistema de atendimento ao Cliente(SAC)

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição (2019): formato digital

Embrapa



Supervisão editorial
Lígia Maria Rolim Bandeira

Revisão de texto
Francisco de Assis David da Silva

Normalização bibliográfica
Orlane da Silva Maia (CRB 3/915)

Diagramação
Jorimá Marques Ferreira

Fotos
Luiz Gonzaga Alves dos Santos Filho

CGPE 15554