

Estudo sobre métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais: elucidações e limitações das técnicas

Study on methods used to determine the antimicrobial activity of medicinal plants extracts: clearance and limitations of the techniques

DOI:10.34117/bjdv8n4-222

Recebimento dos originais: 21/02/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

Maria do Socorro Vieira Pereira

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Faculdade de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança

Endereço: Av. Frei Galvão, 12 - Gramame, CEP: 58067-698

João Pessoa - PB

E-mail: vieirapereira@uol.com.br

Adyelle Dantas Ribeiro

Mestra em Saúde e Sociedade

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário, CEP: 58429-500

Campina Grande-PB

E-mail: adyelle.d@hotmail.com

Ernani Canuto Figueirêdo Júnior

Doutor em Odontologia

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário, CEP: 58429-500

Campina Grande-PB

E-mail: ernanicfjunior@outlook.com

Julliana Cariry Palhano Freire

Doutora em Odontologia

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário, CEP: 58429-500

Campina Grande-PB

E-mail: jullianapalhano@hotmail.com

Mariana Mélani Alexandrino Costa

Graduada em Odontologia

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário, CEP: 58429-500

Campina Grande-PB

E-mail: melanialexandrinocosta@gmail.com

Jozinete Vieira Pereira

Doutora em Odontologia

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário, CEP: 58429-500

Campina Grande-PB

E-mail: jozinetevieira@hotmail.com

RESUMO

Esse estudo realizou uma revisão de literatura sobre os métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre microrganismos patogênicos. No teste de difusão em ágar avalia-se comparativamente frente a um padrão biológico de referência com medição da zona de inibição de crescimento. Na diluição em ágar, os extratos são diluídos no meio de cultura fundido em várias concentrações e os microrganismos são inoculados após a gelificação do meio. Outras técnicas incluem o uso de discos de papel de filtro, cilindro inoxidável, a perfuração em ágar, além da bioautografia para identificação de constituintes bioativos de extratos vegetais e a medição da impedância para detecção da atividade bacteriana com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). Para avaliação da atividade antimicrobiana, os métodos mais utilizados e recomendados são difusão em ágar, para triagem da atividade, e microdiluição, para determinação da CIM.

Palavras-chave: plantas medicinais, odontologia, fitoterapia.

ABSTRACT

This study carried out a literature review on the methods used to determine the antimicrobial activity of extracts of medicinal plants on pathogenic microorganisms. In the agar diffusion test, it is compared against a biological reference standard with measurement of the growth inhibition zone. In the agar dilution, the extracts are diluted in the molten culture medium at various concentrations and the microorganisms are inoculated after the medium has gelled. Other techniques include the use of filter paper discs, stainless cylinders, agar perforation, in addition to bioautography to identify bioactive constituents of plant extracts and impedance measurement to detect bacterial activity with determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). For the evaluation of antimicrobial activity, the most used and recommended methods are diffusion in agar, to screen the activity, and microdilution, to determine the MIC.

Keywords: medicinal plants, dentistry, phytotherapy.

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas por novos agentes antimicrobianos favorecem expressivamente o avanço da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007). As plantas se destacam nesse cenário por serem uma importante fonte de novos fármacos, estudos

etnofarmacológicos e fitoquímicos apontam diversos metabólitos encontrados nas plantas com propriedades antimicrobianas no sentido de contribuir para a descoberta de novos antibióticos. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas de vegetais (AMPARO et al., 2018; VARGAS et al., 2020).

Os extratos vegetais são amostras complexas de propriedades físico-químicas particulares e é difícil padronizar sua solubilização para os testes de atividade antimicrobiana. Sendo assim, são utilizados diferentes solventes e tensoativos que podem inibir o crescimento microbiano. Recomenda-se a utilização das normas estabelecidas pelo CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais) para meio de cultura e concentração de inóculo nos testes. Além disso, também se recomenda a inclusão de um controle negativo da forma de solubilização das amostras, com quantificação do crescimento microbiano, para evitar a interferência nos resultados (AMPARO et al., 2018).

Os principais métodos para avaliação da atividade antimicrobiana são difusão em ágar, microdiluição e macrodiluição. O teste de susceptibilidade antifúngica por exemplo é apenas um entre outros elementos e análises para orientar o clínico na escolha do antifúngico e sua dosagem, sendo essencial o diálogo entre clínicos e micólogos. Por serem fáceis de executar, rápidos e econômicos, os métodos de disco-difusão são necessários para a rotina clínica dos micologistas (OSTROSKY et al., 2008; UWINGABIYE et al., 2017).

Além da atividade antifúngica, a falta de padronização motiva o surgimento de novos métodos em diversas áreas e para diferentes microrganismos e finalidades, como o desenvolvimento de um método de macrodiluição em caldo para testar a susceptibilidade de patógenos bacterianos a biocidas uma vez que a desinfecção é uma ferramenta importante para reduzir a disseminação de patógenos bacterianos resistentes. O protocolo desenvolvido demonstrou facilidade de uso e forneceu resultados confiáveis durante um ensaio interlaboratorial, podendo representar um passo para a harmonização dos testes de susceptibilidade de bactérias a biocidas (FELBER et al., 2019).

Existem diferentes métodos para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana, como diluição em caldo, difusão em disco e Etest que são usados em laboratórios de diagnóstico. Para cada método é importante que sejam avaliadas as interferências e que os parâmetros sejam estabelecidos a fim de aumentar a reprodutibilidade e comparatividade. Os ensaios de diluição em ágar estão entre os mais utilizados para a

avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de plantas medicinais, enquanto a técnica da microdiluição ganhou relevância devido ao fornecimento de dados quantitativos, o baixo custo, a sensibilidade e a confiabilidade (OSTROSKY et al., 2008; GIGUÈRE et al., 2010; BONA et al., 2014).

Todavia, para determinar a CIM ou a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998. Esses valores de extratos de plantas podem ser atribuídos a vários fatores, podendo-se citar: a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004; OSTROSKY et al., 2008).

O estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre microrganismos patogênicos, com abordagem para elucidações e limitações das técnicas usadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIFUSÃO EM ÁGAR

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo enfrenta uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado, com a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2003). Essa técnica se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Conforme a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm (OSTROSKY et al., 2008).

Essa técnica foi preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards– NCCLS e está normatizada como parâmetro de análise antimicrobiana na

Farmacopéia Brasileira (MAIA-ARAÚJO et al., 2011). Neste método, os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a CIM (MURRAY, 1999; ALVES et al., 2008).

Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003). As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27 °C por 48 a 72 horas (CARVALHO et al., 2002; CHANDRASEKARAM; VENKATESALU, 2004; KARAMAN et al., 2003; MOODY et al., 2004; SPRINGFIELD et al., 2003; AYRES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008).

Na diluição em ágar, os extratos são diluídos no meio de cultura fundido em várias concentrações e os microrganismos são inoculados após a gelificação do meio. Esse método de diluição é considerado mais sensível que a difusão em ágar, porém é menos sensível que a diluição em caldo (KLANCNIK et al., 2010). Já a diluição em caldo é considerada o método mais sensível para determinação da CIM e pode ser feita em tubos (macrodiluição) ou em placas de 96 poços (microdiluição). Além da sensibilidade, esse método possui vantagens como reprodutibilidade, pequena quantidade de amostra requerida e possibilidade de teste simultâneo de um grande número de amostras (AMPARO et al., 2018).

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (DOERN; TUBERT, 1988; *National Committee for Clinical Laboratory Standard*, 2003). Para realizar o teste preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação overnight, a 35 °C, examinam-se os testes e determina-se a CIM. A CIM pode ser detectada a “olho nu” ou através de espectrofotometria (ALVES et al., 2008).

O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou *template* (CHAND et al., 1994; CORDEIRO et al., 2006). Diversas modificações já foram realizadas nas metodologias de *screening* a fim de se obter resultados mais confiáveis, uma vez que alguns fatores, tais como composição do meio de cultura, microrganismos testados, método de extração, pH e solubilidade das amostras no meio

de cultura, podem alterar os resultados, sendo difícil, portanto, padronizar um procedimento (ALVES et al., 2008). Como variação do método, Rabanal et al. (2002) incubaram as placas de Petri por 14 h à temperatura de 37 °C para bactérias e de 28 a 30 °C para fungos. As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008).

Estudos de Pereira et al., 2016, demonstram modificações da técnica para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, nos ensaios foram utilizados o método de difusão em meio sólido, segundo Bauer *et al.* (1969) e as recomendações do National Commite for Clinical Laboratory Standardas (NCCLS, 2003) para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion- DIFCO); incubadas a 37°C por um período de 18-24 horas. As placas de Agar Mueller Hinton (DIFCO) foram inoculadas através da técnica de inundação da superfície do meio de cultura com uma suspensão fúngica na concentração de 5×10^6 UFC/mL, retirando-se o excesso do líquido com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As placas foram mantidas entreabertas em estufa a $35 \pm 2^0\text{C}$, durante 15 minutos para secagem. A seguir, foram confeccionadas no meio de cultura, cinco orifícios que receberam numerações de 1 a 10, os quais correspondiam ao número da diluição da substância teste (Extrato puro até a diluição de 1:1024), de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nos orifícios foram colocados um volume de 50µl da solução do extrato nas diluições. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas. Foi considerada como CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, ou seja, presença do halo acima de 12 mm.

2.1.1 Limitações

É uma técnica amplamente empregada devido à sua simplicidade e baixo custo, porém, não é indicada para determinação da CIM, devido a fatores que interferem na difusão dos compostos no meio de cultura, como espessura do ágar, volume aplicado e propriedades físico-químicas das amostras analisadas (SCORZONI et al., 2007; KLANCNIK et al., 2010). Dessa forma, permite apenas uma triagem da atividade de produtos naturais, direcionando as análises para determinação da CIM. Entre as variações desse método, a difusão com discos é muito utilizada em óleos vegetais, enquanto o

método em poços é considerado mais sensível para extratos, tendo em vista que a adesão de algumas substâncias ao disco de papel dificulta a difusão para o ágar (AMPARO et al., 2018).

Quando se utiliza o método de difusão vários fatores podem ocasionar erros, tais como composição do meio de cultura, preparação incorreta do meio de cultura, espessura do meio de cultura, densidade do inóculo incorreta, uso de *swab* com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, utilização errada da atmosfera de CO₂ quando necessária, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas (SILVA, 1999; ALVES et al., 2008).

Os métodos de disco-difusão e caldo ou diluição em ágar são amplamente utilizados, pela facilidade de aplicação, custo-benefício e rapidez na interpretação dos resultados. Por outro lado, são demorados e podem estar sujeitos a erros durante a execução da técnica (BALOUIRI et al., 2016). A medição da absorbância das culturas celulares é comumente associada a esses métodos, porém, apresenta algumas limitações, como por exemplo, a necessidade de uma etapa de calibração (CHORIANOPOULOS et al., 2006; BANCALARI et al., 2020).

2.2 DILUIÇÃO EM CALDO

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO et al., 2003). Fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM; WASHINGTON II, 1991). Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado pequeno número de

réplicas (SAHM; WASHINGTON II, 1991; ZGODA; PORTER, 2001; OSTROSKY, 2008).

De acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (2003), a técnica de microdiluição consiste no uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo chato ou cônico estéreis, próprias para microdiluição, que devem ser incubadas a 35 °C por 16-24 h, com no máximo quatro placas em cada pilha, a fim de manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas. Os fatores primários que influenciam nos valores de CIM no método de diluição em caldo são os mesmos tanto para a técnica de macrodiluição como para de microdiluição, ou seja, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano (CHRISTOFILOGIANNIS, 2000; ALVES et al., 2008). Apesar de ser o método mais recomendado, devido à alta sensibilidade, à quantidade mínima de reagentes e amostra e à possibilidade de um maior número de réplicas, apresenta divergências de fatores que podem interferir nos resultados, como técnica aplicada, microrganismos e cepas utilizadas, concentração do inóculo, meio de cultura e características dos extratos, não existindo a padronização de um método para a avaliação (AMPARO et al., 2018).

Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. Todavia, concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente (OSTROSKY et al., 2008).

2.2.1 Modificações da Técnica

Karaman et al. (2003) utilizaram a técnica de microdiluição para verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Juniperus oxycedrus* dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) 10%, concentração de solvente que não inibe o crescimento dos microrganismos. A técnica descrita por Zogda e Porter (2001) foi adaptada, dispensando-se 95 µL de caldo nutriente e 5 µL de inóculo em cada poço. No primeiro foi então adicionado 100 µL de extrato de *J. oxycedrus* preparado inicialmente na

concentração de 500 µg/mL. Fez-se então uma diluição seriada nos 6 poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração, resultando na diluição de até 7,8 µg/mL. No último poço não se adicionou o inóculo e o extrato, a fim de se ter um controle negativo, sendo então para crescimento microbiano determinado por leitura no espectrofotômetro a 600 nm (OSTROSKY et al., 2008).

Khan e Katiyar (2000) testaram a atividade antifúngica do extrato de alho (*Allium sativum*) em microplacas, aplicando 270 µL de caldo sabouraud dextrose por poço. 30 µL do extrato foram adicionados nos primeiros poços e a partir deles foram feitas as diluições seriadas. Em seguida, foi colocado o inóculo de 10⁴ UFC em cada poço. Controles foram submetidos às mesmas condições laboratoriais. A leitura foi feita após 48-72 h em leitor de Elisa a 492 nm. Foram testados os frutos de espécies pertencentes à família Arecaceae (*Palmae*), empregando a metodologia de microdiluição em caldo (SILVEIRA et al., 2005; OSTROSKY et al., 2008).

Um método de microdiluição padronizado incluindo corante de resazurina foi desenvolvido para medir a concentração inibitória mínima (CIM) de biossurfactantes, compostos de origem microbiana responsáveis pela diminuição da tensão superficial, possuindo grande capacidade emulsificante, possível potencial antimicrobiano, antibiofilme e anticorrosivo que garantem a esse composto inúmeras aplicações industriais. A validade do método foi estabelecida através da suscetibilidade de tetraciclina e gentamicina e determinação da CIM com cepas bacterianas padrão, resultando na geração de medições precisas e a resolução de questões críticas relacionadas à cor e solubilidade (NITSCHKE; PASTORE, 2002; ARAUJO; FREIRE, NITSCHKE, 2013; ELSHIKH et al., 2016).

2.2.2 Limitações

Um dos fatores que interfere no método de microdiluição é o meio de cultura utilizado, que deve favorecer o crescimento dos microrganismos e não conter substâncias antagônicas ao antimicrobiano estudado (OSTROSKY et al., 2008). Outro fator é a forma de solubilização dos extratos ou frações para adição no meio de cultura. O solvente pode inibir o crescimento microbiano e levar a resultados falso-positivos. A dificuldade de solubilização é uma das características dos produtos naturais que impede que a metodologia proposta pelo CLSI seja seguida integralmente, exigindo modificações (NASCIMENTO et al., 2007). Independente do solvente utilizado, é importante realizar um controle negativo com quantificação do crescimento na concentração de solvente

empregada. Isso porque a inibição, até em menores intensidades, pode interferir nos resultados. Além disso, o controle deve ser realizado em todos os testes, pois a inibição pode variar com as cepas utilizadas. Os cuidados e dificuldades relacionados à solubilização das amostras não são encontrados em casos de óleos essenciais, formulações e extratos aquosos que podem ser adicionados diretamente ao meio de cultura líquido (AMPARO et al., 2018).

A concentração do inóculo também pode interferir no resultado, já que a atividade antimicrobiana é dependente desta, sendo, portanto, necessária sua padronização e a determinação da quantidade inoculada para cada método desenvolvido (OSTROSKY et al., 2008). O CLSI padroniza como concentração final no teste aproximadamente 5×10^5 UFC/mL para bactérias e para leveduras $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (AMPARO et al., 2018). A disponibilidade de oxigênio é outro fator modificador, visto que, conforme o metabolismo do microrganismo, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, as condições de disponibilidade desse gás podem influenciar na sua multiplicação (OSTROSKY et al., 2008).

2.3 DIFUSÃO EM DISCO

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (BARRY; THORNSBERRY, 1991). A metodologia consiste em colocar os discos sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com diferentes cargas microbianas, 10^8 UFC (Unidade Formadora de colônia)/mL para bactérias, 10^6 UFC/mL para leveduras e 10^4 para esporos/ mL (CHATTOPADHYAY et al., 2002; KARAMAN et al., 2003). A disposição dos discos deve ser tal que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm (BARRY; THORNSBERRY, 1991; OSTROSKY et al., 2008).

Em um estudo comparativo utilizando duas técnicas da Farmacopéia Brasileira de avaliação da atividade antimicrobiana (VITAL et al., 2004), discos de papel filtro estéreis foram embebidos nas soluções antimicrobianas e esta técnica demonstrou ser eficiente frente à *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601). Resultado semelhante foi observado em outro estudo que tratou da preparação de extratos (PARK et al., 1998), onde discos de papel foram embebidos por 15 minutos em extratos de própolis verde e em seguida secos em

dissecador com sílica. Entretanto, com o uso desta técnica, os autores não podem afirmar quanto de solução cada disco possui o que torna inviável a reprodutibilidade dos resultados. Por outro lado, na técnica de difusão em poços, é possível afirmar exatamente quanto de extrato cada poço possui e os resultados por ele apresentados podem ser, portanto, considerados confiáveis e de fácil reprodutibilidade (MAIA-ARAÚJO et al., 2011).

2.3.1 Modificação da Técnica

Ao longo dos anos algumas variações vêm sendo propostas por diversos autores, como a técnica adotada por Rabanal et al. (2002) e por Karaman et al. (2003), que estabelece a aplicação de 10 μ L da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas variando de 31,25 a 500 μ g/mL. Outro método foi preconizado por Carvalho et al. (2002); Chandrasekaran; Venkatesalu (2004), os quais aplicaram 20 μ L de extrato hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. e extratos metanólico e aquoso de *Syzygium jambolanum*, respectivamente, nos discos de papel, com concentrações de 500 a 1000 μ g/mL. Springfield et al. (2003) testaram diferentes extratos obtidos de duas espécies de *Carpobrotus* aplicando 50 μ L das soluções em discos de papel de filtro de 9 mm (OSTROSKY et al., 2008).

Rabanal et al. (2002) utilizaram disco impregnado com DMSO para o controle negativo, e como controle positivo foi utilizado cloranfenicol (30 μ g) para bactérias e anfotericina B (100 μ g) para fungos. Já Springfield et al. (2003) utilizaram ciprofloxacino (40 μ L) para controle positivo de bactérias e anfotericina B (25 μ L) para fungos, enquanto que Tadeg et al. (2005), adotaram como controle negativo metanol, clorofórmio e água destilada e como controle positivo gentamicina e cetoconazol. Além desses, Voravunthikunchai et al. (2004) determinaram a CIM de extratos etanólicos e aquosos de plantas medicinais que produziam zonas de inibição utilizando o método de difusão em ágar, usando Amicacina, ampicilina, gentamicina, kanamicina e tetraciclina como amostras de referência, e inserindo 1 μ L de cada cultura de bactérias em meio ágar Mueller Hinton por 18 h a 35 °C (OSTROSKY et al., 2008).

A utilização de telas de nylon sobre placas de Petri estéreis é outra forma de testar atividade antimicrobiana por meio da técnica de difusão em disco. Nesse caso os discos são depositados sobre a tela e o extrato adicionado no centro, mantendo-se na capela de fluxo até secar completamente (S. JUNIOR; MARTINS, 2004). Entretanto, em estudos

piloto, notou-se que a massa do extrato fica retida na rede de nylon, havendo uma queda do volume inicialmente dispensado no disco, o que também pode superestimar a concentração utilizada no experimento (MAIA-ARAÚJO et al., 2011).

2.4 BIOAUTOGRAFIA

A bioautografia comumente usada para indicar os constituintes bioativos de extratos vegetais quando aliada a técnicas cromatográficas pode ser realizada de forma direta, indireta ou por imersão. A bioautografia direta consiste em aplicar a suspensão microbiana diretamente sobre a superfície da placa cromatográfica, enquanto na forma indireta, o cromatograma desenvolvido é colocado sobre a superfície de um ágar pré-inoculado por um período específico para permitir a difusão. Então, na análise por imersão, a placa cromatográfica é imersa pelo ágar para difusão das substâncias para o meio de cultura (KENNY et al., 2015; AMPARO et al., 2018).

2.5 CILINDROS DE AÇO INOXIDÁVEL

Essa metodologia consiste em usar cilindros de aço inoxidável no meio de cultura solidificado já inoculado e adicionar a solução em estudo nos cilindros. Coelho de Souza et al. (2004) aplicaram 200 µL dos extratos de plantas medicinais comumente utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Como controle positivo para bactérias foi aplicado cloranfenicol (40 µg/mL, 200 µL), e para fungos, nistatina (30 mg/mL, 200 µL), metanol (200 µL) e água (200 µL) foram utilizados como controles negativos. Lopes et al. (2006) empregaram o método de difusão em ágar, utilizando cilindros, empregando uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) na concentração de 10⁸ UFC/mL e 200 µL de extratos glicólicos de *Physalis angulata* L. em diferentes concentrações e como controle positivo uma curva padrão de ampicilina (OSTROSKY et al., 2008).

2.6 MEDIÇÃO DA IMPEDÂNCIA

Em seu estudo Bancalari et al., (2020), propuseram a medição da impedância como um método válido para a avaliação *in vitro* de CIM e CBM de um extrato antimicrobiano natural de *A. platensis*. A análise impedométrica foi realizada por meio do BacTrac 4300® que permite a detecção da atividade bacteriana em tempo real através da diminuição da impedância em um campo de corrente alternada (CA). Este procedimento para subcultura das cepas em um meio fresco sem a adição de antimicrobianos é usado para determinar se as células ainda estão viáveis ou não,

estabelecendo assim se o efeito nas células é bacteriostático ou bactericida (BALOUIRI et al., 2016). Os valores calculados de Lag e yEnd, foram usados para estimar a atividade bacteriostática, quantificada como a CIM e atividade bactericida, como CBM, pela inoculação das cepas no meio na presença de diferentes concentrações de extrato de *A. platensis* e sem qualquer adição como um controle negativo (0%).

2.7 PERFURAÇÃO EM ÁGAR

A técnica de perfuração em ágar fundamenta-se na remoção do meio de cultura sólido com o auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, em que é possível aplicação das substâncias a serem analisadas. Moody et al. (2004) preencheram os poços com 60 µL dos extratos de *Aloe vera* e *Ageratum conyzoides* para verificar a atividade antimicrobiana de sopas medicinais utilizadas na Nigéria. Como controle positivo foi aplicado estreptomicina (100, 25 e 6,25 µg/mL) para bactérias e tioconazol (100, 25 e 6,25 µg/ mL) para fungos. O controle negativo constituiu de metanol:água 50% (v/v), veículo utilizado para dissolver os extratos secos nas diferentes concentrações. Por sua vez, Okeke et al. (2001) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos obtidos da raiz de *Landolphia owerrience*. Os poços de 6 mm de diâmetro foram confeccionados em placa previamente inoculada com uma suspensão microbiana 5×10^5 UFC/mL, posteriormente preenchidos com 100 µL dos extratos dissolvidos em DMSO. A gentamicina (8 e 16 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e uma solução de DMSO como controle negativo (OSTROSKY et al., 2008).

2.8 ESCOLHA DO TESTE

Para avaliação da atividade antimicrobiana, os métodos mais utilizados e recomendados são difusão em ágar, para triagem da atividade, e microdiluição, para determinação da CIM. O método da microdiluição é considerado sensível e reprodutível, porém foram verificadas divergências de fatores, como meio de cultura, concentração de inóculo e solubilização das amostras, que podem interferir nos resultados. Essa ausência de padronização da metodologia dificulta a comparação e reprodução dos resultados. A solubilidade é a principal característica dos extratos vegetais que dificulta a total aplicação das normas do CLSI, padrão mais aceito internacionalmente (NASCIMENTO et al., 2007).

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). 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 (BONA et al., 2014).

De acordo com Maia-Araújo et al. (2011), em termos operacionais a técnica de difusão em poço apresenta maior garantia da concentração de extrato utilizada, por possibilitar que a quantidade de amostra que interage com o microrganismo durante o teste de sensibilidade seja igual ao volume pipetado em cada poço inicialmente nas condições metodológicas testadas. O mesmo não ocorre com a técnica de difusão em disco, uma vez que é impossível garantir a quantidade exata que cada disco de papel consegue absorver quando embebido no extrato, possibilitando ainda o extravasamento de amostra em função da saturação da capacidade de absorção do disco, dificultando a obtenção de resultados mais precisos quando comparado com a técnica de poços.

Bona et al. (2014), compararam os testes de difusão em disco e microdiluição em caldo, em extratos aquosos e etanólicos, e puderam constatar que 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, fato provavelmente relacionado aos distintos metabólitos que podem ser obtidos nos diferentes métodos de extração, 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. Observando-se que, ao contrário do método de microdiluição em caldo, alguns extratos nem mesmo apresentaram atividade inibitória quando foram utilizados nos testes de difusão.

Outras técnicas, como teste de eliminação de tempo ou citometria de fluxo e métodos bioluminescentes também são usados, mas possuem desvantagens como precisar

de equipamentos específicos e treinamento do usuário (BALOUIRI et al., 2016). Além disso, nem todos esses métodos permitem a avaliação de CIM e CBM com uma única abordagem (BANCALARI et al., 2020).

3 CONCLUSÃO

O teste de difusão em ágar é um método que utiliza meio de cultura sólido e a medição do halo de inibição de crescimento, mas limita-se a microrganismos de crescimento rápido e não é indicado para determinação da CIM. Na técnica da diluição em caldo, é considerada a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo testado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada por meio da densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano, fornecendo resultados quantitativos. A diluição em caldo pode empregar a macro e a microdiluição como metodologias. O processo de macrodiluição é mais laborioso e nele é usado um pequeno número de réplicas. Já a microdiluição é indicada para determinação da CIM, mas pode apresentar interferências quanto ao meio de cultura, a forma de solubilização, a concentração do inóculo e disponibilidade de oxigênio. Na difusão em disco, o meio de cultura sólido é previamente inoculado em placas de Petri com diferentes cargas microbianas, mas a depender da técnica não é possível afirmar quanto de solução cada disco possui.

Para avaliação do potencial antimicrobiano, os métodos mais utilizados e recomendados são difusão em ágar, para estabelecer a atividade antimicrobiana, e microdiluição, para determinação da CIM. As limitações e os diferentes objetivos de estudo levaram a modificações nas técnicas resultando em diferentes metodologias com novas possibilidades buscando maior reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.D.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. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

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

ARAUJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v.36, n.6, p.848-858, 2013.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev Bras Farmacogn** **18**, p.90-97, 2008.

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

BANCALARI, E.; MARTELLI, F.; BERNINI, V.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacteriostatic or bactericidal? Impedometric measurements to test the antimicrobial activity of *Arthrospira platensis* extract. **Food Control**, v.118, n.1, p. 107380, 2020.

BARBOSA-FILHO, J.M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, p.141-148, 2007.

BARRY, A.; THORNSBERRY, C.; BARRY, A. Testes de suscetibilidade: procedimentos de teste de difusão - ScienceOpen. In: **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.

BONA, E.A.M.; PINTO, F.G.S.; FRUET, T.K.; JORGE, T.C.M.; MOURA, A.C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

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 Farm Bonaerense**, v.21, p.255-258, 2002.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P.; J. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **J. Antibiotics**, 47: 1295-1304, 1994.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J Ethnopharmacol**, v.91, p.105-108, 2004.

CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; SUR, T.K.; MANDAL, S.C.; BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **J Ethnopharmacol**, v.82, p.229-237, 2002.

CHRISTOFILOGIANNIS, P. Current inoculation methods in MIC determination. *Aquaculture*. 2001;196:297-302.

CHORIANOPOULOS, N.G.; LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; EVERGETIS, E.T.; HAROUTOUNIAN, S.A.; NYCHAS, G.J.E. A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.778–786, 2006.

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

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.90, p.135-143, 2004.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUB, T.M.; **Braz. J. Pharm. Sci**, v.42, n.395, 2006.

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

DOERN GV, TUBERT T. Disk diffusion susceptibility testing of *Branhamella catarrhalis* with ampicillin and seven other antimicrobial agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v.31n.10, p.1519–1523, 1987.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v.64, p.711-713, 1998.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**. v. 38, p. 1015-1019, 2016.

FELBER, A. C.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; MOURÃO, K. S. M.; PAMPHILE, J. A. Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal**, v.35, n.3, p.933-940, 2019.

FENNEL, C.W. et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol**, v.94, p.205-217, 2004.

GIGUÉRE, S.; LEE, E.; WILLIAMS, E.; COHEN, N.D.; CHAFFIN, M.K.; HALBERT, N.; MARTENS, R.J.; FRANKLIN, R.P.; CLARK, C.C; SLOVIS, N.M. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.237, p.74-81, 2010.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J Ethnopharmacol**, v.85, p.231-235, 2003.

KENNY, C.R.; FUREY, A.; LUCEY, B. A post-antibiotic era looms: can plant natural product research fill the void? **Br J Biomed Sci.**, v.72, n.4, p.191-200, 2015.

KHAN, Z.K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. **Pharm Biol**, v.38, p.87-100, 2000.

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **J Microbiol Methods**, v.81, n.2, p.121-126, 2010.

LOPES, D.C.D.X.P.; FREITAS, Z.M.F.; SANTOS, E.P.; TOMASSINI, T.C.B. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.206-210, 2006.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F.; MENDONÇA, L.S.; ORELLANA, S.C.; ARAUJO, E.D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.7, n.4. 046201, 2011.

MOODY, J.O.; ADEBIYI, O.A.; ADENIYI, B.A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **J Ethnopharmacol**, v.92, p.57-60, 2004.

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.

MURRAY, P. R.; Manual of Clinical Microbiology, 7th ed., ASM Press: Washington, 1999.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.I.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, Â.R.; SANTOS, P.O.; JÚNIOR, A.M.B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**. v.17, n.1, p.108-113, 2007.

National Committee for Clinical Laboratory Standard; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard - M7-A6, ed 6, vol. 23, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OKEKE, M.I.; IROEGBU, C.U.; EZE, E.N.; OKOLI, A.S.; ESIMONE, C.O. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia Owerrience* for antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v.78, p.119-127, 2001.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; 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. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.18, n.2, 2008.

PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

PEREIRA et 2016.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, **Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p. 2003.

RABANAL, R.M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **J Ethnopharmacol**, v.81, p.287-292, 2002.

S. JUNIOR, L.F.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da técnica de impregnação de discos na triagem de plantas medicinais com atividade antifúngica pelo método de difusão em agar. Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia. 2004.

SAHM, D.F., WASHINGTON, I.I.J.A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116, 1991.

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.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p.455-465, Jul./Set. 2007.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.28, n.1, p.25-34, 2007.

SILVA, C. H. P. M.; Bacteriologia: Um Texto Ilustrado, Ed. Eventos: Teresópolis, 1999.

SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S.; NEVES JÚNIOR, I.; MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Rev Bras Farmacogn**, v.15, p.143-148, 2005.

SPRINGFIELD, E.P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, p.434-439, 2003.

TADEG, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **J Ethnopharmacol**, v.100, p.168-175, 2005.

UWINGABIYE, J.; LEMNOUER, A.; ROCA, I.; ALOUANE, T.; FRIKH, M.; BELEFQUIH, B.; BSSAIBIS, F.; MALEB, A.; BENLAHLOU, Y.; KASSOUATI, J.; DOGHMI, N.; BAIT, A.; HAIMEUR, C.; LOUZI, L.; IBRAHIMI, A.; VILA, J.; ELOUENNASS, M. Clonal diversity and detection of carbapenem resistance encoding genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients and environment in two intensive care units in a Moroccan hospital. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 6, p.99, 2017.

VARGAS, J.O.S.; REIS, R.; MALDANER, G.; MARIÑO, P.A.; MENEZES, A.P.S.; Avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico de *Maytenus ilicifolia* (Mart. ex Reissek) oriunda da região do Bioma Pampa. **Braz. J. of Develop.**, v. 6, n. 9, p. 66364-66376, 2020.

VITAL, T.M.; REIS, C.; GARCÍA-ZAPATA, M.T.A.; CUNHA, L.C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n.2, abr./jun., 2004.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **J Ethnopharmacol**, v.94, p.49-54, 2004.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R.; A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharm Biol**, v.39, p.221-225, 2001.