



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SINTHIA FRANCIELLY VICENTE DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI. ATRAVÉS DE
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E DE
CAVIDADE EM PLACA**

**CAMPINA GRANDE
2016**

SINTHIA FRANCIELLY VICENTE DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI. ATRAVÉS DE
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E DE
CAVIDADE EM PLACA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: **Microbiologia**

Orientador: Prof. Dr. **Delcio de Castro Felismino**

**CAMPINA GRANDE
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A553a Andrade, Sinthia Francielly Vicente de.
Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi. através da análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa [manuscrito] / Sinthia Francielly Vicente de Andrade. - 2016.
23 p.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Delcio de Castro Felismino, Departamento de Ciências Biológicas".
1. Etnobotânica. 2. Aroeira. 3. Plantas medicinais. 4. Resistência microbiana. I. Título.

21. ed. CDD 582.1

SINTHIA FRANCIELLY VICENTE DE ANDRADE

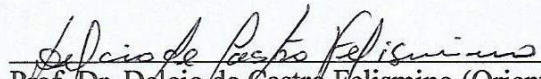
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI ATRAVÉS DE
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E DE
CAVIDADE EM PLACA**

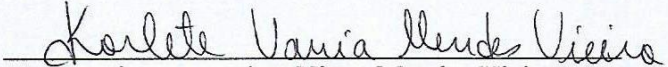
Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

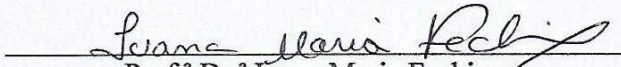
Área de concentração: Microbiologia.

Aprovada em: 26 / 10 /2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Delcio de Castro Felismino (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba/CCBS/Dept. Biologia


Prof.^a Dr.^a Karlete Viana Mendes Vieira
Universidade Estadual da Paraíba/CCBS/Dept. Farmácia


Prof.^a Dr.^a Ivana Maria Fechine
Universidade Estadual da Paraíba/CCBS/Dept. Farmácia

A minha filha, pela força que me fez
continuar, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom do conhecimento e por nunca me deixar sozinha, abrindo sempre uma janela.

À meu querido orientador Delcio de Castro Felismino, que me estendeu a mão no momento mais difícil e me acolheu com tanto carinho, e com muita paciência foi, para mim, um verdadeiro orientador. Delcinho querido, muito obrigada, de coração!!!

À minha mãe Francinete que me incentivou a estudar, dando sempre conselhos e lições de vida. Mãe, me espelho muito no ser humano maravilhoso que és.

Ao meu marido Anderson Morais, por não me deixar desistir e à minha filha Ana Clara, a quem eu dedico todo meu esforço e empenho. Eu amo vocês, meus amores!

Aos funcionários da UEPB, em especial a Luiz Augusto, técnico do Laboratório de Microbiologia, por me ensinar e me guiar durante todo esse período de aprendizado.

Aos meus queridos e amados colegas de turma, em especial Nathália, Mário e Duval, que sempre foram meus monitores particulares. Deus nos dá amigos mais chegados que irmãos. Obrigada pelos momentos maravilhosos e inesquecíveis durante esses anos. Obrigada pelo carinho, amizade e apoio diários. Eu amo vocês.

“O período de maior ganho de conhecimento e experiência é o período de maior dificuldade na vida de cada um.”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	08
2.1 Resistência microbiana.....	08
2.2 Atividade antimicrobiana vegetal.....	09
3. METODOLOGIA	11
3.1 Local do estudo.....	11
3.2 Obtenção do material vegetal.....	11
3.3 Obtenção dos extratos vegetais.....	11
3.3.1 <i>Secagem</i>	11
3.3.2 <i>Moagem</i>	11
3.3.3 <i>Obtenção do extrato hidroalcoólico</i>	11
3.4. Análise microbiológica.....	12
3.4.1 <i>Cepas de Micro-organismos/Preparação do inóculo</i>	12
3.4.2 <i>Testes de sensibilidade microbiana</i>	12
3.4.2.1 Difusão de disco em meio sólido.....	13
3.4.2.2 Cavidade em placa (método poço).....	13
3.4.2.3 Controle positivo e negativo.....	13
3.5 Análise dos dados.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSÃO	14
5. CONCLUSÃO	17
6. REFERÊNCIAS	18

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DE *Schinus terebinthifolius* RADDI. ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E DE CAVIDADE EM PLACA

Sinthia Francielly Vicente de Andrade¹

RESUMO

A resistência microbiana é um processo biológico natural dos micro-organismos resultante da excessiva utilização de antimicrobianos em práticas clínicas. Diante disso, é necessário buscar novas alternativas terapêuticas. A *Schinus terebinthifolius* Raddi. (aroeira), família Anacardiaceae, é utilizada por raizeiros para diversos fins curativos, principalmente como antimicrobiano. O estudo teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *S. terebinthifolius* utilizando a análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa. Na extração dos bioativos foi utilizado álcool a 70° GL, através do método de maceração a frio. Para a análise comparativa dos referidos métodos, o extrato foi testado frente às cepas padronizadas (ATCC) de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* de importância clínica, utilizando a técnica de diluição seriada do extrato. Verificou-se que o extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius* possui atividade antimicrobiana frente à *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. faecalis*, e que os métodos são eficazes na identificação de atividade antimicrobiana do referido extrato, sendo mais efetivo o método de cavidade em placa. Conclui-se que, a casca da *S. terebinthifolius* apresenta metabólitos ativos com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos. Porém, estudos devem ser realizados com o intuito de ajustar as metodologias para estudos de atividade antimicrobiana.

Palavras-Chave: Etnobotânica, Aroeira, Resistência microbiana

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de resistência é fenômeno biológico natural que se seguiu à introdução de agentes antimicrobianos em práticas clínicas (WANNMACHER, 2004). Tavares (2001) explica que se trata de um processo natural complexo onde as cepas de micro-organismos são capazes de se multiplicarem em presença de concentrações de doses terapêuticas excessivas. Nascimento; Maestro; Campos (2001) acrescentam que as drogas consideradas clássicas no arsenal terapêutico e as recentes introduzidas no comércio vêm se tornando cada vez mais ineficientes devido à resistência a antimicrobianos.

Nesse contexto, insere-se a necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas. Desse modo, as plantas medicinais estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos (NASCIMENTO;

¹ Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.
Email: sinthia_francielly@hotmail.com

LOCATELLI; FREITAS, 2000; MICHELIN et al., 2005). O emprego de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local até as formas mais sofisticadas de fabricação industrial de medicamentos (HAMILTON 2004; LORENZI; MATOS 2008).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi., conhecida popularmente como aroeira-vermelha, planta pertencente ao bioma Caatinga e Mata Atlântica, possui interesse científico por apresentar grande potencial terapêutico (RIBAS et al., 2006). Estudos químicos e farmacológicos têm mostrado que o extrato da aroeira possui efeitos antiinflamatórios, atividade antimicrobiana e cicatrizante (VIANA et al., 1995; MARTORELLI et al., 2011).

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para a maioria dos estudos fitoquímicos (MACHADO, 2012). Atualmente, existem diversas técnicas de *screening* para definir se o extrato de uma determinada planta possui atividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até as mais sofisticadas. Dentre as técnicas, as de difusão em disco e cavidades estão entre as mais comumente utilizadas (NASCIMENTO et al., 2007; MACHADO, 2012).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *S. terebinthifolius* Raddi. frente às cepas padronizadas de importância clínica, utilizando a análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resistência microbiana

O uso desenfreado de antibióticos sem uma cuidadosa avaliação das suas indicações apropriadas pode levar ao crescimento de cepas resistentes, ou seja, acarretar numa mutação seletiva (NICOLINI et al., 2010). Para Oliveira et al. (2011), a resistência microbiana é um fenômeno resultante do mau uso de antibióticos para tratamento e profilaxia de infecções, provocando uma redução da eficácia dos mesmos e variação na sensibilidade dos germes às drogas: micro-organismos de uma mesma espécie onde algumas estirpes são sensíveis enquanto outras resistentes a um mesmo antibiótico. E isso se torna preocupante, tendo em vista que os micro-organismos são os principais responsáveis pelas infecções no âmbito hospitalar.

Como consequência da resistência a antimicrobianos, tanto as drogas consideradas clássicas no arsenal terapêutico como aquelas de introdução recente no comércio vêm se

tornando ineficientes. Além do mais, o surgimento de patógenos resistentes estimula a busca por novos antibióticos que sejam eficazes, o que incentiva a evolução das pesquisas; porém, o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência de micro-organismos (NASCIMENTO et al., 2001; MACHADO, 2012).

Devido a problemática de a resistência microbiana ser crescente, Nascimento et al. (2000) afirmam que é necessário adotar medidas urgentes no combate a esse fenômeno, como controle no uso de antibióticos, desenvolvimento de pesquisas para compreender melhor os mecanismos genéticos da resistência microbiana e dar continuidade aos estudos a cerca de novas drogas sintéticas e naturais.

Nessa perspectiva, uma alternativa que muito se vem sendo estudada é a utilização dos princípios ativos presentes nas plantas consideradas medicinais, ou fitofármacos. O emprego de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local até as formas mais sofisticadas de fabricação industrial de medicamentos (HAMILTON, 2004; LORENZI; MATOS, 2008).

2.2 Atividade antimicrobiana vegetal

O advento da medicina científica contribuiu para o aumento da sobrevida humana e, no cotidiano das práticas de saúde, a aplicação de princípios científicos desencadeou a descoberta de terapêuticas que melhoraram a qualidade de vida das pessoas (FRANÇA et al., 2008). Além do mais, a fitoterapia permite que o ser humano se reconecte com o ambiente, acessando o poder da natureza, para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (FRANÇA et al., 2008).

Diante disso, Vale (2002) afirma que a medicina popular vem merecendo atenção cada vez maior devido ao contingente de informações e esclarecimentos que vem sendo oferecido à Ciência. Estudos etnobotânicos, mostram que os raizeiros representam uma importante fonte de informação sobre plantas medicinais, uma vez que estes são o elo entre a produção e o consumo destes produtos (MIURA; LOWE; SCHINESTOCK, 2007).

Schinus terebenthifolius Raddi., família Anacardiaceae, popularmente conhecida como aroeira-vermelha, é uma árvore de folhas perenes, originária da América do Sul, especialmente do Paraguai, Argentina e Brasil, ocorrendo naturalmente na Mata Atlântica e na Caatinga. Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos, conferindo uma beleza à árvore. Essa casca vermelha seca, transformando-se em uma espécie de concha de papel, que envolve a semente. A semente é única, marrom escura e

mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (BORNHAUSEN, 2002; JUVENAL; MATOS, 2002; LORENZI, 2002; USP, 2002).

Segundo Correia (1978), Menezes, Rao (1988), Melo et al. (2002), Lucena et al. (2006), Dantas, Felismino, Dantas (2007), Martorelli et al. (2011), Silva et al. (2014) e Guimarães, Moura (2015), estudos realizados em alguns estados no Nordeste brasileiro (Bahia, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba), afirmam que os raizeiros indicam a aroeira para o tratamento de doenças de base. A parte mais utilizada é a casca em forma de extrato alcoólico ou aquoso, como sendo uma das espécies mais utilizadas no combate de doenças anti-inflamatórias, possui efeitos antipiréticos e é utilizada em banhos (tratamento ginecológico), sinusite, gastrite e hemorragias. Além disso a casca de aroeira, segundo os raizeiros, tem poder cicatrizante e antimicrobiano, onde estudos comprovam a respeito dessas indicações terapêuticas.

Existem vários métodos descritos na literatura (PESSINI et al., 2003; ALVES et al., 2008; ROZATTO, 2012), propostos para mensurar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Entretanto, as pesquisas sobre essas atividades têm sido dificultadas pela ausência de métodos padronizados, o que dificulta a comparação entre os estudos além de inviabilizar sua reprodutibilidade (NASCIMENTO, 2007). Dentre as técnicas mais comumente utilizadas, pode-se citar os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa. Os discos permitem rapidez e praticidade durante a execução dos testes, já as perfurações no ágar exigem o uso de uma maior quantidade de extrato, o que facilita a disseminação do mesmo no meio de cultura (MACHADO, 2012).

Estudos realizados por Silveira et al. (2009) utilizando extrato etanólico das cascas de frutos de *Punica granatum* L. e Machado (2012) utilizando extratos da casca e folha de *Schinopsis brasiliensis*, verificaram efetividade dos extratos frente à *S. aureus*. Os autores constataram que a técnica de poço se apresentou mais sensível para a determinação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal.

3. METODOLOGIA

3.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Fitoquímica, onde foi obtido o extrato hidroalcoólico e as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia. Ambos localizados na Universidade Estadual da Paraíba/Campus I, Campina Grande, Paraíba.

3.2 Obtenção do material vegetal

Inicialmente, o material vegetal foi obtido através de coleta manual e da raspagem da casca do caule de *S. terebinthifolius* Raddi., previamente selecionada, baseando-se nas características botânicas e fitossanitárias, no período de 8:00 às 10:00h, respeitando a época ideal de coleta, ou seja, seus estágios vegetativo e reprodutivo. A coleta foi realizada nas imediações do Sítio Cardoso, município de Massaranduba/Paraíba. Manualmente, foram realizadas duas coletas da amostra de cascas, as quais foram adicionadas em saco de papel Kraft. A primeira coleta correspondeu a uma representação da planta em seu estágio de floração, utilizada para identificação da referida espécie no Herbário Arruda Câmara, no Laboratório de Botânica da UEPB, registrada sob o nº 927. A segunda amostra representou a aquisição do material, no estágio vegetativo, onde foi submetida à obtenção do respectivo extrato.

3.3 Obtenção dos extratos vegetais

3.3.1 Secagem

O material vegetal coletado foi acondicionado em embalagem de papel Kraft e submetido à secagem em estufa de ventilação forçada (FANEM®, modelo 330), à temperatura de 40 °C, até estabilização da umidade.

3.3.2 Moagem

Após o período de secagem, o material foi triturado em moinhos do tipo Willey® e foi peneirados, em tamis de numeração 10 mesh.

3.3.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico

O extrato da casca foi obtido pelo processo de maceração a frio. Inicialmente, 100g do material moído foi umedecido com álcool a 70° GL, sendo adicionados 60% do peso do material. Durante esse processo, o pó foi homogeneizado manualmente, obtendo umedecimento uniforme do material. Em seguida, o produto vegetal macerou a frio em recipiente de vidro, durante um período de cinco dias, sendo agitado, manualmente, em intervalos de 24 horas. Após esse processo, o extrato etanólico obtido foi suspenso e submetido à partição líquido-líquido.

Todo este processamento seguiu recomendações propostas pela Farmacopéia Brasileira (2003) para os extratos fluidos, onde 1g da droga deve originar 1mL de extrato.

Em seguida, o extrato fluído obtido da casca foi acondicionado em recipiente de vidro de cor âmbar e armazenado a temperatura ambiente e protegido da luz.

3.4. Análise microbiológica

3.4.1 Cepas de Micro-organismos/Preparação do inóculo

Foram utilizadas cepas padronizadas American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus epidermidis* (12228), *S. aureus* (25923), *Streptococcus agalactiae* (13813), e *Enterococcus faecalis* (29212), *Candida albicans* (18804), *C. tropicalis* (13803), *C. parapsilosis* (22009), disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ–RJ). As cepas liofilizadas foram reativadas, em câmara asséptica, seguindo as recomendações da empresa fornecedora.

Após a reativação, as cepas em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio de vidro estéril contendo caldo BHI (Brainand Heart Infusion), sendo incubadas à 37°C por 48-72 horas, quando então houve confirmação do crescimento bacteriano e fúngico (DIAS et al., 2006).

Os inóculos microbianos foram padronizados de acordo com o Clinicaland Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI, 2005). As colônias isoladas das bactérias e fungos foram transferidas, com o auxílio de uma alça bacteriológica, para tubos de ensaio de vidro estéreis contendo solução salina de modo a obter suspensões diluídas com transmitância de 85%, no comprimento de onda de 625nm em espectrofotômetro, marca BIOESPECTRO, acoplado a um computador, em cubetas de vidro, a fim de obter-se uma carga microbiana com concentração final próxima a 10^6 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia)/mL para bactérias (BAUER et al., 1966; HADACECK e GREGER, 2000).

3.4.2 Testes de sensibilidade microbiana

O procedimento para obtenção das diluições do extrato hidroalcoólico da casca de *S. terebinthifolius* Raddi., utilizou-se o método adaptado de Stangarlin et al. (1999). Inicialmente, em um tubo de ensaio de vidro estéril foram adicionados 1mL do extrato e 1 mL de água destilada estéril, sendo agitado até a completa homogenização, obtendo-se uma diluição com concentração final de 50% do extrato. A partir desta, utilizando o procedimento de diluição seriada, foram obtidas as demais diluições: 25, 12,5 e 6,25% (v/v).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca de *S. terebinthifolius* Raddi diante das cepas, foram testados os métodos de difusão em disco em meio sólido utilizando-se discos e cavidades em placa.

3.4.2.1 Difusão de disco em meio sólido

O método de disco foi realizado seguindo os procedimentos Kirby-Bauer (NCCLS/CLSI, 2005), sendo utilizadas placas de Petri contendo 20mL de Muller-Hinton para as bactérias e 20mL de Sabouraud Dextrose para os fungos, no qual foram inoculadas as respectivas cepas a serem analisadas, através da técnica de espalhamento em superfície (BAUER et al., 1966), com o auxílio de swabs estéreis, mergulhados na suspensão contendo o inoculo. Logo após, foram impregnados discos de papel de filtro estéreis (n°3 e ø6,0mm) separadamente, com 25µL dos extratos de casca, sendo imediatamente utilizados.

3.4.2.2 Cavidade em placa (método poço)

No método de cavidades em placa, 20mL do meio de cultura foram distribuídos uniformemente em cada placa, sendo estas dispostas em superfícies niveladas para assegurar que a camada do meio tenha profundidade uniforme. Após a solidificação do ágar, as placas foram devidamente tampadas. Os inoculos padronizados foram dispostos nas placas com o auxílio dos swabs estéreis, retirando o excesso de líquido comprimindo a ponta do swab nas paredes dos tubos de ensaio. Depois, espalhou-se o conteúdo do swab sobre o meio de cultura sólido (Muller-Hinton e Sabouraud Dextrose) distribuído na placa de Petri. Procedeu-se, então, a formação das cavidades, usando-se canáliculas (ø6,0mm), nas quais foram adicionadas 50µL do extrato hidroalcoólico da casca de *S. terebinthifolius* Raddi.

3.4.2.3 Controle positivo e negativo

Para o controle positivo nos ensaios com bactérias, foram utilizados discos do antibiótico Cloranfenicol (30µL) e, para os ensaios fúngicos foram utilizados discos de papel de filtro estéreis (n°3 e ø6,0mm) impregnados com antimicótico Fentizol (50µL). Como controle negativo, utilizou-se discos de papel de filtro estéreis (n°3 e ø6,0mm) impregnados com álcool a 70% para bactérias e fungos.

Em seguida, as placas contendo as culturas das bactérias foram inoculadas a 37°C por 24h e as placas contendo os fungos foram incubadas a 37°C por 48h, sendo os ensaios realizados em triplicata. Após este período, foram efetuadas as análises dos efeitos do extrato hidroalcoólico, comparando-se as metodologias utilizadas nos ensaios.

3.5 Análise dos dados

Para análise dos dados foi determinada a média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição (mm), obtidos nas triplicatas de cada ensaio, aferidos por halômetro.

Foi considerada como possuidora de atividade antimicrobiana aquela concentração do extrato aquoso que aplicada sobre o meio de cultura contendo a suspensão do micro-organismo, apresentou um halo de inibição de crescimento igual ou superior a 8,0mm de diâmetro (LIMA et al., 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSÃO

Na tabela 1, observa-se que na técnica de difusão em disco formaram-se halos variando de 15,3mm a 8mm de diâmetro. O extrato hidroalcoólico da casca foi efetivo frente à *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. faecalis*, donde, *S. epidermidis* produziu o maior halo (15,3mm) e *E. faecalis* o menor halo (8mm).

Ao observar os halos produzidos pelo extrato frente aos micro-organismos, pela técnica de cavidade em placa, constatou-se a formação de halos entre 19,3mm a 8,6mm, sendo que os maiores halos foram obtidos contra à *S. epidermidis* (19,3mm) e os menores halos frente à *E. faecalis* (8,6mm).

Ao observar a tabela 2, verifica-se que todas as linhagens fúngicas, em ambos os métodos, apresentaram resistência ao extrato hidroalcoólico de aroeira.

O comportamento antibacteriano do extrato de aroeira, provavelmente se explica, devido à presença de compostos fitoquímicos (polifenólicos e terpenóides, tanino, alcalóides, esteróides, chalconcs e urundeuvinas), pois Lima et al. (2006) e Martorelli et al. (2011), ao trabalharem com *S. terebinthifolius* constataram predominância dos referidos compostos, aos quais atribuíram muitas das propriedades medicinais da referida espécie vegetal.

Trabalhos realizados por Guerra et al. (2000), Degáspari et al. (2005), Santos (2007) e Pinho et al. (2012) ao analisar o extrato hidroalcoólico da casca de aroeira constataram efeito frente à *S. aureus* pelo método de difusão em ágar por perfuração

Ao observar a ausência de atividade antifúngica do extrato da casca de *S. terebinthifolius* Raddi. (Tabela 2), a explicação pode estar no fato de que cada planta possui constituintes em concentrações diferentes, as quais influenciam na intensidade da ação inibitória das plantas ante este agente estudado (VIRTUOSO et al., 2005; DIAS et al., 2006; GRÉGIO et al., 2006; PEREIRA, 2007).

Pereira et al. (1992) complementam que as condições de climas, a forma e o horário da coleta influenciam na produção dos princípios ativos. Essas conclusões são reforçadas por Cechinel-Filho (1998), Simões (2004) e Pereira (2007), observaram que a biossíntese dos metabólitos secundários, também pode ser influenciada pelo tipo de solo, local, época, período de coleta da planta, idade do vegetal, e órgão da planta utilizado. Esses fatores promovem diferenças de concentrações e proporcionalidade entre cada constituinte químico, podendo assim influenciar na elevação ou diminuição da produção dos princípios ativos dos vegetais. De acordo com Antunes (2001) e Pereira (2007), mudanças extremas bem como no caso de situações estressantes como queimadas e enchentes interferem na produção de compostos químicos.

Essas observações são confirmadas por Dantas (2002), ao identificar os princípios ativos de várias espécies vegetais, verificou que as substâncias ativas diferenciam de vegetal para vegetal, devido ser provenientes do metabolismo primário da fotossíntese ou provenientes do metabolismo secundário, derivados da assimilação do nitrogênio, portanto, vale salientar que a exposição ao sol, chuvas, poeira e poluentes podem modificar a porcentagem de compostos químicos nos vegetais.

Outra explicação provável para a ausência de atividade antifúngica pode estar nas diferentes composições químicas entre a parede celular das bactérias Gram positivas e fungos. A parede celular das bactérias Gram positivas é composta basicamente por peptidoglicanos, que constitui uma espessa camada ao redor da célula (VIEIRA; FERNANDES, 2012). Entretanto, de acordo com Adams (2004), Pérez; Ribas (2004), Magnelli; Cipollo; Robbins (2005), Nimrichter et al. (2005) e Fukuda et al. (2009), a parede celular dos fungos é composta por polissacarídeos ligados ou não à proteínas ou lipídios, sendo mais frequentes a quitina, sendo caracterizada como uma estrutura relativamente mais rígida e dinâmica.

Analisando os dois métodos, Tabelas 1 e 2, percebe-se que as zonas de inibição formadas no método de cavidade em placa foram superiores as dos discos de papel. A explicação dos resultados deve-se, provavelmente, ao fato de que o método poço emprega-se uma maior quantidade de extrato (50µL) que no método do disco (20 µL) favorecendo uma

maior dispersão dos extratos pelo meio de cultura, tornando-o, por vezes, mais potencialmente inibitório que o método disco (ALVES et al., 2008; MACHADO, 2012).

Observações reforçadas por Araújo et al. (2011) ao trabalhar com propólis de *Apis mellifera* constataram que, o extrato foi mais efetivo no método de cavidade em placa, e acrescentaram que a técnica de difusão em poço apresenta maior garantia da concentração de extrato utilizado, observação reforçada ao verificar o efeito do extrato, em ambos os métodos nas concentrações 25% e 12,6%, frente aos *S. epidermidis* e *E. faecalis*, respectivamente. Sendo assim, pode-se dizer que a técnica do poço possibilita que a quantidade de amostra que interage com o micro-organismo 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 (SILVEIRA, 2009; ARAÚJO et al., 2011; MACHADO, 2012).

5. CONCLUSÃO

O estudo constatou que o extrato hiroalcoólico de aroeira possui atividade antimicrobiana frente à *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Os métodos são eficazes na identificação de atividade antimicrobiana do extrato, sendo mais efetivo o método de cavidade em placa. Entretanto, estudos devem ser realizados com o intuito de ajustar as metodologias.

Nessa perspectiva, estudos voltados para o conhecimento das plantas medicinais podem dar suporte a novas pesquisas científicas que busquem descobrir medicamentos capazes de combater os micro-organismos patogênicos ao homem.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAN ACTIVITY OF EXTRACT
HIDROALCOHOLIC OF THE RIND *Schinus terebinthifolius* RADDI., THROUGH
COMPARATIVE ANALYSIS IT ENTERS THE METHODS OF DIFFUSION IN RECORD
AND SOCKETIN PLATE

Microbial resistance is a natural biological process of the resulting micro-organisms excessive use of antimicrobials in clinical practice. Therefore, it is necessary to seek new therapies. The *Shinus*

terebinthifolius Raddi. (Mastic), Anacardiaceae family, is used by healers for various healing purposes, primarily as antimicrobial. The study aimed to analyze the antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of *S. terebinthifolius* shell using the comparative analysis between the disk diffusion methods and cavity plate. The extraction of bioactive was used alcohol 70 GL, through the cold maceration method. For the comparative analysis of these methods, the extract was tested in the face of standardized strains (ATCC) of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* clinical importance, using the technique of serial dilution of the extract. It was found that the hydroalcoholic extract of *S. terebinthifolius* have antimicrobial activity against *S. epidermidis*, *S. aureus* and *E. faecalis*, and that the methods are effective in identifying antimicrobial activity of the said extract being the most effective method cavity board. In conclusion, the bark of *S. terebinthifolius* has active metabolites with potential for development of herbal medicines. However, studies should be conducted in order to adjust methodologies for antimicrobial activity studies.

Keywords: Ethnobotany, Mastic, Microbial resistance

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology, Reading**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANTUNES, R.M.P. **Espécies vegetais com atividade antimicrobiana em bactérias fitopatogênicas da batata**. Campina Grande, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento e meio ambiente) - Universidade Estadual da Paraíba.

ARAÚJO, Y. L. F. M.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; ARAÚJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 3, 2011.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **AJCP**, v. 45, p. 493-96, 1966.

BORNHAUSEN, R. **Ervas do sítio**. Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Journal Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CORREIA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v.1, p.747, 1978.

DANTAS, I.C. O raizeiro e suas raízes: **Um novo olhar sobre o saber Popular**. Campina Grande, 2002. 134p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Estadual da Paraíba.

DANTAS, I. C.; FELISMINO, D. C.; DANTAS, G. D. S. Plantas medicinais. In: DANTAS, I. C. (Ed.). **O raizeiro**. Campina Grande-PB. EDUEPB, p. 57-404, 2007.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.9, n.3, p.617-622, 2005.

DIAS, J. F.G.; VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI-JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, A. B.; FERRONATO, M. L. Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd. Asteraceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 16, n. 1, p. 83-87,2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª Ed. Parte II. Fasc. 5. São Paulo-SP, Editora Atheneu, 2003.

FRANÇA, I. S. X; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 61, n. 2, p. 202. 2008.

FUKUDA,E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M.L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GRÉGIO, A.M.T.; EDILENE, S.M.F.; EDVALDO, A.R.R.R.; BAGGIO, S.; ROSEMEIRE, T.R.Ação antimicrobiana do *Zingiberofficinall*efrente à microbiota bucal. **Biology Studies**.Curitiba, v. 28, n. 62, p. 61-66, 2006.

GUERRA, M. J. M.;BARREIRO, M. L.; RODRÍGUEZ, Z. M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Inst. Superior de Ciencias Médicas de La Habana. **Revista Cubana Plant. Med.** v.15, n.1, p.5-23, 2000. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100006>. Acessado em: 08 de maio de 2016.

GUIMARÃES, L. A.L.; MOURA, M. G. C. Educação e saúde: um estudo das plantas medicinais. **Revista Metáfora Educacional** (ISSN 1809-2705) – versão on-line. Editora Dra. Valdeci dos Santos. Feira de Santana – Bahia (Brasil), n. 18 (jan. – jun. 2015), 1 jun. 2015, p. 25-43. Disponível em: <http://www.valdeci.bio.br/pdf/n18_2015/guimaraes_moura_educacao_e_saude_n18_jun2015.pdf>. Acesso em: 02 de Maio de 2016.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing antifungal natural products: methodologies comparability of results and assay choice. **Phytochem. Anal.** v.11, p. 137-147, 2000.

HAMILTON, A.C. Medicinal plants, conservation and livelihoods. **Biodiversity and Conservation** 13: 1477-1517, 2004.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. **O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento**. BNDS Setorial, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, 2002.

LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiano de seu extrato aquoso. **Infarma**. v. 16, n. 1, p. 7-8, 2004.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M.P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. 4 ed. v. 1. São Paulo: **Instituto Plantarum**, 368p. 2002.

LORENZI, H. ; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

LUCENA, P. L. H.; FILHO, J. M. R.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; NETO, M. A. C.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexigas de ratos. **Acta Cir Bras.**, v.21, n.2, p.46-51, 2006.

MACHADO, S. E. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de casca e folha da *Schinopsis brasiliensis* engler. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e cavidade em placa**. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.

MARTORELLI, S. B. F. Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) a 30 % em orabase – estudo “In vivo”. **Int J Dent**, Recife, v.10, n.2, p.80-90, 2011.

MELO JR, E. J. M.; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO JÚNIOR, C. A. C.; SANT’ANA, A. E. G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**. v.9, p.109-116, 2002.

MENEZES, A.M.S.; RAO, V.S. Effect of *Astronium urundeuva* on gastrointestinal transit in mice. **Braz J Med Biol Res.**, v.21, n.3, p.531-3, 1988.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais. **Revista Brasileira de farmacologia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MIURA, A.K.; LOWE, T.R.; SCHINESTSCCK, C.F., Comércio de plantas medicinais, condimentares e aromáticas por ervateiros da área central de Pelotas - RS: estudo etnobotânico preliminar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2 , n.1, p.1025-1028, 2007.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, v. 31, n. 2, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V., CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

NASCIMENTO, P. F.C.; NASCIMENTO, A. C. A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBSOSA JR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 108-113, 2007.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, 2010.

NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 4, p. 789– 798, 2005.

NCCLS/CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2005, Disponível em: <<http://www.contractlaboratory.com>> Acesso em 26 de maio de 2015.

OLIVEIRA, F. B. M.; LIMA, L. M.; MOURA, M. E. B.; NUNES, B. M. V. T.; OLIVEIRA, B. M. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**. v.4, n.4, p.72-77, 2011.

PEREIRA, E.C.; CAVALCANTE, L.H; CAMPOS-TAKAJI, G.M.; NASCIMENTO, S.C. Atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos brutos de funligo séptica l. Wigg e tabifera microsperma (Berk& Curt.) Martin (Myxomycetas). **Ciências Biomédicas**, São Paulo. v. 13, n.1, p. 23-32, 1992.

PEREIRA, J. F. S. **Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da casca de *schinopsis brasiliensis engler*: um estudo baseado na indicação etnofarmacológica**. Campina Grande, 2007. 60p. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Paraíba.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell wall analysis. **Methods**, v. 33, n. 3, p. 245-251, 2004.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES,N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 12, supl., p. 21-24, 2003.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 226-331, 2012.

RIBAS, M. de O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi. sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**. São Paulo: FAC. 2006.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SANTOS, A. L.R. **Avaliação do sistema conservante em formulação com extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi. - Anacardiaceae**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SILVA, P. A. O perfil dos raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em feiras livres do município de Vitória da Conquista, Bahia. **ISSN**. v. 5, n. 2, p. 8-18, 2014.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, R.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Universitária. Porto Alegre, 2004.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n.2, p. 124-128, 2009.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 2, n. 1, p. 16-21, 1999.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Biblioteca virtual do estudante brasileiro**: aroeira. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/acervo/paradidat/fruta/s/aroeira/aroeira.html>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

VALE, N. B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira Anestesiol**. v. 52, n. 3, p. 80-368, 2002.

VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO VSN. **Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 1995.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, C. A. Q. **Microbiologia geral**. Disponível em: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_geral.pdf>. Acessado em: 28 de outubro de 2016.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas

de *Erythrina velutina* Willd. Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **ISSN**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2000.